Aus dem Institut für Medizinische Psychologie
Medizinische Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Geschäftsführende Direktorin (komm.):

Priv.-Doz. Dr. Renate Deinzer

# Zirkadianer Rhythmus von Interleukin 1 beta im Sulkus Fluid des Sulkus gingivalis

**Dissertation**

**Zur Erlangung eines Grades eines Doktors der Zahnmedizin**
**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

vorgelegt von

Angela Bergmann

**(2007)**

**Als Inauguraldissertation gedruckt mit**

**Genehmigung der Medizinischen Fakultät**

**Der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf**

**Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg**

**Dekan**

**Referentin: Deinzer**

**Korreferent: Lang**

## Inhalt

1. Einleitung....4
1.1 Interleukin-1 (IL-1)....6
1.2 Interleukin-1β in der Parodontologie....8
1.3 Untersuchungen zur zirkadianen Rhythmik von IL-1β....10
1.4 Ableitung der Fragestellung....12

2. Material und Methoden....14
2.1 Probanden....14
2.2 Vorbehandlung....15
2.3 Experimentelle Manipulation der Mundhygiene....17
2.4 Entnahme der Sulkusflüssigkeit und Bestimmung von IL-1β....17
2.5 Versuchsablauf....19
2.6 Kontrollvariabeln....20
2.6.1 Plaqueindex....20
2.6.2 Papillenblutungsindex....21
2.7 Statistische Datenanalyse....22

3 Ergebnisse....24

4 Diskussion....27

5 Zusammenfassung....31

6 Literatur....33

# 1. Einleitung

Entzündliche Erkrankungen des Parodontiums sind aufgrund ihrer hohen Prävalenz Gegenstand vieler wissenschaftlicher Untersuchungen. Als primäre Ursache für das Entstehen und Fortschreiten entzündlicher Parodontopathien wird mikrobielle Plaque angesehen. Diese lagert sich zunächst supragingival an, es kommt zur Entzündung der Gingiva mit Rötung und Schwellung der betroffenen Gewebe (Gingivitis). Die Schwellung und die häufig damit vergesellschaftete erhöhte Schmerzempfindlichkeit der Gingiva erschweren die Plaqueentfernung. Die Plaque kann sich somit nach subgingival ausbreiten, ihre Qualität verändert sich (Plaquereifung). Zu Beginn besteht sie hauptsächlich aus grampositiven Kokken und Stäbchen, dann erfolgt die Ansiedlung von gramnegativen Kokken, grampositiven und gramnegativen Stäbchen. Mit der Etablierung von Filamenten, fusiformen Bakterien, Spirillen und Spirochäten wird die Plaque für das Parodontium pathogen. Folge ist ein irreversibler Verlust von Zahnstützgewebe mit Attachmentverlust und Ausbildung pathologisch veränderter Taschen. Eine Parodontitis liegt vor. Es kann zu Zahnlockerungen und schließlich zum Zahnverlust kommen (Hellweg et al., 1995). Zur Abwehr der parodontopathogenen Bakterien und ihrer Toxine wird vom Wirtsorganismus eine entzündliche Immunreaktion ausgelöst. Die durch die lokale immunologische Reaktion freigesetzten Entzündungsmediatoren, darunter insbesondere Interleukin-1β (IL-1β), gelten als Hauptursache für die entzündliche Degeneration vom Zahnhalteapparat mit desmodontalen Faserbündeln, Alveolarknochen, Wurzelzement und gingivalen Gewebe (Offenbacher, 1996).

In den vergangenen Jahren haben Studien mit Analysen der Konzentration von Interleukinen in der parodontologischen Forschung zunehmend an Bedeutung gewonnen. Sie tragen zum besseren Verständnis der Pathogenese der Parodontitiden bei und ergänzen die wissenschaftlichen Erkenntnisse zu klinischen Parametern. Dabei eröffnen die immer sensibler gestalteten Analysetechniken für Interleukine neue Möglichkeiten den Wissensstand über ein Interleukin und seine Funktion innerhalb der Erkrankung zu erweitern. Besonders interessant ist hierbei die Möglichkeit, die lokale Konzentration von Immunparametern zu bestimmen, denn entzündliche Prozesse sind in der Regel zunächst lokale Prozesse. Diese lokalen Prozesse können durch eine Analyse systemischer Parameter wie der Zytokinkonzentration im Serum oder in *ex vivo* untersuchten Zellkulturen nicht abgebildet werden. Der lokalen Konzentration von Immunparametern und ihrer Veränderung kommt daher eine besondere Bedeutung für das Verständnis der Erkrankung zu (Ebersole, 2003).

Im Bereich des Parodontiums ist die Analyse der lokalen Immunantwort minimal invasiv möglich, indem der Zahnfleischfurche (Sulkus gingivalis) Sulkus Fluid entnommen wird. Sulkus Fluid ist im gesunden Zustand ein Transudat, im entzündlichen Zustand ein Exsudat von der Gingiva in den Sulkus gingivalis. Es enthält nahezu alle Immunparameter, die für die Ätiopathogenese der Parodontitis von Bedeutung sind (Lamster et al., 1992).

Die Konzentration von Interleukinen im Sulkus gingivalis könnte sich jedoch im Verlauf eines Tages ebenso wie die systemische Konzentration ändern, ohne dass die Gründe dafür in einer Veränderung der Antigenbelastung zu sehen sind. Erklärung für eine solche Konzentrationsveränderung kann das Vorliegen einer zirkadianen Rhythmik der Zytokinsynthese und/oder -freisetzung sein. Unter einem zirkadianen Rhythmus versteht man einen Rhythmus, der sich in etwa alle

24 Stunden wiederholt und zentral im Organismus gesteuert und reguliert wird (lat.: circa = etwa; lat.: dies = Tag) (Aschoff, 1968; Panda, 2000).

Im Bereich der Grundlagenforschung der Parodontologie fehlen bisher systematische Untersuchungen solcher zirkadianer Rhythmen.

Die vorliegende Arbeit macht es sich daher zur Aufgabe zu untersuchen, ob die Konzentration von IL-1β im Sulkus Fluid des Sulkus gingivalis einer zirkadianen Rhythmik unterliegt.

Zuvor werden die Bedeutung von Interleukin-1 (IL-1) und seine Funktion als Entzündungsmediator im Organismus dargestellt und Studien zu IL-1β als proinflammatorischem Zytokin in der Parodontologie sowie Daten zur zirkadianen Rhythmik des Parameters im Detail erläutert.

## 1.1 Interleukin-1 (IL-1)

IL-1 existiert in Form zweier unterschiedlicher Moleküle, IL-1α (Interleukin-1α) und IL-1β. Sie werden hauptsächlich von Monozyten und den sich daraus entwickelnden Makrophagen auf Reize wie pathogene Keime, Noxen und Endotoxine von Bakterien synthetisiert (Dinarello, 2005, 2000, 1998). Obwohl sie sich zu 74% in ihrer Anordnung der Aminosäuren und zu 55% in ihrer Nukleinsäuresequenz unterscheiden, ist ihr biologischer Wirkmechanismus identisch. Beide Formen binden an den gleichen Rezeptor, allerdings liegt die biologische Wirksamkeit von IL-1β deutlich über der von IL-1α (Dinarello, 1998, 1994, 1992; Graves & Cochran, 2003). Bereits minimale Konzentrationen von $10^{-12}$M bis $10^{-15}$M haben lokale und systemische Auswirkungen auf viele Zelltypen der Immunabwehr (Dinarello, 1998). Allgemein gilt IL-1β als das wichtigste

proinflammatorische Zytokin. Es fördert die Chemotaxis von Monozyten und neutrophilen Granulozyten (Dinarello, 2005, 1997; Dinarello & Thompson, 1991; Quan et al., 2001; Sauder et al., 1984; Westmacott et al., 1987) und operiert als interzellularer Signalstoff zwischen T-Helfer-, Suppressor- und Killerzellen (Dinarello, 2005, 1997; Mizel, 1982). Weiterhin initiiert es die Stimulation von Antikörpern (Dinarello, 2005, 1994) und aktiviert die Proliferation von B-Lymphozyten (Chiplunkar, 1986). Damit spielt es eine bedeutende Rolle bei der Auslösung entzündlicher Prozesse auf Gewebsniveau und bei der Regulation der Immunantwort. IL-1β gehört wie Tumornekrose-Faktor-α (TNF-α), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) zu der Gruppe der so genannten pyrogenen Zytokine, die multiple Effektorfunktionen besitzen (Alexander & Damoulis, 1994; Nguyen et al., 1991). Sie induzieren unter anderem die so genannte Akutphase-Antwort und die Auslösung von Fieber bis zu einer Sepsis (Dinarello, 2005, 1996).

Interleukin-1 hat darüber hinaus weitere proinflammatorische Eigenschaften. So gehört IL-1 ebenso wie TNF-α zu der Gruppe der Zytokine, die die Bildung des Entzündungsenzyms Cyclooxygenase-2 (COX-2) initiieren und/oder verstärken können. Weiterhin kann IL-1 die Bildung eines weiteren entzündlich wirkenden Enzyms einleiten, nämlich der induzierbaren Stickoxid-Synthetase (iNOS). Bei entsprechenden Experimenten konnte in Zellkulturen nachgewiesen werden, dass Zellen unter dem Einfluss von IL-1 die Entzündungsmediatoren Prostaglandin $E_2$ ($PGE_2$) und Stickoxid (NO) produzieren (Moolwaney et al., 2005; Shi et al., 2006; Yang et al., 2005).

