

Aus dem Medizinischen Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. U. Lotzmann
des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg



**Migration Inhibitory Factor und Prostaglandin E₂
bei experimenteller Gingivitis
in verschiedenen Altersgruppen**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

KRISTINA HELMS
aus Hildesheim

Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 23.10.2008.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Reiner Mengel

Korreferent: Prof. Dr. Richard Dodel

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Pathogenese der entzündlichen Parodontalerkrankungen	2
1.2	Prostaglandin E ₂	8
1.2.1	Eikosanoide	8
1.2.2	Arachidonsäurekaskade	9
1.2.3	Definition und Historie der Prostaglandine	11
1.2.4	Chemische Struktur und Wirkmechanismen	11
1.2.5	Biologische Aktivität	15
1.2.5	Die Rolle von PGE ₂ bei entzündlichen parodontalen Erkrankungen	18
1.3	Migration Inhibitory Factor	22
1.3.1	Definition und Historie	22
1.3.2	Chemische Struktur und Wirkmechanismen	22
1.3.3	Biologische Aktivität	24
1.3.4	MIF in Entzündungsprozessen	30
1.3.5	Korrelation MIF zu PGE ₂	38
1.4	Ziel der Studie	40
2.	MATERIALIEN UND METHODEN	41
2.1	Probanden	41
2.2	Studiendesign	42
2.3	Klinische Untersuchung	42
2.4	Immunologische Untersuchungen	44
2.4.1.	Bestimmung der Prostaglandin E ₂ –Konzentration	44
2.4.2	Bestimmung der MIF-Konzentration	45
2.5	Statistische Evaluation	46
3.	ERGEBNISSE	48
3.1	Klinische Ergebnisse	48
3.2	Immunologische Ergebnisse	54
3.2.1	Prostaglandin E ₂	54
3.2.2	Migration Inhibitory Factor	57
3.3	Korrelationen	60
4.	DISKUSSION	62
4.1	Diskussion der Methode	62
4.1.1	Untersuchungszeitraum und Probandenauswahl	62
4.1.2	Klinische Untersuchungsparameter	63

4.1.3 Die Gewinnung der Sulkusflüssigkeit	65
4.1.4 Der Enzymimmunoassay.....	71
4.2 Diskussion der Ergebnisse	75
5. SCHLUSSFOLGERUNG	80
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	81
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	82
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	110
9. ANHANG	112
9.1 Materialien und Laborgeräte.....	112
9.2 Tabellen und Abbildungen.....	113
9.3 Lebenslauf	122
9.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer	123
9.5 Danksagung	124
9.6 Ehrenwörtliche Erklärung.....	125

1. EINLEITUNG

In epidemiologischen Studien zeigte sich, dass die Prävalenz, das Ausmaß und die Schwere des parodontalen Attachmentverlustes mit zunehmendem Patientenalter anwachsen (Albandar et al.1999). Bei einer vergleichbaren Plaquesammlung steigt die Tendenz, eine Gingivitis zu entwickeln, von der frühen Kindheit bis zum Erwachsenenalter kontinuierlich an (Matsson 1978; Matsson & Goldberg 1985). Auch in experimentellen Gingivitisstudien konnten altersbedingte Unterschiede festgestellt werden, da die Plaquesammlung bei den älteren Probanden signifikant größer war (Holm-Pedersen et al.1975) und das Bluten nach Sondieren sich schneller entwickelte (Van der Velden et al.1985; Fransson et al.1996).

Neben diesen klinischen Parametern wurde in einer Tierstudie der Einfluss des Patientenalters auf die histologische Reaktion der gingivalen Gewebe auf Plaquesneubildung untersucht. Es wurden bei älteren Hunden qualitative und quantitative Veränderungen im Bindegewebe, Wurzelzement und Knochen festgestellt (Berglundh et al.1991). Die Zementschicht, gemessen auf Höhe des Knochenkammes und 1mm apikal davon, war bei den alten Hunden 5-10mal so breit wie bei den jungen Tieren, und das Kollagen-Fibroblasten-Verhältnis war bei den älteren Hunden signifikant höher. Alte und junge Tiere bildeten während einer 3-wöchigen Plaquesakkumulation zwar gleiche Plaquesmengen, allerdings waren die begleitenden gingivalen Läsionen bei den alten Hunden größer, weiter nach apikal ausgedehnt und enthielten mehr Plasmazellen (Berglundh & Lindhe 1993).

Diese Ergebnisse konnten auch am Menschen in experimentellen Gingivitisstudien bestätigt werden, da die entstandenen gingivalen Läsionen bei den älteren Probanden stärker ausgeprägt waren und einen höheren Anteil an B-Zellen und eine geringere Dichte an PMN-Zellen zeigten (Fransson et al.1999). Es liegt somit nahe, dass spezielle Wirtsabwehrmechanismen, die eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Parodontalerkrankungen spielen, altersabhängigen Veränderungen unterliegen. In dieser Hinsicht besitzt insbesondere **Prostaglandin E₂ (PGE₂)** eine große biologische Bedeutung, da es unter anderem Osteoklasten zur Knochenresorption aktiviert und durch seine vasodilatierende Wirkung die Gefäßpermeabilität erhöht (Nakashima et al.1994). Eine erhöhte PGE₂ -Konzentration in der Sulkusflüssigkeit und im gingivalen Gewebe konnte mit parodontalen Destruktionen in Verbindung

gebracht werden (Offenbacher et al.1981, 1984, 1989; Dewhirst et al.1983; Heasman et al.1993).

Auch **Migration Inhibitory Factor (MIF)**, der schon vor 40 Jahren als erstes Zytokin überhaupt *in vitro* isoliert wurde (Bloom & Bennett 1968; David 1966), könnte eine altersabhängige biologische Relevanz in der Entstehung von entzündlichen parodontalen Erkrankungen aufweisen. MIF wurde zunächst mit der Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ (*delayed hypersensitivity*) in Verbindung gebracht und gilt heute als ein wichtiger Mediator von Entzündungs- und Immunantworten (Calandra & Roger 2003). MIF zirkuliert im Serum physiologisch in einer Konzentration, die im Bereich des Glukokortikoids Cortisol (~3ng/ml) liegt. Genau wie bei Glukokortikoiden steigen die MIF-Konzentrationen vielfach bei Stress, Entzündung oder Infektionen deutlich an (Bernhagen et al.1998). MIF ist pathogenetisch mit einer Vielzahl von entzündlichen Krankheiten assoziiert (Baugh & Bucala 2002). Bei Patienten mit Gastritis, Hepatitis, Pankreatitis und entzündlichen Darmkrankheiten ist die MIF Konzentration sowohl im Serum als auch lokal im Gewebe deutlich erhöht (Ohkawara et al. 2005). Es findet sich zudem eine gesteigerte Expression an Entzündungsorten bei rheumatoider Arthritis und Glomerulonephritis (Leech et al.1999), wobei eine Korrelation zwischen MIF und PGE₂ bei Patienten mit rheumatoider Arthritis festgestellt wurde (Sampey et al. 2001). Aufgrund dieser Erkenntnisse könnte MIF durch seine proinflammatorische Wirkung auch bei einer entzündlichen Parodontalerkrankung mitbeteiligt sein. Zurzeit liegen jedoch noch keine Studien vor, die MIF in der Sulkusflüssigkeit oder im parodontalen Gewebe nachweisen.

1.1 Pathogenese der entzündlichen Parodontalerkrankungen

Die Hauptursache einer entzündlichen parodontalen Erkrankung stellt der mikrobielle Zahnbelag (Biofilm der Plaque) dar (Löe et al.1965). Der charakteristische pathogenetische Ablauf wird vom Zusammenwirken von Bakterien und wirtseigener Faktoren bestimmt.

Die Abläufe im Einzelnen wurden von Page und Schröder nach tierexperimentellen Studien in vier Stadien eingeteilt: die initiale Läsion, die frühe Läsion, die etablierte Läsion und die fortgeschrittene Läsion (Page & Schroeder 1976; Schroeder 1983).

Die **initiale Läsion** entwickelt sich im Bereich des Saumepithels innerhalb von wenigen Tagen nach Plaqueeinwirkung. Es existiert ein Entzündungsinfiltrat, das vorwiegend aus neutrophilen Granulozyten im Saumepithel und Lymphozyten im Bindegewebe, daneben aus Makrophagen und Monozyten besteht. Es nimmt etwa 5% des Bindegewebsvolumens ein. Exsudative und transsudative Flüssigkeit und Plasmaproteine treten in der Sulkusregion auf und bilden die Sulkusflüssigkeit. Es findet eine ständige Passage von neutrophilen Granulozyten durch das Saumepithel in den Sulkus statt, ausgelöst durch chemotaktische Faktoren des Immunsystems wie Interleukin-8 und Komplementfaktor 5a, sowie durch Produkte aus Bakterien, zum Beispiel Lipopolysaccharide. Eine Vaskulitis durch Dilatation des subepithelialen Gefäßplexus und die Bildung von Gefäßen, die nur eine Endothelwand haben, ist feststellbar. Weiterhin kommt es zur Zerstörung des perivaskulären Kollagens und zur Auflockerung des Sulkusbodens (Payne et al.1975).

Die **frühe Läsion** entwickelt sich innerhalb von 10 – 14 Tagen aus einer unbehandelten initialen Läsion und entspricht einer Gingivitis ohne Vorhandensein von echten Zahnfleischtaschen. Histologisch bleibt die Vasodilatation der subepithelialen Gefäße bestehen, deren Anzahl erhöht sich jedoch durch Öffnung von inaktiven Kapillarbetten. Es besteht ein starkes Lymphozyten- und Makrophagen-Infiltrat unmittelbar unterhalb des Saumepithels (Zachrisson 1968; Seymour et al.1983a; b; Schroeder et al.1973; Brex et al.1987).

Das Zellinfiltrat in diesem Stadium nimmt etwa 15% des Bindegewebsvolumens ein. Im Gegensatz zu Leukozyten (z.B. PMN), die in großer Anzahl ins Saumepithel und den Sulkus gingivae migrieren, lassen sich Plasmazellen nur in geringen Mengen nachweisen. Die Fibroblasten sind zumeist geschädigt, und es kommt zu einem weiteren Abbau der kollagenen Fasern (Seymour & Greenspan 1979; Lindhe et al.1980; Okada et al.1983; Brex et al.1987; 1988). Durch die beginnende Proliferation der Basalzellen dehnt sich das Saumepithel lateral ins Bindegewebe aus.

Die **etablierte Läsion** entwickelt sich spontan innerhalb von wenigen Wochen aus der frühen Läsion und entspricht dem Beginn einer Parodontitis. Sie kann jahrelang bestehen und ist bei entsprechender Behandlung reversibel. Das histologische Hauptcharakteristikum der etablierten Läsion ist das Dominieren von Plasmazellen vor allem im koronalen Anteil des Bindegewebes und um die Gefäße. Der Verlust von kollagenen Fasern dehnt sich sowohl nach lateral als auch nach apikal aus, und

das Entzündungsinfiltrat nimmt an Volumen zu. Das Saumepithel wandelt sich in ein Taschenepithel um, das von einem Leukozyteninfiltrat dominiert wird und durchlässiger wird. Es kommt zu einer hohen Migration von PMN und Immunoglobulinen durch das Bindegewebe und Saumepithel.

Nach lang andauernder Plaqueexposition entwickelt sich die **fortgeschrittene Läsion**. Sie ist charakterisiert durch die weitere Ausdehnung der entzündlichen und immunpathologischen Gewebsreaktionen. Die entstandenen Taschen vertiefen sich durch apikale Ausdehnung des Epithels aufgrund der anhaltenden Plaqueirritation. Das Entzündungsinfiltrat breitet sich im Bindegewebe weiter nach apikal und lateral aus. Das kollagene Bindegewebe und der umliegende Alveolarknochen werden in Granulationsgewebe umgewandelt. Auch in dieser Phase sind Plasmazellen der dominierende Zelltyp (Page & Schroeder 1976; Schroeder & Lindhe 1975; Seymour et al. 1979; Listgarten & Helldén 1978).

Der Verlauf fortgeschrittener Läsionen ist nicht kontinuierlich, sondern aktive (Exazerbation) und passive (Stagnation) Phasen treten abwechselnd und wiederholt auf (Goodson et al. 1982; Haffajee et al. 1983; Lindhe et al. 1983; Socransky et al. 1984). Während der aktiven Phase spielen sich im parodontalen Gewebe hochaktive Entzündungsprozesse ab, die u.a. zu einer Ulzeration der Taschenwand führen. Das Gewebe ist von zahlreichen PMN überschwemmt, und der angrenzende Alveolarknochen zeigt eine sehr hohe Osteoklastendichte. Es kommt zu einer deutlichen Vertiefung der Zahnfleischtasche und zum raschen Knochenabbau. Die passiven Phasen hingegen sind durch eine subakute Entzündung gekennzeichnet. Das Taschenepithel ist nicht ulzerös, und das entzündliche Infiltrat besteht vorwiegend aus Plasmazellen.

Diese von Page und Schröder im Jahr 1976 beschriebenen pathogenetischen Abläufe beruhen zumeist auf Tierstudien. Nachfolgende klinische Studien zeigten jedoch, dass das zeitliche Aufeinanderfolgen der verschiedenen Stadien sich beim Menschen von den Abläufen beim Tier unterscheidet (Brex et al. 1988).

Charakteristika der initialen und frühen Läsion treten beim Menschen bereits in der klinisch gesund erscheinenden Gingiva auf. Aufgrund dieser Diskrepanz zwischen klinischem Erscheinungsbild und klinischem Verlauf auf der einen Seite und der Histopathogenese auf der anderen Seite definierte Lindhe eine neue Klassifikation (Tab.1).

Klinische Bezeichnung	Histopathologischer Befund
Unversehrte Gingiva	Histologisch makellos
Normale gesunde Gingiva	Initiale Läsion von Page & Schröder
Frühe Gingivitis	Frühe Läsion von Page & Schröder (wenige Plasmazellen)
Etablierte Gingivitis	Etablierte Läsion ohne Knochenabbau und ohne Epitheltiefenwachstum (Plasmazellanteil zwischen 10% und 30% des Leukozyteninfiltrates)
Parodontitis	Etablierte Läsion mit Knochenabbau und Epitheltiefenwachstum (Plasmazelldichte >50%)

Tab.1 Klassifikation der histopathologischen Stadien von Gingivitis und Parodontitis (Lindhe 2003)

Die klinisch gesunde Gingiva erscheint blass-rosa mit girlandenförmigem Verlauf, matt glänzend, gestipelt, bei sanfter Sondierung nicht blutend und hat eine feste Konsistenz. Die Interdentalpapillen füllen den Raum unter den Kontaktpunkten vollständig aus. Ihr keratinisiertes orales Epithel geht kontinuierlich in das Saumepithel über und ist über Hemidesmosomen mit der Zahnoberfläche verbunden. Das Bindegewebe enthält kollagene Fasern, die den Geweben ihre Form verleihen und zusätzlich zur Verankerung an der Zahnoberfläche beitragen. Diese in Klinik und Histologie perfekte Gingiva definiert Lindhe als „unversehrt“. Dieses Stadium ist nur unter experimentellen Bedingungen mit mehrwöchigen, täglich überwachten Plaquekontrollen zu erreichen.

Die unter normalen Mundhygienebedingungen zu erzielende klinisch gesunde Gingiva weist das gleiche klinische Erscheinungsbild auf und wird von Lindhe als **normale gesunde Gingiva** bezeichnet. Histologisch entspricht dieses Stadium jedoch bereits der initialen Läsion von Page und Schröder. Im Gegensatz zum Tier, bei dem sich die ersten Entzündungszeichen innerhalb von wenigen Tagen nach Plaqueeinwirkung entwickeln, zeigen sich am Menschen bereits nach 24h erste histologische Veränderungen.

Lindhe beschreibt nach cirka einer Woche der Plaquebildung am Menschen die **frühe Gingivitis**, die histopathologisch mit den Veränderungen der frühen Läsion einhergeht. Klinisch können in diesem Stadium bereits Veränderungen festgestellt werden: Es imponieren leichte Farb-, Kontur- und Texturveränderungen (Rötung, Schwellung, glattglänzende Oberfläche) der betroffenen Gingivaanteile. Anfänglich sind die interdentalen Bereiche involviert.

Bei weiterer Plaqueexposition verstärkt sich der Entzündungsgrad, und es entwickelt sich eine **etablierte Gingivitis**, die histologisch einer etablierten Läsion ohne Knochenabbau und ohne apikale Migration des Saumepithels entspricht. Klinisch besteht eine Tasche, die sich auf den Bereich der Gingiva beschränkt (gingivale Tasche) und mit einem typischen Taschenepithel ausgekleidet ist. Ein Abbau des Knochens liegt noch nicht vor. Im Vergleich zur frühen Gingivitis findet sich eine verstärkte ödematöse Schwellung und eine erhöhte Exsudation in den gingivalen Sulkus. Die Stippelung der attached Gingiva kann in schweren Fällen verloren gehen.

Im Gegensatz zum Tierversuch zeigte sich bei Studien am Mensch, dass sich diese Phase erst nach sehr viel längerer Zeit unter Plaqueeinwirkung entwickelt. Wie von Page und Schröder beschrieben, ist die etablierte Läsion am Tier von Plasmazellen dominiert. Der Plasmazellanteil in humanen Biopsien beträgt nach einer sechsmonatigen Mundhygieneabstinenz aber lediglich 10% des zellulären Infiltrates und ist somit noch nicht der dominierende Zelltypanteil (Brecx et al. 1988). Demnach benötigt die humane etablierte Läsion erheblich mehr Zeit als diejenige beim Tier, um sich zu entwickeln. War das Dominieren von Plasmazellen Hauptcharakteristikum der etablierten Läsion am Tier, so findet sich in der etablierten Gingivitis beim Mensch eine Plasmazellichte von 10% bis 30% des Leukozyteninfiltrates und erst in der Parodontitis ein Anteil von über 50%.

Die fortgeschrittene Läsion entspricht in ihrem klinischen Erscheinungsbild einer **Parodontitis** und wird von Lindhe auch als solche definiert. Histopathologisch charakterisiert er diese als etablierte Läsion mit alveolärer Knochendestruktion und Migration des Saumepithels apikalwärts der Schmelz-Zement-Grenze. Das heißt, es zeigen sich alle Eigenschaften der etablierten Läsion mit dem Unterschied, dass sich das Saumepithel unterhalb der Schmelz-Zement-Grenze befindet, die Schädigung der apikal des Saumepithels im Zement inserierenden kollagenen Faserbündel stark zunimmt und Verlust von Alveolarknochen auftritt. Beim Menschen erreichen die Plasmazellen erst in dieser Phase einen Anteil von über 50%.

Die klinischen Anzeichen sind die Ausbildung von echten Taschen mit erhöhten Sondierungstiefen, Bluten auf Sondierung, Attachmentverluste sowie ein beginnender Knochenabbau, der sich röntgenologisch als horizontaler oder vertikaler Defekt darstellen kann.

Ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der Parodontitis sind die Substanzen von parodontopathogenen Bakterien, die die Immunantwort initiieren und steuern und deren anhaltende Präsenz entscheidend für die Aufrechterhaltung der Entzündung ist. Dennoch sind es endogene Moleküle, die den Entzündungsprozess vermitteln und eine wichtige Rolle in seiner Verstärkung und seines Fortbestehens sowie in der daraus folgenden Gewebeerstörung spielen (Page 1991). Es zeigte sich, dass bei Patienten mit Parodontitis in der Sulkusflüssigkeit, im Blutserum und im umliegenden Gewebe insbesondere IL-1 β (Masada et al.1990), IL-6 (Geivelis et al.1993) und TNF- α/β (Stashenko et al.1991) in höheren Konzentrationen vorliegen. In der Sulkusflüssigkeit und im gingivalen Gewebe ist die PGE₂ Konzentration bei parodontal erkrankten Patienten erhöht. Dabei scheinen insbesondere IL-1 β und PGE₂ wichtige Mediatoren bei der Immunabwehr zu sein, da ein deutlicher Zusammenhang zwischen erhöhten Konzentrationen und dem Abbau des Zahnhalteapparates bis hin zur Knochenresorption besteht (Stashenko et al.1991; Tatakis 1993, Offenbacher et al.1993b).

Auch TNF- α ist ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin, das den Abbau der Bindegewebsmatrix und Knochenresorption direkt stimuliert (Heasman et al.1993). Hohe Konzentrationen an IL-1 β und TNF- α werden somit mit aktivem Attachmentverlust und fortgeschrittener parodontaler Destruktion in Zusammenhang gebracht. IL-1 β , TNF- α und IL-8 können von Monozyten bzw. Makrophagen, PMNs, Keratinozyten und Fibroblasten exprimiert werden; die Hauptquelle in der Gingiva scheinen die Makrophagen zu sein (Matsuki et al.1991). IL-6 spielt eine wichtige Rolle in der T-Zell-Aktivierung und -proliferation und agiert synergistisch mit IL-1 β . IL-1 β und TNF- α wiederum sind die Hauptinduktoren von IL-6 und IL-8. T-Lymphozyten, die antigen- oder mitogenaktiviert sind, bilden zudem Lymphotoxin, welches an den gleichen Rezeptor wie TNF- α bindet und viele funktionelle Eigenschaften mit diesem teilt (Aggarwal et al.1985). IL-2 wird durch T-Zellen in Anwesenheit von Makrophagen gebildet und ist durch die Anregung der Proliferation aktivierter T-Zellen für das langfristige Heranwachsen von T-Zellen notwendig (Zafiroopoulos et al.1991b).

1.2 Prostaglandin E₂

1.2.1 Eikosanoide

Bei den nicht spezifischen Mechanismen der Immunreaktion des Organismus spielen besonders die Metaboliten des Arachidonsäurestoffwechsels eine wichtige Rolle, die unter dem Begriff **Eikosanoide** zusammengefasst werden können. Eikosanoide bilden eine Familie von bioaktiven Lipiden, die als Hormone wirken. Sie werden von allen Zellen des angeborenen Immunsystems (Granulozyten, Monozyten/Makrophagen) gebildet, sind aber auch in somatischen Zellen (Niere, Magen, Geschlechtsorganen usw.) nachweisbar (Funk 2001).

Chemisch betrachtet sind Eikosanoide die oxygenierten Derivate von hochungesättigten Fettsäuren mit einem Gerüst aus 20 Kohlenstoffatomen, typischerweise der Arachidonsäure (Bergstroem et al.1964). Zu den Eikosanoiden gehören:

- Prostaglandine
- Prostazykline
- Thromboxane
- Leukotriene
- Hydroxyfettsäuren

Dabei handelt es sich um biologisch hochpotente Verbindungen mit einem für jede Substanz typischen Wirkungsspektrum. Mit Einschränkungen werden die Vertreter dieser Substanzgruppe der Eikosanoide als Gewebehormone bezeichnet. Dies sind Substanzen mit hormonartiger Wirkung, die jedoch nur im Gewebeareal wirksam werden, wo sie auch biosynthetisiert werden. Die lokale Wirksamkeit ist auf die kurze Halbwertszeit zurückzuführen. Eikosanoide werden nicht in intrazellulären Kompartimenten gespeichert, sondern de novo auf einen entsprechenden Reiz hin synthetisiert. Der zelluläre Spiegel an freien Fettsäuren ist im Organismus sehr niedrig, so dass für die Eikosanoidbiosynthese erst eine Mobilisierung der Substratfettsäuren aus endogenen Speichern erforderlich ist. Von besonderer Bedeutung sind neben Triglyceriden und Cholesterolestern vor allem Phospholipide der Zellmembran. Sie enthalten je nach Zelltyp bis zu 40% Arachidonsäure, die enzymatisch durch Phosphatid-Acyl-Hydrolasen freigesetzt

werden kann (Clark et al.1991). Eine Aktivierung dieses Enzyms kann u. a. durch Schädigung der Zellmembran erfolgen.

Die biologische Wirkung der Eikosanoide ist rezeptorvermittelt. Sie wirken direkt auf das Erfolgsorgan sowie indirekt über andere Hormone oder intrazelluläre Signalsubstanzen wie cAMP oder Kalzium. Ihre Wirkung setzt zum Teil schon bei Konzentrationen von weniger als 1nmol/l ein. Der Plasmaspiegel der meisten Eikosanoide liegt unter Ruhebedingungen in einer Größenordnung von etwa 1pg/ml (Patrono et al.1986).

1.2.2 Arachidonsäurekaskade

Die Arachidonsäure wurde erstmals von Burr et al. (1930) als für den Organismus essentielle Fettsäure beschrieben. Sie ist eine mehrfach ungesättigte Fettsäure, die durch Phospholipasen aus Zellwandlipiden herausgelöst wird. Extrazellulär erfolgt unverzüglich der Abbau von Arachidonsäure über den enzymatischen Cyclooxygenaseweg zu Prostaglandinen (PG), Thromboxan (TX), Prostazyklin und über den Lipoxygenaseweg zu Leukotrienen und Hydroxyfettsäuren (Abb.1) (Smith & Lands 1972).

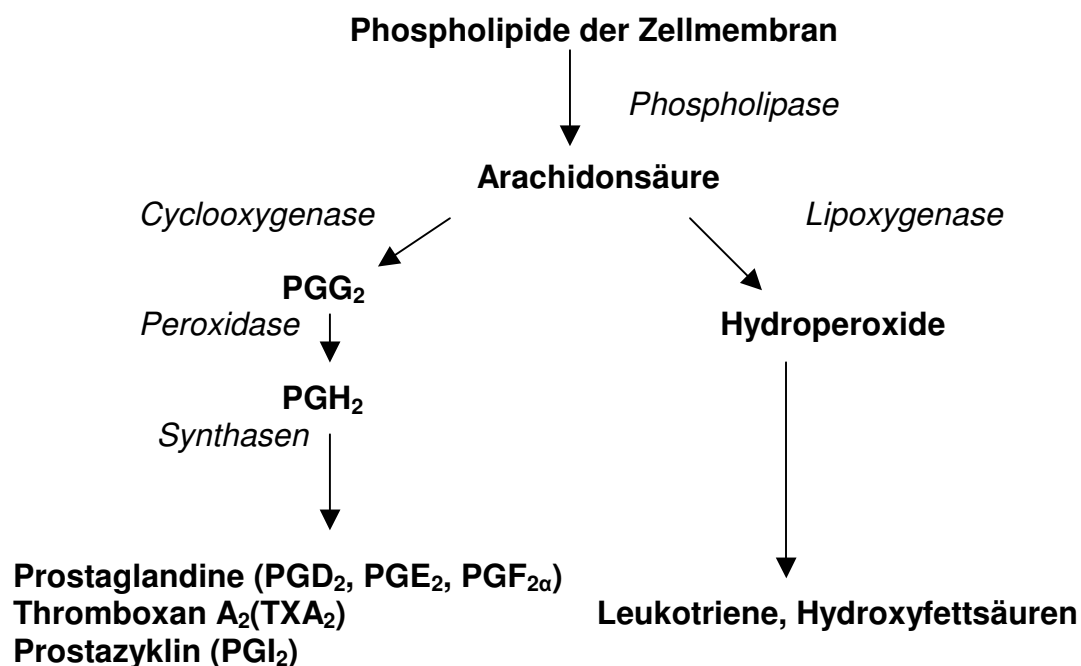


Abb.1 Arachidonsäurekaskade

Jeglicher Stimulus, der Zellmembranen stört oder beschädigt, löst eine solche Arachidonsäurekaskade aus. Diese Stimuli umfassen eine Vielzahl an Entzündungsgeschehen wie Endotoxin-Stimulation, Komplementfixation, Phagozytose, Zell-Lyse und Degranulation.

Unter Einwirkung der Cyclooxygenasen (Cox) wird die Arachidonsäure zum Prostaglandin-Endoperoxid metabolisiert und anschließend von verschiedenen Prostaglandin-Synthasen zu den Prostaglandinen E₂, D₂, F_{2a}, sowie dem Thromboxan und dem Prostazyklin umgewandelt. Diese wirken über spezifische Rezeptoren auf ihre Zielzellen, wobei die Thromboxane einen stimulierenden Effekt auf die Aggregation von Thrombozyten haben und die Prostazykline als Antagonisten des Thromboxans die wichtigsten endogenen Thrombozyten-Aggregationshemmer sind (Salmon & Higgs 1987).

Die Cyclooxygenasen, auch bekannt als Prostaglandin-H-Synthasen oder Prostaglandin-Endoperoxid-Synthasen, sind Fettsäureoxygenasen der Myeloperoxidasefamilie. Die wichtigsten Isoformen der Cyclooxygenase sind Cox-1 und Cox-2. Cox-1 wurde 1976 in Samenblasen beim Schaf und Rind entdeckt (Hemler & Lands 1976; Miyamoto et al. 1976). Das Klonen des Cox-1-Gens gelang 1988 (DeWitt & Smith 1988). Durch Studien zur Zellteilung wurde 1991 Cox-2 identifiziert (Xie et al. 1991). Wirbeltiere besitzen zwei Cox-Gene: Eines codiert die konstitutive Cox-1, das andere die induzierbare Cox-2. Die Cyclooxygenasen umfassen alle ungefähr 600 Aminosäuren und haben eine ähnliche Primärstruktur (Garavito et al. 2002). Cox-1 und Cox-2 teilen 60-65% Aminosäure-Identität miteinander. Ihre Lokalisation ist auf der lumenwärtigen Seite der Membran des Endoplasmatischen Retikulums und der Kernhülle (Coffey et al. 1997). In einigen Fällen konnten sie auch in Mitochondrien, Lipidkörpern, Filamentstrukturen und im Nukleus nachgewiesen werden (Bozza et al. 1997; Liou et al. 2000).

Cox-1 wird konstitutiv in fast allen Zellen exprimiert (DeWitt & Smith 1988) und dient der Aufrechterhaltung physiologischer Prozesse (z.B. gastroenterale Zytoprotektion, Regulation vaskulärer Funktionen und Koordination der Wirkungen zirkulierender Hormone). Bei Cox-2 handelt es sich um ein induzierbares Enzym, das bevorzugt in stimulierten inflammatorischen Zellen wie Monozyten (Morham et al. 1995), aber auch in malignen Zellen (Tucker et al. 1999) zu finden ist. Es wird unter dem Einfluss von bakteriellen Endotoxinen (Hempel et al. 1994), inflammatorischen Zytokinen (Jobin et al. 1998), Wachstumsfaktoren (Sasaki et al. 1998) und Mitogenen exprimiert. Cox-2

katalysiert vorwiegend die Synthese von Prostanoiden, die an Entzündungs- und Schmerzvorgängen beteiligt sind. Die Präsenz und katalytische Funktion einer dritten Isoform, Cox-3, wird noch kontrovers diskutiert (Botting 2000). Cox-3 wird als eine Acetaminophen-sensitive Variante angenommen. Sie scheint eine induzierbare Isoform von Cox1 zu sein, die im Gehirn und Herzmuskel hoch exprimiert wird (Chandrasekharan et al. 2002).

1.2.3 Definition und Historie der Prostaglandine

Die über den Cyclooxygenaseweg entstandenen Moleküle, Prostaglandine und Thromboxane, werden als Prostanoiden zusammengefasst, häufig vereinfacht aber auch nur Prostaglandine genannt. Diese Bezeichnungen gehen darauf zurück, dass die Entdeckung der Prostaglandine als saure, lipidlösliche Substanzen in der Prostata und in Samenbläschen von Schafen und Menschen durch von Euler (1934) und durch Goldblatt (1933) erfolgte und sie hierdurch irrtümlicherweise für ein Sekret der Prostata gehalten wurden.

Prostaglandine sind hormonähnliche Substanzen, die in nahezu allen Organen nachgewiesen werden können. Sie agieren als autokrine oder parakrine Lipidmediatoren und wirken somit direkt an ihrem Synthesepunkt oder in der unmittelbaren Umgebung (Funk 2001). Die Strukturaufklärung der Prostaglandine gelang 1962 durch Gaschromatographie, Massenspektroskopie und Röntgenstrukturanalyse (Bergstroem et al. 1963).