## 1.2 Interleukin-1β in der Parodontologie

In der Parodontologie erweckte IL-1β besonders wegen seiner Rolle als lokaler Mediator bei der Bindegewebs- und Knochendestruktion das Interesse der Forschung. Das Zytokin gilt als potentester osteoklastenaktivierender Faktor im menschlichen Organismus (Dewhirst et al., 1985; Dinarello, 1996; Dinarello, 1998; Nguyen et al., 1991; Tatakis et al., 1993). Die Ergebnisse vieler parodontologischer Studien deuten darauf hin, dass IL-1ß eines der wichtigsten Interleukine im katabolen Prozess des Knochenabbaus in der Ätiopathogenese der Parodontitis ist (Cavanaugh et al., 1998; Ebersole, 1994; Graves & Cochran, 2003; Jandinski et al., 1990; Lamster, 1992; Lee et al., 1995; Masada et al., 1990; Matsuki et al., 1993, 1992; Rasmussen et al., 2000; Stashenko et al., 1991; Tokoro et al., 1996; Tsai et al., 1995). Dabei verstärkt IL-1β nicht nur die Knochenresorption durch Aktivierung der Osteoklasten auf zellulärer Ebene. Zusätzlich verhindert es die Knochenneubildung, indem es Leukozyten zur Anheftung an das Kapillarendothel anregt (Dewhirst et al., 1985; Dinarello, 1997; Kjeldsen, 1993; Nguyen et al., 1991; Offenbacher, 1996; Tatakis, 1993). Darüber hinaus stimuliert das Interleukin die Synthese von Prostaglandin-$E_2$ (PGE-$_2$) und steigert die Freisetzung von Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8), die als wichtige Mediatoren des Entzündungsstoffwechsels ihrerseits noch zusätzlich zur Aktivierung der Osteoklasten beitragen (Alexander & Damoulis, 1994; Nguyen et al., 1991). Dies lässt den Schluß zu, dass Zusammenhänge bestehen zwischen dem Ausmaß der Entzündung und Zerstörung von Bindegewebe und Knochen des Parodontiums auf der einen Seite und den lokalen IL-1β-Spiegeln auf der anderen Seite (Lamster et al., 1989). Die Analysen von IL-1β-Konzentrationen an gesunden und erkrankten Parodontien stützen diese Hypothese. An Stellen mit

Gingivitis oder Parodontitis werden erhöhte Konzentrationen gegenüber gesunden Stellen gemessen, außerdem sind die Konzentrationen an Stellen mit Parodontitis regelmäßig höher als an Stellen mit Gingivitis (Biesbrock et al., 2000; Cavanaugh et al., 1998; Deinzer et al., 2004, 1999; Ebersole et al., 1994; Faizuddin et al., 2003; Figueredo et al., 1999; Honig et al., 1989; Ishihara et al., 1997; Kinane et al., 1992; Lee et al., 1995; Lerner et al., 1998; Liu et al., 1996; Masada et al., 1990; Mogi et al., 1999; Preiss u. Meyle, 1994; Rawlinson et al., 2000; Salvi et al., 1997; Stashenko et al., 1991, 1991; Suwatanapongched et al., 2000; Tsai et al., 1995; Waschul et al., 2003; Wilton et al., 1993). Nach einer Parodontalbehandlung sinken die lokalen IL-1β-Konzentrationen (Alexander et al., 1996; Engebretson et al., 2002; Gamonal et al., 2000; Goutoudi et al., 2004; Holmlund et al., 2004; Hou et al., 1995; Reinhardt et al., 1993; Yoshinari et al., 2004).

Die vorangegangenen Ausführungen sprechen für eine entscheidende Beteiligung von Il-1ß am Krankheitsverlauf der Parodontitiden.

Obwohl sehr viele Daten zur sulkulären IL-1β-Konzentration vorliegen, fehlen Studien, die untersuchen, ob diese Konzentrationen einer zirkadianen Rhythmik unterliegen. Solche Informationen sind für Konzeption, Planung und Finanzierung zukünftiger Studien zu IL-1β in der Parodontologie von großem Interesse. Wenn IL-1β einer zirkadianen Variation unterliegt, ist dies bei der Studienplanung zu berücksichtigen, um die Ergebnisse interpretieren zu können.

Tatsächlich weisen einige wenige Studien zu IL-1β im Serum oder in *ex vivo* stimulierten Vollblutproben darauf hin, dass dessen Freisetzung im Allgemeinen und damit auch möglicherweise im Sulkus gingivalis einer zirkadianen Rhythmik unterliegt. Diese Studien werden nachfolgend zusammengefaßt, bevor dann auf

dieser Grundlage die Konzeption und die Forschungshypothese der vorliegenden Studie herausgestellt werden.

## 1.3 Untersuchungen zur zirkadianen Rhythmik von IL-1β

De Rijk et al. (1997) veröffentlichten eine *ex vivo*-Studie, deren primäres Ziel darin bestand, die Auswirkungen von Cortisol auf die Zytokinkonzentrationen im Organismus von gesunden Probanden zu erfassen. Im Zuge dessen führten sie auch eine Untersuchungsreihe durch, die für die Forschungshypothese dieser Arbeit von Bedeutung ist. Bei sechs männlichen gesunden Probanden mit einem durchschnittlichen Alter von 36,2 ± 5 Jahren wurden Vollblutproben morgens im Zeitraum von 8.00 – 8.30 Uhr und abends im Zeitraum von 20.00 – 20.30 Uhr entnommen, mit LPS stimuliert und für 18 Stunden inkubiert. Die Konzentrationen von IL-1β, TNF-α und IL-6 wurden daraufhin bestimmt. Die Ergebnisse der Untersuchungsreihe geben Hinweise auf eine zirkadiane Variation der LPS-induzierten IL-1β-Freisetzung mit reduzierten Werten in den Morgen- gegenüber den Abendstunden.

In einer Studie von Entzian et al. (Entzian et al., 1996) wurden die Konzentrationen der Zytokine IL-1 und TNF-α *ex-vivo* im LPS-stimulierten Vollblut von Probanden analysiert. Ziel der Untersuchung war es unter anderem die Zusammenhänge zwischen der zirkadianen Variation von Hormonen wie Melatonin und Cortisol und der Zytokinkonzentration darzustellen. Untersucht wurden unter anderem 5 männliche und 5 weibliche Probanden in einem Alter zwischen 19 und 29 Jahren. Blutproben aus Venenkathetern wurden alle vier Stunden in dem Zeitraum von 8.00 Uhr morgens bis 20.00 Uhr abends

entnommen. Unter Zufuhr von bakteriellem LPS wurden die Vollblutproben in einer Kurzzeitzellkultur 6 Stunden bei 37° Celsius inkubiert. Die Konzentrationen von IL-1 waren im Zeitraum von 16.00 bis 22.00 Uhr deutlich erhöht. Die Ergebnisse der Daten der gesunden Probanden geben folglich ebenfalls Hinweise auf eine zirkadian erhöhte Produktion von IL-1 in den Nachmittags- und Abendstunden. Die Ergebnisse der ebenfalls in dieser Studie untersuchten Konzentrationen von Melatonin und Cortisol geben Hinweise darauf, dass erhöhte Konzentrationen von IL-1 mit erhöhten Konzentrationen von Melatonin und reduzierten Konzentrationen von Cortisol einhergehen.

Einen direkten Zusammenhang zwischen der Produktion von Melatonin und IL-1β legt eine *in-vitro*-Studie von Sutherland et al. (Sutherland et al., 2002) nahe, die zeigt, dass Melatonin die Produktion von IL-1β steigert.

Zusammengenommen sprechen die oben dargestellten Ergebnisse deutlich für die Hypothese, dass die IL-1β-Sekretion einer zirkadianen Rhythmik unterliegt. Allerdings erlauben die hier dargestellten, die sich auf *ex vivo* stimulierte und inkubierte Vollblutproben beziehen, keine eindeutigen Rückschlüsse auf die zirkadiane Rhythmik von IL-1β *in vivo* im Gewebe. Diese soll daher mit der vorliegenden Arbeit erfasst werden.

## 1.4 Ableitung der Fragestellung

Zusammenfassend lassen sich aus den hier dargestellten Forschungsergebnissen folgende Aussagen ableiten:

IL-1β ist ein bedeutsames proinflammatorisches Zytokin und spielt eine wichtige Rolle bei der Entzündungsinduktion und -regulation.

Es ist auch ein wichtiger Parameter in der Ätiopathogenese der Parodontitis.

Dabei sind die lokalen IL-1β-Konzentrationen von besonderer Bedeutung, denn sie stehen in direktem Zusammenhang mit dem Ausmaß der Entzündung und der entzündlichen Destruktion des Parodontiums.

Der Bestimmung der lokalen Konzentrationen von Interleukin-1β kommt daher eine besondere Bedeutung für das Verständnis der Erkrankung zu, sie ist deshalb von großem Forschungsinteresse.

Allerdings könnte es sein, dass die lokalen IL-1β-Konzentrationen auch zirkadianen Schwankungen unterliegen. Dies wäre dann in zukünftigen Forschungsarbeiten zu berücksichtigen.

Bisher existieren keine Studien zu zirkadianen Rhythmen von IL-1β im Sulkus Fluid des Sulkus gingivalis. Studien über IL-1β in *ex vivo* stimulierten Blutproben weisen darauf hin, dass die IL-1β-Konzentration dort einer zirkadianen Rhythmik unterliegt. Diese Erkenntnis ist jedoch nicht ohne weiteres auf die Konzentration im Sulkus Fluid übertragbar.

Die vorliegende Arbeit untersucht deshalb erstmals, ob auch sulkuläre IL-1β-Konzentrationen einer zirkadianen Rhythmik unterliegen.

Von besonderem forschungspraktischen Interesse sind dabei die zirkadianen Variationen, die zu Uhrzeiten auftreten, zu denen normalerweise Sulkus Fluid-

Entnahmen stattfinden. Die vorliegende Arbeit fokussiert daher diesen Zeitraum und analysiert zirkadiane Variationen von IL-1β tagsüber im Zeitraum zwischen 8.00 morgens und 22.00 Uhr abends.

Außerdem soll in dieser Untersuchung berücksichtigt werden, dass sich zirkadiane Rhythmen möglicherweise in Abhängigkeit von der Ausgangssituation unterscheiden. Im klassischen Split-mouth Design sollen daher zirkadiane Rhythmen in Quadranten mit und ohne Plaqueakkumulation verglichen werden.

Da in engen Zeitabständen wiederholte Sulkus Fluid-Entnahmen möglicherweise eine Irritation der Gingiva bewirken, werden die Untersuchungen auf zwei Tage verteilt. Damit beträgt der Abstand zwischen 2 Sulkus Fluid-Entnahmen immer mindestens 4 Stunden. Nach Auswertung der Daten werden diese in einem Tagesprofil zusammengefasst.

# 2. Material und Methoden

## 2.1 Probanden

An der Studie nahmen 28 Probanden, davon 12 weibliche und 16 männliche Probanden im Alter von 22 bis 47 Jahren teil. Die Gruppe setzte sich aus Studenten unterschiedlicher Fachrichtungen und Mitarbeitern der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf sowie deren Angehörigen zusammen.

Als Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie galten:

- Schwangerschaft/ Stillzeit
- Chronische Erkrankungen des Immunsystems (HIV, etc.)
- Psychische Erkrankungen
- Diabetes mellitus
- Raucher mit einem Zigarettenkonsum über 5 Zigaretten/Tag
- Drogenmissbrauch
- Regelmäßige Einnahme von Medikamenten wie
  - Immunsuppressiva und –stimulantien
  - Kalziumantagonisten und Antikonvulsiva
  - Antiphlogistika und Antibiotika im Zeitraum ab 4 Wochen vor und während des Untersuchungszeitraums
- Bestehende Parodontalerkrankung (anamnestisch) oder Sondierungstiefen über 3 mm oder parodontale Rezessionen
- Laufende zahnärztliche oder kieferorthopädische Behandlungen

Diese Daten der Probanden wurden vor Beginn der Untersuchung anamnestisch respektive klinisch (Bestimmung der Sondierungstiefen; Erfassung parodontaler Rezessionen) erhoben.

Von den genannten Faktoren ist bekannt oder muss befürchtet werden, dass sie den parodontalen Zustand beeinflussen. Dies könnte zu einer Verzerrung der Daten führen.

Die Probanden wurden bei der ersten Untersuchung gebeten, auf die Einnahme von Medikamenten während des Untersuchungszeitraumes zu verzichten. Alle Teilnehmer der Untersuchung wurden über die Untersuchungsbedingungen schriftlich und mündlich aufgeklärt und erklärten schriftlich Ihre Bereitschaft zur Untersuchungsteilnahme. Für die Teilnahme an der Untersuchung erhielten die Probanden 50 DM.

## 2.2 Vorbehandlung

Die Probanden wurden vor Studienbeginn gründlich untersucht (baseline). Mit Erhebung des Zahnstatus wurde eine Kariesdiagnostik mittels zahnärztlicher Sonde durchgeführt. Weiterhin wurden mittels nachfolgend aufgeführter paradontaldiagnostischer Parameter der Zustand der Mundhygiene, der gingivale Entzündungszustand und die Tiefen der parodontalen Taschen der Probanden erfasst.

Zur Beurteilung der Mundhygiene der Probanden wurde der Plaqueindex nach Silness und Loe (1964), modifiziert nach Rateitschak (1989), verwendet. Der Papillen-Blutungs-Index nach Saxer & Mühlemann (1975), modifiziert nach Rateitschak (1989), wurde zur Erfassung von Gingivitiden angewandt. Die Indizes

wurden jeweils vestibulär und oral an den Zähnen, an denen im weiteren Verlauf der Studie Sulkus Fluid entnommen werden sollte, durch einen Zahnarzt erhoben. Im Anschluss an die Diagnostik erhielten alle Probanden eine professionelle Zahnreinigung. Sämtliche supra- und subgingivalen Beläge wurden mit Hilfe von Ultraschall (Cavitron) und anschließend mit Handinstrumenten entfernt. Daraufhin wurden die Zahnzwischenräume mittels Zahnseide gereinigt. Abschließend wurden die Zähne poliert. Um den Mundhygienezustand zu erhalten, wurden Probanden mit Mundhygienedefiziten fachgerecht zur optimalen Mundhygiene durch Erläuterung und Demonstration der modifizierten Putztechnik nach Bass sowie durch Information über Zahnseide und andere Möglichkeiten der Zwischenraumpflege angeleitet. Bei Probanden mit guter Mundhygiene reichten einzelne, individuell abgestimmte Pflegehinweise zur Optimierung der Mundhygiene aus. Die Probanden wurden angewiesen, für die Dauer der Untersuchung auf den Gebrauch von Mundspüllösungen zu verzichten.

Ziel der Vorbehandlung war es, einen plaque- und entzündungsfreien Zustand an allen Zähnen der Probanden zu erhalten. Die Vorbehandlung wurde 2-3 Tage vor Beginn der Untersuchung durchgeführt, um zu verhindern, dass eine mechanische Irritation der Gingiva oder des Saumepithels durch die professionelle Zahnreinigung und/oder eine immunologische Veränderung durch abklingende leichte Entzündungsprozesse nach der Reinigung Einfluss auf das Volumen des Sulkus Fluid und die Konzentration des Parameters (IL-1β) haben könnten (Cimasoni, 1983; Lamster et al., 1989).

## 2.3 Experimentelle Manipulation der Mundhygiene

Mit der vorliegenden Studie sollten Erkenntnisse über IL-1β im Sulkus Fluid bei guter Mundhygiene wie auch bei leichter Plaqueakkumulation gesammelt werden. In Anbetracht von Ergebnissen von Studien über Konzentrationsveränderungen von IL-1β in Anwesenheit von mikrobieller Plaque (Deinzer et al., 2004, 2000, 1999; Gonzales et al., 2001; Kinane et al., 1992; Suwatanapongched et al., 2000; Tsalikis et al., 2002; Waschul et al., 2003) wird dabei davon ausgegangen, dass in Quadranten mit Plaque im Vergleich zu Quadranten ohne Plaque höhere IL-1β-Konzentrationen im Sulkus gingivalis vorhanden sein werden. Nun soll geprüft werden, ob sich zirkadiane Rhythmen von sulkulärem IL-1β in Quadranten mit guter Mundhygiene von denen in Quadranten mit Plaque unterscheiden. Dazu wurden die Probanden nach der Vorbehandlung gebeten, für die Dauer der Untersuchung die Mundhygiene in zwei antagonistischen Quadranten zu vernachlässigen. Die Auswahl der zu vernachlässigenden Mundhälfte erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Auf der gegenüberliegenden Seite sollte optimale Mundhygiene praktiziert werden.

## 2.4 Entnahme der Sulkusflüssigkeit und Bestimmung von IL-1β

Die Sulkusflüssigkeit wurde mittels genormter Filterpapierstreifen (Periopaper®, Harco, New York, NY, U.S.A.) wie bereits vorher beschrieben mesio-bukkal und disto-bukkal sowie mesio-palatinal und disto-palatinal an den Zähnen 14 bis 17 und an den Zähnen 24 bis 27 (ggf. 3-7, bei Fehlen von 4) entnommen. Dabei wurden folgende Vorbereitungen getroffen. Durch Einlegen einer Watterolle in die

Umschlagfalte wurden die entsprechenden Zähne vor Einlegen eines Periopaper®-streifens isoliert vor jeder einzelnen Entnahme mit einem leichten Luftstrahl senkrecht zur Zahnachse 30 Sekunden getrocknet. Dabei galt es, ein Leerblasen oder eine Reizung des Sulkus gingivalis zu vermeiden, um nicht die Daten zu verfälschen. Danach wurde ein zuvor mit 1mm vom Rand mit Bleistift markiertes Periopaper® exakt 1 mm in den gingivalen Sulkus eingeführt und für 30 Sekunden dort belassen (Cimasoni, 1983). Dann wurde die Flüssigkeitsmenge des Sulkus Fluids mit dem Periotron® 8000 bestimmt. Im sofortigen Anschluß an die Messung wurde der Filterpapieranteil des Periopapers® abgeschnitten. Jeweils 16 Streifen eines Quadranten wurden in einem Eppendorfgefäß mit 800 µl PBS-Puffer gesammelt. Die Proben wurden sofort zentrifugiert und danach in 7 Eppendorfgefäße zu je 100 µl aliquotiert. Innerhalb von 5 Minuten nach der Zentrifugation wurden alle Gefäße mittels $CO_2$-Schnee Schock gefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80°C aufbewahrt. Die Analyse erfolgte mit einem Standard human IL-1ß ELISA kit der Firma Endogen (Cambridge, MA, U.S.A.).

Vor der Volumenmessung wurde das Periotron® mit Humanserum entsprechend dem Herstellervorschlag und dem Vorgehen in anderen Studien kalibriert (Deinzer et al., 2004, 2000, 1999; Waschul et al., 2003). Dabei wurden mit einer Hamiltonspitze (0-1µl) Standardvolumina von 0,1µl – 0,9µl in 0,1µl-Schritten auf Periopaper®-teststreifen aufgebracht und deren Periotron®-Messwert erfasst. Dieser Vorgang wurde für jedes Volumen 5 Mal wiederholt. Aus diesen Werten wurde die Standardkurve berechnet, der eine quadratische Funktion zugrunde lag. Das $R^2$ der Standardkurve lag bei allen Untersuchungen über $R^2 = 0,97$.

## 2.5 Versuchsablauf

Zur genauen Erfassung der zirkadianen Rhythmik von IL-1β sollte die Konzentration des Parameters in dem Zeitraum von 08.00 – 22.00 Uhr an zwei aufeinander folgenden Tagen alle 4 Stunden erfasst werden. So konnte einerseits eine Irritation der Gingiva oder des Saumepithels durch wiederholte Messungen in engen Zeitabständen vermieden werden (Lamster et al., 1989). Andererseits wurden die Messzeitpunkte an den zwei Tagen so gewählt, dass tageszeitlich betrachtet für jede zweite Stunde des Messzeitraumes eine Probe vorlag. Dadurch konnte der tageszeitliche Verlauf dennoch engmaschig beschrieben werden. Abbildung 1 zeigt zur Verdeutlichung die Untersuchungsprotokolle von zwei Probanden.