1.2.4 Chemische Struktur und Wirkmechanismen

Die Prostaglandine werden in 5 Hauptgruppen mit zahlreichen Untergruppen unterteilt. Ihnen gemeinsam ist als zentrales Strukturelement die Prostanoidsäure (Abb.2), die durch einen alizyklischen Fünfring gekennzeichnet ist.

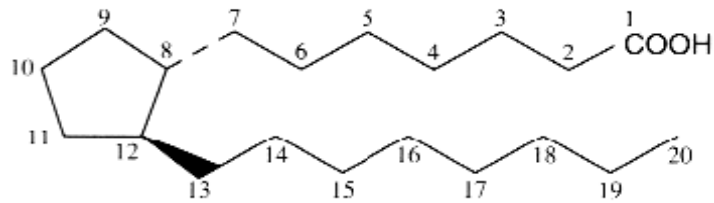


Abb.2 Struktur der Prostanoidsäure

Nach ihrer Substitution im Fünfring mit Oxo- und Hydroxy-Gruppen werden die Prostaglandine in die Reihen A-F eingeteilt. Durch zusätzliche, tief gestellte Ziffern wird die Zahl der Doppelbindungen in der Seitenkette bezeichnet. Prostazykline sind eine Untergruppe der Prostaglandine. Wird bei der Arachidonsäurekaskade durch die Thromboxan-Synthase der Fünfring des Prostaglandins H_2 geöffnet, gelangt man zum Thromboxan A_2 , das durch Hydrolyse des Epoxid-Rings in Thromboxan B_2 übergehen kann (Abb.3).

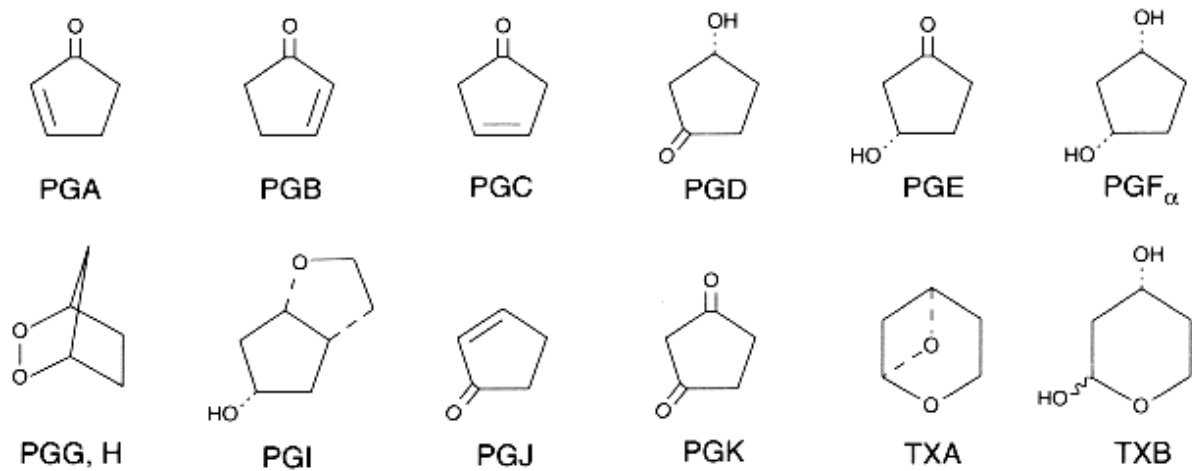


Abb. 3: Funktionelle Gruppen der wichtigsten Prostaglandine und Thromboxane

Im entzündeten Gewebe ist die Aktivität und Expression der Phospholipasen A_2 erhöht. Sie setzen aus den Zellmembranen Arachidonsäure frei, die als Substrat für Cox-1 dient und über die oben beschriebene Kaskade zu einer vermehrten Prostaglandinbildung führt. Wird bei diesem Überangebot an Arachidonsäure zusätzlich Cox-2 induziert, nimmt die Prostaglandinbildung erheblich zu. Am Entzündungsort entstehen auf diese Weise vermehrte Mengen an PGD_2 , PGE_2 ,

PGF_{2α}, TXA₂ und PGI₂. PGE₂, das über diesen Cox-2-Weg synthetisiert wurde, wird lokal in den extrazellulären Raum ausgeschüttet, wo es verschiedene biologische Systeme beeinflussen kann. Es wirkt entweder direkt auf das Erfolgsorgan oder indirekt über andere Hormone oder intrazelluläre Signalsubstanzen wie cAMP oder Calcium.

Neben der Entzündung wird die Produktion und Freisetzung der Prostaglandine durch neurale Reize, andere Mediatoren (z.B. Histamin), aber auch durch gastrointestinale Hormone (z.B. Gastrin) ausgelöst (Guo et al. 2002).

Einmal synthetisiert, haben Prostaglandine jedoch eine kurze biologische Halbwertszeit. Der Wirkungskreis ist entsprechend auf die Nachbarschaft des Syntheseursprungs beschränkt (Offenbacher et al. 1981).

Inzwischen ist es gelungen, die Rezeptoren für sämtliche Prostaglandintypen zu charakterisieren und zu klonieren. Die Prostanoidrezeptoren wurden anhand ihrer Spezifität für natürliche und synthetische Agonisten und Antagonisten sowie biochemisch durch ihre Kopplung an verschiedene G-Proteine (Guanin-Nucleotid-bindende Proteine) klassifiziert und in acht Gruppen unterteilt (Coleman et al. 1994). Danach existieren folgende Rezeptortypen: PGD₂-Rezeptor (DP-R), PGF_{2α}-Rezeptor (FP-R), PGI₂-Rezeptor (IP-R), Thromboxan A₂-Rezeptor (TP-R) und vier Subtypen von PGE₂-Rezeptoren: EP1-R, EP2-R, EP3-R, EP4-R, die von verschiedenen Genen codiert werden und sich in ihrer Größe und in ihrer G-Protein-Kopplung unterscheiden. Es sind kleine, membranassoziierte Proteine von circa 450 Aminosäuren, die durch sieben Transmembranhelices gekennzeichnet sind. Sie übertragen ihre vom Liganden ausgelöste Konformationsänderung auf G-Proteine, mit denen sie in der Membran vergesellschaftet sind. Die Belegung des PGE₂-Rezeptors aktiviert die G-Proteine, deren α-Untereinheit an ein Effektorprotein bindet und dessen Aktivität ändert. Bei der Adenylatcyclase als Effektorprotein führt die Aktivierung je nach Typ des G-Proteins zu einer Stimulierung bzw. Hemmung mit einer entsprechenden Veränderung der cAMP Konzentration, beim Phosphatidylinositol-Zyklus wird die zelluläre Kalziumkonzentration beeinflusst. Die meisten der diversen zellulären Antworten auf PGE₂ wurden traditionell der Adenylatcyclase-Aktivierung mit einem intrazellulären Anstieg von cAMP als second messenger zugeschrieben. Das cAMP aktiviert die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A, welche dadurch verschiedene Proteine, darunter Enzyme, phosphorylieren und den Funktionszustand der Proteine verändern kann. In vielen

Systemen dämpft eine Erhöhung von cAMP durch physiologische oder nicht-physiologische Stimuli bestimmte zelluläre und humorale Ereignisse (Offenbacher et al.1993b). Dieses führte zu der irrtümlichen Annahme, PGE₂ sei alleinig immunsuppressiv (Phipps et al.1991). Neuerdings wird diskutiert, dass der cAMP-Anstieg ein anderes primäres Signal zusätzlich verstärken könnte. Zum Beispiel kann PGE₂ allein die IgG1 Synthese in B-Zellen nicht stimulieren. In Gegenwart von LPS oder IL-4 fördert PGE₂ jedoch einen 26-fachen Anstieg der IgG1 Synthese (Roper et al.1990). Es gibt viele Beispiele von PGE₂ als Synergist zu Wachstumsfaktoren oder katabolischen Signalen. PGE₂ verstärkt unter anderem die Schmerzantwort auf Bradykinin, die Knochenresorptions-Antwort auf IL-1 β oder TNF α und die Fieberreaktion auf IL-1 α (Offenbacher et al.1993b). In all diesen Umständen ist PGE₂ alleinig kein potenter Auslöser für die beobachteten biologischen Reaktionen, aber indem es die cAMP-Konzentration erhöht, dient dieses Prostaglandin als ein gestattender Aktivator der Genexpression oder als ein synergistischer Verstärker von anderen primären Zellsignalen. Die hierfür benötigten Konzentrationen sind im Allgemeinen viel niedriger als diejenigen, bei denen PGE₂ eine direkte agonistische Aktivität aufweist. Beispielsweise induzieren ng/ml-Konzentrationen an PGE₂ bei der Anwesenheit von ng/ml-Konzentrationen an IL-1 β ebenso große Knochenresorptionswirkungen wie μ g/ml Titer von PGE₂ allein (Dewhirst et al.1987). Das Erreichen von intrazellulären Schwellenwerten an cAMP könnte auch kritisch für die Expression von bestimmten Genen sein (Roesler et al.1988). Einige regulatorische Gene, welche die Transkription von anderen Genen anregen, benötigen erhöhte cAMP-Konzentrationen für ihre Aktivität. Diese Gene beinhalten den IL-2 Rezeptor, die Klasse I und II MHC Gene, ebenso wie die Gene für IL-1 β , IL-6 und TNF α (Lenardo & Baltimore 1989).

Aus all diesen Beispielen wird klar, dass andere Faktoren den Vektor liefern, der die Richtung der biologischen Reaktion bestimmt, und dass PGE₂ über den Mechanismus des cAMP-Anstiegs im Prinzip dazu dient, die Größe dieser Antwort zu erhöhen (Offenbacher et al.1993). PGE₂ kann somit einerseits verschiedene biologische Systeme, im Allgemeinen durch Erhöhung von intrazellulären Konzentrationen an cAMP, direkt beeinflussen oder über den oben beschriebenen Mechanismus andere Signale verstärken.

1.2.5 Biologische Aktivität

Prostaglandin E_2 als Hauptmetabolit der Arachidonsäure kann von den meisten Zellen produziert werden. Makrophagen, die durch Lipopolysaccharide stimuliert worden sind, stellen eine wichtige Quelle von PGE_2 dar (Lindemann et al.1988). Zusätzlich produzieren diese LPS-stimulierten Makrophagen IL-1 und $TNF\alpha$, welche wiederum Fibroblasten zur Sekretion von PGE_2 stimulieren (Alexander et al.1996). Weitere Quellen des PGE_2 sind Monozyten, z. T. auch Antigen präsentierende Zellen (APC), Fibroblasten und Endothelzellen. Neutrophile Granulozyten besitzen keine Cyclooxygenase und können weder Prostaglandine noch Thromboxane in Abwesenheit von Thrombozyten herstellen (Offenbacher et al.1993). Thrombozyten hingegen haben sowohl Lipoxygenase- als auch Cyclooxygenase-Aktivität. Verschiedene Zelltypen können interagieren und Substrate transferieren, beispielsweise können Prostaglandin-Endoperoxide von Thrombozyten auf Makrophagen übertragen werden (Smith et al.1987). Thrombozyten funktionieren als kleine Päckchen von Cyclooxygenase, Arachidonsäure und TxA_2 -Synthase, die bei ihrer Aktivierung mit anderen Zellen wie Neutrophilen oder Monozyten fusionieren und ihnen ihre Enzyme und Substrate abgeben (Marcus et al.1987). Wenn Thrombozyten also während eines Entzündungsprozesses aktiviert werden, sind sie eine wichtige potentielle Quelle von freier Arachidonsäure für die PGE_2 -Synthese, zumal sie 8-mal mehr Arachidonsäure als Neutrophile oder Monozyten enthalten (Offenbacher et al.1993).

Prostaglandine wirken bereits in sehr geringen Konzentrationen auf eine Vielzahl physiologischer Prozesse.

- $PGF_{2\alpha}$ ist zusammen mit PGE_2 an der Regulation der Uteruskontraktilität während der Schwangerschaft beteiligt (Kelly 1981).
- PGD_2 hemmt die Plättchenaggregation in vitro durch den cAMP Anstieg (Watanabe et al.1982) und besitzt möglicherweise neuromodulatorische Eigenschaften (Shimizu et al.1979).
- PGE_2 und PGI_2 wirken vasodilatatorisch und TXA_2 und $PGF_{2\alpha}$ vasokonstriktorisch. Zudem sind die Prostaglandine an der Regulation der Körpertemperatur, der Neurotransmission, der Regelung des ovariellen Zyklus, der Thrombozytenaggregation (TXA_2 , PGI_2), der Bronchokonstriktion (PGD_2 , $PGF_{2\alpha}$, TXA_2 , PGG_2) und Bronchodilatation (PGE_2 , PGI_2), der Magenschleim- und

Magensäurebildung (PGE₂, PGI₂) und an vielen weiteren physiologischen Prozessen beteiligt. Außerdem vermitteln sie auch pathophysiologische Prozesse wie Fieber und spielen eine aktive Rolle bei der Schmerzauslösung und –empfindung, indem sie unter anderem Histamin-vermittelten Schmerz potenzieren.

Insbesondere Prostaglandin E₂ (PGE₂) besitzt eine große biologische Bedeutung mit diversen proinflammatorischen und immunmodulatorischen Effekten. Es ist ein potenter Vasodilatator (Vane 1976), Aktivator von monozytischer und fibroblastischer Kollagenase-Sekretion und bei hohen Titern ein Mediator der Knochenresorption (Klein & Raisz 1970). Weiterhin beeinflusst PGE₂ die Freisetzung von Metallproteinasen (z.B. Kollagenasen) aus Makrophagen/ Monozyten (Wahl et al.1977) und die Entstehung eines Entzündungsinfiltrates durch eine stimulierende Wirkung auf die Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten (Garrone et al.1994). Durch unterschiedliche molekulare Aktivitäten kann PGE₂ suppressiv oder stimulierend auf die Wirtsabwehr wirken.

Die vasoaktiven Effekte von PGE₂ können durch synergistische Interaktionen mit anderen Entzündungsmediatoren wie Bradykinin, Spaltfragmenten der Komplementkaskade und Histamin gesteigert werden (Williams & Downing 1977). Zusammen mit Bradykinin, Histamin und Substanz P ist PGE₂ an der Entstehung der Entzündungssymptome Schmerz (*dolor*), Erythem (*rubor*), Temperaturerhöhung (*calor*), Schwellung (*tumor*) und Funktionsstörung (*functio laesa*) beteiligt.

PGE₂ erhöht auch die Entzündungszellinfiltration, nicht als ein „Chemoattractant“, also eine Substanz, die Zellakkumulation auslöst, sondern durch die Verhinderung des Wegflusses von Neutrophilen und anderen Entzündungszellen, die an die Stelle der Entzündung durch Chemoattractants wie Leukotrien B₄ (LTB₄) oder Komplementfaktor C5 angelockt wurden. Am Entzündungsort kann PGE₂ die neu angezogenen Neutrophilen stabilisieren, um einer vorzeitigen Degranulation vor der bakteriellen Konfrontation vorzubeugen (Offenbacher et al.1993b).

Prostaglandine, insbesondere PGE₂, werden im Knochen gebildet und haben weitreichende Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel (Raisz et al.1993). In Knochenkulturen und in vivo stimuliert PGE₂ die osteoklastische Knochenresorption durch Erhöhung der Replikation und Differenzierung neuer Osteoklasten (Chambers & Dunn 1983). Dieser Effekt ist assoziiert mit erhöhten cAMP-Konzentrationen ebenso wie mit einer gesteigerten Osteoklastenzahl, welche erhöhte Aktivität und Mobilität zeigt (Dziak 1993). Die Komplementaktivierung entweder über den

klassischen oder den alternativen Weg kann über einen PGE₂-abhängigen Mechanismus Knochenresorption induzieren (Sandberg et al.1977). Die Zerstörung der extrazellulären Matrix des Bindegewebes wird weitestgehend der lokalen Wirkung von Metalloproteinasen (MP) zugeschrieben, welche Kollagenasen aus Fibroblasten, Makrophagen und Neutrophilen einschließen (Overall et al.1987; Heath et al.1982). Die Produktion und Freisetzung von MP ist eng reguliert über die Aktivierung von MP- Genen unter dem Einfluss von Zytokinen wie TNF α und IL-1 β (Meikle et al.1989). Diese Zytokine stimulieren die MP-Freisetzung über einen PGE₂-abhängigen Mechanismus. Niedrige Titer an PGE₂ müssen für eine optimale MP-Freisetzung vorherrschen. Die Freisetzung von IL-1 β und TNF α sowie die MP-Genaktivität werden durch hohe Konzentrationen an PGE₂ unterdrückt. Über letzteren Mechanismus scheinen hohe PGE₂-Konzentrationen eine Rolle als Feedback-Hemmer zu haben, um das Ausmaß der extrazellulären Matrix-Degradation bei parodontalen Erkrankungen zu kontrollieren. Auch auf die Knochenbildung haben Prostaglandine konzentrationsabhängige Effekte. Bei niedrigen Konzentrationen oder bei Vorhandensein von Glukokortikoiden wird die Replikation und Differenzierung von Osteoblasten stimuliert und damit die Knochenbildung gesteigert. Bei hohen Konzentrationen an Prostaglandinen wird die Kollagensynthese jedoch gehemmt (Raisz et al. 1993).

Auch zwischen PGE₂ und IL-1 konnte ein eng reguliertes Zusammenspiel aufgezeigt werden. IL-1 reguliert die PGE₂-Synthese durch Makrophagen nach oben.

Umgekehrt schwächen erhöhte PGE₂-Titer die IL-1 β Ausschüttung und Produktion ab (Kunkel & Chensue 1985). Somit kann IL-1 seine eigene Produktion durch einen selbst-induzierten Inhibitor, dem Prostaglandin E₂, regeln (Bernzweig et al.1998).

Wenn Cyclooxygenase-hemmende Wirkstoffe wie Indomethacin verabreicht werden, kann die IL-1- Synthese durch abnehmende Arachidonsäure-Metaboliten wie PGE₂ ansteigen (Kunkel & Chensue 1986).

Während die proinflammatorische Rolle der Prostaglandine in zahlreichen Untersuchungen nachgewiesen wurde, stützen neuere Studien die Hypothese, wonach Prostaglandine in der späten Phase auch für die Auflösung einer Entzündung bedeutsam sind (Yin et al. 2007). Am Beispiel einer induzierten Pleuritis zeigten Gilroy et al. (1999) einen zeitlichen Zusammenhang zwischen einem frühen PGE₂ Gipfel mit der Induktion der Cox-2 Expression und der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das Entzündungsgebiet auf. Nach 48h folgte eine noch

stärkere Cox-2 Induktion, die sich mit der Auflösung der Entzündung deckte und mit minimaler PGE₂ Synthese, dafür aber mit einem Peak von PGD₂ und PGI₂, assoziiert war. Somit scheint die Rolle von Cox-2 in der Entzündungsreaktion komplexer als bisher angenommen.

Zusammengenommen spielt PGE₂ nicht nur in der Entzündungsreaktion, sondern auch in der Zerstörung von Bindegewebe und Knochen eine wichtige Rolle (Tsai et al.1998). Die verschiedenen Zellantworten auf PGE₂ können zu der Annahme führen, dass dieser Mediator fähig ist, sowohl eine unterdrückende als auch eine stimulierende Rolle im Verlauf einer Entzündung auszuüben (Offenbacher et al.1993b).

1.2.5 Die Rolle von PGE₂ bei entzündlichen parodontalen Erkrankungen

Zahlreiche Untersuchungen belegen die Wichtigkeit der Arachidonsäureprodukte, vor allem der Prostaglandine, bei der Gewebeerstörung im Rahmen entzündlicher Parodontalerkrankungen (Offenbacher et al.1993b; Inada et al. 2006).

Prostaglandine, besonders PGE₂, sind in entzündetem parodontalen Gewebe sowie in der Sulkusflüssigkeit zu finden (Goodson et al 1974; Rifkin & Tai 1981; Tsai et al. 1998). Makrophagen und Fibroblasten stellen die Hauptquellen für Prostaglandine im parodontalen Gewebe dar (Loning et al.1980; Lindemann et al.1988).

Zahlreiche klinische Studien haben gezeigt, dass die Konzentration an Prostaglandin E₂ in der Sulkusflüssigkeit und im Gewebe als ein Marker des Entzündungsgrades angesehen werden kann (Albers et al.1979; Ohm et al.1984; Tsai et al.1998). Es ist ein progressiver Anstieg von PGE₂ in der Sulkusflüssigkeit mit der Schwere der PA-Erkrankung zu beobachten (Heasman et al.1993; Offenbacher et al.1984, 1986; 1989). So zeigte sich ein 2-phasiger Anstieg von PGE₂ -Titern im Sulkusfluid. Die erste Erhöhung war mit dem Übergang von Gesundheit zu Gingivitis assoziiert. Im gingivalen Bindegewebe von Patienten mit Gingivitis wurden 10fach höhere PGE₂ Level nachgewiesen als im Gewebe von parodontal gesunden Kontrollpersonen (Goodson et al.1974).

Die zweite Phase des Anstiegs mit 3- bis 6-facher Steigerung gegenüber der Konzentration bei Gingivitis ging mit Attachment- und Knochenverlust einher (Offenbacher et al.1993b). In experimentellen Studien konnte von exogen in den

gingivalen Sulkus hinzugefügtes PGE₂ die Anzahl und die Aktivität der Osteoklasten steigern und alveolären Knochenverlust verursachen (Miyachi et al.1992).

Die Korrelation des PGE₂ Levels mit klinischen Parametern wurde in einer Longitudinalstudie an 41 Patienten mit Erwachsenen-Parodontitis untersucht. Es zeigte sich, dass an den Zahnflächen mit Attachmentverlusten signifikant erhöht PGE₂ in der Sulkusflüssigkeit vorlag, wobei insbesondere in aktiven Taschen die Konzentrationen am höchsten waren (Offenbacher et al. 1986). In einer anderen Studie konnte bei Patienten mit Juveniler Parodontitis in der Sulkusflüssigkeit ein dreimal höherer PGE₂ Level als bei Patienten mit Erwachsenen-Parodontitis festgestellt werden, wobei eine deutliche Korrelation zwischen dem Grad der Erkrankung und dem PGE₂ Level bestand (Offenbacher et al.1984).

Der Einfluss einer parodontalen Behandlung (subgingivales Scaling und Wurzelglättung) auf den PGE₂ Level in der Sulkusflüssigkeit wurde bei Patienten mit Erwachsenen-Parodontitis deutlich. Nach der Behandlung war eine Abnahme der zuvor erhöhten PGE₂ Level feststellbar (Offenbacher et al.1984). Bei Patienten ohne deutliche Reduktion des PGE₂ Levels lagen erhöhte Attachmentverluste vor (Offenbacher et al. 1993b). Eine Abnahme der PGE₂ Konzentration sowohl in der Sulkusflüssigkeit als auch im Blutplasma konnte nach chirurgischer Therapie bei Parodontitis-Patienten beobachtet werden (Leibur et al.1999).

Bereits 1979 zeigten Albers und Löning eine erhöhte Prostaglandinkonzentration in entzündlich veränderter Gingiva im Vergleich zu gesunder Gingiva. Eine Senkung des Prostaglandinspiegels wurde bei einer Anzahl von Patienten mit Gingivitis beobachtet, die 5 Tage eine Mundspüllösung mit 0,1%-tiger Acetylsalicylsäure verwendeten. Ein signifikanter Anstieg der PGE₂ Level in der Sulkusflüssigkeit nach 14 bzw. 28 Tagen ohne Mundhygiene wurde in experimentellen Gingivitisstudien beschrieben (Nonnenmacher 2004; Heasman et al. 1993). Hierbei konnte eine Abnahme des PGE₂-Levels in der Sulkusflüssigkeit bei Patienten nach 11-tägiger Spülung mit 2x10 ml Acetylsalicylsäurelösung pro Tag beobachtet werden (Nonnenmacher 2004).

Da die Cox-2-Expression in Geweben mit erhöhtem Level an Entzündungsinfiltraten gesteigert ist, konnten auch in parodontalen Geweben eine Cox-2 Expression in Endothelzellen, Gingivaepithel sowie in Zellen mit Fibroblasten-Morphologie gefunden werden (Siegel et al. 2007). In vitro Studien haben gezeigt, dass gingivale Fibroblasten nicht ständig Cox-2 exprimieren. Wenn diese Zellen jedoch mit IL-1β

oder Bakterien (z.B. *Aggregatibacter actinomycetem comitans*) in Kontakt gebracht werden, werden sowohl die Cox-2 Expression als auch die Aktivität nach oben reguliert (Morton & Dongari-Bagtzoglou 2001; Noguchi et al. 2003). Dies bestätigt Studien, die die Induktion der Produktion von Prostaglandinen durch Makrophagen und Fibroblasten durch IL-1 nachgewiesen haben (Richards & Rutherford 1988; Knudsen et al. 1986).

PGE₂ kann suppressiv oder stimulierend auf die Wirtsabwehr wirken. Hierzu wird die entscheidende Rolle für PGE₂ in parodontalen Erkrankungen nicht nur in der Knochenresorption gesehen (Page 1991). Auch die Fähigkeit, die Produktion von IL-1 und TNF α zu unterdrücken und somit die Schritte kontrollieren zu können, die diese beiden Zytokine initiieren und unterhalten, stellt eine wichtige Interventionsmöglichkeit für PGE₂ im parodontalen Geschehen dar. Diese umfassen beispielsweise die Beteiligung an der Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten an den Ort der Entzündung und an der Formation neuer Osteoklasten aus Vorläuferzellen sowie der Aktivierung reifer Osteoklasten zur Knochenresorption (Pfeilschifter et al. 1988; Mundy 1989). Die genaue Intervention von PGE₂, IL-1 β und TNF- α in den Mechanismus der Knochenresorption konnte durch die Entdeckung von RANKL („Receptor activator of nuclear factor-kappa-B ligand“) verstanden werden (Suda et al. 1999). Bis zu der Entdeckung von RANKL war bekannt, dass es unter dem Einfluss von proresorptiven Signalmolekülen wie Parathormon und inflammatorischen Zytokinen zur Entstehung osteoklastärer Zellen kommt. Der unmittelbare Kontakt der hämatopoetischen Zellen mit den mesenchymalen Zellen war notwendig für die Differenzierung zu Osteoklasten (Suda et al. 1992). RANKL ist nun der membranständige Rezeptor der mesenchymalen Zellen, der von diesen als Antwort auf die Signalmoleküle exprimiert wird und die Differenzierung der hämatopoetischen Zellen zu Osteoklasten vermittelt (Suda et al. 1999). In parodontalen Geweben bewirken chronische Entzündungen eine vermehrte Expression von RANKL in T-Zellen und B-Zellen (Kawai et al. 2006).

Inflammatorische Signalmoleküle wie PGE₂, IL-1 β und TNF- α können direkt die Genese und Aktivität von Osteoklasten forcieren, indem sie die Wirkung von RANKL verstärken (Wei et al. 2005). Indirekt können sie das Expressionsgleichgewicht der Ligamentzellen zugunsten von RANKL verschieben (Nukaga et al. 2004). RANKL kann, insbesondere bei entzündlichen Vorgängen, von der Zellmembran abgespalten werden und dadurch seinen Wirkungsbereich erweitern. Diese gesteigerte Freisetzung

von RANKL spiegelt sich in der Sulkusflüssigkeit von Patienten mit Parodontitis wider (Mogi et al. 2004). Insbesondere PGE₂ kann über zwei verschiedene, RANKL-abhängige Wege die osteoklastische Knochenresorption stimulieren: erstens über die Induktion der Expression von RANKL in Osteoblasten, zweitens über die direkte Steigerung der RANKL-induzierten Differenzierung von osteoklastischen Vorläuferzellen zu reifen Osteoklasten (Kobayashi et al. 2005). Bei erhöhten Konzentrationen von PGE₂ bei entzündlichen Erkrankungen wie Parodontitis oder rheumatoider Arthritis kann so über diese RANKL-abhängigen Wege die osteoklastische Knochenresorption gesteigert werden.

Alle oben aufgeführten Studienergebnisse zeigen, dass zeitliche Veränderungen von PGE₂ in der Sulkusflüssigkeit empfindliche Vorhersager für zukünftigen Verlust von klinischem Attachment sind (Offenbacher et al. 1986). Dies führte zu der Bestimmung eines Schwellenwertes von 66,2 ng/ml als die Durchschnittskonzentration, deren Überschreiten die Wahrscheinlichkeit, innerhalb der folgenden 6 Monate eine Episode von Attachmentverlust zu erleiden, um das 47fache erhöht (Offenbacher et al. 1993a; 1993b). Ein PGE₂-Durchschnittstiter von 610 ng/ml in der Sulkusflüssigkeit könnte einen akuten Attachmentverlust von 1 mm/Jahr induzieren (Offenbacher et al. 1991). Allerdings geben Heasman et al. 1993 zu bedenken, dass PGE₂-Titer im Sulkusfluid von ca. 50 ng/ml eher eine Widerspiegelung der oberflächlichen Entzündung der Gingiva darstellen als eine progressive Läsion des Attachmentapparates.

Aufgrund dieser Ergebnisse scheint in der Diagnostik von parodontalen Erkrankungen die Bestimmung des PGE₂ Levels sowohl in der Sulkusflüssigkeit als auch im parodontalen Gewebe ein guter Indikator für die parodontale Gewebsdestruktion zu sein. Weiterhin kann eine abgelaufene aktive Erkrankungsphase zuverlässig angezeigt und ein bevorstehender Attachmentverlust vorausgesagt werden. Welche Rolle die Prostaglandine jedoch in der Pathogenese von parodontalen Erkrankungen spielen, ist zurzeit noch nicht bekannt.

1.3 Migration Inhibitory Factor

1.3.1 Definition und Historie

Der Makrophagen Migrations-Inhibierende Faktor („Macrophage migration inhibitory factor“, MIF) konnte schon vor 40 Jahren als erstes Zytokin überhaupt *in vitro* isoliert werden (Bloom & Bennett 1968; David 1966). Er wurde als ein von T-Lymphozyten sezerniertes Zytokin im Zusammenhang mit der Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ entdeckt. *In-vitro*-Versuche zeigten damals, dass die Applikation eines von T-Lymphozyten stammenden, zellfreien Mediums die Wanderungsgeschwindigkeit von Peritoneal-Makrophagen des Meerschweinchens aus Glaskapillaren reduzierte (Bloom & Bennett 1966). Der dafür verantwortlich gemachte Faktor wurde Makrophagen Migrations-Hemmstoff genannt (Nathan et al.1971). Im Gegensatz zu anderen Zytokinen verzögerte sich die Klonierung des Gens bis Ende der 80er Jahre (Weiser et al.1989), und erst 1994 konnte die Reinigung, Bestimmung der Bioaktivität und Sekundärstruktur des murinen und humanen Proteins vorgestellt werden (Bernhagen et al.1994). In der Folge des Klonens und der Expression von rekombinantem Protein und der Entwicklung von spezifischen anti-MIF-Antikörpern wurde offensichtlich, dass MIF ein wichtiger Regler von Entzündungs- und Immunantworten ist (Baugh & Bucala 2002) und eine wichtige Rolle in der Regulierung sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems spielt.

1.3.2 Chemische Struktur und Wirkmechanismen

Es gibt nur ein MIF Gen im menschlichen Genom, das auf Chromosom 22 lokalisiert ist (Esumi et al.1998). Es ist sehr klein (< 1kb) und besteht aus drei Exons, die durch zwei kleine Introns getrennt sind.

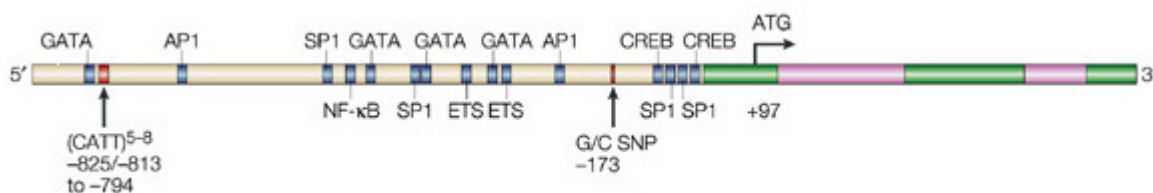


Abb.4: Struktur des humanen MIF-Gens. Die drei Exons (grüne Bereiche) bestehen aus 107, 172 und 66 Basenpaaren, die zwei Introns (rosa Breiche) aus 188 und 94 Basenpaaren (nach Calandra und Roger 2003).

Im Gegensatz zum humanen MIF-Gen wurden mindestens 9 Pseudogene im Genom der Maus gefunden (Kozak et al.1995; Bozza et al.1995).

Das einzige Gen im menschlichen Genom mit einer merklichen Homologie zum MIF-Gen ist D-Dopachrom-Tautomerase (DDT). Da beide Gene sehr nah auf Chromosom 22 lokalisiert sind, wurde spekuliert, dass die MIF und DDT Gene Duplikationen eines gemeinsamen Stammgens sein könnten, die sich unterschiedlich weiterentwickelt und verschiedene biologische Funktionen haben (Esumi 1998).

Eine einzige MIF mRNA Art von ~0,8kb wurde beim Menschen, Ratten und Mäusen gefunden. Diese codiert das MIF-Protein, das aus 114 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 12,5kDa hat. Diese Struktur wurde mit Hilfe der Röntgen-Kristallographie ermittelt (Sun et al.1996).

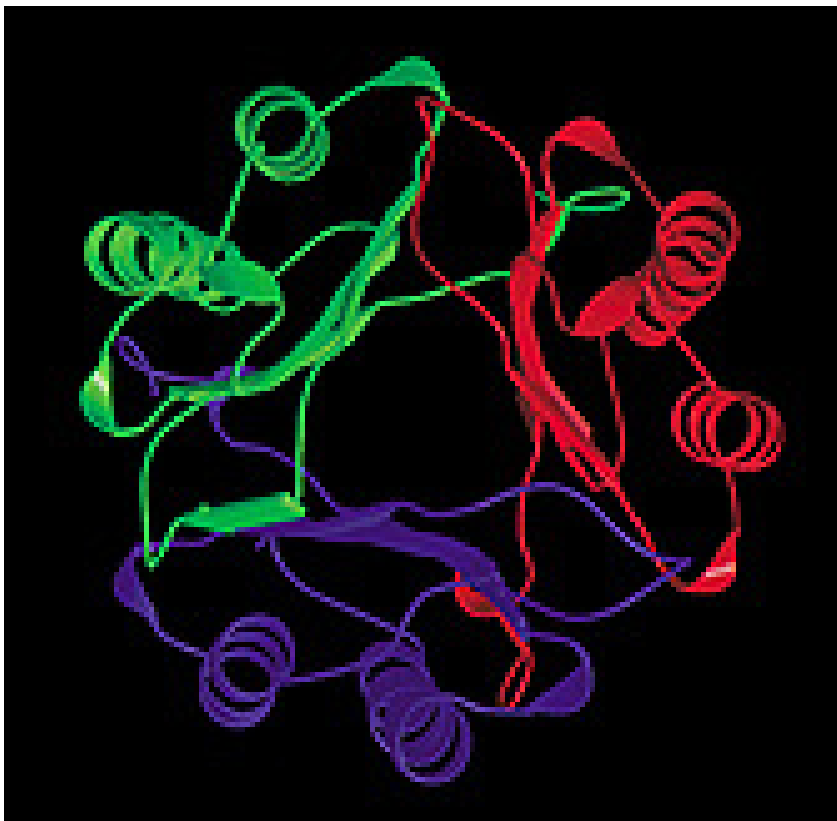


Abb.5: Dreidimensionale Struktur des MIF-Proteins mit farblicher Kennzeichnung der einzelnen Untereinheiten. Die α -Helices sind als Spiralen dargestellt, die β -Faltblätter als Pfeile. Ansicht von oben auf den Kanal (freundl. überlassen von PD Dr. Bacher).

Das physiologisch aktive MIF ist eine α/β Struktur und existiert als Homotrimer aus drei identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von insgesamt 37,5 kDa und den Maßen 35 Å x 50 Å x 50 Å (Abb.5). 6 α -Helices umgeben drei β -Stränge, welche eine Art Rohr formen, das einen flüssigkeitszugänglichen Kanal enthält. Er ist

innen positiv geladen, was auf eine mögliche Bindungskapazität für negativ geladene Moleküle oder auf mögliche Molekül- oder Ionenbewegungen durch das Protein hinweist (Bernhagen et al. 1994a).

Die MIF-Struktur ist einzigartig; es wurden keine bedeutenden Sequenz-Homologien zu anderen erforschten Proteinen gefunden. Die α/β Struktur mit dem zentralen Kanal unterscheidet MIF von anderen Mediatoren und zeigt, dass MIF nicht zu den bekannten Zytokin-Familien gehört.

Es wurde noch kein spezifischer MIF-Rezeptor beschrieben. Allerdings fanden Leng et al. 2003 heraus, dass MIF die „extracellular signal-regulated kinase 1“ (ERK1)/ERK2 aktiviert - Mitglieder der Familie der „mitogen activated protein kinases“ (MAPKs). Es wurde in dieser Studie außerdem berichtet, dass MIF an die extrazelluläre Domäne von CD74 bindet, die Zelloberflächenstruktur der MHC-Klasse II-assoziierten unveränderlichen Kette auf humanen Monozyten und murinen Makrophagen (Leng et al. 2003). Die Aktivierung von ERK1/ERK2, der Zellproliferation und der Produktion von Prostaglandin E₂ sind MIF-Aktivitäten, die die Mitwirkung von CD74 erfordern. Ob CD74 der lang gesuchte MIF-Rezeptor ist oder lediglich ein Andock-Molekül, welches an der Präsentation von MIF gegenüber seinem noch unidentifizierten Rezeptor beteiligt ist, bleibt unklar.

1.3.3 Biologische Aktivität

Im Gegensatz zu den meisten Zytokinen wird MIF kontinuierlich produziert von Immun- und endokrinen Zellen sowie von Zellen der Epithelschicht, die in direktem Kontakt zu der äußeren Umwelt stehen.

Obwohl MIF ursprünglich als ein Produkt von T-Lymphozyten beschrieben wurde, zeigten Studien der frühen 90er Jahre, dass MIF von Zellen des Hypophysenvorderlappens ausgeschüttet wird, und zwar zu 0,05 % des totalen Hypophyseninhaltes (Vergleich: ACTH 0,2 %) (Bernhagen et al. 1993). Eine physiologische Aktivierung der HPA-Achse (Hypothalamo-Pituitary-Adrenal bzw. Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde-Achse) bei Ratten führt gleichzeitig mit der Erhöhung von ACTH (Adreno-Corticotropes Hormon) und Corticosteron zu einem erhöhten MIF Spiegel im Serum (Calandra et al. 1995). Dies spricht dafür, dass MIF nach Stimulation der HPA-Achse in hormon-ähnlicher Weise sezerniert wird.

Eine Vielzahl von Zellen und Gewebe wurden als wichtige **MIF-Produktionsstätten** identifiziert (siehe Abb. 6). Diese umfassen Entzündungs-/ Immnzellen wie Monozyten/ Makrophagen, Lymphozyten und Eosinophile, Basophile, Mastzellen und dendritische Zellen. Auch Gewebe wie Thymus, Milz und Lymphknoten produzieren MIF. Bei Ratten wird MIF von β -Inselzellen des endokrinen Pankreas glucoseabhängig sezerniert und kann in autokriner Weise regulatorisch auf die Insulinfreisetzung wirken (Waeber et al.1997). In den Granulosazellen des humanen Ovars gebildetes MIF scheint in die Oozyten-Entwicklung involviert zu sein (Wada et al.1997). MIF kann auch in Leydig-Zellen des Hodens von Ratten nachgewiesen werden (Meinhardt et al.1996). MIF kommt in der Nebennierenrinde besonders in der Zona glomerulosa vor und wird dort nach LPS-Stimulation freigesetzt (Bacher et al.1997). Außerdem wird MIF in der Hypophyse, im Auge, von Endothelzellen, Epithelzellen der Haut, Niere, Prostata und Epididymidis produziert. Im ZNS ist das MIF-Protein eher in den Axonen lokalisiert, während die MIF-mRNA hauptsächlich in den Zellkörpern zu detektieren ist (Bacher et al.1998). In der Maus wurde das MIF-Protein in makrophagenreichen Organen wie Hirn, Leber, Milz und Niere gefunden (Calandra et al.1994). Dagegen konnte MIF in polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMNs) nicht nachgewiesen werden (Calandra et al.1994).

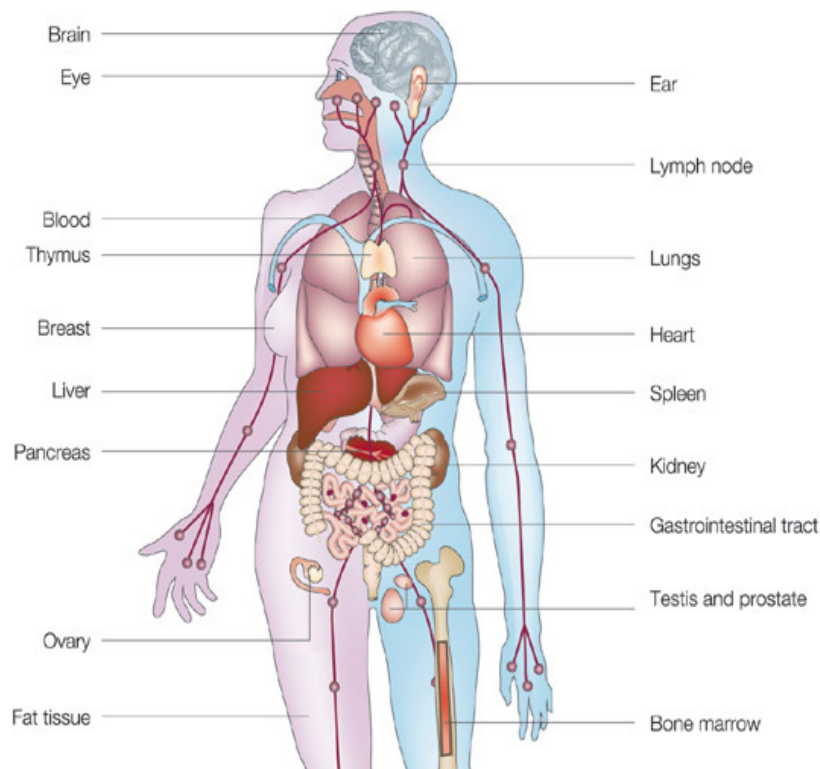


Abb. 6: Verteilung von MIF in Geweben sowie zelluläre Quellen von MIF (nach Calandra und Roger 2003).

MIF weist einige Eigenschaften von **endokrinen Hormonen** auf. So zirkuliert MIF im Blut auf einem Grundlevel. Der Serumspiegel beträgt in ruhenden, nicht gestressten Ratten (Corticosteron im Serum unter 25 ng/ml) etwa 16 ng/ml (Calandra et al.1995). In humanem Serum liegt der MIF-Gehalt bei 5-7 ng/ml (Shimizu et al.1997; Leech et al.1999). Auch enthalten unstimulierte Immunzellen wie Monozyten und T-Zellen große, vorgeformte Mengen an MIF. Eine Stimulierung führt zu einem weiteren Anstieg von zellulärer mRNA und Protein-Levels, begleitet von der Sekretion sowohl des vorgeformten als auch des neu synthetisierten Proteins. Dies steht in deutlichem Kontrast zu anderen pro-inflammatorischen Mediatoren wie $TNF\alpha$ oder IL-1, bei denen sowohl die mRNA - als auch die Protein-Expression nur nach Stimulierung induziert werden (Baugh & Donnelly 2003).

Andere proinflammatorische Mediatoren wie $TNF-\alpha$ und $IFN-\gamma$ bewirken die Freisetzung von MIF (Calandra et al.1994). MIF wiederum wirkt über einen autokrinen Mechanismus fördernd auf die Produktion von $TNF-\alpha$. Durch die gegenseitige positive Stimulation der Zytokine MIF und $TNF-\alpha$ entsteht ein Verstärkungseffekt, der es Makrophagen ermöglicht, schnell und effektiv auf Infektion und Gewebeinvasion zu reagieren (Calandra et al 1994).

Die ursprünglich erkannte biologische Funktion, nämlich als ein Inhibitor der zufälligen Migration von Monozyten und Makrophagen zu agieren, war namensgebend für den „Migration Inhibitory Factor“. Spätere Studien verdeutlichten, dass die Hemmung der Migration von Monozyten durch rekombinantes murines MIF dosisabhängig ist: Bei hohen MIF-Konzentrationen wird die Hemmung vermindert (Bernhagen et al.1994b). Obwohl der zelluläre Mechanismus, der für diese glockenförmige Dosis-Wirkungs-Kurve verantwortlich ist, noch nicht bekannt ist, wurden ähnliche Aktivitätsprofile in anderen Zytokin/Monozyten-Migrations-Systemen beobachtet (Sherry et al.1992).

In einer Studie wurde festgestellt, dass MIF außerdem ein Inhibitor der Chemotaxis von menschlichen peripheren Blutmonozyten ist (Hermanowski-Vosatka et al.1999). Die Leukozyten-Migration wird klassischerweise in drei Kategorien aufgeteilt: Erstens die „random migration“, die zelluläre Fortbewegung ohne jeglichen Stimulus, zweitens die Chemotaxis, die direkte Bewegung unter Einwirkung eines Gradienten und drittens die Chemokinese, die erhöhte Bewegung einer Zelle unter dem Einfluss einer aktivierenden Substanz ohne Gradienten (Snyderman et al.1982). War die Hemmung der „random migration“, wie oben ausgeführt, lange bekannt, ist die

Hemmung der Chemotaxis durch MIF erst durch die Studie von Hermanowski-Vosatka (1999) belegt worden. Die gezielte Zellbewegung, die durch einen chemotaktischen Gradienten des „monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP1) ausgelöst war, konnte durch MIF gehemmt werden. Die Hemmung der Chemotaxis ist nahezu vollständig bei Konzentrationen, die mit denen vergleichbar sind, die zur Hemmung der random migration benötigt werden.

Erwähnenswert, wenn auch noch nicht vollständig geklärt, ist die **enzymatische Funktion** von MIF. Dem Protein wird eine katalysierende Wirkung in einer Tautomerisations-Reaktion zugeschrieben, wobei jedoch das einzusetzende Substrat D-Dopachrom physiologischerweise nicht vorkommt (Rosengren et al.1996). Der Zusammenhang zwischen enzymatischer und biologischer Aktivität ist jedoch nicht unumstritten. In Experimenten, in denen das N-terminale Prolin durch andere Aminosäuren ersetzt wird, bleibt die Chemotaxis und Monozytenmigration unbeeinflusst, obwohl keine katalytische Wirkung mehr vorhanden ist (Hermanowski-Vosatka et al.1999).

Eine wichtige biologische Aktivität von MIF ist die **Rolle als Gegenspieler von Glukokortikoiden**. Glukokortikoide üben einen großen Teil ihrer anti-inflammatorischen Effekte dadurch aus, dass sie die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen durch Zellen hemmen. Somit trat eine entscheidende Wendung in der MIF-Forschung ein, als erste Studien zeigten, dass Glukokortikoide die MIF-Sekretion fördern, anstatt zu hemmen (Calandra & Bucala 1995). Die Beobachtung, dass ein solch potentes anti-inflammatorisches Agens wie Cortisol die Makrophagen dazu veranlassen kann, ein „proinflammatorisches“ Zytokin zu sekretieren, war zunächst verwirrend. Dieses scheinbare Paradoxon wurde jedoch durch eine Reihe von Studien aufgeklärt, die zeigten, dass MIF in einer dosisabhängigen Art die Hemmung der Sekretion von Monozyten-TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 durch Glukokortikoide überwinden kann (Calandra & Bucala 1995). Ebenso übertrifft MIF in einer dosisabhängigen Art die durch Glukokortikoide vermittelte Unterdrückung der T-Zell-Proliferation (Bucala 1996a). MIF ist damit der erste in der Literatur beschriebene Mediator, der aktiv durch Zellen nach deren Stimulierung mit Glukokortikoiden freigesetzt wird (Bucala 1996b).

Glukokortikoide in niedrigen Konzentrationen induzieren direkt die MIF-Freisetzung aus Makrophagen und T-Zellen. Diese Glukokortikoid-induzierte MIF-Freisetzung ist eng reguliert und folgt einer glockenförmigen Kurve in Bezug auf die Glukokortikoid-

Konzentration, d.h. dass bei hohen „antiinflammatorischen“ Glukokortikoid-Konzentrationen ($>10^{-8}M$) keine MIF-Sekretion vorliegt (Bucala 1996b).

MIF zirkuliert im humanen Serum normalerweise in einer Konzentration (5-7ng/ml) (Leech et al. 1999), die im Bereich des Glukokortikoids Cortisol ($\sim 3ng/ml$) liegt. Dies bedeutet, dass der Baseline-Status von MIF zu Glukokortikoiden eine „aktive“ Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Effekten ist. Genau wie bei Glukokortikoiden steigen die MIF-Konzentrationen vielfach bei Stress, Entzündung oder Infektion (Bernhagen et al. 1998).

Am Ort einer Entzündungsreaktion oder im Lymphknoten wird MIF **lokal** von Makrophagen oder T-Zellen produziert. Es wirkt den hemmenden Effekten der Glukokortikoide entgegen, die notwendigerweise als ein wesentlicher Teil der Stressantwort des Wirtes produziert werden. Somit ermöglicht das lokal produzierte MIF den Aufbau einer primären Immunantwort. Andererseits weist die Ausschüttung von MIF durch die Hypophyse darauf hin, dass der Wirt ebenfalls die umfassenden anti-inflammatorischen Eigenschaften der Glukokortikoide, die auf dem zirkulierenden **systemischen** Level auftreten, gegenregulieren kann (Bucala 1996a). Da MIF bei hohen Glukokortikoid-Konzentrationen nicht induziert wird und dann auch nur eine reduzierte gegenregulatorische Kraft hat, ist anzunehmen, dass ein regulatorischer „Escape - Mechanismus“ existiert, der den Wirt gegen überschießende Entzündungsreaktionen assoziiert mit lebensbedrohendem Trauma oder Infektion, schützt (Bucala 1996b).

Zusätzlich zu seinen proinflammatorischen und immunologischen Funktionen spielt MIF auch eine wesentliche Rolle in **Zellwachstum und –differenzierung**. In Bezug auf Tumorentstehung konnte die Erhöhung der MIF mRNA Expression im Brustkarzinom (Bini et al.1997) und in Lymphknotenmetastasen des Prostatakarzinoms (Meyer-Siegler & Hudson 1996) nachgewiesen werden. Die Beteiligung von MIF an Tumorwachstum und Neovaskularisierung konnte in mehreren in vivo und in vitro Studien an Lymphomzellen (Chesney et al.1999), Melanomzellen (Shimizu et al.1999a) und Kolonkarzinomzellen (Ogawa et al. 2000) bestätigt werden. Zudem ist die MIF mRNA Expression ebenfalls als Antwort auf den „transforming growth factor“ (TGF)- β , „basic fibroblast growth factor“ (bFGF) und den „platelet-derived growth factor“ (PDGF) erhöht (Nishihira 2000). MIF kann also direkt oder im Zusammenspiel mit anderen Wachstumsfaktoren Tumorzellwachstum induzieren.

Ein wichtiger Weg, über den MIF in die Tumorentstehung eingreifen kann, ist die Beeinflussung des Tumor-Suppressor-Gens p53 (Hudson et al. 1999). Dieses Gen spielt eine Schlüsselrolle in der Verhinderung der Tumorentstehung. MIF hat die Fähigkeit, die Aktivität des Tumor-Suppressor-Gens p53 zu unterdrücken und damit die p53-vermittelte Apoptose zu verhindern, wodurch sich die Lebensdauer von Zellen verlängert (Mitchell et al. 2002). Diese Eigenschaft von MIF könnte ein wesentlicher Mechanismus sein, durch den MIF zu der Pathologie verschiedener entzündlicher Erkrankungen beiträgt. Während der Immunreaktion wird die zelluläre Immunantwort durch spezielle gegenregulatorische Maßnahmen kontrolliert; hierzu zählen Apoptose und programmierter Zelltod. So führt mangelnde Apoptose von aktivierten Makrophagen zu einer verlängerten Immunantwort an Entzündungsorten (Baugh & Bucala 2002). Aber die verhinderte Apoptose könnte auch zu einer Tumorentstehung beitragen. Einige chronisch-entzündliche Erkrankungen sind mit einer möglichen malignen Entartung assoziiert (z.B. Kolonkarzinom bei Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn, Ösophaguskarzinom bei Refluxösophagitis bzw. Barrett-Syndrom, Magenkarzinom nach *Helicobacter pylori*-Infektion). So veranlasst *Helicobacter pylori* das Magenepithel zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, unter anderem MIF. Dieses wiederum bindet an CD74, welcher während einer Infektion mit *H.pylori* vermehrt auf der Oberfläche von gastrischen Epithelzellen zu finden ist, und führt über eine Hemmung von p53 zu gesteigerter Zellproliferation des gastrischen Epithels und somit zur Entstehung einer möglichen Präkanzerose (Beswick et al. 2006).

MIF ist Erkenntnissen zufolge auch in die Regulation der **Wundheilung** involviert: In Wundheilungsprozessen, beispielsweise nach einer Einstichsverletzung der Kornea (Matsuda et al. 1997) oder nach Schädigung der Haut durch ultraviolette Strahlung (Shimizu et al. 1999b), ist eine erhöhte MIF mRNA Expression zu finden, und die Gabe von anti-MIF Antikörper verzögert die Heilung von Wunden (Abe et al. 2000). Traumapatienten mit multiplen Verletzungen wiesen gegenüber gesunden Kontrollpersonen um das 14fache erhöhte MIF-Konzentrationen im Plasma auf (Joshi et al. 2000). Es wurde hierbei jedoch keine Korrelation zwischen der Schwere der Verletzungen und den MIF-Werten festgestellt.

MIF tritt auch als **Angiogenesefaktor** bei der Tumorentstehung in Erscheinung. Nach Gabe von Anti-MIF Antikörpern kommt es zu einer Reduktion der Gefäßneubildungen und des Tumorwachstums in vivo (Ogawa et al. 2000). Auch bei

Lymphomen kann experimentell durch Applikation von Anti-MIF-Antikörpern eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums und der Neovaskularisierung erreicht werden (Chesney et al. 1999). MIF wurde in dieser Studie in tumorassoziierten Endothelzellen gefunden und scheint für die mikrovaskuläre Endothelzellproliferation notwendig zu sein. Die Verabreichung von anti-MIF monoklonalen Antikörpern reduzierte signifikant das Wachstum und die Gefäßneubildung eines B-Zell-Lymphoms in Mäusen. Die Studie belegte außerdem, dass mikrovaskuläre Endothelzellen MIF Protein produzieren und dessen Aktivität zur Proliferation in vitro benötigen. Eine Behandlung von Mäusen mit anti-MIF monoklonalem Antikörper war mit einer dramatischen Reduktion sowohl der Anzahl als auch der Durchmesser der neugeformten Blutgefäße assoziiert.

1.3.4 MIF in Entzündungsprozessen

1.3.4.1 Übersicht

MIF stellt eine wesentliche Komponente der Entzündungsreaktion des Wirtes dar. Das Zytokin wird sehr schnell von Immunzellen ausgeschüttet, die mikrobiellen Produkten ausgesetzt sind oder während antigen-spezifischer Aktivierung (Calandra & Roger 2003). Studien, die sich auf der Grundlage von MIF-spezifischen Antikörpern, rekombinantem MIF oder Mäusen mit fehlendem MIF mit der Rolle von MIF in Entzündungsprozessen beschäftigten, konnten zeigen, dass MIF direkt oder indirekt die Produktion oder Ausschüttung einer großen Anzahl von proinflammatorischen Molekülen fördert, inklusive Zytokinen wie TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 (Calandra et al. 1994; Calandra & Bucala 1995), Stickoxid (Bernhagen et al. 1994b) und mehreren Matrix-Metalloproteinasen (Onodera et al. 2002). Außerdem induziert MIF den Cyclooxygenase-2-Weg und fördert somit die Produkte des Arachidonsäurestoffwechsels wie z.B. Prostaglandin E₂ (Mitchell et al. 1999). Stimuli für die MIF-Sekretion sind bakterielle Endo- und Exotoxine, TNF- α , IFN- γ , IL-5, C5a und Malariapigment; IL-1 β und IL-6 haben offensichtlich keinen Einfluss (Calandra et al. 1994). MIF wiederum induziert die TNF- α -Sekretion durch Makrophagen, was bedeuten könnte, dass MIF und TNF- α ihre jeweilige Produktion in einer reziproken, proinflammatorischen Schleife vermehren. Hierdurch könnten sie

zusammen die akute, proinflammatorische Immunantwort verstärken (Calandra et al.1994).

Makrophagen sind nicht nur Zielzellen von lokal durch T-Lymphozyten oder systemisch von der Hypophyse produziertem MIF, sondern auch selbst eine wichtige Quelle der MIF-Produktion in vivo. Im Durchschnitt enthält ein Makrophage 0,1-1pg an immunreaktivem, präformierten MIF, was in etwa dem Inhalt von T-Zell-Linien entspricht. Das von Makrophagen sezernierte MIF, das durch einen proinflammatorischen Stimulus ausgeschüttet wird, koordiniert zusammen mit TNF- α und anderen Zytokinen die Immunantwort gegen Infektion und Gewebeinvasion. Das von der Hypophyse produzierte MIF dient als ein vom ZNS hergeleitetes Stresssignal, das das Immunsystem in Voraussicht eines drohenden invasiven Stimulus aktiviert (Calandra et al.1994).

1.3.3.2 Angeborenes und adaptives Immunsystem

Erstmals wurde MIF als ein von aktivierten T-Lymphozyten freigesetztes Zytokin entdeckt. Trotz dieser ursprünglichen Verbindung zur spezifischen Immunabwehr ist bislang wenig über die **Rolle von MIF im adaptiven Immunsystem** („adaptive immunity“) bekannt. T-Zellen schütten kontinuierlich MIF aus. Mitogene, Tetanustoxin, CD3-spezifischer Antikörper, TSST1 („toxic shock syndrome protein“) und Glukokortikoide stimulieren die Freisetzung von MIF aus T-Zellen. Die Stimulierung von T-Zellen mit anti-CD3-Antikörpern oder Superantigen induziert eine MIF mRNA-Expression und Proteinsekretion (Bacher et al.1996; Calandra et al.1998). Möglicherweise über eine autokrine Schleife, unterstützt MIF die Aktivierung und die Proliferation von T-Zellen und die Produktion von IL-2 (Bacher et al.1996). Wird aus T-Zellen stammendes MIF mit spezifischen anti-MIF-Ak neutralisiert, werden dadurch sowohl die anti-CD3- und Superantigen- induzierte IL-2-Sekretion gehemmt als auch die T-Zell-Proliferation um 40-60% reduziert. Zudem hemmt MIF regulatorische Effekte auf zytotoxische CD8 T-Zellen und reguliert das „lymphocyte trafficking“ (Abe et al. 2001). Unter diesem Begriff versteht man das 'routing' von Lymphozyten, sodass sie die Blutbahn an der richtigen Stelle und zur richtigen Zeit verlassen, und ihre Abwehraufgaben entsprechend wahrnehmen können. MIF ist ebenfalls eine notwendige Komponente bei der antigen-induzierten

T-Zellaktivierung und Antikörperproduktion in B-Lymphozyten. In vivo hindert die Behandlung von Mäusen mit anti-MIF-Ak die T-Zell-Proliferation und reduziert die antigen-spezifische IgG-Produktion (Bacher et al.1996).

MIF erscheint als ein wichtiges Zytokin in der Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ („Delayed-type hypersensitivity reaction“). Diese Reaktion wird allein durch die zelluläre Immunfunktion vermittelt, humorale Antikörper sind nicht beteiligt. Sowohl Th1- als auch Th2 – T-Zellen sekretieren MIF, jedoch ist die Ausschüttung vor allem in aktivierten Th2-Zellen erhöht. Zytokine, die von Th1-Zellen ausgeschüttet werden, wie z.B. IFN- γ , IL-1, TNF- α , IL-12, haben ihre zirkadianen Spitzenwerte im menschlichen Vollblut während des späten Abends und dem frühen Morgen, während MIF als ein Th2-Zytokin den Höchststand zwischen 6 und 9 Uhr und den Tiefststand zwischen 0 und 3 Uhr hat, mit einer viermal höheren Konzentration am Höchst - als am Tiefststand. Der MIF-Peak fällt mit dem Plasmakortikoid-Peak zusammen oder folgt ihm (Petrovsky et al. 2003).

Im **angeborenen Immunsystem** („innate immunity“) konnten MIF in zahlreichen Untersuchungen viele wichtige Funktionen nachgewiesen werden.

Sehr geringe Konzentrationen an **gram-positiven** Exotoxinen sind bereits starke Stimuli der MIF-Ausschüttung durch Makrophagen (Froidevaux et al. 2001). MIF ist in die Aktivierung von Makrophagen, Hypophysenzellen und T-Zellen einbezogen durch die Exotoxine „toxic shock syndrome protein“ (TSST-1) aus *Staphylokokkus aureus* und durch das „streptococcal exotoxin A“ (SPEA). Beide Toxine induzieren die MIF-Freisetzung aus Makrophagen, und zwar bereits bei Konzentrationen im Attogramm-Bereich (10^{-18}). Die Schwelle für die MIF-Freisetzung nach TSST-1 Stimulierung ist niedriger als für die T-Zell-Zytokine IL-2 und IFN- γ . Auch hier folgt die MIF-Produktion einer glockenförmigen Kurve: Hohe Konzentrationen an TSST-1 oder SPEA ($>1\text{ng/ml}$), LPS ($>100\text{ng/ml}$) oder Glukokortikoide ($>10^{-7}\text{M}$) stimulieren keine MIF-Freisetzung aus Makrophagen (Calandra et al.1998).

TSST-1 agiert auch als ein T-Zell-Superantigen und induziert somit die Aktivierung einer großen Unterfraktion an T-Zellen in einer antigen-unabhängigen Art und Weise (Bernhagen et al.1994a). Indem man die MIF-Aktivität mit neutralisierenden Antikörpern blockt, wird die T-Zell-Aktivierung durch TSST-1 reduziert. Dies ist in Übereinstimmung mit vorherigen Beobachtungen, dass MIF eine Rolle in der T-Zell-Aktivierung spielt (Froidevaux et al. 2001).

Im Vergleich zu Wildtyp-Zellen sind Makrophagen, denen MIF fehlt, hyporesponsiv gegenüber Endotoxin und gram-negativen Bakterien, was sich in einer deutlichen Reduktion von NF- κ B Aktivität und Zytokin-Produktion äußert. Im Gegensatz dazu zeigen Makrophagen, denen MIF fehlt, normale Antworten auf gram-positive Bakterien (Gruppe der *A-Streptokokken*, *Streptokokkus aureus*, *Streptokokkus mitis*) und Peptidoglykan, was darauf hinweist, dass die mangelhafte Antwort auf LPS und gram-negative Bakterien beschränkt ist (Calandra et al. 2003).

Endotoxine sind Hauptvirulenzfaktoren von **gram-negativen** Bakterien. Wenn Makrophagen mit LPS stimuliert werden, setzen sie MIF frei. Die LPS-Konzentration, die benötigt wird, um die MIF mRNA-Expression in Makrophagen nach oben zu regulieren, ist mindestens zwei Zehnerpotenzen niedriger als diejenige, die die TNF α - Expression induziert. Die MIF-Produktion als Antwort auf steigende Konzentrationen an bakteriellen Toxinen folgt einer glockenförmigen Kurve, die bei hohen LPS-Konzentrationen abnimmt. Dieses könnte ein Schutzmechanismus des Wirtes sein, um den schädlichen Effekten von übermäßiger MIF-Freisetzung vorzubeugen. Vergleichsweise wird angenommen, dass die exzessive Produktion von TNF α bei schweren bakteriellen Infektionen die Kaskade von Ereignissen initiiert, die zum septischen Schock führt und oft in Organversagen und Tod resultiert (Bernhagen et al. 1998).