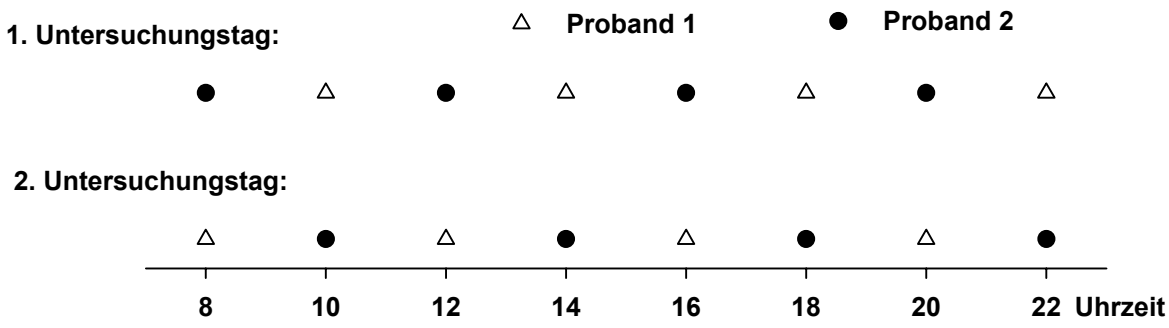


Abbildung 1: Untersuchungsprotokolle von zwei Probanden. Die Probanden werden an zwei aufeinander folgenden Tagen jeweils im Abstand von 4 Stunden untersucht. Dabei werden die Zeitpunkte an den beiden aufeinander folgenden Tagen so gewählt, dass insgesamt für jede zweite Stunde im Zeitraum von 8-22 Uhr ein Messwert vorliegt.

Um eine Irritation der Gingiva und eine daraus resultierende Verzerrung der Daten während des Untersuchungszeitraumes auszuschließen, wurden die Probanden

gebeten, jeweils im Zeitraum von 2 Stunden vor dem Messzeitpunkt nicht die Zähne zu putzen, nicht zu rauchen, nicht zu essen und nur Wasser zu trinken. Weiterhin wurden die Probanden angewiesen, in ihrem normalen Tagesablauf Stress zu vermeiden. Viele Studien liefern Hinweise, dass es unter Stress zu einer Veränderung der Konzentrationen von Immunparametern, speziell zu einem Anstieg der sulkulären IL-1β Konzentration kommt (Deinzer et al., 2001, 2000, 1999; Deinzer & Herforth, 1999; Waschul et al., 2003).

## 2.6 Kontrollvariabeln

Die folgenden Parameter wurden als Kontrollvariablen bei Aufnahme in die Studie und am Ende des zweiten Untersuchungstages, nach der letzten Sulkus Fluid-Entnahme erhoben.

### 2.6.1 Plaqueindex

Das Ausmaß der Plaqueakkumulation pro Fläche wurde mit dem Plaqueindex nach Silness und Löe (1964), modifiziert nach Rateitschak et al. (1989) erfasst. Mit diesem Index ist unter Zuhilfenahme einer Sonde ohne Anfärben eine Beurteilung des Hygienezustandes auf einer vierstufigen Rangskala mit folgenden Rangstufen möglich:

0 keine Plaque

1 dünner Plaquefilm am Gingivarand, nur erkennbar durch Abstreichen mit Sonde

2 mäßig Plaque entlang des Gingivarands, Interdentalräume frei, mit den Augen erkennbar

3 viel Plaque entlang des Gingivarands, Interdentalraum mit Plaque gefüllt

### 2.6.2 Papillenblutungsindex

In dieser Untersuchung fand der Papillenblutungsindex (PBI) nach Saxer und Mühlemann (1975), modifiziert nach Rateitschak et al. (1989), als Indikator der gingivalen Entzündungsreaktion Anwendung. Dieser Index wurde anderen Indizes vorgezogen, weil er gut standardisiert ist, eine sehr zuverlässige und relativ differenzierte Bestimmung des klinischen Zustandes erlaubt und dabei weniger von subjektiver Einschätzung der Untersucher abhängt als Gingivitisindizes, bei denen auch das Ausmaß einer eventuellen Rötung und Schwellung der Gingiva beurteilt wird (Sulkusblutungsindex nach Mühlemann und Son, 1971; Gingival-Index nach Loe und Silness, 1963).

Zur Erfassung des PBI wurde das Ausmaß der Blutung nach drucklosem Ausstreichen anhand folgender Kriterien in fünf Rangstufen eingeteilt:

0 keine Blutung

1 ein einzelner Blutpunkt

2 eine feine Blutlinie oder mehrere Blutpunkte

3 das interdentale Dreieck füllt sich mit Blut

4 profuse Blutung, das Blut fließt sofort in den Interdentalbereich und über Zahn oder Gingiva

## 2.7 Statistische Datenanalyse

Zu prüfen war die Forschungshypothese, dass sulkuläres Interleukin-1ß einer zirkadianen Rhythmik unterliegt. Die zugehörige statistische Hypothese lautet, dass sich die Mittelwerte zu den unterschiedlichen Tageszeiten unterscheiden.
Weiterhin sollte geprüft werden ob sich zirkadiane Rhythmen an Stellen mit und ohne leichte Plaqueakkumulation unterscheiden. Dies müsste sich in einer Interaktion der Faktoren Plaque x Tageszeit dokumentieren.
Zur Prüfung dieser Hypothesen wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung auf beiden Faktoren mit den Faktoren Plaque (2 Stufen) und Tageszeit (8 Stufen) berechnet. Um zu prüfen, ob das Geschlecht der Probanden einen bedeutsamen Einfluss auf die Daten hat, wurde außerdem der Faktor Geschlecht als dritter Faktor in die Varianzanalyse mit einbezogen. Eine α Fehlerwahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 5\%$ wurde für alle Haupteffekte und Interaktionen als statistisch bedeutsam angesehen. Die Berechnungen der F-Statistiken und Fehlerwahrscheinlichkeiten erfolgten Greenhouse-Geisser-korrigiert.
Die Normalverteilungsvoraussetzung wurde für jede Zelle des varianzanalytischen Versuchsplans mit dem Kolmogorov-Smirnov-Goodnes of Fit-Test geprüft. Hier galten α-Werte von $\alpha \leq 10\%$ als signifikant.
Zur Beurteilung von Unterschieden hinsichtlich der klinischen Parameter wurde zunächst für jede Bedingung mittels t-Test für unabhängige Stichproben geprüft, ob Geschlechtseffekte erkennbar waren ($p \leq 10\%$). Für den Fall, dass sich keine Geschlechtseffekte herausstellten, wurden die Daten beider Geschlechter

zusammengefasst und die Hygienebedingungen mittels t-Test für abhängige Stichproben miteinander verglichen. Für den Fall bestehender Geschlechtsunterschiede sollte dieser Vergleich für jede Geschlechtsgruppe einzeln durchgeführt werden.

# 3. Ergebnisse

Bei der Normalverteilungsprüfung zeigten sich zunächst, dass die Daten in zwei Zellen des varianzanalytischen Versuchsplans nicht-normalverteilt waren ($p<0,10$). Dies war auf extreme Werte einer einzelnen Person zurückzuführen, die mehr als zwei Standardabweichungen vom Mittelwert abwichen und daraufhin aus der Analyse ausgeschlossen wurde, wonach Tests auf univariate Normalverteilungen in den Zellen p-Werte>0,10 erreichten. In die endgültige Analyse gingen damit die Werte von 16 männlichen und 11 weiblichen Probanden ein.

Hinsichtlich der klinischen Daten zeigten sich keine Geschlechtseffekte (alle $p>0,30$). In den gepoolten Daten beider Geschlechter (Abbildung 2) zeigten sich dann deutliche Effekte der Hygienebedingung auf die Anzahl plaquefreier Flächen ($t(26)=4,55$; $p<0,001$), nicht aber auf die Anzahl blutungsfreier Flächen ($t(26)=0,61$; $p=0,55$). Die Probanden weisen in den Quadranten mit Hygiene am zweiten Untersuchungstag mehr plaquefreie Flächen auf (Mittelwert ± Standardabweichung: 11,78±3,82) als in den Quadranten mit Plaqueakkumulation (7,44±4,77). Unter beiden Bedingungen sind dabei an diesem Tag durchschnittlich etwa 15,5 (Hygiene: 15,67±0.88; Plaque: 15,52±0,94) der sechzehn untersuchten Flächen blutungsfrei.

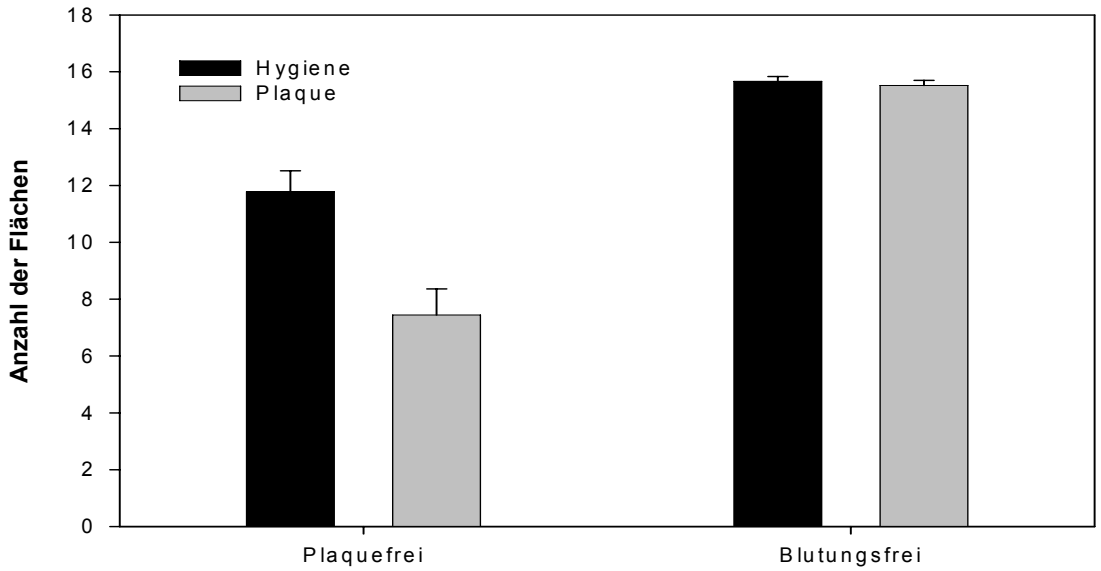


Abbildung 2: Klinische Daten: Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts der Anzahl der plaque- und blutungsfreien Flächen unter Plaque- und Hygienebedingungen

Abbildung 3 zeigt die sulkulären IL-1ß-Konzentrationen der Probanden zu den einzelnen Messzeitpunkten getrennt nach Hygienebedingungen. Bei der varianzanalytischen Auswertung ergaben sich ein signifikanter Haupteffekt Zeit, sowie tendenziell signifikante Interaktionen Hygiene x Zeit x Geschlecht und Hygiene x Geschlecht (vgl. Tabelle 1).