Ogleich MIF bei alleiniger Injektion keinen Schock induziert, verschlimmern hohe Dosen von rekombinantem MIF letale Endotoxämie und *Escherchia-coli*-Sepsis, wenn sie zusammen mit LPS oder *E.coli* in Mäuse injiziert werden. Hohe Gewebs- und zirkulierende Level an MIF wurden in Mäusen mit Sepsis gefunden.

Neutralisierende MIF-Antikörper reduzierten die Produktion von TNF α und retteten die Mäuse vor einem letalen endotoxischen Schock oder einer Sepsis, welche durch *E.coli* oder eine CLP (caekale Ligation und Punktion) induziert worden war. Die Möglichkeit, diese Tiere zu retten, besteht sogar 8 Stunden nach CLP, was eine MIF-Gabe als anti-Sepsis-Therapie ermöglichen könnte (Calandra et al. 2000).

Auch das von der Hypophyse produzierte MIF trägt signifikant zu dem im Serum gemessenen MIF bei. Die Serum-Konzentrationen an MIF, die nach LPS-Verabreichung gefunden wurden, sind mit jenen vergleichbar, die bei den klassischen Hypophysen-Hormonen nach jeweiliger Stimulierung gemessen wurden (circa 50-500 ng/ml). Die MIF-Sekretion der Hypophyse erreicht 8 bis 20 Stunden nach LPS-Gabe ihren Höhepunkt. Sie folgt im Gegensatz zur MIF-Freisetzung der

Makrophagen (2h nach LPS) keiner glockenförmigen Kurve. Dies bedeutet, dass das zentrale MIF, das mehrere Stunden nach dem initialen, peripheren Makrophagen-MIF ausgeschüttet wird, nicht über den gleichen shut-off-Mechanismus wie im Makrophagen reguliert wird (Bernhagen et al.1998).

In Makrophagen wird die MIF-Sekretion schon bei 10 pg/ml LPS induziert, erreicht einen Peak bei 1 pg/ml LPS und ist bei LPS > 1µg/ml nicht mehr nachweisbar. Diese Absenkung der MIF-Sekretion bei hohen LPS-Konzentrationen (1-10µg/ml) steht im Gegensatz zu TNF α . Dass bereits bedeutende Mengen an MIF bei geringen Konzentrationen von LPS ausgeschüttet werden, könnte bedeuten, dass MIF aus Makrophagen bei Patienten mit gram-negativer bakterieller Invasion sekretiert wird (Calandra et al.1994).

LPS und IFN- γ haben einen synergistischen Effekt auf die MIF-Sekretion, die dadurch bis auf das 1000fache erhöht wird (Bacher et al.1996; Calandra et al.1994).

1.3.4.3 MIF in entzündlichen, bakteriellen Erkrankungen

MIF ist mit der Pathogenese einer Vielzahl von entzündlichen Krankheiten assoziiert:

- Glomerulonephritis (Lan et al.1997a; b)
- Rheumatoide Arthritis (Leech et al.1999)
- Sepsis (Calandra et al. 2000)
- Uveitis, Iridozyklitis (Kitaichi et al.1999)
- Atopische Dermatitis, Psoriasis (Shimizu et al.1997; Steinhoff et al.1999)
- Arteriosklerose (Burger-Kentischer et al. 2002)
- Otitis (Kariya et al. 2003)
- Pankreatitis (Sakai et al. 2003)
- Kolitis und Morbus Crohn (de Jong et al. 2001)
- Delayed-type hypersensitivity (Bernhagen et al.1996)

Die MIF Expression ist beispielsweise an Entzündungsorten bei rheumatoider Arthritis erhöht (Leech et al.1999). Der MIF-Level (im Serum) lag im Durchschnitt bei 17,2 ng/ml und war signifikant höher als bei den gesunden Kontrollpersonen (5,1 ng/ml). Signifikant erhöhte MIF-Konzentrationen fanden sich auch in der Synovia und fibroblastenartigen Synoviozyten. In einer tierexperimentellen Glomerulonephritis ließen sich gesteigerte MIF-Konzentrationen ermitteln (Lan et al.1997a; 1997b; Yang

et al.1998). So konnte gezeigt werden, dass durch Verabreichung von MIF-blockierenden Antikörpern die mit fortschreitender Glomerulonephritis einhergehende Abnahme der Nierenfunktion fast vollständig verhindert werden kann (Lan et al.1997b). Zudem führte die Antikörpergabe auch zu einer drastischen Reduktion des Leukozyten-Infiltrates, das zur Gewebeschädigung in erheblichem Ausmaß beiträgt. Selbst bei etablierter Glomerulonephritis führt die Blockierung von MIF zu einer erheblichen Verbesserung der Nierenfunktion und Abnahme des Leukozyten-Infiltrates.

MIF wird unter anderem ständig in Darm, Leber und Pankreas freigesetzt. Bei Patienten mit Gastritis (Huang et al. 2001), Hepatitis (Bourdi et al. 2002), Pankreatitis (Sakai et al. 2003) und entzündlichen Darmkrankheiten (Murakami et al. 2001) ist die MIF Konzentration sowohl im Serum als auch lokal im Gewebe deutlich erhöht. Die Blockade der MIF Aktivität verhinderte in Tierstudien die Entzündung in experimenteller Gastritis, Kolitis, Hepatitis und Pankreatitis (Ohkawara et al. 2005). Bei Patienten mit Morbus Crohn, der zu der Gruppe der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen gehört, wurden erhöhte Plasma Konzentrationen von MIF detektiert (de Jong et al. 2001). In der Glaskörperflüssigkeit des Auges konnten signifikant erhöhte MIF Konzentrationen bei Patienten mit aktiver Uveitis festgestellt werden (29,7ng/ml in aktiver Uveitis zu 3,3ng/ml in inaktiver Uveitis) (Taguchi et al. 2001). Bei Patienten mit Morbus Behçet oder Sarkoidose, systemische Entzündungskrankheiten, die mit schwerer Uveitis einhergehen, wurden durchschnittliche MIF Konzentrationen im Serum von $60,4 \pm 9,0$ bzw. $27,1 \pm 5,6$ ng/ml ermittelt. In akuten Phasen des Morbus Behçet mit Exazerbation der okulären Symptome stieg die Serum-Konzentration bis auf $80,9 \pm 15,4$ ng/ml (Kitaichi et al.1999).

Auch an der Entwicklung der Artherosklerose ist MIF beteiligt. Die Artherosklerose ist charakterisiert als eine chronische Entzündungsreaktion der an das Blut angrenzenden obersten Arterienwandschicht (Intima) auf Verletzungen („Response to injury“ Hypothese), wobei hierzu morphologische Schädigungen durch Trauma, mechanische Verletzungen, biochemische Schädigungen durch bakterielle Toxine, Angriff durch Viren oder Antigen-Antikörper-Reaktionen sowie biophysikalische Verletzungen auf molekularer Ebene gehören. MIF wird von allen Zellen der Arterienwand wie Endothelzellen, T-Lymphozyten, Makrophagen und glatten Muskelzellen in allen Stadien der Entwicklung der Läsion produziert. Während der

Progression der Artherosklerose ist sowohl die Produktion als auch die MIF Immunreaktivität erhöht (Burger-Kentischer et al. 2002). Die durchschnittliche MIF Konzentration im Serum von Patienten mit atopischer Dermatitis ist gegenüber Gesunden mehr als fünffach erhöht ($36,4 \pm 3,7\text{ng/ml}$ zu $6,5 \pm 0,45\text{ng/ml}$). Es konnte eine Korrelation von sinkenden MIF-Konzentrationen zu einer Verbesserung der klinischen Symptome beobachtet werden (Shimizu et al.1997). Die atopische Dermatitis ist eine chronische, juckende entzündliche Hautkrankheit, die durch eine T-Zell-Dysfunktion, eine unterdrückte Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ („delayed type hypersensistivity“) und eine gestörte Zytokin-vermittelte Immunantwort charakterisiert ist. Da MIF in all diese Immunvorgänge involviert ist, könnte MIF ein wichtiges Protein der Immunregulation in pathophysiologischen Mechanismen der atopischen Dermatitis sein (Shimizu et al.1997). Auch bei Patienten mit Psoriasis könnte MIF eine Rolle bei der Entstehung und Pathogenese spielen. Die Ursache der Hauterscheinungen ist eine Entzündungsreaktion der Haut, die ein überschießendes Wachstum von Keratinozyten bewirkt. Es konnten an psoriatischen Läsionen signifikante Anstiege der MIF Immunreaktivität in suprabasalen Keratinozyten, vor allem der Spinalschicht, gegenüber gesunder Haut beobachtet werden. Auch Endothelzellen der Dermis der erkrankten Haut produzierten vermehrt MIF (Steinhoff et al.1999).

Ein Vergleich zwischen Erwachsenen und Kindern mit Otitis media und Erguss (OME) brachte die Erkenntnis, dass die MIF-Konzentration bei Kindern signifikant höher war als bei den älteren Probanden (Kariya et al. 2003).

Eine besonders gut untersuchte und durch mehrere Studien belegte Rolle spielt MIF in Sepsis und septischem Schock (Lehmann et al. 2001). So ist die Konzentration im Plasma bei Patienten mit schwerer Sepsis ($12,2\text{ ng/ml}$) oder septischem Schock ($17,8\text{ ng/ml}$) gegenüber gesunden Kontrollpersonen (3ng/ml) deutlich erhöht (Calandra et al.2000). Auch unterschieden sich die Plasma-Level an MIF und Interleukin-6 von Überlebenden und Nicht-Überlebenden der Sepsis signifikant (Bozza et al. 2004). Somit scheint eine stark erhöhte MIF-Konzentration im Plasma ein früher Indikator für eine schlechte Prognose bei Sepsis und septischem Schock zu sein. Die Neutralisierung der MIF-Aktivität oder das Entfernen des MIF Gens bei Mäusen verminderte die proinflammatorische Aktivität und verbesserte die Überlebenschancen (Bozza et al.1999). MIF-Antikörper konnten den Tod sogar noch verhindern, wenn die Behandlung um bis zu 8 Stunden nach Auftreten

der Infektion verzögert war. Eine neueste Studie konnte einen MIF-Inhibitor, ISO-1 (ISO-1 ((S,R)-3-(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazole acetic acid methyl ester)), präsentieren, der im Tiermodell protektiv gegen letale Sepsis war und die Überlebensrate gegenüber einer Kontrollgruppe verdoppeln konnte (Al Abed et al. 2005). Hieraus ergibt sich die Möglichkeit, schädliche Spätkomplikationen von MIF in Krankheiten mit MIF-Überschuss wie Sepsis durch Behandlungen mit ISO-1 oder ähnlichen spezifischen MIF-Inhibitoren aufzuheben.

Mit der Rolle von MIF bei **entzündlichen parodontalen Erkrankungen** haben sich bislang nur wenige Studien beschäftigt. Es deuten sich jedoch Zusammenhänge zwischen den Eigenschaften von MIF und den Abläufen bei Gingivitis und Parodontitis an. Zum einen besitzt MIF wesentliche proinflammatorische Eigenschaften. Außerdem wird MIF von Immunzellen produziert und spielt eine entscheidende Rolle bei Makrophagenreaktionen gegenüber mikrobiellen Produkten. All dies sind wichtige Anhaltspunkte zugunsten einer Rolle von MIF in entzündlichen parodontalen Erkrankungen. So besteht in der Phase der frühen Gingivitis ein starkes Lymphozyten- und Makrophagen-Infiltrat unmittelbar unterhalb des Saumepithels, das bei der etablierten Gingivitis weiter proliferiert und sich im Stadium der Parodontitis im Bindegewebe des parodontalen Halteapparates weiter nach apikal und lateral ausbreitet (siehe Abschnitt 1.2). Auch wird im Gewebe von Patienten mit Parodontitis im Vergleich zu gesunden Probanden eine erhöhte Anzahl an T-Suppressorzellen und zytotoxischen T-Zellen gefunden (Okada et al. 1984). Diese Zellen stellen wichtige MIF-Produktionsstätten dar.

Zytokine vermitteln den Entzündungsprozess in parodontalen Geweben und spielen eine wichtige Rolle in seiner Verstärkung und seines Fortbestehens sowie in der daraus folgenden Gewebeerstörung (Page 1991). MIF fördert direkt oder indirekt die Produktion und Expression von zahlreichen Mediatoren, die auch in der Parodontitis eine Rolle spielen, z.B. TNF, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6 und IL-8. TNF und IFN- γ sind wiederum starke Förderer der MIF-Produktion der Makrophagen (Calandra et al. 1994).

Auch begünstigt MIF die Bildung verschiedener Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). Einige MMPs, beispielsweise MMP-1, -3, -8 –und -9, sind wichtige Mediatoren der Bindegewebszerstörung bei der Parodontitis (Birkedal-Hansen et al. 1993). IL-1 β , TNF- α und IL-17 sind mit einer anhaltenden Überexpression zahlreicher MMPs assoziiert (Beklen et al. 2007).

Die Anwesenheit von MIF im Gingivaepithel und seine Lokalisation wurden in einer immunhistochemischen Studie untersucht (Morimoto et al. 2003). Die MIF-Expression wurde in der Basalschicht beobachtet, wie es für die humane Epidermis bereits beschrieben wurde (Shimizu et al. 1996). Zudem konnte die Expression von MIF auch in allen Keratinozyten des Gingivaepithels, vor allem in der attached Gingiva und im Saumeepithel, nachgewiesen werden. Zusätzlich zu den Entzündungsarealen wurde MIF auch in Bereichen mit hoher Zellproliferationsaktivität, unter anderem ausgelöst durch externe mechanische Stimuli, detektiert. Morimoto et al. vermuteten, dass auch das Zähneputzen zu diesen mechanischen Stimuli gehören könnte, da bereits Auswirkungen des Bürstens auf parodontale Immunabwehrmechanismen nachgewiesen wurden (Horiuchi et al. 2002).

MIF könnte somit eine wichtige Rolle im homöostatischen Prozess der parodontalen Entzündung spielen. Die Kongruenz der proinflammatorischen Aktivitäten von MIF mit den pathogenetischen Mechanismen der parodontalen Entzündung lässt die Hypothese zu, dass MIF auch in der Sulkusflüssigkeit zu finden sein kann. Gerade weil die Sulkusflüssigkeit mit den zahlreichen Bakterien der Mundhöhle in ständigem Kontakt steht und bekannt ist, dass MIF es Zellen wie Makrophagen, die die erste Barriere des Abwehrsystems bilden, ermöglicht, schnell auf invasive Bakterien zu reagieren, könnte die Sulkusflüssigkeit hohe Konzentrationen an MIF enthalten, um so eine rasche Immunantwort auf eindringende Bakterien aufzubauen.

1.3.5 Korrelation MIF zu PGE₂

Nur wenige Studien beschäftigen sich mit den Wegen, die zur Aktivierung von Phospholipase A₂ und der Cyclooxygenase-2 und damit zu einer Steigerung der Prostaglandin E₂-Synthese durch MIF führen (Mitchell et al. 1999; Sampey et al. 2001; Santos et al. 2004).

Um diese Zusammenhänge zu verstehen, muss kurz auf die Wirkungsweise von MIF eingegangen werden. MIF aktiviert die Extrazellulären Signalregulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/ERK2) – Mitglieder der Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Dieses geschieht zeit- und dosisabhängig über eine Phosphorylierung der 42/44-kDa ERK-MAP Kinasen. Der MIF-induzierte Anstieg der ERK-Aktivität ist

Proteinkinase A-abhängig und mit einer Steigerung der Enzymaktivität von zytoplasmatischer Phospholipase A2 (PLA2) assoziiert (Calandra & Roger 2003). PLA2 liegt zum einen als sekretorische Form (sPLA2) und zum anderen als eine Arachidonsäure-selektive zytoplasmatische Form vor (Murakami et al. 1997). Diese katalysiert die Abspaltung von Arachidonsäure aus Membranphospholipiden, was letztlich zur Bildung von verschiedenen entzündungsfördernden Lipidmediatoren (Prostaglandine, Leukotriene und lyso-Phospholipide) führt. Außerdem ist PLA2 ein Schlüsselziel der anti-inflammatorischen Effekte von Glukokortikoiden. Nach Applikation von Dexamethason zu Fibroblasten der Maus wird die Arachidonsäurefreisetzung gehemmt. Die Zugabe von rekombinantem MIF antagonisiert die glukokorticoinduzierte Suppression der Arachidonsäureproduktion vollkommen (Mitchell et al. 1999). Somit stellt die ERK1/ERK2-vermittelte Induktion von PLA2 einen Mechanismus dar, durch den MIF der immuno-suppressiven Wirkung der Steroide entgegenwirken kann. Bei in-vitro-Versuchen mit humanen fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten („fibroblast-like synoviocytes“) bei der rheumatoiden Arthritis wirkt MIF über einen zusätzlichen Weg fördernd auf die Produktion von COX-2: über eine Phosphorylierung der 38-kDa MAP-Kinase ERK. MIF fördert so signifikant die intrazellulären COX-2 Proteingehalte der fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten sowie die COX-2 mRNA. Auch die Freisetzung von PGE₂ aus unstimulierten fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten wurde durch die Zugabe von rekombinantem MIF signifikant gesteigert (Santos et al. 2004).

Eine weitere Studie zeigt, dass MIF zusammen mit IL-1 β bei der Aktivierung der COX-2 und der Phospholipase A2 in Synoviazellen bei der rheumatoiden Arthritis des Menschen von Bedeutung ist (Sampey et al. 2001). Rekombinantes humanes MIF förderte in dieser Untersuchung die Phospholipase A2 -Aktivität und die Expression von zytoplasmatischer PLA2-mRNA, außerdem die COX-2-Aktivität und die Expression von COX-mRNA. Zusätzlich zu diesem direkten Effekt auf cPLA2 und COX-2 agierte MIF als ein essentieller Cofaktor bei der Förderung von cPLA2 und COX-2 durch IL-1 β . Durch Anti-MIF-Antikörper konnte eine IL-1 β -vermittelte Stimulierung von COX-2 und Phospholipase A2 verhindert werden. MIF hatte keinen Effekt auf die Expression von COX-1 und auf die sekretorische PLA2.

1.4 Ziel der Studie

Das Ziel dieser Studie war es, die klinischen und immunologischen Veränderungen während der Entwicklung einer experimentellen Gingivitis bei parodontal gesunden jungen Probanden mit denen gesunder älterer Probanden zu vergleichen und dabei insbesondere die MIF- (Migration Inhibitory Factor) und Prostaglandin E₂-Konzentrationen in der Sulkusflüssigkeit bzw. mögliche Korrelationen zu untersuchen.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Probanden

An der Studie nahmen insgesamt 21 Probanden teil, die in eine Gruppe von 18 bis 30 Jahren (9 Männer, 3 Frauen) und eine Gruppe von 46 und 77 Jahren (5 Männer, 4 Frauen) aufgeteilt waren.

Als Voraussetzung für die Teilnahme an der Studie galten folgende Kriterien:

- a) Die Probanden mussten allgemeinmedizinisch gesund sein.
- b) Sie sollten über ein nahezu vollbezahntes Gebiss (mindestens 20 Zähne) ohne umfangreiche prothetische Rekonstruktionen verfügen. Probanden über 48 Jahre mussten wenigstens 8 Zähne im Bereich von 15 bis 25 besitzen.
- c) Die parodontale Sondierungstiefe durfte generell 4 mm nicht überschreiten.
- d) Akute Entzündungszeichen, spontane Blutung, Schwellung, Schmerzen, purulentes Exsudat oder Zahnlockerungen von Grad II oder III durften nicht vorliegen.
- e) Es durften keine orthodontische Behandlung (z.B. Brackets) oder funktionelle Störungen vorhanden sein.
- f) Eine erfolgte antibiotische Behandlung oder Therapie mit entzündungshemmenden oder desinfizierenden Mitteln in einem Zeitraum von sechs Monaten vor Beginn der Studie führte zum Ausschluss.
- g) Eine Schwangerschaft zu Beginn der Studie war mit der Teilnahme nicht vereinbar.
- h) Die Probanden mussten Nichtraucher sein.

Alle Probanden wurden vor Beginn der Studie eingehend informiert und gaben ihre schriftliche Einwilligung. Die Teilnahme an der Studie erfolgte freiwillig.

Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission des Fachbereiches Humanmedizin der Phillips-Universität Marburg genehmigt.

2.2 Studiendesign

Nach einer eingehenden zahnärztlichen Untersuchung wurden die Probanden zu Mundhygienemaßnahmen motiviert und instruiert, und es wurde eine professionelle Zahnreinigung vorgenommen (Abb.7). Diese wurde bei Bedarf wiederholt, bis eine sehr gute Mundhygiene vorlag (API unter 20 %) (Lange 1978). Anschließend wurde eine Baseline-Untersuchung durchgeführt. Diese umfasste die Erhebung der klinischen Parameter und die Entnahme von Sulkusflüssigkeit. Daraufhin wurden die Probanden aufgefordert, für einen Zeitraum von 14 Tagen jegliche Mundhygienemaßnahmen einschließlich des Gebrauchs von Kaugummis und abrasiver Nahrung zu unterlassen. Nach dieser Zeit hatte sich bei allen Probanden eine experimentelle Gingivitis entwickelt. Die Untersuchungen wurden wiederholt und eine eingehende professionelle Zahnreinigung mit Fluoridierung mit Motivation und Instruktion durchgeführt. Eine Abschlussuntersuchung erfolgte 14 Tage später.

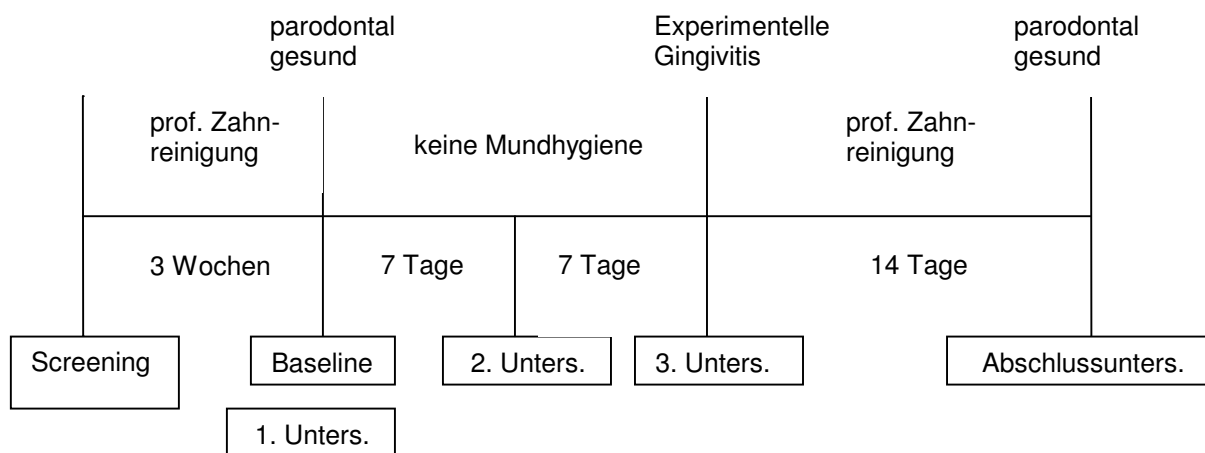


Abb. 7: Zeitlicher Ablauf der Studie

2.3 Klinische Untersuchung

Die klinische Untersuchung erfolgte an allen Zähnen jeweils mesial, distal, bukkal, palatinal bzw. lingual zu jedem Untersuchungszeitpunkt nach folgenden Kriterien: Die **Sondierungstiefen** wurden mit der Parodontalsonde WHO TRS 621 bestimmt und 30 Sekunden danach eine Blutung festgestellt.

Die **Gingivalen Rezessionen** wurden von der Schmelz-Zement-Grenze bis zum Gingivarand gemessen.

Der **Attachmentlevel** wurde vom Taschenboden bis zur Schmelz-Zement-Grenze bestimmt. Lagen an Zähnen oder einzelnen Zahnflächen gingivale Rezessionen vor, so wurde der Attachmentlevel aus gingivaler Rezession und Sondierungstiefe berechnet.

Der **Gingival Index** (Löe & Silness 1963) wurde als klinische Meßmethode zur Beurteilung des Entzündungsgrades der Gingiva benutzt. Die numerische Einteilung erfolgt nach den Kriterien:

Grad 0 entspricht einer entzündungsfreien Gingiva

Grad 1 entspricht einer geringen Entzündung, die mit leichten Farb- und Oberflächenveränderungen einhergeht. Keine Blutung nach Sondierung

Grad 2 entspricht einer mäßigen Entzündung, die sich durch Rötung, Ödem und Hypertrophie der Gingiva sowie Blutung nach Sondierung auszeichnet.

Grad 3 entspricht einer schweren Entzündung mit starker Rötung, Hypertrophie und Ulzerationen. Es besteht eine Tendenz zur spontanen Blutung.

Der **Plaque Index** (Silness & Löe 1964) bewertet den Plaquebefall und die Plaquedicke im Zahnhalsbereich unter Berücksichtigung des Sulkus, der Zahnoberfläche und des Gingivarandes. Die Untersuchung erfolgte mit Spiegel und Sonde nach sorgfältiger Trocknung mit dem Luftbläser im Zervikalbereich, ohne dass die Plaque angefärbt wurde.

Grad 0 entspricht keiner Plaque

Grad 1 entspricht einem dünnen Plaquefilm auf der Gingiva und den benachbarten Zahnflächen, der nach Abstreichen mit der Sonde erkennbar ist.

Grad 2 entspricht einer mäßigen Plaquemenge auf den Zahnflächen und entlang des Gingivarandes, die mit dem Auge erkennbar ist.

Grad 3 entspricht sehr viel Plaque

2.4 Immunologische Untersuchungen

Die Entnahme der Sulkusflüssigkeit erfolgte jeweils an den mesialen und distalen Flächen der 1. Molaren, Prämolaren und Frontzähnen des Oberkiefers zur Baseline-Untersuchung sowie nach 7 und 14 Tagen der experimentellen Gingivitis. Die Entnahmestellen wurden mit Watterollen sorgfältig trockengelegt und zusätzlich mit Luftstrom getrocknet. Vorhandene supragingivale Plaque wurde vorsichtig mit Küretten entfernt. Sterile Papierspitzen (Firma Antaeos, München) wurden zunächst mittels einer fein justierbaren Waage (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) gewogen, dann in den Sulkus eingeführt und dort für 60 sec belassen. Nach erneutem Wiegen wurden die Proben jeweils in ein steriles, im Eisbad stehendes Eppendorf- Röhrchen, welches mit 250µl PBS-Puffer gefüllt war, gegeben. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße kurz gevotext und bis zur Auswertung mittels spezifischer ELISAs bei -80 °C eingefroren.

2.4.1. Bestimmung der Prostaglandin E₂-Konzentration

Die Sulkusflüssigkeit der distalen Flächen der 1. Molaren, 1.Prämolaren und 1. Frontzähnen des Oberkiefers wurde für die Bestimmung der PGE₂ Konzentration entnommen. Dabei wurden die jeweils sechs Proben eines Probanden pro Untersuchung gepoolt. Die Messungen wurden mit einem PGE₂-ELISA der Firma Amersham (Amersham Pharmacia Biotech UK, Buckinghamshire, UK) durchgeführt. Die Messplatte wurde gebrauchsfertig, die Proben- und Waschpuffer als Trockensubstanz geliefert und mussten nach Herstellervorgabe in doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) gelöst werden. Konjugat und Antikörper wurden ebenfalls nach Herstellervorgabe im Probenpuffer gelöst. Eine Verdünnungsreihe des Standards von 320 bis 2,5 wurde nach Herstellervorgabe mit dem Probenpuffer angesetzt. Die 96-Well-Platte wurde nach Plan mit Nullwert, 50 µl des Standards und 50 µl Probe/Well als Einfachbestimmung befüllt, die Proben ggf. vorher mit Probenpuffer nach Bedarf verdünnt. Nach Zugabe von 50 µl Antikörper und 50 µl Konjugat/Well wurde die Platte zugedeckt eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach einer Stunde wurde die Flüssigkeit abgekippt, die Platte viermal mit dem Waschpuffer gewaschen, getrocknet, mit 150 µl des Substrates/Well befüllt und zugedeckt dreißig Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler

inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 1 M Schwefelsäure gestoppt, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgte. Die Platte wurde anschließend sofort als Endpoint-Messung bei 450 nm abgelesen. Die Berechnung der endgültigen Konzentrationen erfolgte mit Hilfe einer speziellen Excel-Tabelle.

Die Konzentrationen von PGE₂ für die Standardkurve betragen 320pg; 160pg; 80pg; 40pg; 20pg; 10pg; 5pg und 2,5pg/well.

2.4.2 Bestimmung der MIF-Konzentration

Die Sulkusflüssigkeit der mesialen Zahnflächen der 1. Molaren, 1. Prämolaren und 1. Frontzähnen des Oberkiefers wurde für die Analyse der MIF-Konzentrationen verwendet. Es wurde ein MIF-spezifischer Sandwich-ELISA mit rekombinantem humanen MIF als Standard durchgeführt. 96-well-Platten (F96 Maxisorp NUNC-Immuno Plate, NalgeNUNC, Rochester, New York, USA) wurden mit monoklonalem, anti-humanem MIF Antikörper (500µg/ml, R&D Systems, Minneapolis; Minnesota, USA) beschickt, welcher vorher 1:250 in PBS verdünnt worden war. Die Platten wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert, um dann mit Waschpuffer (PBS/0,05% Tween) gewaschen, mit 200µl Superblock Blocking Puffer in TBS (Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois, USA) geblockt und anschließend wieder gewaschen zu werden. Der MIF-Standard (10ng/ml, R&D Systems) wurde in Testmedium zu 7 verschiedenen Konzentrationen verdünnt. Jeweils 100µl Standard oder 100µl der Proben wurden nach einem bestimmten Pipettierschema zu jedem well zugegeben. Die Platten wurden für 1h bei Raumtemperatur inkubiert und danach mit Waschpuffer gewaschen.

Der 2. Antikörper, der biotinylated Anti-human MIF Antibody (50µg/ml, R&D Systems, Minneapolis; Minnesota, USA) wurde 1:500 in TBS verdünnt. 100µl dieses verdünnten Antikörpers wurden dann zu jedem well dazugegeben, die Platten wiederum inkubiert und gewaschen.

Jeweils 100µl einer Streptavidinlösung (Streptavidin POD Konjugat 500U/ml, Boehringer, Ingelheim, Deutschland) wurden nach vorherigem Verdünnen 1:5000 in TBS zu jedem well zugefügt und die Platten bei 37 °C für 30min inkubiert und gewaschen. Eine o-Phenylenediamine 10mg Tablette (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) wurde in 10ml OPD-Puffer und 10µl H₂O₂ (30%) aufgelöst. 100µl

dieser OPD-Lösung wurden in jedes well gegeben, die Inkubation erfolgte für 20min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 25µl 2,5 N H₂SO₄ (Stop Solution) hinzugefügt.

Der Auswertung des MIF-ELISAs liegt eine Messung bei 490nm mit einer Referenzmessung bei 630nm zugrunde. Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte über eine Standarddeichkurve. Pro SF-Probe wurden zwei unabhängige ELISA-Zyklen mit je 100µl durchlaufen und die Ergebnisse zu einem Mittelwert verrechnet.

Die Gewichts Differenz der vor und nach Applikation in den Sulkus gewogenen Papierspitze wurde in µl umgerechnet. Die Dichte wurde dabei mit 1 angenommen, wie Giannopoulou et al. es in ihrer Veröffentlichung der Wiegemethode beschrieben haben (Giannopoulou et al. 1992). Demnach konnte 1mg mit 1µl gleichgesetzt werden.

Zur Quantifizierung von MIF in den Sulkusflüssigkeitsproben wurde der Quotient des zu den Papierspitzen zugegebenen PBS Puffers (250µl) dividiert durch das von den Papierspitzen aufgenommene Volumen mit der durch ELISA bestimmten Konzentration multipliziert. Die entsprechende Formel hierzu ist:

$$\frac{250\mu l}{v} \times c = x$$

x: MIF-Konzentration in der Sulkusflüssigkeit in ng/ml
c: MIF-Konzentration in der eluierten Probe in ng/ml
v: Sulkusflüssigkeitsmenge in µl

2.5 Statistische Evaluation

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Programmsystems SPSS durchgeführt. Die Hypothesen der Gleichheit der Mittelwerte zu benachbarten Zeitpunkten wurden bei Vorliegen der Normalverteilung mit dem t-Test für verbundene Stichproben getestet. Lag keine Normalverteilung vor, wurde ein Wilcoxon -Test für verbundene Stichproben angewendet. Der Test auf Gruppenunterschiede der zwei Gruppen erfolgte mit dem t-Test der Varianzanalyse bzw. mit dem Mann-Whitney-U-Test. Die Rangkorrelation nach Spearman wurde angewendet, um den Zusammenhang zwischen den einzelnen Parametern zu ermitteln. Der Korrelationskoeffizient r zeigt dabei den Grad des Zusammenhangs für eine entsprechende Parameterkombination an. Für die Korrelationskoeffizienten

wurde ein Test auf $r = 0$ durchgeführt. Bei signifikanten Ergebnissen kann von einem signifikanten Zusammenhang zwischen den Parametern ausgegangen werden.

Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt.

3. ERGEBNISSE

Alle im Screening ausgewählten Probanden beendeten die Studie.

3.1 Klinische Ergebnisse

Der **Plaque Index** lag in der Gruppe der 18-30-Jährigen zur Baseline-Untersuchung nahe 0 (Abb. 8 und Tab. 2). Während der experimentellen Gingivitis konnte ein statistisch signifikanter Anstieg zwischen den einzelnen Untersuchungen beobachtet werden. Die Zunahme war während der ersten Woche stärker als in der zweiten. In der Gruppe der 46-77-Jährigen zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg des Plaque-Indexes im Verlauf der experimentellen Gingivitis.

Im Gruppenvergleich wurden zur Baseline-Untersuchung gesunde Verhältnisse in beiden Gruppen ermittelt. Die jüngere Gruppe wies sowohl bei der zweiten als auch bei der dritten Untersuchung einen niedrigeren PI-Wert auf als die ältere Gruppe, jedoch sind diese Unterschiede statistisch nicht signifikant (Abb. 9).

Die Betrachtung der einzelnen Probanden (Abb. 24 und 25 im Anhang) ergab, dass der Plaque Index bei allen Teilnehmern von einem Baseline-Wert nahe 0 während der experimentellen Gingivitis anstieg. Dabei erfolgte die Zunahme vor allem in der ersten Untersuchungswoche. Am Tag 15 wiesen zwei Drittel der älteren Probanden einen $PI > 2$ auf, bei den Jüngeren waren dies lediglich ein Drittel der Teilnehmer.

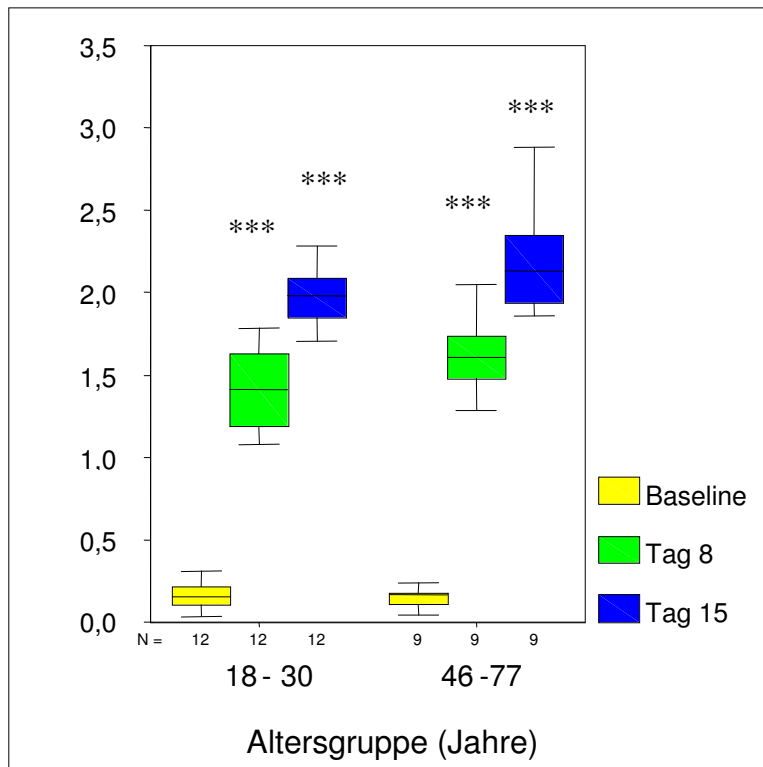


Abb. 8: Plaque Index: Mittelwerte der Indizes über alle Zähne

Der *t*-Test für verbundene Stichproben auf Unterschiede zu den Zeitpunkten zeigt signifikante Anstiege.

* signifikant $p < 0,05$; ** sehr signifikant $p < 0,005$; *** hoch signifikant $p < 0,001$

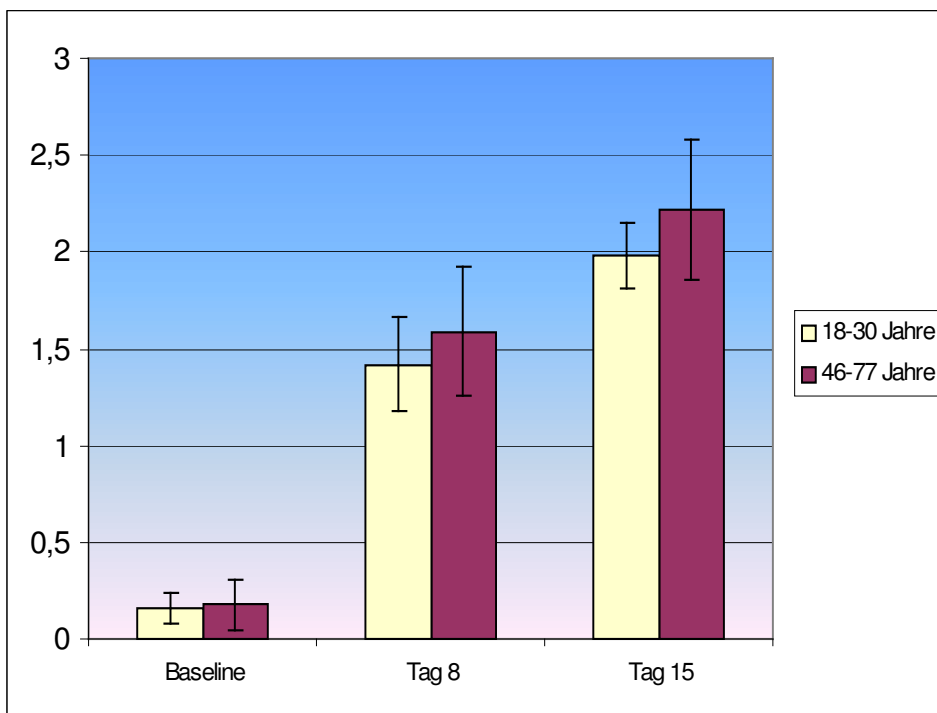


Abb. 9. Plaque Index Gruppenunterschiede

Der *t*-Test der Varianzanalyse auf Unterschiede der zwei Altersgruppen zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Für den **Gingival Index** konnte in der Gruppe der 18-30-Jährigen zur Baseline-Untersuchung ein Wert von 0,16 ermittelt werden. Während der experimentellen Gingivitis zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg zwischen den einzelnen Untersuchungen. Die Zunahme war während der ersten Woche stärker als in der zweiten. In der Gruppe der 46-77-Jährigen wurde ebenfalls ein signifikanter Anstieg des Gingival-Indexes im Verlauf des zweiwöchigen Experimentes festgestellt (Abb. 10 und Tab. 2).

Im Gruppenvergleich wurden zur Baseline Untersuchung gesunde Verhältnisse in beiden Gruppen beobachtet. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen lagen nicht vor. Die Werte in der älteren Gruppe waren zu allen Zeitpunkten geringfügig höher als in der jüngeren (Abb. 11).

In beiden Gruppen lag bei allen Teilnehmern außer bei zwei Probanden (Nr. 2 und 21) ein stärkerer Anstieg des Gingival Indexes in der ersten Woche vor (Abb. 27 und 28 im Anhang).

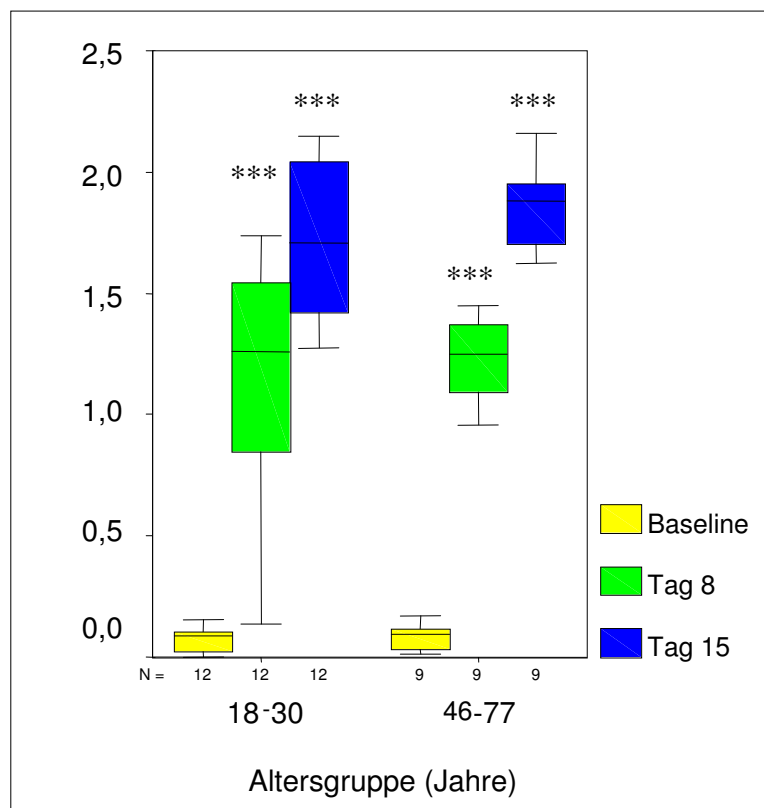


Abb.10 Gingival Index: Mittelwerte der Indizes über alle Zähne

Der *t*-Test für verbundene Stichproben auf Unterschiede zu den Zeitpunkten zeigt signifikante Anstiege.

* signifikant $p < 0,05$; ** sehr signifikant $p < 0,005$; *** hoch signifikant $p < 0,001$

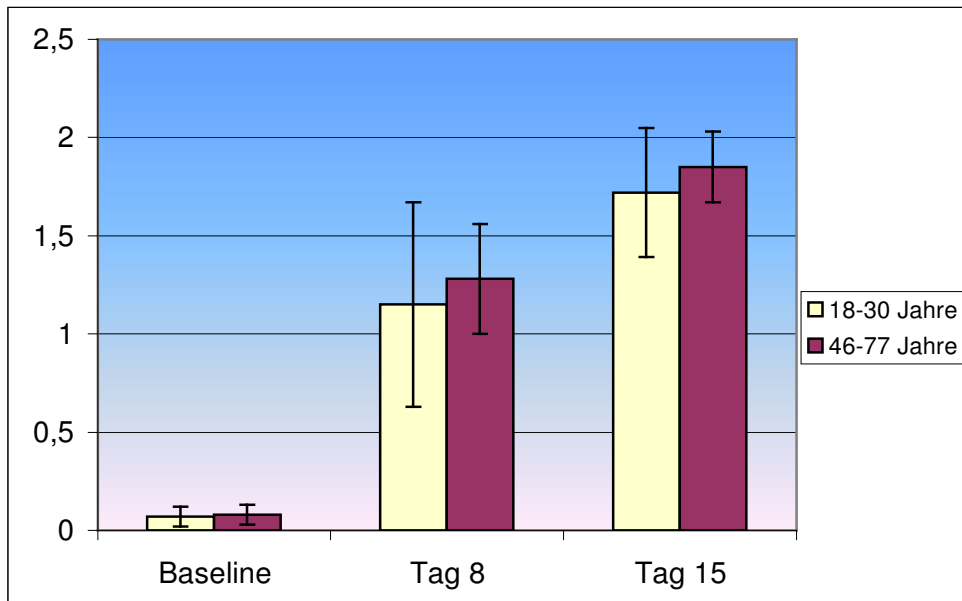


Abb.11 Gingival Index Gruppenunterschiede

Der *t-Test der Varianzanalyse* auf Unterschiede der zwei Altersgruppen zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Für das **Bluten nach Sondieren (BNS)** lag der Ausgangswert in der jüngeren Gruppe bei 0,15. 15 % der sondierten Flächen wiesen eine Blutung auf. Sowohl am Tag 8 als auch am Tag 15 konnte ein signifikanter Anstieg der Blutungspunkte ermittelt werden. Für die Gruppe der 46-77-Jährigen wurde, ausgehend von einem gleichen Baseline-Wert, ebenfalls eine signifikante Zunahme in beiden Untersuchungswochen beobachtet (Abb.12).

Im Gruppenvergleich zeigten die jüngeren Probanden sowohl zum zweiten als auch zum dritten Zeitpunkt geringere Werte als die älteren. Die vorhandenen Gruppenunterschiede waren statistisch nicht signifikant (Abb.13).

Am Tag 15 wiesen 7 von 12 der jungen Probanden (58,3%) ein BNS von mehr als 0,5 auf, d.h. es bluteten mehr als die Hälfte der untersuchten Flächen beim Sondieren. Bei den Älteren wurde dieser Wert von 8 der 9 Teilnehmer (88,9%) überschritten (Abb.30 und 31 im Anhang).

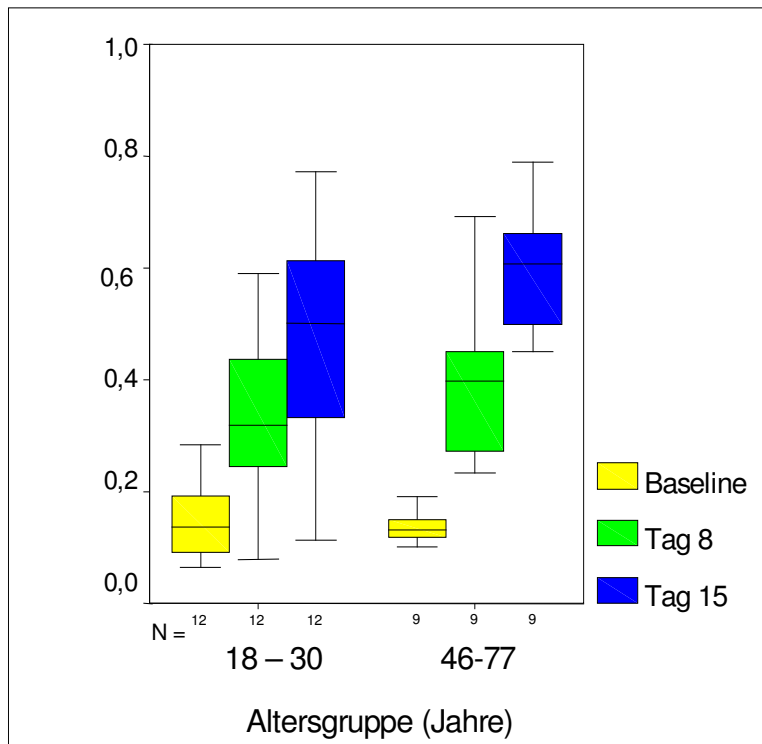


Abb.12 Bluten nach Sondieren

Der *t*-Test für verbundene Stichproben auf Unterschiede zu den Zeitpunkten zeigt signifikante Anstiege.
 * signifikant $p < 0,05$; ** sehr signifikant $p < 0,005$; *** hoch signifikant ($p < 0,001$)

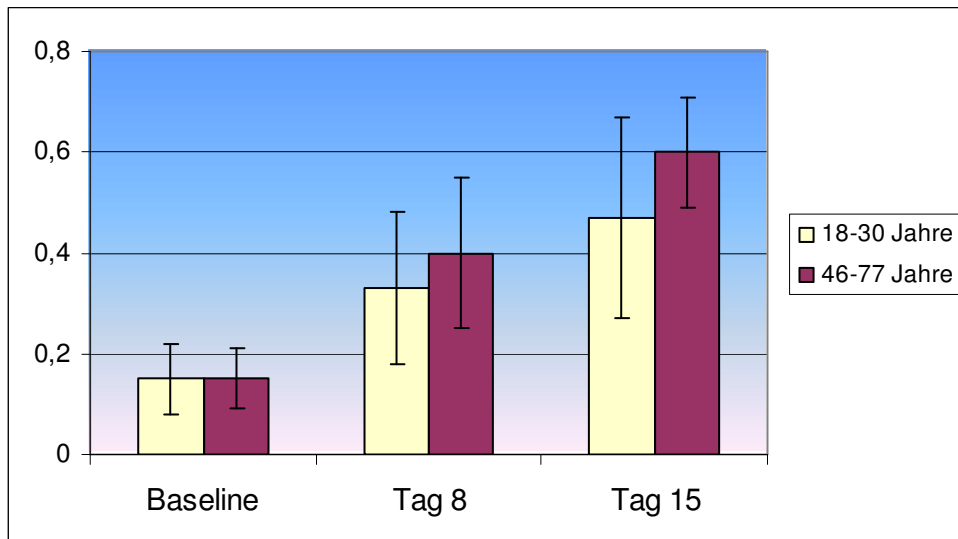


Abb.13 Bluten nach Sondieren Gruppenunterschiede

Der *t*-Test der Varianzanalyse auf Unterschiede der zwei Altersgruppen zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied.

	Plaque Index				Gingival Index				Bluten nach Sondieren			
	18-30 Jahre		46-77 Jahre		18-30 Jahre		46-77 Jahre		18-30 Jahre		46-77 Jahre	
	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD
Tag 0	0,07	0,05	0,08	0,05	0,16	0,08	0,18	0,13	0,15	0,07	0,15	0,06
Tag 8	1,15*	0,52	1,28*	0,28	1,42*	0,24	1,59*	0,33	0,33*	0,15	0,4*	0,15
Tag15	1,72*	0,33	1,85*	0,18	1,98*	0,17	2,22*	0,36	0,47*	0,2	0,6*	0,11

Tab. 2: Plaque Index, Gingival Index, Bluten nach Sondieren

x= Mittelwert, SD= Standardabweichung

t-Test für verbundene Stichproben auf Unterschiede zwischen den Untersuchungszeitpunkten zeigt signifikante Anstiege in beiden Gruppen (*, $p < 0.05$)

t-Test der Varianzanalyse auf Unterschiede zwischen den Gruppen zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied

Bei den jüngeren Probanden konnten im entzündungsfreien Zustand

Sondierungstiefen von $2,18 \pm 0,25$ erhoben werden. Während der experimentellen Gingivitis nahm dieser Parameter statistisch signifikant zu (Abb.14). In der Gruppe der 46-77 Jährigen lag der Baseline Wert bei $2,17 \pm 0,3$ und stieg im Verlauf der Studie statistisch signifikant an (Abb.14).

Im Gruppenvergleich konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 15).

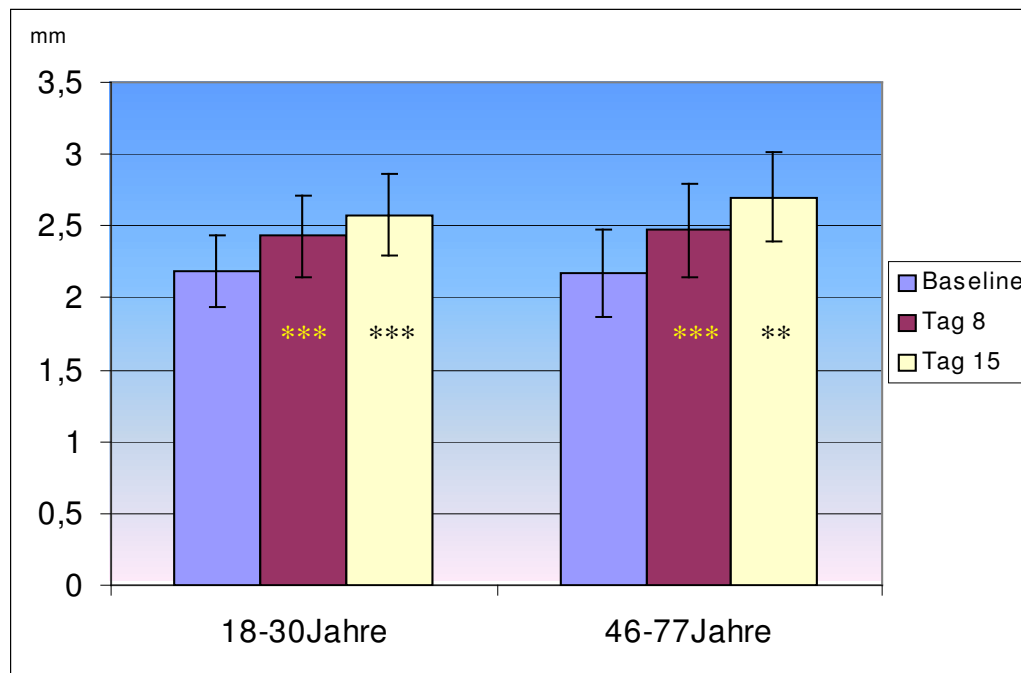


Abb.14 Sondierungstiefe

Der t-Test für verbundene Stichproben auf Unterschiede zu den Zeitpunkten zeigt signifikante Anstiege. * signifikant $p < 0,05$; ** sehr signifikant $p < 0,005$; *** hoch signifikant $p < 0,001$

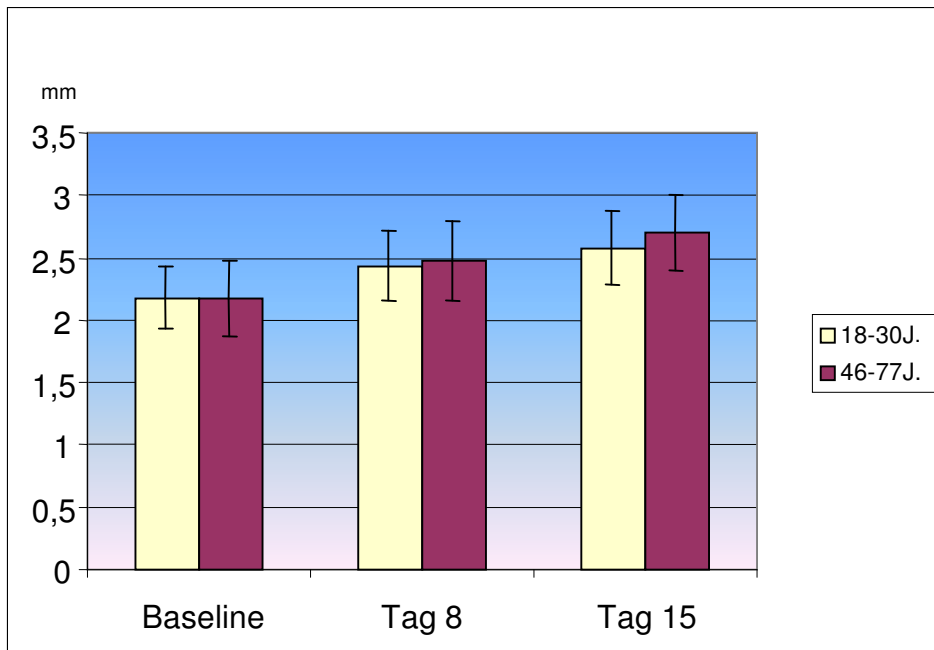


Abb.15 Sondierungstiefe Gruppenunterschiede

Der *t-Test der Varianzanalyse* auf Unterschiede der zwei Gruppen zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied.

3.2 Immunologische Ergebnisse

3.2.1 Prostaglandin E₂

Bei der Gruppe der 18-30-Jährigen konnte im gesunden Zustand zur Baseline-Untersuchung eine Konzentration von $12,7 \pm 12,62 \text{ ng/ml PGE}_2$ in der Sulkusflüssigkeit gemessen werden. Nach einer Woche experimenteller Gingivitis sank die Konzentration leicht auf $10,0 \pm 9,07 \text{ ng/ml}$ und stieg nach der zweiten Woche auf $17,9 \pm 10,61 \text{ ng/ml}$ an. Diese Veränderungen waren statistisch nicht signifikant.

Für die älteren Probanden wurde zur Baseline-Untersuchung eine Konzentration von $18,26 \pm 12,62 \text{ ng/ml}$ ermittelt. Sowohl am Tag 8 als auch am Tag 15 konnte eine Zunahme der Werte beobachtet werden; diese war statistisch jedoch nicht signifikant (Abb.16 und Tab.3).

Im Gruppenvergleich wurden bei den älteren Probanden im gesunden Zustand höhere PGE₂-Konzentrationen als bei den jüngeren erhoben. Auch während der experimentellen Gingivitis konnten für die Gruppe der 46-77-Jährigen höhere Werte als für die jüngere Gruppe festgestellt werden (Tag 15: junge Probanden $17,87 \pm$

10,61, ältere Probanden $23,17 \pm 35,88$) (Abb.17). Diese Gruppenunterschiede waren statistisch nicht signifikant.

Bei Betrachtung der einzelnen Probanden ließ sich für die Gruppe der 18-30-Jährigen eine relativ gleichmäßige Verteilung der PGE₂ Konzentrationen feststellen. In der älteren Altersgruppe war der sehr hohe Werte bei Proband 16 auffällig (>100ng/ml), was zu der hohen Standardabweichung an Tag 15 bei den älteren Probanden führte (siehe Abb 32 und 33 im Anhang).

	PGE ₂ (ng/ml)			
	18-30Jahre		46-77Jahre	
	x	SD	x	SD
Baseline	12,7	12,62	18,26	12,62
Tag 8	10	9,07	21,32	17,66
Tag 15	17,9	10,61	23,17	35,88

Tab. 3: Prostaglandin E₂

x= Mittelwert, SD= Standardabweichung

Der Wilcoxon-Test auf Unterschiede zwischen den Untersuchungszeitpunkten zeigt keine signifikanten Anstiege in beiden Gruppen

Der Mann-Whitney-U-Test auf Unterschiede zwischen den Gruppen zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied

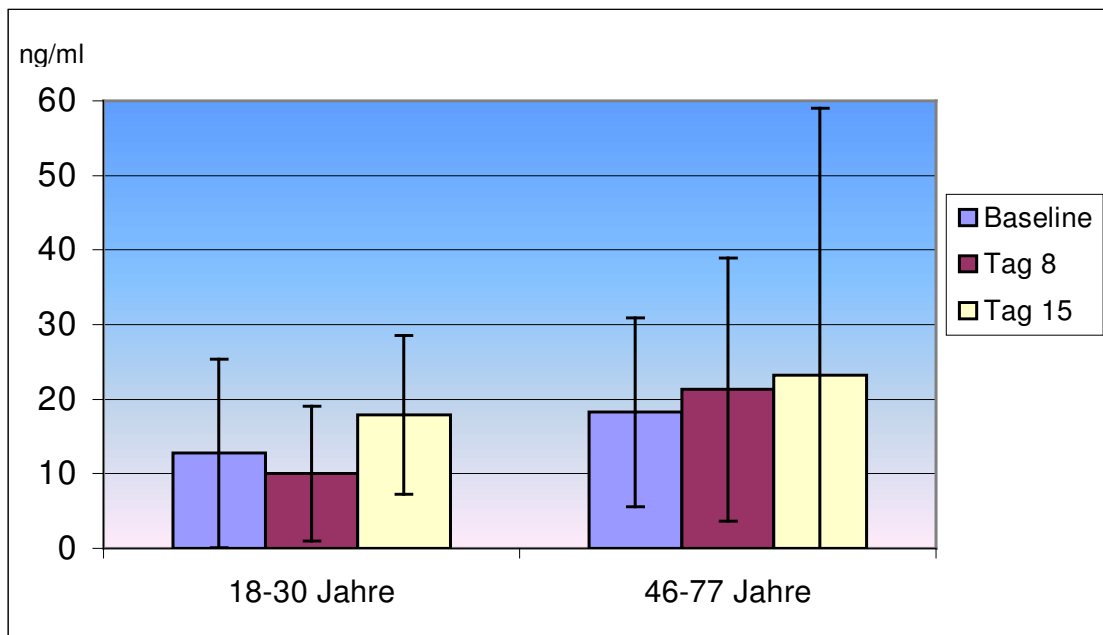


Abb.16 Prostaglandin E₂

Der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben auf Unterschiede zu den Zeitpunkten zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied.

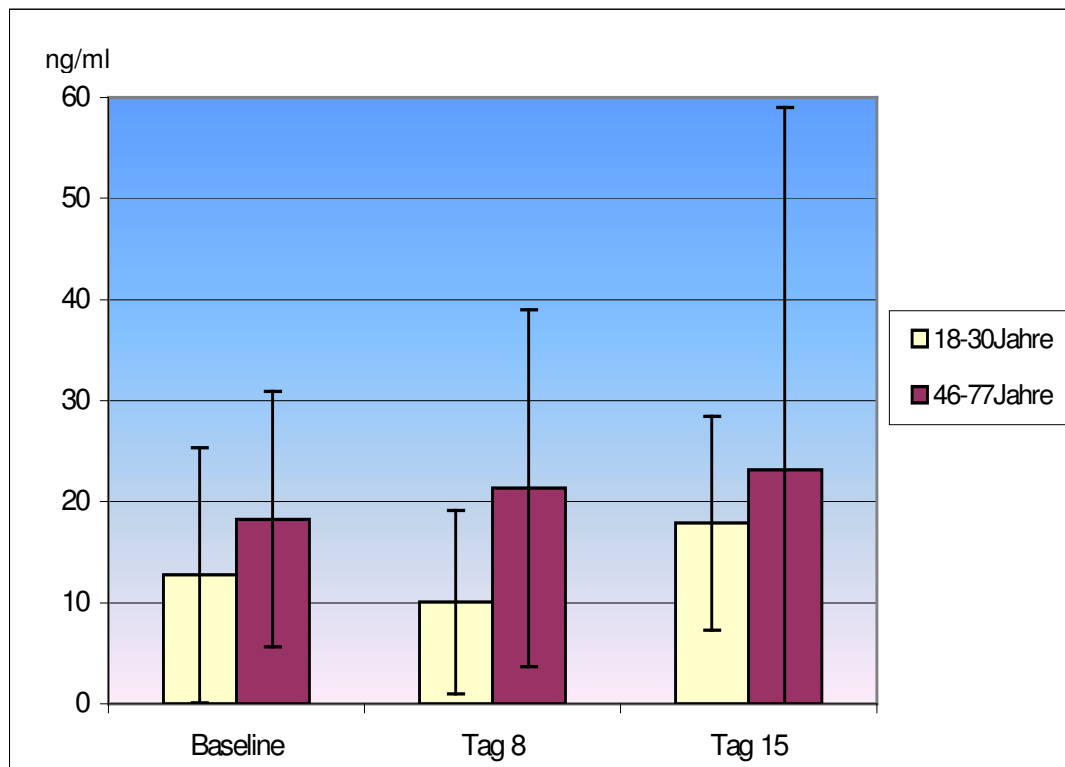


Abb.17 Prostaglandin E₂ Gruppenunterschiede

Der *Mann-Whitney-U-Test* auf Gruppenunterschiede der zwei Gruppen zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Fasst man für Prostaglandin E₂ die beiden Gruppen zusammen, lässt sich im Verlauf der zweiwöchigen experimentellen Gingivitisphase eine Zunahme der PGE₂-Konzentrationen im Sulkusfluid beobachten. Hierbei stieg die Ausgangskonzentration von $15,5 \pm 12,03$ ng/ml auf $20,52 \pm 25,22$ ng/ml nach 14 Tagen (Abb.18).