**Tabelle 1: Ergebnisse der Varianzanalytischen Auswertung der IL-1ß-Daten**

| Effekt | Freiheitsgrade (Greenhouse-G. korrigiert) | F | P | Partielles Eta$^2$ |
|---|---|---|---|---|
| Hygiene | 1/ 25 | 0.028 | 0,87 | 0,001 |
| Geschlecht | 1/ 25 | 0,10 | 0,76 | < 0,04 |
| Zeit | 3,0/ 74,6 | 7,1 | < 0,001 | 0,222 |
| Zeit * Hygiene | 3,7/ 93,4 | 0,831 | 0,502 | 0,032 |
| Zeit * Geschlecht | 3,0/ 74,6 | 0,214 | 0,885 | 0,009 |
| Hygiene * Geschlecht | 1/ 25 | 2,912 | 0,100 | 0,104 |
| Zeit * Hygiene * Geschlecht | 3,7/ 93,4 | 2,370 | 0,062 | 0,087 |

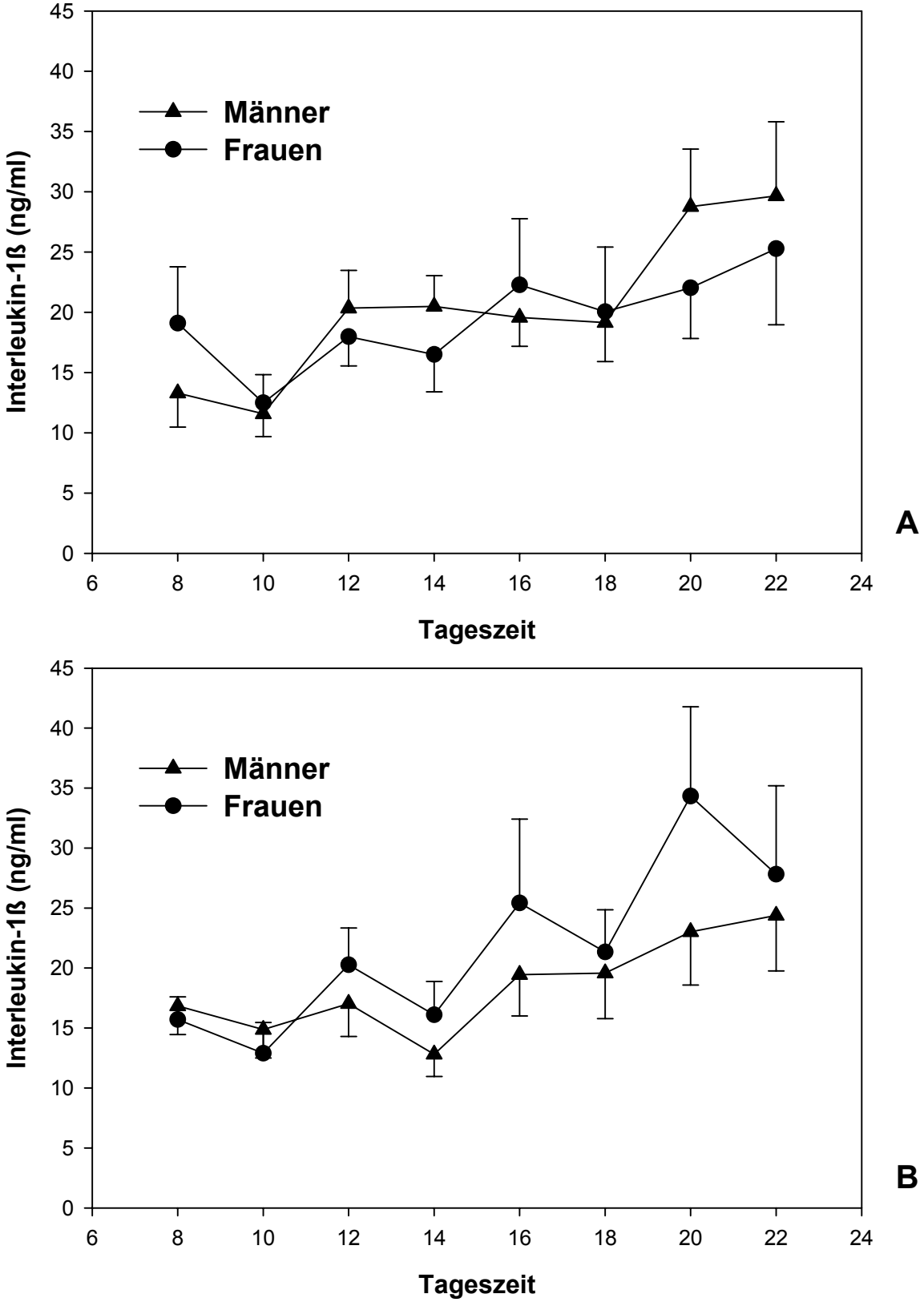


Abbildung 3: IL-1ß-Konzentrationen im Tagesverlauf. Gezeigt werden die Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts der sulkulären IL-1ß-Konzentrationen der Probanden zu den einzelnen Messzeitpunkten getrennt nach Hygienebedingungen (Abbildung 3A: Hygiene; Abbildung 3B: Plaque).

# 4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob Interleukin-1β, ein in der Ätiopathogenese der Parodontitis bedeutsames proinflammatorisches Zytokin, einer zirkadianen Rhythmik unterliegt. Dazu wurde zu festgelegten Zeitpunkten an zwei aufeinander folgenden Tagen nach einem standardisiertem Verfahren Sulkus Fluid aus der Zahnfleischfurche entnommen.

Die Konzentration von sulkulärem IL-1β steht im direkten Zusammenhang mit dem Ausmaß der lokalen Entzündung und der entzündlichen Destruktion des Parodontiums. Untersuchungen über zirkadiane Rhythmen der sulkulären Interleukin-1ß-Konzentrationen fehlen bisher, sind jedoch von großem forschungspraktischen Interesse. Einige Studien über zirkadiane Rhythmen von IL-1β in *ex vivo* stimulierten Blutproben geben Hinweise auf eine zirkadiane Rhythmik des Interleukins. Unklar war bislang, ob diese Erkenntnisse auf das Medium Sulkus Fluid übertragbar sind. Diese Überlegung führt zu der Forschungshypothese, dass sulkuläres IL-1β einer zirkadianen Rhythmik unterliegt.

Bei der varianzanalytischen Auswertung der Daten ergab sich ein signifikanter Haupteffekt Zeit (Tabelle 1). Damit stützt die hier vorliegende Studie die Forschungshypothese und weist auf das Bestehen einer zirkadianen Rhythmik von sulkulärem IL-1 β hin. Das Interleukin scheint über den Tag hinweg, insbesondere in den Stunden nach 14.00 Uhr anzusteigen. Der Anstieg von lokalem IL-1β bestätigt Hinweise anderer Studien, in denen IL-1β in anderen Kompartimenten (De Rijk et al., 1997; Entzian et al., 1996; Sutherland et al., 2002) gemessen wurde; auch hier sind die Werte in den Abendstunden erhöht. Einen Hinweis auf den möglichen Mechanismus liefern die Daten von Sutherland et al.

(2002). Sie beobachteten eine Korrelation zwischen dem abendlichen Abstieg der Konzentration von IL-1β und dem durch den zirkadianen Rhythmus bedingten Anstieg von Melatonin.

Zusammenfassend bestätigt die vorliegende Studie das, was schon aus anderen Kompartimenten bekannt war, nun auch für das sulkuläre IL-1β: Dieses unterliegt einer zirkadianen Rhythmik.

Eine weitere Fragestellung dieser Studie befasste sich damit, ob sich zirkadiane Rhythmen des sulkulären IL-1β möglicherweise in Abhängigkeit von der klinischen Ausgangssituation oder vom Geschlecht unterscheiden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Plaqueakkumulation Effekte auf die zirkadiane Rhythmik des Interleukins haben könnte. Hinweise dafür lieferten Ergebnisse von Studien, die einen Konzentrationsanstieg von sulkulärem IL-1β in Anwesenheit von mikrobieller Plaque darstellten (Deinzer et al., 2004, 2000, 1999; Gonzales et al., 2001; Kinane et al., 1992; Suwatanapongched et al., 2000; Tsalikis et al., 2002; Waschul et al., 2003). Im klassischen Split-mouth Design wurden daher bei Quadranten mit und ohne Plaqueakkumulation die Ergebnisse über zirkadiane Schwankungen von IL-1β getrennt nach Geschlecht verglichen. Tatsächlich zeigten die varianzanalytischen Auswertungen tendenziell signifikante Interaktionen von Hygiene x Zeit x Geschlecht und Hygiene x Geschlecht (Tabelle 1). Angesichts des deutlich signifikanteren und effektstärkeren Haupteffekts der Zeit sollte dieses Ergebnis allerdings nicht überbewertet werden. Dennoch weisen die Daten darauf hin, dass die genaue Struktur der zirkadianen Variation von den Mundhygienebedingungen und dem Geschlecht der Probanden abhängig ist.

Zusammenfassend ergibt sich damit auch eine tendenzielle Bestätigung der zweiten Hypothese, dass bei der Kontrolle von zirkadianen Effekten des

sulkulären IL-1β auch das Geschlecht der Probanden und ihre Mundhygiene berücksichtigt werden sollte.

Neben diesen Schlussfolgerungen bleiben einige Fragen offen, die Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein könnten. Erkenntnisse, in wieweit Faktoren, die mit Immunfunktionen interagieren, auch die zirkadiane Rhythmik des sulkulären IL-1β beeinflussen könnten, fehlen. Studien zu den Einflüssen von Nikotinkonsum, von Diabetes, von immunologischen Polymorphismen und anderen Einflüssen auf die zirkadiane Rhythmik von IL-1β existieren bisher nicht.

Die vorliegende Studie weist auch einige methodische Schwächen auf, die nicht unerwähnt bleiben sollen. So wurde die erste Sulkus Fluid-Entnahme bereits 48-72 Stunden nach der Zahnreinigung angesetzt. Daraus ergab sich in den Quadranten ohne Hygiene eine maximale Plaqueakkumulation von 72 Stunden. Zwar liefert die Interaktion der Faktoren Zeit X Hygiene Hinweise darauf, dass die Plaqueakkumulation die zirkadiane Rhythmik des Interleukins beeinflusst. Der verhältnismäßig sehr kurze Zeitraum der Plaqueakkumulation lässt aber keine Rückschlüsse auf zirkadiane Rhythmen der sulkulären Interleukin-1ß-Konzentrationen bei längerfristiger Plaqueakkumulation zu, wie sie beispielsweise bei einer experimentellen oder chronischen Gingivitis zu beobachten ist. Tatsächlich weisen Daten von Deinzer et al. (2006) darauf hin, dass nicht ohne weiteres von einem dieser Zustände auf den anderen geschlossen werden kann. Demnach sollten weitere Studien prüfen, ob sich die zirkadianen Rhythmen von IL-1β in diesen Zuständen voneinander unterscheiden.

Zusammenfassend unterstreicht die vorliegende Studie, dass die Tageszeit in zukünftigen Studien mit sulkulärem IL-1β kontrolliert werden muss. Sie liefert keinen klaren Hinweis auf Zeiträume, in denen dies nicht notwendig ist. Unter Hygienebedingungen ergibt sich anhand der Auswertungen unter Abbildung 3 eine relativ stabile Konzentration in der Zeit zwischen 12.00 und 18.00 Uhr. Unter Plaquebedingungen kann ein solches variationsarmes Intervall nicht ausgemacht werden. Weiterführende Studien sollten nun die Einflüsse anderer Faktoren auf die zirkadiane Rhythmik von IL-1β untersuchen. Forschungsbedarf besteht bei der Analyse von Einflüssen anderer oraler Gesundheitszustände auf die zirkadiane Rhythmik von sulkulärem IL-1β sowie bei der Analyse der zirkadianen Rhythmen anderer parodontitisrelevanter Entzündungsparameter im Sulkus Fluid (z.B. Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra), Prostaglandin $E_2$ ($PGE_2$), Tumornekrosefaktor-α (TNF-α), Immunglobulin-G (IGG), Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-10 (IL-10)). Außerdem fehlen Erkenntnisse über die zirkadianen Rhythmen von allen sulkulären Immunparametern bei Vorliegen von systemischen Erkrankungen wie bei Diabetes und bei immunologischen Polymorphismen.

# 5. Zusammenfassung

Die Analyse der lokalen Immunantwort im Sulkus gingivalis gibt Auskunft über Immunparameter, unter anderem IL-1β, die für die Ätiopathogenese der Parodontitis von Bedeutung sind. Studien mit Analysen der Konzentration von IL-1β haben in der parodontologischen Forschung zum besseren Verständnis der Pathogenese der Parodontitiden beigetragen. Während viele Studien die Bedeutung von IL-1β und seine Funktion als proinflammtorisches Zytokin in der Parodontologie beschreiben, fehlen Studien, die untersuchen, ob die Konzentrationen von IL-1β einer zirkadianen Rhythmik unterliegen. Diese Informationen sind für Konzeption, Planung und Finanzierung zukünftiger Studien zu IL-1β in der Parodontologie von großem Interesse.

Wenige Studien zu IL-1β in *ex vivo* stimulierten Vollblutproben weisen darauf hin, dass die Freisetzung im Allgemeinen und damit auch möglicherweise im Sulkus gingivalis einer zirkadianen Rhythmik unterliegt.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte daher überprüft werden, ob sulkuläres Interleukin-1β einer zirkadianen Rhythmik unterliegt.

Die zirkadianen Variationen, die zwischen 8.00 morgens und 22.00 Uhr abends auftreten, sind dabei von besonderem forschungspraktischen Interesse.

Außerdem sollte berücksichtigt werden, dass sich zirkadiane Rhythmen möglicherweise in Abhängigkeit von der klinischen Ausgangssituation unterscheiden, daher wurden im Split-mouth Design zirkadiane Rhythmen in Quadranten mit und ohne Plaqueakkumulation verglichen.

Insgesamt 28 gesunde Probanden, davon 12 weibliche und 16 männliche im Alter von 22 bis 47 Jahren wurden zu Beginn der Studie untersucht. Nach der Eingangsuntersuchung erfolgte eine professionelle Zahnreinigung, um für alle

Probanden einen plaque- und entzündungsfreien Zustand zu erhalten und gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen. Nach dem Zufallsprinzip wurden die Quadranten mit Plaqueakkumulation bestimmt, die Probanden wurden angewiesen, die Mundhygiene in diesem Quadranten zu vernachlässigen. Mit den gewonnenen Daten sollten Erkenntnisse über die zirkadiane Rhythmik von IL-1β im Sulkus Fluid bei guter Mundhygiene als auch mit leichter Plaqueakkumulation gesammelt werden.

In Hinblick auf Studien über Konzentrationsveränderungen von IL-1β in Anwesenheit von mikrobieller Plaque wurde vermutet, dass in Quadranten mit Plaque im Vergleich zu Quadranten ohne Plaque höhere IL-1β -Konzentrationen im Sulkus gingivalis vorliegen. Es stellte sich allerdings die Frage, ob sich zirkadiane Rhythmen von sulkulärem IL-1β in Quadranten mit guter Mundhygiene von denen mit Plaque unterscheiden. Tatsächlich zeigte sich, dass sulkuläres IL-1β einer zirkadianen Variation mit Anstieg in den Abendstunden unterliegt. Außerdem ergaben sich tendenziell signifikante Interaktionen bei den Parametern Hygiene x Zeit x Geschlecht und Hygiene x Geschlecht.

Damit liefert die Studie Hinweise dafür, dass IL-1β im Sulkus Fluid einer zirkadianen Rhythmik unterliegt.

# 6. Literatur


1. Alexander D.C., Martin J.C., King P.J., Powell J.R., Caves J., Cohen M.E. (1996). Interleukin-1 beta, prostaglandin $E_2$, and immunoglobulin G subclasses in gingival crevicular fluid in patients undergoing periodontal therapy. Journal of Periodontology, 67(8): 755-62

2. Alexander M.B. & Damoulis P.D. (1994). The role of cytokines in the pathogenesis of periodontal disease. Current Opinion in Periodontology, 39-53

3. Aschoff J. (1968). Biological rhythms. Handbook of behavioural neurobiology, Vol. 4; New York, Plenum Press

4. Biesbrock A., Yeh C.H. (2000). Relationship of surface epithelium concentrations of IL-1α and IL-1β to clinical inflammation during experimental gingivitis. Monographs in Oral Science, 17: 20-31

5. Cavanaugh P.F. Jr., Meredith M.P., Buchanan W., Doyle M.J., Reddy M.S. & Jeffcoat M.K. (1998). Coordinate Production of $PGE_2$ and IL-1β in the Gingival Crevicular Fluid of Adults with Periodontitis: its Relationship to Alveolar Bone Loss and Disruption by Twice Daily Treatment with Ketorolac Tromethanine Oral Rinse. Journal of Periodontal Research, 33: 75-82

6. Chiplunkar S., Langhorne J., u. Kauffman S.H.E. (1986). Stimulation of B cell growth and differentiation by murine recombinant interleukin-1. Journal of Immunology, 137: 3748-3752

7. Cimasoni G. (1983). Crevicular Fluid Updated. Monographs in Oral Science, 12: 1-152

8. Danielson B., Manji F., Nagelkerke N., Fejerskov O. & Baelum V. (1989). Transition dynamics in experimental gingivitis in humans. Journal of Periodontal Research, 24: 254-260

9. Deinzer R., Weik U., Kolb-Bachofen V., Herforth A. (2006). Comparison of experimental gingivitis with persistent gingivitis: differences with respect to clinical parameters and cytokine concentrations. Journal of Periodontal Research, (OnlineEarlyArticles), doi: 10.111/ j.1600-0765.2006.00951.x

10. Deinzer R., Granrath N., Stuhl H., Twork L., Idel H., Waschul B., Herforth A. (2004). Acute stress effects on local IL-1 beta responses to pathogens in a human in vivo model. Brain, Behaviour and Immunity, 18(5): 458-467

11. Deinzer R., Hilpert D., Bach K., Schawacht M., Herforth A.: (2001). Effects of academic stress on oral hygiene – a potential link between Stress and plaque-associated disease? Journal of Clinical Periodontology, 28: 459-464

12. Deinzer R., Kleineidam C., Stiller-Winkler R., Idel H., Bach D. (2000). Prologend reduction of salivary immunoglobulin A (slgA) after a major academic exam. International Journal of Psychophysiology, 37: 219-232

13. Deinzer R., Förster P., Fuck L., Herforth A., Stiller-Winkler R., Idel H. (1999). Increase of crevicular interleukin 1β under academic Stress at experimental gingivitis sites and at sites of perfect oral hygiene. Journal of Clinical Periodontology, 26: 1-8

14. Deinzer R. & Herforth A. (1999). Parodontitis: Risikofaktor Stress? Quintessenz, 50: 373-375

15. Deinzer R. & Herforth A. (1996). Stress und Parodontitis – ein kritischer Forschungsüberblick. I. Mandl H: Bericht über den 40. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Psychologie in München, 195-200, Göttingen, Hogrefe 1997

16. De Rijk R., Michelson D., Karp B., Petrides J., Galliven E., Deuster P., Paciotti G., Gold P.W. and Sternberg E. M. (1997). Exercise and circadian rhythm-induced variations in plasma cortisol differentially regulate interleukin-1β (IL-1β), Il-6, and tumor necrosis factor-α (TNF-α) production in humans: high sensivity of TNF-α and Resistance of Il-6. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 82(7): 2182-2191