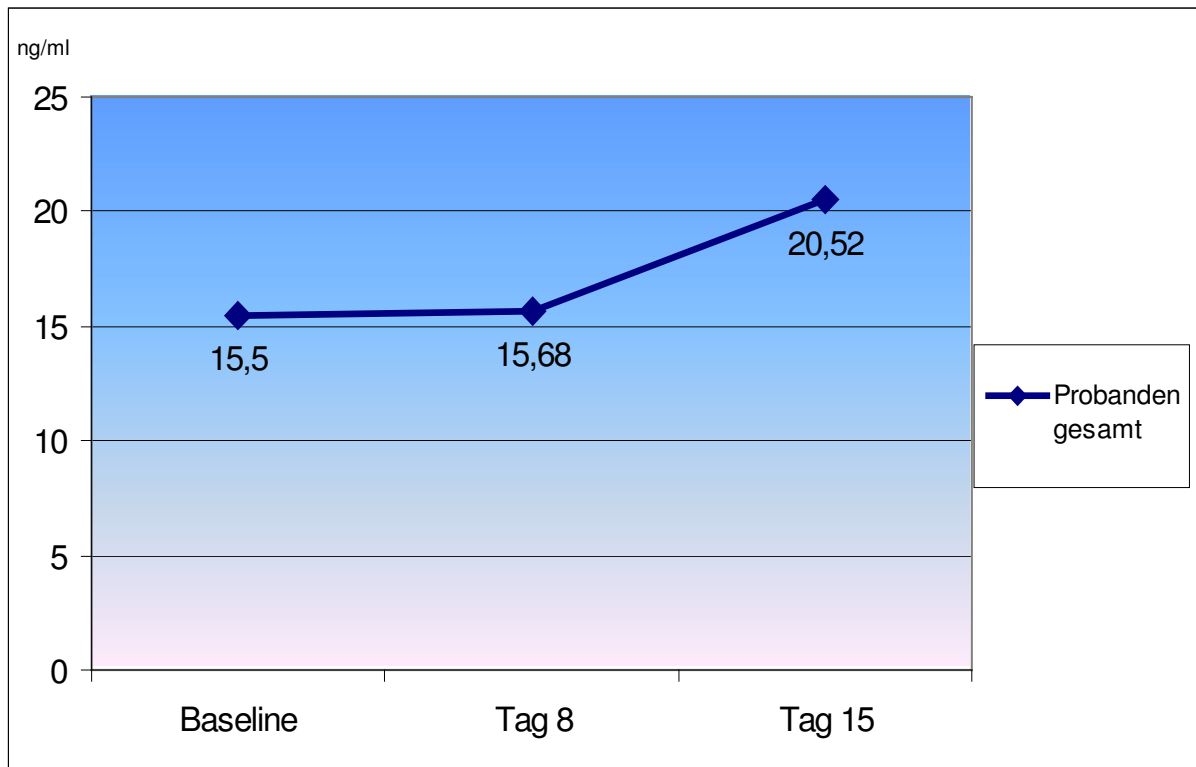


Abb. 18: Prostaglandin E₂ Gesamtkonzentration beider Altersgruppen

3.2.2 Migration Inhibitory Factor

Migration Inhibitory Factor war im gesunden Zustand zur Baseline-Untersuchung in hohen Konzentrationen in beiden Gruppen nachzuweisen ($1542,48 \pm 792,96$ ng/ml respektive $1503,81 \pm 804,27$ ng/ml). In der Gruppe der 18-30-Jährigen stieg die MIF-Konzentration nach einer Woche der experimentellen Gingivitis auf 2194 ± 1317 ng/ml und sank nach der zweiten Untersuchungswoche auf $1826 \pm 930,95$ ng/ml. Für den Zeitraum der gesamten Studie ergab sich damit ein Anstieg der MIF-Konzentration für die jüngere Altersgruppe. Diese Veränderungen waren statistisch nicht signifikant. Für die älteren Probanden konnte am Tag 8 der experimentellen Gingivitis eine Abnahme auf $1157 \pm 409,38$ ng/ml festgestellt werden. Am Tag 15 betrug die MIF-Konzentration 1224 ± 568 mg/ml. In der Gruppe der 46-77-Jährigen konnte somit ein Absinken während der zweiwöchigen Gingivitis nachgewiesen werden. Auch diese Veränderungen waren statistisch nicht signifikant (Abb.19 und Tab.4).

Im Gruppenvergleich konnten im gesunden Zustand für beide Altersgruppen nahezu gleiche Ausgangswerte ermittelt werden. Bei den jüngeren Probanden stieg MIF im

Verlauf der ersten Woche der experimentellen Gingivitis an, in der Gruppe der älteren Probanden sank die MIF-Konzentration im gleichen Zeitraum. Am Tag 8 der experimentellen Gingivitis war dieser Gruppenunterschied statistisch signifikant. Zum dritten Untersuchungszeitpunkt am Tag 15 war die MIF-Konzentration bei den jüngeren Probanden ebenfalls höher als die der älteren, dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (Abb.20).

Bei Betrachtung der einzelnen Probanden konnten in der Gruppe der 18-30-Jährigen zwischen den einzelnen Teilnehmern sehr große Schwankungen der MIF-Konzentration beobachtet werden. Bei 50% der jüngeren Probanden war der MIF-Wert nach der ersten Woche der experimentellen Gingivitis der höchste. Die ältere Gruppe zeigte nur geringe Schwankungen zwischen den Probanden. Hier war bei 5 von 9 Probanden (55,6%) der Baseline-Wert am höchsten (Abb. 34 und 35 im Anhang).

	MIF (ng/ml)			
	18-30 Jahre		46-77Jahre	
	x	SD	x	SD
Baseline	1541	792,96	1503,8	804,27
Tag 8	*2194	1317	*1157,2	409,38
Tag 15	1826	930,95	1224,7	568,33

Tab. 4: MIF

x= Mittelwert, SD= Standardabweichung

Der Wilcoxon-Test auf Unterschiede zwischen den Untersuchungszeitpunkten zeigt keine signifikanten Anstiege in beiden Gruppen.

Der Mann-Whitney-U-Test auf Unterschiede zwischen den Gruppen zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an Tag 8 (*).

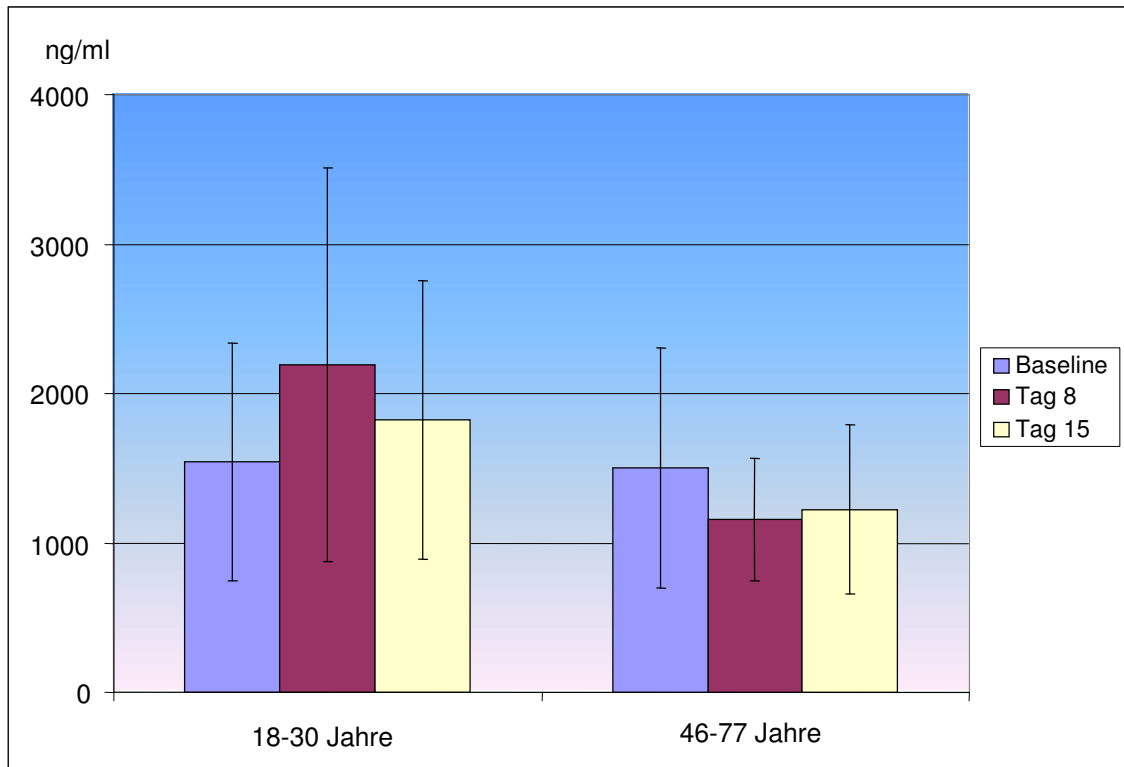


Abb.19 MIF

Der *Wilcoxon-Test* für *verbundene Stichproben* auf Unterschiede zu den Zeitpunkten zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied

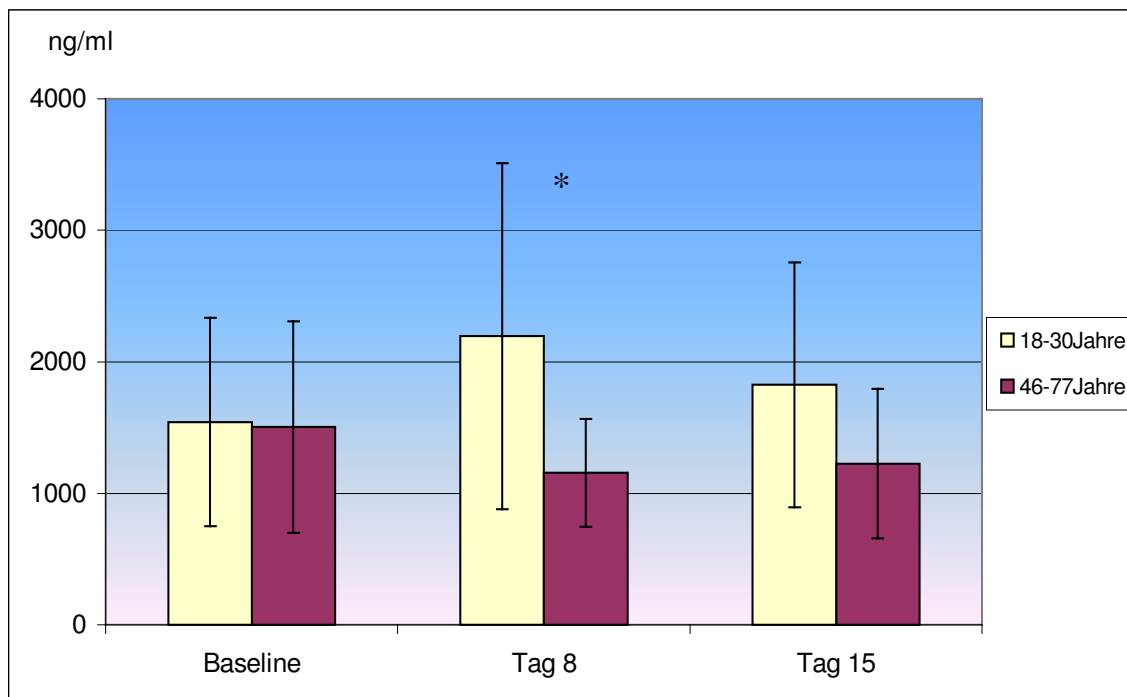


Abb.20 MIF Gruppenunterschiede

Der *Mann-Whitney-U-Test* auf Gruppenunterschiede der zwei Gruppen zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied am Tag 8 *

3.3 Korrelationen

Die Korrelationsprüfung der klinischen Parameter ergab für die 18-30-Jährigen statistisch signifikante hohe Korrelationen zwischen BNS und GI zu allen drei Zeitpunkten. Das Verhältnis von BNS zu PI zum Zeitpunkt 2 zeigte eine geringe Korrelation, die statistisch signifikant war. Außerdem stellte sich jeweils eine mittlere Korrelation zwischen PGE₂ und PI zum Zeitpunkt 2 und von PGE₂ und GI zum Zeitpunkt 3 dar. MIF korrelierte zu keinem Zeitpunkt mit den klinischen Parametern (Tab.5).

Für die ältere Gruppe war eine hohe Korrelation zwischen PI und GI zur Baseline nachzuweisen. Eine Korrelation von PGE₂ zu GI, PI und BNS konnte im Verlauf der experimentellen Gingivitis nicht nachgewiesen werden. Zu den Zeitpunkten 2 und 3 lag jeweils eine mittlere bzw. hohe negative Korrelation zwischen hohen Werten für BNS und niedrigen für MIF vor (Tab.5).

	Baseline				Tag 8				Tag 15			
18-30 Jahre	GI	PI	BNS	MIF	GI	PI	BNS	MIF	GI	PI	BNS	MIF
PI	r = 0,594 p = 0,070				0,424 0,169				0,431 0,162			
BNS	r = 0,697 p = 0,025	0,413 0,236			0,778 0,003	0,595 0,041			0,747 0,005	0,455 0,137		
MIF	r = 0,415 p = 0,233	0,212 0,556	0,358 0,310		-0,287 0,366	-0,455 0,138	-0,112 0,729		-0,336 0,286	-0,035 0,914	-0,294 0,353	
PGE₂	r = -0,226 p = 0,531	0,042 0,907	-0,358 0,310	-0,127 0,709	0,287 0,366	0,601 0,039	0,483 0,112	-0,014 0,966	0,697 0,025	0,188 0,603	0,267 0,455	-0,418 0,229
46-77 Jahre												
PI	r = 0,771 p = 0,015				0,494 0,176				0,662 0,052			
BNS	r = 0,018 p = 0,964	0,045 0,909			-0,395 0,293	-0,449 0,226			-0,120 0,758	0,119 0,760		
MIF	r = 0,183 p = 0,637	0,184 0,635	-0,517 0,154		0,650 0,058	0,567 0,112	-0,667 0,050		0,350 0,356	0,283 0,460	-0,883 0,002	
PGE₂	r = 0,233 p = 0,546	0,377 0,318	0,233 0,546	0,483 0,187	0,417 0,265	0,000 1,000	0,300 0,433	0,267 0,488	-0,050 0,898	-0,217 0,576	-0,317 0,406	0,367 0,332

Tab. 5 Korrelationen

zwischen PI, GI und BNS: Pearsonscher Korrelationswert
zwischen MIF und PGE₂: Spearmanscher Korrelationswert

p≤0,05	signifikant	r	Korrelationskoeffizient
p≤0,01	sehr signifikant	r≤0,2	sehr geringe Korrelation
p≤0,001	höchst signifikant	r≤0,5	geringe Korrelation
		r≤0,7	mittlere Korrelation
		r≤0,9	hohe Korrelation
		r>0,9	sehr hohe Korrelation

		Baseline				Tag 8				Tag 15			
		GI	PI	BNS	MIF	GI	PI	BNS	MIF	GI	PI	BNS	MIF
PI	r =	0,684				0,431				0,475			
	p =	0,001				0,051				0,030			
BNS	r =	0,391	0,185			0,437	0,122			0,646	0,360		
	p =	0,098	0,098			0,047	0,598			0,002	0,109		
MIF	r =	0,284	0,196	-0,022		-0,037	-0,166	-0,301		-0,151	0,008	-0,583	
	p =	0,239	0,422	0,929		0,873	0,471	0,184		0,513	0,973	0,006	
PGE₂	r =	-0,015	0,116	-0,056	0,140	0,299	0,410	0,377	0,046	0,348	-0,096	-0,055	0,046
	p =	0,952	0,637	0,819	0,556	0,188	0,065	0,092	0,853	0,144	0,694	0,822	

Tab. 6 Spearmansche Rangkorrelationen, Korrelationskoeffizient r und p-Wert für alle Probanden

Bei Betrachtung aller Probanden wurde eine statistisch signifikante mittlere bzw. geringe Korrelation zwischen PI und GI zu den Zeitpunkten 1 und 3 festgestellt ($r = 0,684$ bzw. $0,475$) (Tab.6). Für BNS wurde in Bezug auf GI zum Zeitpunkt 2 eine geringe und zum Zeitpunkt 3 eine mittlere Korrelation ermittelt, die jeweils statistisch signifikant waren ($r = 0,437$ bzw. $0,646$). Eine Korrelation zwischen PI und BNS war statistisch nicht nachzuweisen. Für Prostaglandin E_2 konnte zu keinem Zeitpunkt ein Zusammenhang zu GI, PI und BNS beobachtet werden. Eine Korrelation von MIF zu GI und PI konnte ebenso nicht nachgewiesen werden; zum Zeitpunkt 3 lag eine negative Korrelation zwischen BNS und MIF ($p \leq 0,01$) vor.

MIF und PGE_2 wurden ebenfalls auf mögliche Korrelationen hin untersucht. Dafür wurden für alle Probanden für beide Parameter die Differenzen der Zeitpunkte zwei und eins errechnet und diese Differenzen korreliert. Gleiches wurde für die Differenzen der Zeitpunkte drei und zwei durchgeführt (Tab.11 und 12 im Anhang). Die Spearmansche Korrelation zwischen den Differenzen der ersten beiden Zeitpunkte der Parameter PGE_2 und MIF ergab $r = 0,140$ ($p = 0,556$) und war damit nicht signifikant. Für die Spearmansche Korrelation zwischen den Differenzen des zweiten und dritten Zeitpunktes der Parameter PGE_2 und MIF wurde $r = 0,046$ ($p = 0,853$) und damit ebenfalls keine Signifikanz festgestellt. Aufgrund der beobachteten Korrelationen kann nicht von einem zeitlichen Zusammenhang (Steigen/Fallen des einen Parameters bewirkt ein Steigen/Fallen des anderen Parameters) der beiden Parameter ausgegangen werden.

4. DISKUSSION

4.1 Diskussion der Methode

4.1.1 Untersuchungszeitraum und Probandenauswahl

Die erstmals von Loe und Mitarbeitern vorgestellte experimentelle Gingivitis ist ein in zahlreichen Studien verwendetes und verlässliches Modell für klinische Untersuchungen der Gingivitis (Loe et al. 1965). Nach Aussetzen der gewohnten Mundhygiene lässt sich innerhalb von 10 - 21 Tagen eine Gingivitis experimentell erzeugen (Loe et al. 1965). In der vorliegenden Studie war eben dieser Effekt erwünscht, wobei ein Zeitraum von 14 Tagen gewählt wurde. Auch in anderen Studien, die ebenfalls auf dem Modell der experimentellen Gingivitis basierten, wurden die Mundhygienemaßnahmen für 14 Tage unterlassen (Cutler et al. 2000; Sekino et al. 2005).

Untersuchungen zeigen, dass die inflammatorische Reaktion der Gingiva auf Plaque individuell unterschiedlich sein kann und des Weiteren von zahlreichen Faktoren (z.B. systemische, genetische, metabolische oder umweltbedingte Faktoren) abhängen kann (Tatakis & Trombelli 2004). Folglich ist es bei Anwendung des Modells der experimentellen Gingivitis besonders wichtig, möglichst viele modifizierende Faktoren durch die Probandenauswahl auszuschließen. Auch in der hier durchgeführten Studie hat man versucht, beeinflussende Faktoren auszuschalten. Durch die Erhebung von Anamnese und Befund konnten Allgemeinerkrankungen, eine Medikamenteneinnahme und das Vorhandensein von Prädilektionsstellen für eine Plaqueakkumulation ausgeschlossen werden. Weiterhin waren nur Nichtraucher zu der Studie zugelassen, da verschiedene Untersuchungen belegt haben, dass die klinischen Zeichen einer gingivalen Entzündung bei Rauchern durch einen reduzierten Blutfluss im Mikrovaskularsystem der Gingiva und veränderter Funktion von neutrophilen Granulozyten maskiert waren (Machuca et al. 2000; Obeid & Bercy 2000; Kinane 2001). Lie et al. zeigten in einer experimentellen Gingivitis-Studie, dass Raucher bei gleicher Plaquemenge eine nur halb so große Blutungsneigung aufwiesen wie Nichtraucher, obgleich keine Unterschiede in der oralen Mikroflora gefunden wurden (Lie et al. 1998).

Die Voraussetzung, dass alle Probanden sowohl allgemeinmedizinisch als auch parodontologisch gesund sein und über ein nahezu vollständiges Gebiss verfügen

mussten, gestaltete sich insbesondere in der älteren Probandengruppe als schwierig, da in dieser Altersgruppe nur wenige Menschen die geforderten Voraussetzungen erfüllten. Dadurch erklären sich die Notwendigkeit der Selektion der Probanden und die geringe Probandenzahl in der vorliegenden Studie.

Zu Beginn der Studie wurden durch professionelle Zahnreinigungen bei allen Probanden gesunde Parodontien etabliert, was durch die untersuchten klinischen Parameter bestätigt wurde. Die klinischen Untersuchungskriterien entsprachen internationalen Standards, wobei insbesondere die Sondierungstiefe mit Bluten nach Sondieren, der Gingival Index nach Loe & Silness (1963) und der Plaque Index nach Silness & Loe (1964) sehr aussagekräftig waren. Die Entwicklung der experimentellen Gingivitis nach 14 Tagen ohne Mundhygienemaßnahmen wurde ebenfalls durch die klinischen Indizes beurteilt.

4.1.2 Klinische Untersuchungsparameter

Plaque Indizes erlauben eine graduelle Einteilung der oralen Mundhygiene. Obwohl ein Plaque Index nicht die Gewebereaktion beschreibt, gibt er doch Auskunft über das Vorhandensein von Faktoren, die an der Zahn-Gingiva-Grenzfläche die Gewebereaktion beeinflussen können. Die Beurteilung bezieht sich auf die Quantität der Plaque bzw. auf die Dicke des Plaquebelages in den zu untersuchenden Regionen (Fischman 1986). Der Plaque Index nach Silness und Loe (1964) wurde in der vorliegenden Studie zur Kontrolle des Plaquezuwachses eingesetzt. Er liefert für klinisch-wissenschaftliche Untersuchungen sehr genaue Ergebnisse und zeigt insbesondere den Einfluss der Plaque auf die Gingivitis (Zafiroopoulos et al. 1991a). Im Rahmen einer Studie wurde untersucht, ob die Ermittlung des Plaquegewichtes gegenüber der Verwendung von Plaqueindizes Vorteile hat, wobei in dieser Untersuchung kein signifikanter Vorteil in der Bestimmung des Plaquegewichtes festgestellt werden konnte (McCracken et al. 2006). Auch in der hier vorliegenden Studie wurde auf die Ermittlung des Plaquegewichtes verzichtet und ein Plaque Index ermittelt.

Der **Gingival Index** nach Loe und Silness (1963) erlaubt eine graduierte Einschätzung des Entzündungsgrades der parodontalen Gewebe. Ein Gingival Index von null bis eins entspricht weitgehend gesunden Verhältnissen, bei Grad zwei und

drei liegen jedoch starke Entzündungszeichen vor. Optische Anzeichen wie Rötung und Schwellung sind klinische Zeichen der gingivalen Entzündung. Histologische Studien haben bestätigt, dass diese sichtbaren Zeichen der Entzündung mit bedeutenden entzündlichen Veränderungen in der Gingiva korrelieren (Davenport et al.1982). Der Gingival Index eignet sich allerdings nur zu einer orientierenden Beurteilung des Entzündungsgrades und der Entzündungsbereitschaft der Gewebe und muss immer im Zusammenhang mit anderen klinischen Befunden gesehen werden. Die Erhebung des Gingival Indexes kann in Kombination mit weiteren klinischen Parametern ein geeignetes Mittel für die Erfassung von Entzündungszeichen sein und wurde in der vorliegenden Studie mit einbezogen. Die **Blutung auf Sondierung**, wie sie der Gingivalindex nach Loe und Silness fordert, stellt einen besonders leicht und schnell zu erhebenden, objektiven Entzündungsparameter der Gingiva dar (Newbrun 1996). Sie ist noch früher als Farb- und Formveränderungen der Gingiva feststellbar und im Gegensatz zu diesen ein objektiveres Merkmal einer Entzündung. Die gingivale Blutung ist allgemein als klinisches Zeichen gingivaler Entzündung akzeptiert (Caton et al.1988). Histologische Studien belegen eine stärkere Entzündungsreaktion in blutendem als in nichtblutendem Weichgewebe. Allerdings korrelierte die Blutung nach Sondieren in einigen Untersuchungen nicht mit dem histologischen Grad der Entzündung (Apse et al.1991; Lekholm et al.1986). Um eine reproduzierbare Auskunft über den Entzündungsparameter der Blutungsneigung der Gingiva zu erhalten und falsch-positive Untersuchungsergebnisse zu vermeiden, ist es besonders entscheidend, einen möglichst standardisierten Sondendruck zu verwenden. Studien haben gezeigt, dass eine Abhängigkeit zwischen aufgewendetem Sondendruck und Blutungsindex besteht (Lang et al.1991). Durch die Verwendung einer standardisierten Parodontalsonde sowie die Durchführung der Untersuchungen durch einen einzigen geübten Behandler sollte in dieser Studie ein möglichst reproduzierbarer Sondendruck ausgeübt werden.

Die Bestimmung der **Sondierungstiefe** stellt bei schonender Methodik mit geeigneten manuellen Sonden eine einfache und exakte Befundung dar. In einer Langzeitstudie gleich bleibende Sondierungstiefen deuten auf gesunde Verhältnisse hin. Die Messung der Zahnfleischtasche ist eine reine „status quo“ Beschreibung, die eine bereits abgelaufene parodontale Destruktion feststellt, jedoch aktive und passive Entzündungsphasen nicht identifizieren kann. Bei der Bestimmung der

Sondierungstiefe sollte bedacht werden, dass die Messung nicht unbedingt mit dem tatsächlichen histologischen Befund der Zahnfleischtasche übereinstimmt, da die Sondenspitze selten exakt den apikalsten Punkt des Taschenbodens erreicht. Oftmals wird beim Sondieren das Sulkus - bzw. Taschenepithel durchbrochen, die Sonde bis ins Bindegewebe vorgeschoben, und die klinische Messung führt somit zu überhöhten Werten. Die Sondierungstiefe ist zudem von einer Vielzahl weiterer Faktoren abhängig, wie z.B. der Sondierungskraft, Form, Durchmesser und Einschubrichtung der Parodontalsonde sowie dem Gewebszustand. So ist beispielsweise entzündetes Gewebe durch eine Kollagenarmut sehr weich und durch die Sonde wesentlich leichter zu penetrieren als gesundes Parodontalgewebe. Die Messung der Sondierungstiefe bei der experimentellen Gingivitis lässt offen, ob der Anstieg durch apikale Verschiebung des Taschenbodens oder durch eine Schwellung der Gingiva verursacht wird (Löe & Silness 1963). Einige der angeführten Fehlerquellen können durch die Verwendung einer standardisierten Parodontalsonde sowie die Durchführung der Untersuchungen durch einen einzigen geübten Behandler vermieden werden.

Die Bestimmung des klinischen **Attachmentlevels** hängt stark von der Messung der Sondierungstiefe (siehe oben) und somit auch von den Ungenauigkeiten beim Sondieren ab. Charakteristisch für den Verlauf einer parodontalen Erkrankung ist neben anderen Zeichen der Attachmentlevelverlust. Gemeinsam mit der Bestimmung der Sondierungstiefe ist die Messung des klinischen Attachmentlevels trotz der Ungenauigkeiten eine einfache und schnelle Methode, um Veränderungen im parodontalen Gewebe aufzuzeigen.

4.1.3 Die Gewinnung der Sulkusflüssigkeit

Der im Sulkus vorhandene Biofilm mit seinen Stoffwechselprodukten bewirkt noch vor dem Auslösen einer entzündlichen Reaktion den Austritt von Flüssigkeit in Form eines *Transsudates*, dessen Hauptbestandteil die interzelluläre Flüssigkeit bildet. Weitere Bestandteile sind die dem Zahn und der Gingiva in diesem Bereich anhaftenden Bakterien und deren Abbauprodukte (Zafiroopoulos et al.1991b). Im Rahmen der gingivalen Entzündungsreaktion kommt es zu einer Steigerung der Gefäßwandpermeabilität, was zum Austritt von Blutserum in das umgebende

Bindegewebe führt (*Exsudat*). Von dort sickert es durch das Saumepithel in den Sulkus, wo es Substanzen des entzündlichen Prozesses aufnimmt und als Sulkusflüssigkeit schließlich in die Mundhöhle austritt. Die Hauptbestandteile leiten sich in diesem Fall vom Plasma, dem Gingivagewebe (durch welches die Flüssigkeit, um in den Sulkus zu gelangen, durchtritt) und den im Gewebe und im Sulkus befindlichen Mikroorganismen sowie deren Bestandteilen bzw.

Stoffwechselprodukten ab (Lamster et al.1985; Kornman 1987; Suido et al.1988).

Sowohl die Qualität als auch die Quantität der Sulkusflüssigkeit lassen demnach Rückschlüsse auf den Entzündungszustand der Gingiva zu. Mit Hilfe verschiedener Verfahren kann eine Beurteilung der ausgetretenen Sulkusflüssigkeitsmenge vorgenommen werden. Die Wahl der Methode richtet sich dabei in der Regel nach dem Zweck der Untersuchung. Für die eigentliche Gewinnung der Sulkusflüssigkeit sind in der Literatur drei Möglichkeiten beschrieben:

Bei der Auswaschmethode wird der Sulkus mit physiologischer Kochsalzlösung gespült, die dann sofort wieder gemeinsam mit der Sulkusflüssigkeit aspiriert wird. Dieses Verfahren dient der Gewinnung von Sulkusflüssigkeit mit ihren zellulären Bestandteilen. Es sind zwei verschiedene Methoden in der Literatur beschrieben worden. Die einfachere umfasst die Einträufelung und Re-Aspiration von physiologischer Kochsalzlösung an der Interdentalpapille (Skapski & Lehner 1976). Dieser Vorgang wird mehrfach wiederholt, um eine gründliche Mischung der Transportlösung und der Sulkusflüssigkeit zu gewährleisten. Die aufwendigere Methode setzt einen maßgefertigten Acrylstent voraus, der das parodontale Gewebe des entsprechenden Zahnes vom Rest der Mundhöhle isolieren soll. Das Gewebe wird dann für 15min mit einer Salzlösung und einer peristaltischen Pumpe gespült, und die verdünnte Sulkusflüssigkeit wird entnommen (Oppenheim 1970).

Diese Gingivawaschung erscheint sinnvoll, wenn lediglich die Anzahl und die Art der verschiedenen Zelltypen untersucht werden sollen. Als Hauptnachteil dieser Methode ist zu sehen, dass nicht die gesamte Sulkusflüssigkeit durch das Aspirieren und Re-Aspirieren aufgenommen wird. Dadurch ist eine genaue Quantifizierung des Volumens oder der Zusammensetzung nicht möglich, da ein exakter Verdünnungsfaktor nicht bestimmt werden kann (Griffiths 2003).