17. Dewhirst F.E., Stashenko P.P., Mole J.E. & Tsurumachi T. (1985). Purification of partial sequence of human osteoclast-activating factor: identity with interleukin-1 beta. Journal of Immunology, 135: 2562-2568

18. Dinarello C.A. (2005). IL-1β. Critical Care Medicine, 33(12 Suppl.) 460-2

19. Dinarello C.A. (2000). Proinflammatory Cytokines. Chest, 118(2): 503-8 Review

20. Dinarello C.A. (1998). Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonists. International Reviews of Immunology, 16(5-6): 457-99

21. Dinarello C.A. (1997). Interelukin-1. Cytokine & growth factor review, 8(4): 253-65

22. Dinarello C.A. (1996). Biological basis for interleukin-1 in disease. Blood, (15); 87(6): 2095-147

23. Dinarello C.A. (1994). Interleukin-1. Advances in pharmacology., 25: 21-51

24. Dinarello C.A. (1992). Dissociation of transcription from translation of human IL-1 beta: induced of steady state mRNA by adherence or recombinant C5a in the absence of translation. Proceedings of the society for Experimental Biology and Medicine, 200(2): 228-232

25. Dinarello C.A. (1984). Interleukin-1. Reviews of infectious diseases, 6: 51-95

26. Dinarello C.A. & Thompson R.C. (1991). Blocking IL-1β: Interleukin-1 Receptor Antagonist in Vivo and in Vitro. Immunology Today, 12: 404-410

27. Ebersole J.L. (2003). Humoral immune responses in gingival crevicular fluid: local and systemic implications. Periodontology 2000, 31:135-66 Review

28. Ebersole J.L. & Taubmann M.A. (1994). The Protective Nature of Host Responses in Periodontal Diseases. Periodontology 2000, 5: 112-141

29. Engebretson S.P., Grbic J.T., Singer R., Lamster I.B. (2002). GCF IL-1 beta profiles in periodontal disease. Journal of Clinical Periodontology, 29(1): 48-53

30. Entzian P., Linnemann K., Schlaak M. and Zabel P. (1996). Obstructive Sleep Apnea Syndrome and Circadian Rhythms of Hormons and Cytokines. American Journal of Critical Care Medicine, 153: 1080-6

31. Faizuddin M., Bharathi S.H., Rohini N.V. (2003). Estimation of IL-1β levels in the gingival crevicular fluid in health and in inflammatory periodontal disease. Journal of Periodontal Research, 38(2): 111-4

32. Figueredo C.M., Ribeiro M.S., Fischer R.G., Gustafsson A. (1999). Increased IL-1β concentrations in gingival crevicular fluid as a characteristic of periodontitis. Journal of Periodontology, 70(12): 1457-63

33. Gamonal J., Acevedo A., Bascones A., Jorge O., Silva A. (2000). Levels of Interleukin-1 beta, Il-8 and IL-10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. Journal of Periodontology, 71(10): 1535-45

34. Graves D.T. & Cochran D., (2003). The contribution of IL-1 and Tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. Journal of Periodontology, 74(3): 391-401 Review

35. Gonzales J.R., Hermann J.M., Boedeker R.H., Francz B.I., Biesalski H., Meyle J. (2001). Concentration of IL-1β and neutrophil elastatse activity in gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. Journal of Clinical Periodontology, 28(6): 544-9

36. Goutoudi P., Diza E., Arvanitidou M. (2004). Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1beta and Interleukin-10 levels in chronic periodontitis. Journal of Dentistry, 32(7): 511-20

37. Hellwig E., Klimek J., Attin T. (1995). Einführung in die Zahnerhaltung. München; Wien; Baltimore; Urban & Schwarzenberg

38. Heasman P.A., Collins J.G., Offenbacher S. (1993). Changes in Crevicular Fluid Levels of Interleukin-1β, Leukotriene B4, Prostaglandin $E_2$, Thromboxane B2 and Tumor Necrosis Factor α in Experimental Gingivitis in Humans. Journal of Periodontal Research, 28: 241-247

39. Hillam D.G. & Hull P.S. (1977). The influence of experimental gingivitis on plaque formation. Journal of Clinical Periodontology, 4: 56-61

40. Honig J., Rordorf-Adam C., Siegmund C., Wiedemann W. & Erard F. (1989). Increased Interleukin-1 beta (IL-1 beta) concentration in gingival tissue from periodontitis patients. Journal of Periodontal Research, 24: 362-367

41. Holmlund A., Hanstrom L., Lerner U.H. (2004). Bone resorbing activity and cytokine levels in gingival crevicular fluid levels before and after treatment of periodontal disease. Journal of Clinical Periodontology, 31(6): 475-82

42. Hou L.T., Liu C.M., Rossomando E.F. (1995). Crevicular interleukin-1 beta in moderate and severe periodontitis patients and the effect of phase I periodontal treatment. Journal of Clinical Periodontology, 22(2): 162-7

43. Ishihara O., Numari H., Saitoh M., Arai Y.,Takanashi H., Kitagawa H., Kinoshita K. (1997). Prostaglandin-E2 production by endogenous secretion of IL-1 in decidual cells from a fetal membrane. Advances in experimental medicine and biology, 433:419-22

44. Jandinski J.J., Stashenko P., Feder L.S., Leung C.C., Peros W.J., Rynar J.E. Deasy M.J. (1990). Lokalisation of IL-1β in human periodontal tissue. Journal of Periodontology, 62(1): 36-43

45. Johnson T.C., Reinhardt R.A., Payne J.B., Dyer J.K. ,Patil K.D. (1997). Experimental Gingivitis in Periodontitis-susceptible Subjects. Journal of Clinical Periodontology, 24: 618-625

46. Kinane D.F., Winstanley F.P., Adonogianaki E., & Moughal N.A. (1992). Bioassay of Interleukin-1 (IL-1) in Human Crevicular Fluid during Experimental Gingivitis. Oral Microbiology and Immunology, 8: 65-68; Archives of Oral Biology 37.2: 153-156

47. Kjeldsen M., Holmstrup P., Bendtzen K. (1993). Marginal Periodontitis and Cytokines: a review of the literature. Journal of Periodontology, 64(11): 1013-22

48. Lamster I.B., Harper D.S., Goldstein S., Celenti R.S., Oshrain R.L. (1992). The effect of sequential sampling on crevicular fluid volume and enzyme activity. Journal of Clinical Periodontology, 16: 252-258

49. Lamster I.B., Oshrain R.L., Celenti R.S. (1989). Gingival crevicular fluid analysis as an adjunct in periodontal diagnosis: a review. Periodontal Case Reports, 11(2): 13-6

50. Lee H., Kang I.-K., Chung C.-P. & Choi S.-M. (1995). The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. Journal of Clinical Periodontology, 22: 885-890

51. Lerner U.H., Modeer T., Krekmanova L., Claesson R., Rasmussen L. (1998). Gingival crevicular fluid from patients with periodontitis contains bone resorbing activity. European Journal of Oral Science, 106(3): 778-87

52. Liu Y.J., Gruard G., de Bouteiller O., Baucherau J. (1996). Follicular dendritic cells and germinal centers. International review of cytology, 166:139-79

53. Masada M.P., Persson R., Kenney J.S., Lee S.W., Page R.C., Allison A.C. (1990). Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid: Implications fort he pathogenesis of periodontal disease. Journal of Periodontology Research, 25:156-163

54. Matsuki Y., Yamamoto T. & Hara K. (1993). Localization of Interleukin-1 (IL-1) mRNA-expressing macrophages in human inflamed gingiva and IL-1 activity in gingival crevicular fluid. Journal of Periodontal Research, 28: 35-42

55. Mizel S.B. (1982). Interleukin 1 and T-cell activation. Immunological reviews, 63: 51-72

56. Mogi M., Otogota J., Ota N., Inagaki H., Minami M., Kojima K. (1999). IL-1beta, Il-6, beta 2-microglobulin and transforming growth factor-alpha in gingival crevicular fluid from human periodontal disease. Archives of Oral Biology, 44(6): 535-9

57. Moolwaney A.S., Igwe O.J. (2005). Regulation of the cyclooxygenase-2 system by interleukin-1 beta through mitogen-activated protein kinase signalling pathways: a comparative study of human neuroglioma and neuroblastoma cells. Brain Research and Molekular Brain Research, 13;137 (1-2): 202-12

58. Nguyen L., Dewhirst F.E., Hauschka P., Stashenko P. (1991). Interleukin-1 beta stimulates bone resorption and inhibits bone formation in vivo. Lymphokine Cytokine Research, 10:15-21

59. Offenbacher S. (1996). Periodontal diseases: pathogenesis. Annals of Periodontology, 1(1):821-78 Review

60. Panda S., Hogenesch J.B., Kay S.A. (2002). Circadian rhythms from flies to human. Nature Vol., 417: 329-335

61. Preiss D.S. & Meyle J. (1994). Interleukin-1 beta concentration of gingival crevicular fluid. Journal of Periodontology, 65: 423-428

62. Quan N., Avitsur R., Stark J.L., He L., Shah M., Caligiuri M., Padgett D.A., Marucha P.T. & Sheridan J.F. (2001). Social Stress increases the susceptibility to endotoxic shock. Journal of Neuroimmunology, 115:36-45

63. Rasmussen L., Hanstrom L., Lerner U.H. (2000). Characterization of bone resorbing activity in gingival crevicular fluid from patients with periodontitis. Journal of Clinical Periodontology, 27(1): 41-52

64. Rateitschak K. H., Rateitschak E.M., Wolf H.F. (1989). Parodontologie. Stuttgart / New York, Thieme

65. Rawlinson A., Dalati M.H., Rahman S., Walsh T.F., Faizzudin A.L. (2000). Interleukin-1 and IL-1 receptor antagonist in crevicular fluid. Journal of Clinical Periodontology, 27(10): 738-43

66. Reinhardt R.A., Masada M.P., Kaldahl W.B., Dubois L.M., Kornman K.S., Choi J.-L., Kalkwarf K.L. and Allison A.C. (1993). Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. Journal of Clinical Periodontology, 20: 225-231

67. Salvi G.E., Lawrence H.P., Offenbacher S., Beck J.D. (1997). Influence risk factors on the pathogenesis of periodontitis. Periodontology 2000, 14: 173-201 Review

68. Sauder D.N., Mounessa N.L., Katz S., Dinarello C.A., u. Gallin J.I. (1984). Chemotactic cytokines: the role of leucocytic pyrogen and epidermic cell thymocyte-activating factor in the neutrophil chemotaxis. Journal of Immunology, 132: 828-832

69. Saxer U.P., Mühlemann H.R.: Motivation und Aufklärung. Schweizer Monatsschrift für Zahnmedizin, 1975; 85: 905-919

70. Shi L., Smolders I., Umbrain V., Lauwers M.H., Sarre S., Michotte Y., Zizi M., Camu F. (2006). Peripheral inflammation modifies the effect of intrathecal IL-1beta on spinal $PGE_2$ production mainly through cyclooxygenase-2 activity. A spinal microdialysis study in freely moving rats. Pain, 120(3): 307-14

71. Silness J., Löe H. (1964). Periodontal disease in pregnancy. Acta Odontologica Scandinavica, 22: 121-135

72. Stashenko P., Jandinski J.J., Fujiyashi P., Rynar J., Socransky S.S. (1991). Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. Journal of Periodontology, 62(8): 504-9

73. Stashenko P., Fujiyoshi P., Obernesser M.S., Prostak L., Haffajee A.D. & Socransky S.S. (1991). Levels of interleukin 1ß in tissue from sites of active periodontal disease. Journal of Clinical Periodontology, 18: 548-554

74. Sutherland E.R., Martin R.J., Ellison M.C., Kraft M. (2002). Immunomodulatory effects of melatonin in asthma. American Journal of Critical Care Medicine, 15;166(8):1055-61

75. Suwatanapongched P., Laohapand P., Suarit R., Ohmoto Y., Ruxrungtham K. (2000). IL-1β-level in gingival crevicular fluid of patients with active periodontitis. Asian pacific journal of allergy and immunology, 18(4): 201-7

76. Tatakis D.N. (1993). IL-1 and bone metabolism: a review. Journal of Periodontology, 64(5 Suppl.): 416-31 Review

77. Tsai C.C., Hoy P., Chen C.C. (1995). Levels of IL-1β and Il-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. Journal of Periodontology, 66(10): 852-9

78. Tsalikis L., Parapanisiou E., Bata_Kyrkou A., Polymenides Z., Konstantinidis A. (2002). Crevicular fluid levels of interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta during experimental gingivitis in young and old adults. Journal of International Academy of Periodontology, 4(1): 5-11

79. Tokoro Y., Yamamoto T. & Hara K. (1996). IL-1ß mRNA as the Predominant Inflammatory Cytokine Transcript: Correlation with Inflammatory Cell Infiltration into Human Gingiva. Journal of Oral Pathology and Medicine, 25: 225-231

80. Van der Velden U., & Abbas F. (1986). Probing considerations in relation to susceptibility to periodontal breakdown. Journal of Clinical Periodontology, 13: 894-899

81. Waschul B., Herforth A., Stiller-Winkler R., Idel H., Granrath N., Deinzer R. (2003). Effects of plaque, psychological stress and gender on crevicular IL-1beta and IL-1ra secretion. Journal of Clinical Periodontology, 30 (3): 238-48

82. Wiedemann W., Lahrsow J., Naujoks R. (1979). Über den Einfluss der parodontalen Resistenz auf die experimentelle Gingivitis. Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift, 34: 6-9

83. Wilton J.M., Bampton J.L., Hurst T.J., Caves J. & Powell J.R. (1993). Interleukin-1 beta and IgG subclass concentrations in gingival crevicular fluid from patients with adult periodontitis. Archives of Oral Biology, 38(1): 55-60

84. Yang G., Im H.J., Wang J.H. (2005). Repetitive mechanical stretching modulates IL-1beta induced COX-2, MMP-1 expression, and $PGE_2$ production in human patellar tendon fibroblasts. Gene, 19;363: 166-72

85. Yoshinari N., Kawase H., Mitani A., Ho M., Sugiishi S., Matsuka M., Shirozu N., Ishihara Y., Bito B., Hiraga M., Arakawa K., Nogucki T. (2004). Effects of scaling and root planning on the amounts of IL-1 and IL-1 receptor antagonist and the mRNA expression of IL-1β in gingival crevicular fluid and gingival tissues. Journal of Periodontal Research, 39(3): 158-67

## Lebenslauf

| | |
|---|---|
| Name: | Angela Bergmann |
| Geburtsdatum: | 3 Juni 1969 |
| Geburtsort: | Hamburg |
| Wohnort: | Düsseldorf |
| Familienstand: | ledig |
| Vater: | Dr. med. dent. Wolfgang Rolf Alexander Bergmann (15. März 1941), Zahnarzt |
| Mutter: | Kristine Elisabeth Dorothea Bergmann (19. Juni 1942), Lehrerin, Gesundheitsberaterin |
| Geschwister: | Annette Sophie Solzin (2. Juni 1973), Anwältin, Christoph Florian Bergmann (22. September 1977) Student der Medizin |

Schulbildung:

| | |
|---|---|
| 1975-1979 | Grundschule von Bodelschwingh, Düsseldorf |
| 1979-1989 | Ceciliengymnasium Düsseldorf, Abschluss Abitur |

Studienvorbereitende Maßnahme

| | |
|---|---|
| 01.08.-30.09.1989 | Auszubildende im Dentallabor Breuer, Haan |

Studiengang Zahnmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

| | |
|---|---|
| 01.10.1989 | Immatrikulation |
| 15.07.1997 | Zahnärztliche Approbation nach Staatsexamen |

Berufliche Tätigkeit als Zahnärztin

| | |
|---|---|
| 15.07.1997 | Angestellte Zahnärztin in der Praxis Dr. W. Bergmann |
| 01.11.2000 | Angestellte Zahnärztin im Gesundheitsamt in Krefeld |
| 15.08.2001 | Beginn einer Promotion an der Heinrich Heine- Universität Düsseldorf, Abteilung für Medizinische Psychologie, Professor Steingrüber |
| 16.04.2007 | Beginn der Weiterbildung zum Fachzahnärztin für Öffentliches Gesundheitswesen an der Akademie für Öffentliches Gesundheitswesen, Düsseldorf |

Düsseldorf, Juni 2007

**Zirkadianer Rhythmus von Interleukin-1 beta im Sulkus Fluid des Sulkus gingivalis**

Angela Bergmann

## Abstract

Die Analyse der lokalen Immunantwort im Sulkus gingivalis gibt Auskunft über Immunparameter, unter anderem IL-1β, die für die Ätiopathogenese der Parodontitis von Bedeutung sind. Studien mit Analysen der Konzentration von IL-1β haben in der parodontologischen Forschung zum besseren Verständnis der Pathogenese der Parodontitiden beigetragen. Während viele Studien die Bedeutung von IL-1β und seine Funktion als proinflammtorischem Zytokin in der Parodontologie beschreiben, fehlen Studien, die untersuchen, ob die Konzentrationen von IL-1β einer zirkadianen Rhythmik unterliegen. Diese Informationen sind für Konzeption, Planung und Finanzierung zukünftiger Studien zu IL-1β in der Parodontologie von großem Interesse.
Wenige Studien zu IL-1β in *ex vivo* stimulierten Vollblutproben weisen darauf hin, dass die Freisetzung im Allgemeinen und damit auch möglicherweise im Sulkus gingivalis einer zirkadianen Rhythmik unterliegt.
Mit der vorliegenden Arbeit sollte daher überprüft werden, ob sulkuläres Interleukin-1β einer zirkadianen Rhythmik unterliegt.
Die zirkadianen Variationen, die zwischen 8.00 morgens und 22.00 Uhr abends auftreten, sind dabei von besonderem forschungspraktischen Interesse.
Außerdem sollte berücksichtigt werden, dass sich zirkadiane Rhythmen möglicherweise in Abhängigkeit von der klinischen Ausgangssituation unterscheiden, daher werden im Split-mouth Design zirkadiane Rhythmen in Quadranten mit und ohne Plaqueakkumulation verglichen.
Insgesamt 28 gesunde Probanden, davon 12 weibliche und 16 männliche im Alter von 22 bis 47 Jahren wurden zu Beginn der Studie untersucht. Nach der Eingangsuntersuchung erfolgte eine professionelle Zahnreinigung, um für alle Probanden einen plaque- und entzündungsfreien Zustand zu erhalten und gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen. Nach dem Zufallsprinzip wurden die Quadranten mit Plaqueakkumulation bestimmt, die Probanden wurden angewiesen, die Mundhygiene in diesem Quadranten zu vernachlässigen. Mit den gewonnenen Daten sollten Erkenntnisse über die zirkadiane Rhythmik von IL-1β im Sulkus Fluid bei guter Mundhygiene als auch mit leichter Plaqueakkumulation gesammelt werden.
In Hinblick auf Studien über Konzentrationsveränderungen von IL-1β in Anwesenheit von mikrobieller Plaque wurde vermutet, dass in Quadranten mit Plaque im Vergleich zu Quadranten ohne Plaque höhere IL-1β -Konzentrationen im Sulkus gingivalis vorliegen. Es stellte sich allerdings die Frage, ob sich zirkadiane Rhythmen von sulkulärem IL-1β in Quadranten mit guter Mundhygiene von denen mit Plaque unterscheiden. Tatsächlich zeigte sich, dass sulkuläres IL-1β einer zirkadianen Variation mit Anstieg in den Abendstunden unterliegt. Außerdem ergaben sich tendenziell signifikante Interaktionen bei den Parametern Hygiene x Zeit x Geschlecht und Hygiene x Geschlecht.
Damit liefert die Studie Hinweise dafür, dass IL-1β im Sulkus Fluid einer zirkadianen Rhythmik unterliegt.