Bei der Kapillar-bzw. Mikropipettenmethode wird die Sulkusflüssigkeit in Kapillarröhrchen von standardisiertem Ausmaß bei standardisierter Zeit aufgesaugt (Sueda et al.1969). Die Sulkusflüssigkeit migriert durch Kapillarkräfte in das

Röhrchen, und da der innere Durchmesser bekannt ist, kann das Volumen der gesammelten Sulkusflüssigkeit anhand der zurückgelegten Strecke in dem Röhrchen genau analysiert werden. Solche Mikropipetten kommen immer dann zum Einsatz, wenn größere Mengen an Sulkusflüssigkeit benötigt werden bzw. vorhanden sind, beispielsweise bei entzündetem Gewebe. Bei gesunden Verhältnissen und entsprechend geringer vorhandener Sulkusflüssigkeitsmenge kann es nötig sein, die Kapillare über mehr als 30 min im Sulkus zu belassen, um ein ausreichendes Volumen aufzusaugen. Dies ist weder atraumatisch für den entsprechenden Sulkus, noch in der Praxis am gesunden Untersuchungsort umsetzbar. Eine weitere Komplikation dieser Methode stellt die vollständige Herauslösung der Sulkusflüssigkeit aus der Pipette dar. Dies kann entweder über einen Luftstrahl, eine Verdünnungslösung oder durch Zentrifugation erfolgen.

Die Sulkusflüssigkeit wird bei der Filterpapierstreifen-Methode mit speziellen Filterpapierstreifen aufgenommen, die für eine bestimmte Zeit entweder auf den Eingang des Sulkus (extrakrevikulär) oder in den Sulkus (intrakrevikulär) appliziert werden. Die intrakrevikuläre Methode kann weiter unterteilt werden in die oberflächliche Variante, wobei der Filterpapierstreifen gerade in den Eingangsbereich des Sulkus geführt wird, und die tiefe Variante, bei der der Streifen bis zum Taschenboden appliziert wird (Abb. 21).

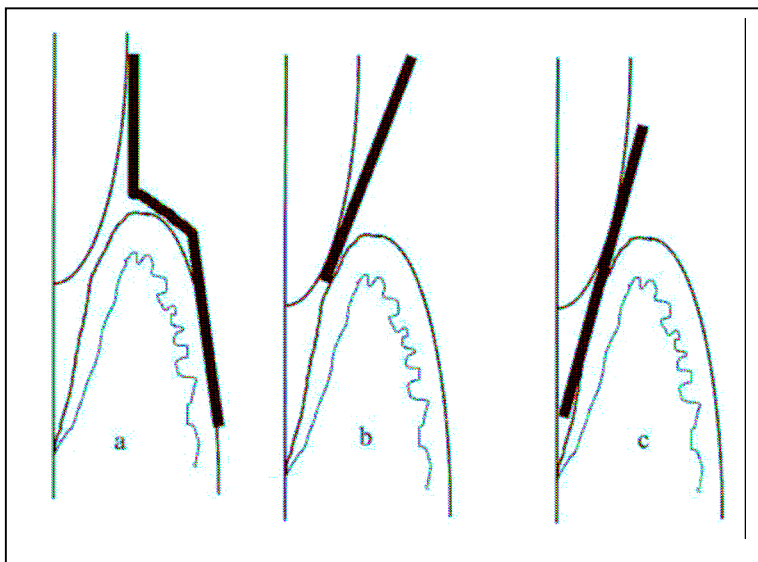


Abb.21. Darstellung der Positionierung der Filterpapierstreifen (Griffiths 2003)

- (a) extrakrevikuläre Methode
- (b) "oberflächliche" intrakrevikuläre Methode
- (c) "tiefe" intrakrevikuläre Methode

Die Filterpapierstreifen-Methode ist am weitesten verbreitet. Als Vorteile sind die schnelle und einfache Handhabung sowie die - bei korrekter Anwendung- geringe Traumatisierungsgefahr des Gewebes zu nennen.

Die mittels Filterstreifen gewonnenen Proben lassen sich mit verschiedenen Methoden auswerten. Bei der Ninhydrin-Methode wird die Sulkusflüssigkeit der Filterpapierstreifen mit alkoholischer 0,2%iger Ninhydrinlösung blau bis violett eingefärbt, so dass die gefärbte Strecke auf dem Filterpapierstreifen gemessen werden kann. Die blau- violette Anfärbung wird durch die Reaktion von Ninhydrin mit Proteinen und α - Aminosäuren der Sulkusflüssigkeit ermöglicht. Eine noch genauere Markierung der Sulkusflüssigkeit der Filterpapierstreifen ist möglich durch die so genannte Fluorescein-Methode. Hierbei werden dem Probanden 2g Fluorescein zwei Stunden vor Probenentnahme systemisch verabreicht, und die Filterpapierstreifen mit der Sulkusflüssigkeit werden unter ultraviolettem Licht untersucht.

Um eine Verfälschung der Messergebnisse zu vermeiden, darf kein Speichel mit dem Filterpapier aufgesogen werden (Cimasoni 1974). Die Nachteile der Färbetechniken liegen zum einen darin, dass die unumgängliche Verzögerung der Ausmessung des Streifens zu Verdunstung und damit zu Ungenauigkeiten des ermittelten Volumens führen kann. Außerdem verhindert die Reaktion der Färbemittel mit den Proteinen der Sulkusflüssigkeit eine weitere Laboruntersuchung der weiteren Komponenten; die Methode beschränkt sich demnach nur auf die Messung des Volumens.

Bei selbstfärbenden Indikatorstreifen handelt es sich um in Millimeter skalierte 1 mm breite Teststreifen, die einen sogenannten nichtblutenden pH- abhängigen Indikator an Cellulose gebunden enthalten. Durch steigende pH- Werte kommt es zu einer Farbveränderung von Gelb nach Violett. Nach Applikation an den Sulkuseingang kommt es durch die Sulkusflüssigkeit zu einer Verfärbung des Streifens entsprechend der Steighöhe, die anschließend mittels einer Lupe abgelesen werden kann (Kohlbecker et al.1989).

Eine Analyse der Sulkusflüssigkeitsmenge ist auch über die Messung der Gewichtszunahme eines mit Sulkusflüssigkeit beschickten Filterpapierstreifens möglich (Cimasoni et al.1988; Valazza et al.1972). Hierbei wird der Streifen vor und nach Probenentnahme gewogen und die Differenz berechnet. Diese Wiegemethode konnte erfolgreich angewendet werden (Condacci et al.1982; Giannopoulou et al.1992), erfordert aber eine sehr genaue Waage, um die zum Teil sehr kleinen

Mengen an Sulkusflüssigkeit, vor allem aus einem gesunden Sulkus, zu bestimmen. Ähnlich wie bei den vorher beschriebenen Techniken können Verdunstungseffekte zu Ungenauigkeiten führen.

Auch bei der hygrometrischen Bestimmung mit dem Periotron[®] werden spezielle Filterpapierstreifen verwendet, mit denen die Sulkusflüssigkeit in einer vorgegebenen Zeit aufgenommen wird. Die Volumenbestimmung der aufgenommenen Sulkusflüssigkeitsmenge erfolgt anschließend mit dem Periotron[®]-Gerät (Oraflow Inc., Amityville, New York, USA), das Feuchtigkeitssensoren besitzt und Flüssigkeitsmengen bis in den Nanoliterbereich bestimmen kann. Das Gerät misst dabei das gesammelte Flüssigkeitsvolumen des Streifens über die Veränderung der Leitfähigkeit gegenüber einem trockenen Streifen. Die Flüssigkeitsmenge wird digital in Einheiten (PU = Periotron units) angegeben, kann aber bei Bedarf durch eine Kalibrierung des Gerätes in Volumina umgerechnet werden. Bei der neuesten Version, dem Periotron[®] 8000, besteht die Möglichkeit, das Gerät mit einem Computer zu koppeln und mit der entsprechenden Software eine sofortige Umrechnung in Volumen zu erhalten.

Es gibt mehrere Faktoren, die bei der Periotron[®]-Methode zu Fehlern bei der Volumenbestimmung führen können. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass üblicherweise der totale Fehler im Modell gemessen wird und dieser sich aus dem Periotron[®] an sich, der Verdunstung von Flüssigkeit, Raumtemperatur und -luftfeuchtigkeit, der verwendeten Dispersierungsmethode und der für die Dispersierung des Volumens angewendeten Spritze zusammensetzt. Die häufigsten gerätespezifischen Fehlerquellen des Periotrons[®] stellen die Positionierung des Filterpapierstreifens innerhalb der Maschine, Flüssigkeitsretention an den Sensoren, Ungenauigkeiten bei der Kalibrierung des Periotrons[®] und Unterschiede bei der Viskosität und Ionenkonzentration der Kalibrierungsflüssigkeiten dar. In verschiedenen Studien wurde die Fehlerhäufigkeit zwischen wiederholten Messungen mit dem Periotron[®] beschrieben (Griffiths 2003). Bei Testvolumina von 0,1 µl führte die Flüssigkeitsretention an den zwei Sensoren zu Verlusten von bis zu 8,21% (Tozum et al. 2004).

Diese an sich minimalen Fehler schlagen sich in erhöhten Prozentzahlen nieder, wenn die Originalvolumina klein sind und somit das untere Ende der Kalibrierungskurve des Periotrons[®] betroffen ist. Aus diesem Grund wird das untere

Ende der Kalibrierungskurve als fehlerverdächtig eingestuft und das Periotron[®] als ein Gerät gesehen, mit dem man nur akkurate Volumenmessungen zwischen 0,1 und 1,2µl durchführen kann (Griffiths 2003).

Die Sulkusflüssigkeitsmenge stellt, wie aus den obigen Ausführungen hervorgeht, einen besonders empfindlichen Untersuchungsparameter dar. Fehlerhafte Probenentnahmen können zu einer Verfälschung des Ergebnisses der gesamten Untersuchung führen. Bei allen Entnahmeverfahren der Sulkusflüssigkeit können die Resultate der Analyse dadurch negativ beeinflusst werden, dass bei der Gewinnung kapilläre Mikrorisse im subepithelialen Gefäßplexus entstehen. Diese Mikroverletzungen können zu einer Plasmakontaminierung der „natürlichen“ Sulkusflüssigkeit führen (Lamster et al.1985). Da sich die Zusammensetzung des Plasmas von der der Sulkusflüssigkeit unterscheidet, wird so das Verhältnis von Bestandteil zu Volumen verändert. Gerade die in einigen früheren Untersuchungen verwendeten Kapillarröhrchen, die relativ große Standardmengen (10-20µl) lieferten, stellten diesbezüglich keine physiologische Annäherung zur Sulkusflüssigkeitsanalyse dar (Bang et al.1972; Lamster et al.1986). Auch bei der heute gebräuchlichen Methode mit Filterpapierstreifen kann es beim Einsetzen zu Mikroverletzungen kommen. Um einer Traumatisierung des Gewebes und der damit verbundenen Permeabilitätssteigerung entgegenzuwirken, sollte der Streifen am Gingivarand angesetzt werden (Egelberg 1966). Die intrakrevikuläre Methode wird dabei heute favorisiert (Griffiths 2003).

Auch Speichel im Bereich des Sulkuseinganges oder die fehlerhafte Applikation der sterilen Papierspitzen können die Messwerte verfälschen. Nimmt man beispielsweise mit dem Filterpapierstreifen Plaque auf oder appliziert ihn mit Druck, wird ein zu hohes Messergebnis erreicht. Studien zeigen, dass die gemessenen Sulkusflüssigkeitsmengen bei Vorhandensein von supragingivaler Plaque verfälscht werden (D'Aoust & Landry 1994). Entscheidend ist hier, nur die Sulkusflüssigkeit zu entnehmen, um die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse zu gewährleisten. Sowohl für die Filterstreifen- als auch für die Kapillarmethode ist es entscheidend, dass die Verweildauer der Entnahmegерäte eine Zeit von 120sec nicht übersteigt (Curtis et al.1989). Da eine Traumatisierung des Gewebes wie oben beschrieben nie gänzlich ausgeschlossen werden kann, soll so ein mögliches überproportionales Ansteigen der Plasmakomponente vermieden werden. Bezüglich der Liegedauer der Filterpapierstreifen im Sulkus bzw. am Sulkuseingang ist zudem zu beachten, dass

bei längeren Verweilzeiten das Ergebnis durch Verdunstungseffekte verfälscht werden könnte.

Zur Bestimmung der Sulkusflüssigkeitsmenge wurde in dieser Studie die oben beschriebene Wiegemethode von Filterpapierstreifen verwendet. Die Gewinnung der Sulkusflüssigkeit erfolgte an jeweils ausgewählten Zähnen an festgelegten Punkten. Eine Entnahme mittels Mikropipetten oder Kapillaren kam wegen der sehr kleinen Mengen an Sulkusflüssigkeit im gesunden Zustand nicht in Frage. Die dargestellten Ungenauigkeiten bei Verwendung des Periotrons[®] in Bereichen von unter 0,1µl sind für die Bestimmung von Kleinstmengen im gesunden Sulkus nicht tolerierbar. Durch bereits minimale Fehler bei der Messung können die später errechneten Konzentrationen an MIF und PGE₂ verfälscht werden, zumal durch die kleinen Volumina solche Fehler noch potenziert werden würden. Die verwendete Waage wurde vor Studienbeginn kalibriert. Die durch diese Methode ermittelten Sulkusflüssigkeitsmengen der Probanden beliefen sich zum Teil im gesunden Zustand auf Werte kleiner 0,05µl und hätten damit in dem für das Periotron[®] kritischen Bereich gelegen.

4.1.4 Der Enzymimmunoassay

Die Enzymassaymethode vereint die hohe Spezifität der Antikörper mit der Empfindlichkeit einfacher spektrophotometrisch ausgewerteter Enzymtests. Benutzt werden Antikörper oder Antigene, die mit hoher Wechselzahl kovalent an einfach zu bestimmende Enzyme gebunden sind.

Das Prinzip des Enzymimmunoassays beruht auf der Konkurrenz zwischen der zu untersuchenden Substanz, dem freien Antigen und einer bekannten Menge eines Enzym gekoppelten Antigens, um eine limitierte Anzahl von Bindungsstellen an einem für das Antigen spezifischen Antikörper (1.AK). Dieser Antikörper gebundene Enzymligand wird immobilisiert durch einen zweiten Antikörper (2.AK). Mit dem zweiten Antikörper ist die Mikrotiterplatte beschichtet, wie Abb.22 verdeutlicht. Dadurch kann der ungebundene Ligand leicht abgewaschen werden.

Um die Menge an ungebundenen markierten Antigenen festzustellen, wird eine chromogene Lösung (Tetramethylbenzin/TMB) zugesetzt. Es bildet zusammen mit dem Enzym ein farbiges Endprodukt, wobei die Farbintensität der Menge der zu

untersuchenden Substanz in der Probe oder in dem Standard proportional ist. Diese Reaktion wird durch Zugabe einer Säurelösung (1M H_2SO_4) beendet. Anschließend wird die Absorption des farbigen Endproduktes bei 450 nm im Spektrometer gemessen und ausgewertet.

Als Kontrollwerte dienen einmal Ansätze, denen nur die chromogene Lösung TMB zugesetzt sind (Standard/B), Ansätze ohne freies Antigen (Null Standard/0) und Ansätze, bei denen kein Antikörper an die feste Phase adsorbiert ist (NSB). Zudem wird eine Standardkurve mit bekannten Konzentrationen des zu untersuchenden Antigens angefertigt.

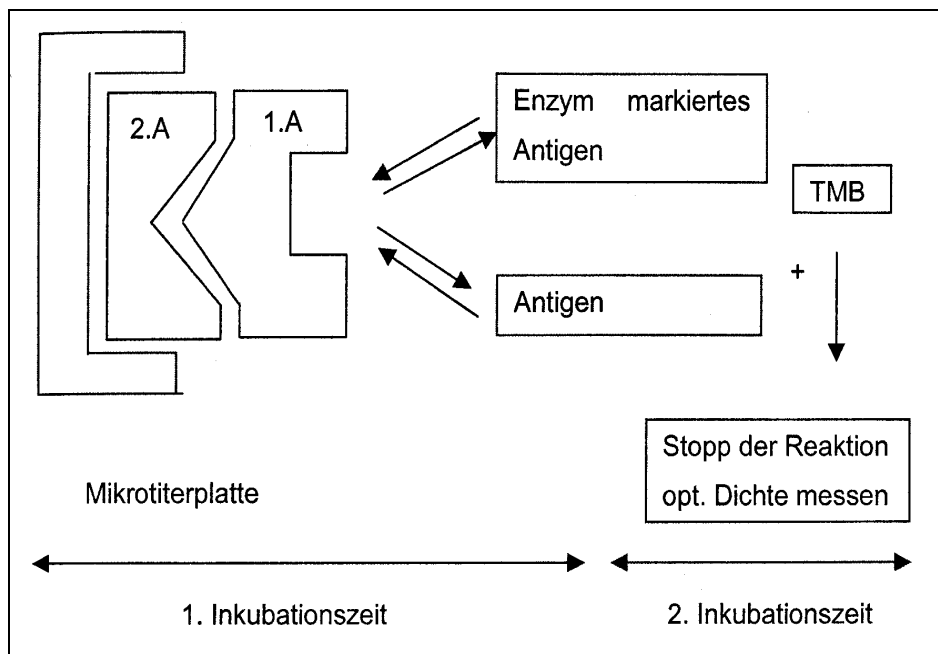


Abb. 22 Prinzip des ELISAs

4.1.4.1 MIF ELISA

Kalibrierung

Der verwendete Immunoassay wird von der Firma R&D Systems mit Hilfe eines hoch aufbereiteten, *E.coli* entstammenden rekombinanten humanen MIF der Firma kalibriert.

Sensitivität

Die minimale detektierbare Dosis (MDD) von humanem MIF wurde in 32 Assays ausgewertet. Sie lag im Mittel bei 0.017ng/ml und reichte von 0.007 bis 0.046ng/ml.

Spezifität

Dieser Assay erkennt sowohl rekombinanten als auch natürlichen humanen Migration Inhibitory Factor. Die unten aufgelisteten Faktoren wurden auf Kreuzreaktionen mit rekombinantem humanem MIF und mögliche gegenseitige Beeinflussung hin untersucht. Es wurden keine signifikanten Kreuzreaktionen oder Interferenzen festgestellt.

Recombinant human:	IL-8	Recombinant mouse:	OPG	Recombinant porcine:
ANG	IL-9	CT-1	OPN	IL-1 α
ANG-2	IL-10	CTLA-4	OSM	IL-1 β
AR	IL-11	Fas	SCF	IL-2
BDNF	IL-12	Fas Ligand	TNF- α	IL-4
CD4	IL-12 p40	GITR Ligand	Tpo	IL-6
CD40	IL-13	IFN- γ	TRANCE	IL-8
CD40 Ligand	IL-15	IL-1 α		IL-10
CNTF	IL-16	IL-1 β	Recombinant rat:	TNF- α
CT-1	IL-17	IL-1ra	CNTF	
CTLA-4	Leptin	IL-2	GDNF	
Epo	LIF	IL-3	IFN- γ	
Fas	NT-3	IL-4	IL-1 α	
GDNF	NT-4	IL-5	IL-1 β	
GITR	OPG	IL-6	IL-2	
IFN- γ	OSM	IL-7	IL-4	
IL-1 α	PTN	IL-9	IL-6	
IL-1 β	SCF	IL-10	IL-10	
IL-1ra	SLPI	IL-11	Leptin	
IL-2	SMDF	IL-12	MK	
IL-3	TNF- α	IL-12 p40	TNF- α	
IL-4	TNF- β	IL-13		
IL-5	Tpo	IL-17		
IL-6	TRAIL	Leptin		
IL-7	TRANCE	LIF		

Tab.7: Faktoren, die auf Kreuzreaktionen und Interferenzen mit dem MIF ELISA getestet wurden
(Quelle R&D Systems)

Präzision (Tab.8)**Intra-assay Präzision (Präzision innerhalb eines Assays)**

Drei Proben bekannter Konzentration wurden zwanzigmal auf einer Platte getestet, um die Präzision innerhalb eines Assays zu bestimmen.

Inter-assay Präzision (Präzision zwischen verschiedenen Assays)

Drei Proben bekannter Konzentration wurden in vierzig verschiedenen Assays getestet, um die Präzision zwischen den Assays zu bestimmen.

Sample	Intra-assay Precision			Inter-assay Precision		
	1	2	3	1	2	3
n	20	20	20	40	40	40
Mean (ng/mL)	0.89	2.58	5.24	0.88	2.44	5.15
Standard deviation	0.04	0.17	0.20	0.08	0.16	0.26
CV (%)	4.5	6.6	3.8	9.1	6.6	5.0

Tab.8: Intra-und Inter-Assay Präzision (Quelle R&D Systems)
CV(%) entspricht der Standardabweichung in Prozent

4.1.4.2 PGE₂ ELISA

Die polyklonalen Antikörper stellen natürliche Gemische der Antikörper dar, die im Zuge einer Immunantwort gegen verschiedene Determinanten eines Antigens von B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen gebildet werden. Das am häufigsten zur Erzeugung dieser Antikörper genutzte Tier ist das Kaninchen. Aber auch von Spezies wie Schwein, Pferd, Ziege lassen sich geeignete Seren erzeugen. Jedes dieser Tiere besitzt jedoch eine Reihe von spontan entstandenen Antikörpern, die Störfaktoren bei den immunchemischen Reaktionen darstellen können. Der Nachteil der polyklonalen Antikörper besteht darin, dass sie ein breites Reaktionsspektrum besitzen, welches zu Kreuzreaktionen führen kann.

Als Kreuzreaktion wird die Bindung eines Antikörpers an verschiedene Antigene bezeichnet, die als gleiche oder ähnliche Epitop besitzen.

Analysierte Stoffe	Kreuzreaktionen in %
PGE ₁	25
PGF _{2a}	0,04
Arachidonsäure	<0,001

Tab.9: Mögliche Kreuzreaktionen des angewendeten Enzymimmunoassays für PGE₂

Die Empfindlichkeit des Testes beziffert der Hersteller mit 2pg/ml. Aus GC-MS basierenden Vergleichsmengen ist bekannt, dass nur geringe Mengen PGE_{2a} und vernachlässigbare Mengen PGE₁ renal ausgeschieden werden. Von daher besteht eine hohe Genauigkeit der ermittelten PGE₂-Werte.

Eine Fehlerquelle stellt die Verunreinigung der Proben durch den Speichel dar, wodurch es zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann. Eine sorgfältige Trocknung der Entnahmestelle ist somit unbedingt durchzuführen.

Weiterhin ist eine sorgsame Kalibrierung der photometrischen Gerätschaften von erheblicher Bedeutung, da es sich um kleinste Konzentrationen handelt. Eine einzelne Auswertung der pro Patient entnommenen sechs Proben war im Rahmen der Untersuchung zudem nicht möglich, da die Mediatorkonzentrationen ansonsten unterhalb des messbaren Bereiches gelegen hätten. Somit wurde ein Pooling durchgeführt, weshalb eine Zuordnung der gemessenen Werte zu einzelnen Parodontien nicht mehr möglich war.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die klinischen Ergebnisse der vorliegenden experimentellen Gingivitisstudie bestätigen andere Studien, in denen keine signifikanten Unterschiede zwischen jüngeren und älteren Probanden hinsichtlich der Plaqueansammlung und der daraus resultierenden gingivalen Entzündung vorlagen (Abbas et al.1986; Winkel et al.1987). Fransson et al. (1996) ermittelten zwar einen stärkeren Anstieg des Entzündungsgrades bei älteren Probanden, jedoch war dieser erst in der dritten Woche der experimentellen Gingivitis signifikant höher. Holm-Pedersen et al. (1975) fanden größere Plaquemengen bei älteren Probanden, deren klinische Untersuchung beschränkte sich jedoch auf die unteren Inzisivi, Eckzähne und Prämolaren, an denen sich in einem gegebenen Zeitraum generell größere Plaquemengen bildeten als an anderen Zähnen (Furuichi et al.1992).

Ein möglicher Einfluss des Alters könnte durch die individuelle Anfälligkeit für Parodontalerkrankungen übertroffen werden (Winkel et al. 1987; Abbas et al. 1986). Die Krankheitsbereitschaft des Parodontiums könnte damit für die Intensität parodontaler Destruktionen ausschlaggebender sein als die Länge der Zeit, während der die parodontalen Gewebe der Plaque ausgesetzt sind (Van der Velden 1984). Demnach wäre das Alter von untergeordneter Bedeutung in der Entwicklung der frühen Gingivitis bei Personen, die keine ausgesprochene Prädisposition für Parodontalerkrankungen haben.

Bezüglich der PGE₂-Werte in der Sulkusflüssigkeit konnten in beiden Altersgruppen im Verlauf der experimentellen Gingivitis keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden. Allerdings wurde tendenziell ein Anstieg in beiden Altersgruppen mit höheren Konzentrationen für die älteren Probanden festgestellt. Dies bestätigt andere experimentelle Gingivitisstudien, in denen keine signifikanten Veränderungen des PGE₂ Levels beobachtet wurden (Preshaw et al. 1998; Deinzer et al. 2004). Ein signifikanter Anstieg der PGE₂ Level in der Sulkusflüssigkeit nach 14 Tagen ohne Mundhygiene wurde jedoch in einer eigenen Studie beschrieben (Nonnenmacher 2004). In einer weiteren Studie wurde über einen plötzlichen signifikanten Anstieg der PGE₂-Konzentration in der Sulkusflüssigkeit in der vierten Woche der experimentellen Gingivitis berichtet (Heasman et al. 1993). Dies wurde dadurch erklärt, dass es sich nach diesem Zeitraum ohne Mundhygiene um eine chronische Entzündung mit charakteristischem Makrophagen-Monozyten-Infiltrat handelte und PGE₂ durch diese Zellen vermehrt gebildet wurde.

Im Rahmen unseres Studiendesigns wurden zusätzlich mukoperiostale Gewebebiopsien der Probanden bezüglich des Vorkommens der Cyclooxygenase als eines der Schlüsselenzyme für die Bildung von Prostaglandinen untersucht (Siegel et al. 2007). Die Auswertung zeigte einen signifikanten Anstieg von Cox-2 im Verlauf der experimentellen Gingivitis bei jungen und älteren Probanden. Allerdings wurden für die gesunden älteren Probanden geringere Werte für Cox-2 ermittelt. Im Gegensatz dazu konnte in beiden Altersgruppen in der Sulkusflüssigkeit nur ein nicht signifikanter, leichter Anstieg des PGE₂ Levels festgestellt werden. Die ältere Gruppe zeigte im gesunden Zustand höhere PGE₂ Konzentrationen als die jüngeren Probanden. Dies verdeutlicht, dass die PGE₂ Konzentrationen der Sulkusflüssigkeit offensichtlich nicht mit dem Cox-2 Vorkommen im mukoperiostalen Gewebe korrelieren. In diesem Zusammenhang ist anzunehmen, dass die PGE₂-

Konzentration bei Gingivitis nur teilweise Cox-2 abhängig ist und Cox-1 zur PGE₂-Synthese in gesunder und entzündeter Gingiva ebenfalls beiträgt. Bei den älteren Probanden war die Anzahl der Cox-1-positiven Langerhanszellen gegenüber den jüngeren erhöht. Die Tatsache, dass in der vorliegenden Studie in der älteren Gruppe höhere PGE₂ Konzentrationen in der Sulkusflüssigkeit gefunden wurden, deutet darauf hin, dass der Anteil an Cox-1 exprimiertem PGE₂ in der Gingiva einen größeren Stellenwert einnehmen könnte als angenommen.

In der vorliegenden Studie ist es erstmals gelungen, MIF in der Sulkusflüssigkeit von parodontal gesunden und erkrankten Probanden nachzuweisen. Im gesunden Zustand konnten in beiden Altersgruppen vergleichbare MIF-Level in der Sulkusflüssigkeit ermittelt werden. Allerdings ist die hohe Konzentration von MIF bei den parodontal gesunden jüngeren und älteren Probanden erstaunlich. In einer Studie wurde gezeigt, dass die konstitutive Expression von MIF in Geweben bzw. Zellen in unmittelbarer Nähe zur externen Umgebung die rasche Detektion von Bakterien und eine schnelle Abwehrreaktion ermöglicht (Calandra & Roger 2003). Die Tatsache, dass die Mundhöhle kein steriles Milieu ist und das gesunde parodontale Gewebe permanent einer Vielzahl an Bakterien ausgesetzt ist, könnte somit eine Erklärung für die hohen MIF-Werte in der Sulkusflüssigkeit darstellen. In einer immunhistochemischen Untersuchung der parodontalen Gewebe konnte zudem gezeigt werden, dass MIF nicht nur in Entzündungsarealen, sondern auch in Bereichen mit hoher Zellproliferationsaktivität, vor allem nach externer Stimulation, nachweisbar ist (Morimoto et al. 2003). In allen Keratinozyten des gingivalen Epithels wurde MIF gefunden, im Gegensatz zur Epidermis, in der MIF nur in der Basalschicht nachzuweisen ist. Daraus könnten sich wichtige pathophysiologische Funktionen von MIF im parodontalen Gewebe mit entsprechend hoher Konzentration ableiten. Bernhagen et al. stellten 1998 fest, dass wirksame proinflammatorische MIF-Konzentrationen in bestimmten Situationen in vivo leicht Konzentrationen im Bereich von niedrigen Mikrogramm pro ml erreichen könnten.

In zahlreichen Studien konnte MIF mit entzündlichen Erkrankungen assoziiert werden. Unsere Studienergebnisse zeigen, dass MIF auch bei Gingivitis in der Sulkusflüssigkeit nachweisbar ist. Hierbei ist die MIF-Konzentration bei den jüngeren Probanden im entzündeten Stadium statistisch signifikant höher als bei den älteren Probanden. Ein Vergleich zwischen Erwachsenen und Kindern mit Otitis media zeigte, dass die MIF-Konzentration im punktierten Mittelohrerguss bei Kindern

signifikant höher war als bei den älteren Probanden (Kariya et al. 2003). Bei jungen Meerschweinchen fand man nach intranasaler Sensibilisierung mit BCG (Bacillus Calmette Guerin) nach 2 Wochen eine signifikant höhere MIF Produktion der aus der Lunge abgeleiteten (lung derived) Lymphozyten als bei den älteren Tieren (Ganguly et al. 1986). Signifikante Unterschiede in der MIF-Plasma Konzentration zwischen jungen (< 55 Jahre) und älteren gesunden Männern (> 55 Jahre) konnten in einer neuen Studie festgestellt werden, die die Plasmalevel von MIF bei chronischen Schmerzpatienten und gesunden Kontrollgruppen untersuchte (Aloisi et al. 2005). Die MIF-Konzentration war bei den jungen männlichen Probanden um das 3,3fache höher als bei den älteren. Zwischen den jeweiligen weiblichen Gruppen gab es jedoch keine Unterschiede. Junge Männer hatten höhere MIF-Konzentrationen als die gleichaltrigen Frauen, was auf eine mögliche Korrelation zwischen MIF und Testosteron hinweisen könnte. Eine geschlechtsspezifische Analyse wurde in der vorliegenden Studie aufgrund der geringen Probandenzahl nicht durchgeführt. Die geringeren Konzentrationen bei älteren Probanden könnten ein Hinweis auf eine reduzierte Immunantwort im Alter sein. In Tier- und Human-Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort im Alter abnehmen (Jaroslow et al. 1974; Menon et al. 1974; Weksler & Hutteroth 1974). Die Beobachtungen, dass die lokale vaskuläre Antwort auf Verletzungen und die Ansammlung von Entzündungszellen in der Wunde junger Ratten höher waren als bei alten, deuten auf eine reduzierte zelluläre Immunantwort mit weniger immunkompetenten Zellen bei den alten Tieren hin (Holm-Pedersen & Zederfeldt 1973). Bei alternden Menschen wurden eine verminderte Antwort auf Impfungen und eine mangelhafte Synthese spezifischer Antikörper festgestellt (Kishimoto et al. 1980; Burns et al. 1993). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Immunmechanismen, die eine wichtige Rolle in der Pathogenese von entzündlichen Erkrankungen spielen, altersabhängigen Veränderungen unterliegen.

Ein bemerkenswertes Ergebnis unserer Studie ist, dass bei den älteren Probanden im Rahmen der experimentellen Gingivitis die Entzündungszeichen (BNS) zunehmen und die MIF-Konzentration im Gegensatz dazu abnimmt. Diese Korrelation könnte auf eine Aufgabe von MIF in der Angiogenese hinweisen. MIF wurde in tumorassoziierten Endothelzellen gefunden und scheint für die mikrovaskuläre Endothelzellproliferation und die Regeneration des Endothels notwendig zu sein (Chesney et al. 1999). Die Unterschreitung einer bestimmten Schwelle an MIF-

Konzentration im Endothel könnte diese Funktionen einschränken und bei parodontaler Sondierung eine leichtere Blutung provozieren.

Welche Funktionen das pro-inflammatorische Zytokin MIF in der Entstehung und Progression von entzündlichen parodontalen Erkrankungen hat, ist zurzeit ist noch nicht bekannt. In zukünftigen Studien sollten bei parodontal gesunden und erkrankten Patienten temporäre Veränderungen des MIF-Levels und dessen Wechselwirkungen mit anderen Entzündungsmediatoren näher untersucht werden. Da T-Zellen in der Aufrechterhaltung einer balancierten Immunabwehr gegen die oralen Bakterien eine zentrale Rolle spielen (Gemmell & Seymour 1994) und MIF auch von T-Zellen in großem Ausmaß produziert wird, sollte deren gegenseitige Wirkung im parodontalen Gewebe untersucht werden. Insbesondere die Rolle von MIF als möglicher Gegenspieler von Glucocorticoiden (z.B. Cortisol) könnte ein interessanter Ansatz sein, um die lokale Wirkung von stressinduzierten neurogenen Stimulationen auf das entzündliche gingivale Gewebe besser zu verstehen.

5. SCHLUSSFOLGERUNG

1. Die klinischen Parameter Gingival Index, Plaque Index und Blutung nach Sondieren nahmen während der experimentellen Gingivitis in beiden Altersgruppen statistisch signifikant zu, mit jeweils geringfügig höheren Werten für die Gruppe der 46-77 Jährigen. Ein statistisch signifikanter Gruppenunterschied ließ sich nicht ermitteln.
2. Sowohl bei den jüngeren als auch bei den älteren Probanden stieg die PGE₂-Konzentration im Verlauf der Studie an, wobei die ältere Gruppe zu allen Zeitpunkten höhere Werte aufwies. Die Anstiege sowie die Gruppenunterschiede zeigten keine statistische Signifikanz.
3. MIF konnte in der Sulkusflüssigkeit nachgewiesen werden. Bei allen Probanden fanden sich bereits im gesunden Zustand sehr hohe Konzentrationen. Während der experimentellen Gingivitis zeigte sich bei den 18-30 Jährigen ein Anstieg, bei den 46-77 Jährigen eine Abnahme. Der Gruppenunterschied war in der ersten Woche der experimentellen Gingivitis statistisch signifikant.
4. Bei den älteren Probanden lag eine Korrelation von MIF zum Bluten nach Sondieren in der experimentellen Gingivitisphase vor.
5. Eine Korrelation zwischen MIF und PGE₂ konnte nicht festgestellt werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der experimentellen Gingivitisstudie war die Bestimmung von MIF (Migration Inhibitory Factor) und Prostaglandin E₂ in der Sulkusflüssigkeit bei jüngeren und älteren Probanden.

Es nahmen insgesamt 21 parodontal gesunde Probanden teil, die in eine Gruppe von 18-30 Jahren (n=12) und eine Gruppe von 46-77 Jahren (n=9) aufgeteilt waren. Nach Etablierung einer sehr guten Mundhygiene erfolgte zur Baseline-Untersuchung eine klinische Untersuchung. In der Sulkusflüssigkeit wurden sowohl PGE₂ und MIF mittels ELISA bestimmt. Anschließend wurden die Patienten aufgefordert, für einen Zeitraum von 14 Tagen jegliche Mundhygienemaßnahmen zu unterlassen. Am Tag 8 und 15 wurde die Untersuchung wiederholt. Die statistische Analyse basierte auf dem t-Test der Varianzanalyse, Mann-Whitney-U-Test, Spearman Test, Wilcoxon-Test und Pearsonscher Korrelation.

Im Verlauf der experimentellen Gingivitis stiegen die Werte für die klinischen Parameter bei allen Probanden altersunabhängig signifikant an. Die PGE₂-Konzentration nahm in beiden Altersgruppen statistisch nicht signifikant zu (18-30-Jährige: 12,7±12,62 ng/ml auf 17,9±10,61 ng/ml, 46-77-Jährige: 18,26±12,62 ng/ml auf 23,17±35,88 ng/ml) und wies zu keinem Untersuchungszeitpunkt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen auf. MIF war zur Baseline in hohen Konzentrationen in beiden Gruppen nachzuweisen (1542,48 ± 792,96 respektive 1503,81±804,27 ng/ml). Im Verlauf der Studie stieg MIF bei den jüngeren Probanden an (+ 652,39 ± 1315,58 ng/ml), während bei den älteren Probanden eine Abnahme zu beobachten war (-346,66 ± 795,49 ng/ml). Der Gruppenunterschied war in der ersten Woche der experimentellen Gingivitis statistisch signifikant.

Eine Korrelation zwischen MIF und PGE₂ konnte nicht nachgewiesen werden. Bei den älteren Probanden lag eine Korrelation von MIF zu BNS in der experimentellen Gingivitisphase vor.

Die Studie zeigt, dass MIF in der Sulkusflüssigkeit von parodontal gesunden Probanden altersunabhängig in hohen Konzentrationen vorkommt. Während der experimentellen Gingivitis stieg die MIF-Konzentration in der jüngeren Altersgruppe an. Bei den älteren Probanden waren eine Abnahme der MIF-Konzentration und eine Korrelation zum Anstieg des Blutens nach Sondieren feststellbar.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Abbas, F., Van der Velden, U., Moorer, W. R., Everts, V., Vroom, T. M. & Scholte, G. (1986) Experimental gingivitis in relation to susceptibility to periodontal disease. II. Phase-contrast microbiological features and some host-response observations. *J.Clin.Periodontol.*, **13**, 551-557.
- Abe, R., Peng, T., Sailors, J., Bucala, R. & Metz, C. N. (2001) Regulation of the CTL response by macrophage migration inhibitory factor. *J.Immunol.*, **166**, 747-753.
- Abe, R., Shimizu, T., Ohkawara, A. & Nishihira, J. (2000) Enhancement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in injured epidermis and cultured fibroblasts. *Biochim.Biophys.Acta*, **1500**, 1-9.
- Aggarwal, B. B., Eessalu, T. E. & Hass, P. E. (1985) Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. *Nature*, **318**, 665-667.
- Al Abed, Y., Dabideen, D., Aljabari, B., Valster, A., Messmer, D., Ochani, M., Tanovic, M., Ochani, K., Bacher, M., Nicoletti, F., Metz, C., Pavlov, V. A., Miller, E. J. & Tracey, K. J. (2005) ISO-1 binding to the tautomerase active site of MIF inhibits its pro-inflammatory activity and increases survival in severe sepsis. *J.Biol.Chem.*, **280**, 36541-36544.
- Albandar, J. M., Brunelle, J. A. & Kingman, A. (1999) Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J.Periodontol.*, **70**, 13-29.
- Albers, H. K., Loning, T. & Lisboa, B. P. (1979) [Biochemical and morphologic studies on prostaglandins E and F in the normal and inflamed gingiva]. *Dtsch.Zahnarztl.Z.*, **34**, 440-443.
- Alexander, D. C., Martin, J. C., King, P. J., Powell, J. R., Caves, J. & Cohen, M. E. (1996) Interleukin-1 beta, prostaglandin E2, and immunoglobulin G subclasses in gingival crevicular fluid in patients undergoing periodontal therapy. *J.Periodontol.*, **67**, 755-762.

- Aloisi, A. M., Pari, G., Ceccarelli, I., Vecchi, I., Ietta, F., Lodi, L. & Paulesu, L. (2005) Gender-related effects of chronic non-malignant pain and opioid therapy on plasma levels of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Pain*, **115**, 142-151.
- Apse, P., Zarb, G. A., Schmitt, A. & Lewis, D. W. (1991) The longitudinal effectiveness of osseointegrated dental implants. The Toronto Study: peri-implant mucosal response. *Int.J.Periodontics.Restorative.Dent.*, **11**, 94-111.
- Bacher, M., Meinhardt, A., Lan, H. Y., Dhabhar, F. S., Mu, W., Metz, C. N., Chesney, J. A., Gemsa, D., Donnelly, T., Atkins, R. C. & Bucala, R. (1998) MIF expression in the rat brain: implications for neuronal function. *Mol.Med.*, **4**, 217-230.
- Bacher, M., Meinhardt, A., Lan, H. Y., Mu, W., Metz, C. N., Chesney, J. A., Calandra, T., Gemsa, D., Donnelly, T., Atkins, R. C. & Bucala, R. (1997) Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Am.J.Pathol.*, **150**, 235-246.
- Bacher, M., Metz, C. N., Calandra, T., Mayer, K., Chesney, J., Lohoff, M., Gemsa, D., Donnelly, T. & Bucala, R. (1996) An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **93**, 7849-7854.
- Bang, J., Rosenbush, C., Ahmad-Zadeh, C. & Cimasoni, G. (1972) Isoenzymes of lactic dehydrogenase in human gingival fluid. *Helv.Odontol.Acta*, **16**, 89-93.
- Baugh, J. A. & Bucala, R. (2002) Macrophage migration inhibitory factor. *Crit Care Med.*, **30**, S27-S35.
- Baugh, J. A. & Donnelly, S. C. (2003) Macrophage migration inhibitory factor: a neuroendocrine modulator of chronic inflammation. *J.Endocrinol.*, **179**, 15-23.
- Beklen, A., Ainola, M., Hukkanen, M., Gurgan, C., Sorsa, T. & Konttinen, Y. T. (2007) MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J.Dent.Res.*, **86**, 347-351.

- Berglundh, T. & Lindhe, J. (1993) Gingivitis in young and old dogs. *J.Clin.Periodontol.*, **20**, 179-185.
- Berglundh, T., Lindhe, J. & Sterrett, J. D. (1991) Clinical and structural characteristics of periodontal tissues in young and old dogs. *J.Clin.Periodontol.*, **18**, 616-623.
- Bergstroem, S., Danielsson, H., Klenberg, D. & Samuelsson, B. (1964) The enzymatic conversion of essential fatty acids into prostaglandins. *J.Biol.Chem.*, **239**, C4006-C4008.
- Bergstroem, S., Ryhage, R., Samuelsson, B. & Sjoevall, J. (1963) Prostaglandins and related factors. 15. The structures of Prostaglandin E1, F1-alpha, and F1-beta. *J.Biol.Chem.*, **238**, 3555-3564.
- Bernhagen, J., Calandra, T. & Bucala, R. (1994a) The emerging role of MIF in septic shock and infection. *Biotherapy*, **8**, 123-127.
- Bernhagen, J., Calandra, T. & Bucala, R. (1998) Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor: biological and structural features. *J.Mol.Med.*, **76**, 151-161.
- Bernhagen, J., Calandra, T., Mitchell, R. A., Martin, S. B., Tracey, K. J., Voelter, W., Manogue, K. R., Cerami, A. & Bucala, R. (1993) MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature*, **365**, 756-759.
- Bernhagen, J., Mitchell, R. A., Calandra, T., Voelter, W., Cerami, A. & Bucala, R. (1994b) Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Biochemistry*, **33**, 14144-14155.
- Bernzweig, E., Payne, J. B., Reinhardt, R. A., Dyer, J. K. & Patil, K. D. (1998) Nicotine and smokeless tobacco effects on gingival and peripheral blood mononuclear cells. *J.Clin.Periodontol.*, **25**, 246-252.
- Beswick, E. J., Pinchuk, I. V., Suarez, G., Sierra, J. C. & Reyes, V. E. (2006) Helicobacter pylori CagA-dependent macrophage migration inhibitory factor produced by gastric epithelial cells binds to CD74 and stimulates procarcinogenic events. *J.Immunol.*, **176**, 6794-6801.

- Bini, L., Magi, B., Marzocchi, B., Arcuri, F., Tripodi, S., Cintonino, M., Sanchez, J. C., Frutiger, S., Hughes, G., Pallini, V., Hochstrasser, D. F. & Tosi, P. (1997) Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue. *Electrophoresis*, **18**, 2832-2841.
- Birkedal-Hansen, H., Moore, W. G., Bodden, M. K., Windsor, L. J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A. & Engler, J. A. (1993) Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev.Oral Biol.Med.*, **4**, 197-250.
- Bloom, B. R. & Bennett, B. (1966) Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science*, **153**, 80-82.
- Bloom, B. R. & Bennett, B. (1968) Migration inhibitory factor associated with delayed-type hypersensitivity. *Fed.Proc.*, **27**, 13-15.
- Botting, R. M. (2000) Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3? *Clin.Infect.Dis.*, **31 Suppl 5**, S202-S210.
- Bourdi, M., Reilly, T. P., Elkahlon, A. G., George, J. W. & Pohl, L. R. (2002) Macrophage migration inhibitory factor in drug-induced liver injury: a role in susceptibility and stress responsiveness. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **294**, 225-230.
- Bozza, F. A., Gomes, R. N., Japiassu, A. M., Soares, M., Castro-Faria-Neto, H. C., Bozza, P. T. & Bozza, M. T. (2004) Macrophage migration inhibitory factor levels correlate with fatal outcome in sepsis. *Shock*, **22**, 309-313.
- Bozza, M., Kolakowski, L. F., Jr., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., David, J. R. & Gerard, C. (1995) Structural characterization and chromosomal location of the mouse macrophage migration inhibitory factor gene and pseudogenes. *Genomics*, **27**, 412-419.
- Bozza, M., Satoskar, A. R., Lin, G., Lu, B., Humbles, A. A., Gerard, C. & David, J. R. (1999) Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J.Exp.Med.*, **189**, 341-346.

- Bozza, P. T., Yu, W., Penrose, J. F., Morgan, E. S., Dvorak, A. M. & Weller, P. F. (1997) Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *J.Exp.Med.*, **186**, 909-920.
- Brecx, M. C., Frohlicher, I., Gehr, P. & Lang, N. P. (1988) Stereological observations on long-term experimental gingivitis in man. *J.Clin.Periodontol.*, **15**, 621-627.
- Brecx, M. C., Schlegel, K., Gehr, P. & Lang, N. P. (1987) Comparison between histological and clinical parameters during human experimental gingivitis. *J.Periodontal Res.*, **22**, 50-57.
- Bucala, R. (1996a) MIF re-discovered: pituitary hormone and glucocorticoid-induced regulator of cytokine production. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **7**, 19-24.
- Bucala, R. (1996b) MIF rediscovered: cytokine, pituitary hormone, and glucocorticoid-induced regulator of the immune response. *FASEB J.*, **10**, 1607-1613.
- Burger-Kentischer, A., Goebel, H., Seiler, R., Fraedrich, G., Schaefer, H. E., Dimmeler, S., Kleemann, R., Bernhagen, J. & Ihling, C. (2002) Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis. *Circulation*, **105**, 1561-1566.
- Burr, G. O., Burr, M. M. (1930) On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition. *J.Biol.Chem.*, **86**, 587-621.
- Calandra, T., Bernhagen, J., Metz, C. N., Spiegel, L. A., Bacher, M., Donnelly, T., Cerami, A. & Bucala, R. (1995) MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature*, **377**, 68-71.
- Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R. A. & Bucala, R. (1994) The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J.Exp.Med.*, **179**, 1895-1902.
- Calandra, T. & Bucala, R. (1995) Macrophage migration inhibitory factor: a counter-regulator of glucocorticoid action and critical mediator of septic shock. *J.Inflamm.*, **47**, 39-51.

- Calandra, T. & Bucala, R. (1997) Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a glucocorticoid counter-regulator within the immune system. *Crit Rev.Immunol.*, **17**, 77-88.
- Calandra, T., Echtenacher, B., Roy, D. L., Pugin, J., Metz, C. N., Hultner, L., Heumann, D., Mannel, D., Bucala, R. & Glauser, M. P. (2000) Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat.Med.*, **6**, 164-170.
- Calandra, T., Froidevaux, C., Martin, C. & Roger, T. (2003) Macrophage migration inhibitory factor and host innate immune defenses against bacterial sepsis. *J.Infect.Dis.*, **187 Suppl 2**, S385-S390.
- Calandra, T. & Roger, T. (2003) Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat.Rev.Immunol.*, **3**, 791-800.
- Calandra, T., Spiegel, L. A., Metz, C. N. & Bucala, R. (1998) Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **95**, 11383-11388.
- Caton, J., Polson, A., Bouwsma, O., Blieden, T., Frantz, B. & Espeland, M. (1988) Associations between bleeding and visual signs of interdental gingival inflammation. *J.Periodontol.*, **59**, 722-727.
- Chambers, T. J. & Dunn, C. J. (1983) Pharmacological control of osteoclastic motility. *Calcif.Tissue Int.*, **35**, 566-570.
- Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S. & Simmons, D. L. (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **99**, 13926-13931.
- Chesney, J., Metz, C., Bacher, M., Peng, T., Meinhardt, A. & Bucala, R. (1999) An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol.Med.*, **5**, 181-191.

- Cimasoni, G. (1974) The crevicular fluid. *Monographs in Oral Science*, **3**, 1-122.
- Cimasoni, G, Giannopoulou C. Can crevicular fluid component analysis assist in diagnosis and monitoring periodontal breakdown? In: Guggenheim B. editor. *Periodontology Today, International Congress, Zurich*. Basel: Karger, 1988: 260–270.
- Clark, J. D., Lin, L. L., Kriz, R. W., Ramesha, C. S., Sultzman, L. A., Lin, A. Y., Milona, N. & Knopf, J. L. (1991) A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell*, **65**, 1043-1051.
- Coffey, R. J., Hawkey, C. J., Damstrup, L., Graves-Deal, R., Daniel, V. C., Dempsey, P. J., Chinery, R., Kirkland, S. C., DuBois, R. N., Jetton, T. L. & Morrow, J. D. (1997) Epidermal growth factor receptor activation induces nuclear targeting of cyclooxygenase-2, basolateral release of prostaglandins, and mitogenesis in polarizing colon cancer cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **94**, 657-662.
- Coleman, R. A., Smith, W. L. & Narumiya, S. (1994) International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol.Rev.*, **46**, 205-229.
- Condacci, I., Cimasoni, G. & Ahmad-Zadeh, C. (1982) Alpha 2-macroglobulin in sulci from healthy and inflamed human gingivae. *Infect.Immun.*, **36**, 66-71.
- Curtis, M. A., Gillett, I. R., Griffiths, G. S., Maiden, M. F., Sterne, J. A., Wilson, D. T., Wilton, J. M. & Johnson, N. W. (1989) Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases: laboratory markers from analysis of gingival crevicular fluid. *J.Clin.Periodontol.*, **16**, 1-11.
- Cutler, C. W., Stanford, T. W., Abraham, C., Cederberg, R. A., Boardman, T. J. & Ross, C. (2000) Clinical benefits of oral irrigation for periodontitis are related to reduction of pro-inflammatory cytokine levels and plaque. *J.Clin.Periodontol.*, **27**, 134-143.
- D'Aoust, P. & Landry, R. G. (1994) The effect of supragingival plaque on crevicular fluid measurements. *Int.Dent.J.*, **44**, 159-164.

- Davenport, R. H., Jr., Simpson, D. M. & Hassell, T. M. (1982) Histometric comparison of active and inactive lesions of advanced periodontitis. *J.Periodontol.*, **53**, 285-295.
- David, J. R. (1966) Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **56**, 72-77.
- de Jong, Y. P., Abadia-Molina, A. C., Satoskar, A. R., Clarke, K., Rietdijk, S. T., Faubion, W. A., Mizoguchi, E., Metz, C. N., Alsahli, M., ten Hove, T., Keates, A. C., Lubetsky, J. B., Farrell, R. J., Michetti, P., van Deventer, S. J., Lolis, E., David, J. R., Bhan, A. K. & Terhorst, C. (2001) Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nat.Immunol.*, **2**, 1061-1066.
- Deinzer, R., Waschul, B. & Herforth, A. (2004) Effects of experimental gingivitis on crevicular PGE2 in a split mouth trial. *J.Clin.Periodontol.*, **31**, 501-505.
- Dewhirst, F. E., Ago, J. M., Peros, W. J. & Stashenko, P. (1987) Synergism between parathyroid hormone and interleukin 1 in stimulating bone resorption in organ culture. *J.Bone Miner.Res.*, **2**, 127-134.
- Dewhirst, F. E., Moss, D. E., Offenbacher, S. & Goodson, J. M. (1983) Levels of prostaglandin E2, thromboxane, and prostacyclin in periodontal tissues. *J.Periodontal Res.*, **18**, 156-163.
- DeWitt, D. L. & Smith, W. L. (1988) Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **85**, 1412-1416.
- Donnelly, S. C. & Bucala, R. (1997) Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of glucocorticoid activity with a critical role in inflammatory disease. *Mol.Med.Today*, **3**, 502-507.
- Dziak, R. (1993) Biochemical and molecular mediators of bone metabolism. *J.Periodontol.*, **64**, 407-415.
- Egelberg, J. (1966) Permeability of the dento-gingival blood vessels. 3. Chronically inflamed gingivae. *J.Periodontal Res.*, **1**, 287-296.

- Esumi, N., Budarf, M., Ciccarelli, L., Sellinger, B., Kozak, C. A. & Wistow, G. (1998) Conserved gene structure and genomic linkage for D-dopachrome tautomerase (DDT) and MIF. *Mamm.Genome*, **9**, 753-757.
- Fischman, S. L. (1986) Current status of indices of plaque. *J.Clin.Periodontol.*, **13**, 371-380.
- Fransson, C., Berglundh, T. & Lindhe, J. (1996) The effect of age on the development of gingivitis. Clinical, microbiological and histological findings. *J.Clin.Periodontol.*, **23**, 379-385.
- Fransson, C., Mooney, J., Kinane, D. F. & Berglundh, T. (1999) Differences in the inflammatory response in young and old human subjects during the course of experimental gingivitis. *J.Clin.Periodontol.*, **26**, 453-460.
- Froidevaux, C., Roger, T., Martin, C., Glauser, M. P. & Calandra, T. (2001) Macrophage migration inhibitory factor and innate immune responses to bacterial infections. *Critical Care Medicine*, **29**, S13-S15.
- Funk, C. D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, **294**, 1871-1875.
- Furuichi, Y., Lindhe, J., Ramberg, P. & Volpe, A. R. (1992) Patterns of de novo plaque formation in the human dentition. *J.Clin.Periodontol.*, **19**, 423-433.
- Ganguly, R., Waldman, R. H., Craig, C. P. & Lockey, R. F. (1986) Effects of age on respiratory tract immunity in guinea pigs. *Allergologia et Immunopathologia(Madr.)*, **14**, 1-7.
- Garavito, R. M., Malkowski, M. G. & DeWitt, D. L. (2002) The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **68-69**, 129-152.
- Garrone, P., Galibert, L., Rousset, F., Fu, S. M. & Banchereau, J. (1994) Regulatory effects of prostaglandin E2 on the growth and differentiation of human B lymphocytes activated through their CD40 antigen. *J.Immunol.*, **152**, 4282-4290.

- Geivelis, M., Turner, D. W., Pederson, E. D. & Lamberts, B. L. (1993) Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *J.Periodontol.*, **64**, 980-983.
- Gemmell, E. & Seymour, G. J. (1994) Modulation of immune responses to periodontal bacteria. *Curr.Opin.Periodontol.*, 28-38.
- Giannopoulou, C., Andersen, E., Demeurisse, C. & Cimasoni, G. (1992) Neutrophil elastase and its inhibitors in human gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *J.Dent.Res.*, **71**, 359-363.
- Gilroy, D. W., Colville-Nash, P. R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M. J. & Willoughby, D. A. (1999) Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat.Med.*, **5**, 698-701.
- Goldblatt, M. W. (1933) A depressor substance in seminal fluid. *J Soc Chem Ind* **52**, 1056-1057.
- Goodson, J. M., Dewhirst, F. E. & Brunetti, A. (1974) Prostaglandin E2 levels and human periodontal disease. *Prostaglandins*, **6**, 81-85.
- Goodson, J. M., Tanner, A. C., Haffajee, A. D., Sornberger, G. C. & Socransky, S. S. (1982) Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease. *J.Clin.Periodontol.*, **9**, 472-481.
- Griffiths, G. S. (2003) Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol.2000.*, **31**, 32-42.
- Guo, Y. S., Cheng, J. Z., Jin, G. F., Gutkind, J. S., Hellmich, M. R. & Townsend, C. M., Jr. (2002) Gastrin stimulates cyclooxygenase-2 expression in intestinal epithelial cells through multiple signaling pathways. Evidence for involvement of ERK5 kinase and transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J.Biol.Chem.*, **277**, 48755-48763.
- Haffajee, A. D., Socransky, S. S. & Goodson, J. M. (1983) Comparison of different data analyses for detecting changes in attachment level. *J.Clin.Periodontol.*, **10**, 298-310.

- Heasman, P. A., Collins, J. G. & Offenbacher, S. (1993) Changes in crevicular fluid levels of interleukin-1 beta, leukotriene B4, prostaglandin E2, thromboxane B2 and tumour necrosis factor alpha in experimental gingivitis in humans. *J.Periodontal Res.*, **28**, 241-247.
- Heath, J. K., Gowen, M., Meikle, M. C. & Reynolds, J. J. (1982) Human gingival tissues in culture synthesize three metalloproteinases and a metalloproteinase inhibitor. *J.Periodontal Res.*, **17**, 183-190.
- Hemler, M. & Lands, W. E. (1976) Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. *J.Biol.Chem.*, **251**, 5575-5579.
- Hempel, S. L., Monick, M. M. & Hunninghake, G. W. (1994) Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes. *J.Clin.Invest*, **93**, 391-396.
- Hermanowski-Vosatka, A., Mundt, S. S., Ayala, J. M., Goyal, S., Hanlon, W. A., Czerwinski, R. M., Wright, S. D. & Whitman, C. P. (1999) Enzymatically inactive macrophage migration inhibitory factor inhibits monocyte chemotaxis and random migration. *Biochemistry*, **38**, 12841-12849.
- Holm-Pedersen, P., Agerbaek, N. & Theilade, E. (1975) Experimental gingivitis in young and elderly individuals. *J.Clin.Periodontol.*, **2**, 14-24.
- Holm-Pedersen, P. & Zederfeldt, B. (1973) Respiratory gas tensions and blood flow in wounds in young and old rats. *Scand.J.Plast.Reconstr.Surg.*, **7**, 91-96.
- Horiuchi, M., Yamamoto, T., Tomofuji, T., Ishikawa, A., Morita, M. & Watanabe, T. (2002) Toothbrushing promotes gingival fibroblast proliferation more effectively than removal of dental plaque. *J.Clin.Periodontol.*, **29**, 791-795.
- Huang, X. R., Chun Hui, C. W., Chen, Y. X., Wong, B. C., Fung, P. C., Metz, C., Cho, C. H., Hui, W. M., Bucala, R., Lam, S. K. & Lan, H. Y. (2001) Macrophage migration inhibitory factor is an important mediator in the pathogenesis of gastric inflammation in rats. *Gastroenterology*, **121**, 619-630.

- Hudson, J. D., Shoaibi, M. A., Maestro, R., Carnero, A., Hannon, G. J. & Beach, D. H. (1999) A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J.Exp.Med.*, **190**, 1375-1382.
- Inada, M., Matsumoto, C., Uematsu, S., Akira, S. & Miyaura, C. (2006) Membrane-bound prostaglandin E synthase-1-mediated prostaglandin E2 production by osteoblast plays a critical role in lipopolysaccharide-induced bone loss associated with inflammation. *J.Immunol.*, **177**, 1879-1885.
- Jaroslow, B. N., Suhrbier, K. M. & Fritz, T. E. (1974) Decline and restoration of antibody-forming capacity in aging beagle dogs. *J.Immunol.*, **112**, 1467-1476.
- Jobin, C., Morteau, O., Han, D. S. & Balfour, S. R. (1998) Specific NF-kappaB blockade selectively inhibits tumour necrosis factor-alpha-induced COX-2 but not constitutive COX-1 gene expression in HT-29 cells. *Immunology*, **95**, 537-543.
- Joshi, P. C., Poole, G. V., Sachdev, V., Zhou, X. & Jones, Q. (2000) Trauma patients with positive cultures have higher levels of circulating macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, **107**, 13-20.
- Kariya, S., Okano, M., Aoji, K., Kosaka, M., Chikumoto, E., Hattori, H., Yuen, K., Nishioka, S., Nishioka, K. & Nishizaki, K. (2003) Role of macrophage migration inhibitory factor in otitis media with effusion in adults. *Clin.Diagn.Lab Immunol.*, **10**, 417-422.
- Kawai, T., Matsuyama, T., Hosokawa, Y., Makihiro, S., Seki, M., Karimbux, N. Y., Goncalves, R. B., Valverde, P., Dibart, S., Li, Y. P., Miranda, L. A., Ernst, C. W., Izumi, Y. & Taubman, M. A. (2006) B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am.J.Pathol.*, **169**, 987-998.
- Kelly, R. W. (1981) Prostaglandin synthesis in the male and female reproductive tract. *J.Reprod.Fertil.*, **62**, 293-304.
- Kinane, D. F. (2001) Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol.2000.*, **25**, 8-20.

- Kitaichi, N., Kotake, S., Sasamoto, Y., Namba, K., Matsuda, A., Ogasawara, K., Onoe, K., Matsuda, H. & Nishihira, J. (1999) Prominent increase of macrophage migration inhibitory factor in the sera of patients with uveitis. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.*, **40**, 247-250.
- Klein, D. C. & Raisz, L. G. (1970) Prostaglandins: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology*, **86**, 1436-1440.
- Knudsen, P. J., Dinarello, C. A. & Strom, T. B. (1986) Prostaglandins posttranscriptionally inhibit monocyte expression of interleukin 1 activity by increasing intracellular cyclic adenosine monophosphate. *J.Immunol.*, **137**, 3189-3194.
- Kobayashi, Y., Mizoguchi, T., Take, I., Kurihara, S., Udagawa, N. & Takahashi, N. (2005) Prostaglandin E2 enhances osteoclastic differentiation of precursor cells through protein kinase A-dependent phosphorylation of TAK1. *J.Biol.Chem.*, **280**, 11395-11403.
- Kohlbecker, G., Grzonka, M. & Gunay, H. (1989) [Quantitative measurement of sulcus fluid with new self-coloring paper indicator strips: a comparison with Periotron]. *Schweiz.Monatsschr.Zahnmed.*, **99**, 414-418.
- Kornman, K. S. (1987) Nature of periodontal diseases: assessment and diagnosis. *J.Periodontal Res.*, **22**, 192-204.
- Kozak, C. A., Adamson, M. C., Buckler, C. E., Segovia, L., Paralkar, V. & Wistow, G. (1995) Genomic cloning of mouse MIF (macrophage inhibitory factor) and genetic mapping of the human and mouse expressed gene and nine mouse pseudogenes. *Genomics*, **27**, 405-411.
- Kunkel, S. L. & Chensue, S. W. (1985) Arachidonic acid metabolites regulate interleukin-1 production. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **128**, 892-897.
- Kunkel, S. L., Chensue, S. W. & Phan, S. H. (1986) Prostaglandins as endogenous mediators of interleukin 1 production. *J.Immunol.*, **136**, 186-192.

- Lamster, I. B., Hartley, L. J. & Vogel, R. I. (1985) Development of a biochemical profile for gingival crevicular fluid. Methodological considerations and evaluation of collagen-degrading and ground substance-degrading enzyme activity during experimental gingivitis. *J.Periodontol.*, **56**, 13-21.
- Lamster, I. B., Oshrain, R. L. & Gordon, J. M. (1986) Enzyme activity in human gingival crevicular fluid: considerations in data reporting based on analysis of individual crevicular sites. *J.Clin.Periodontol.*, **13**, 799-804.
- Lan, H. Y., Bacher, M., Yang, N., Mu, W., Nikolic-Paterson, D. J., Metz, C., Meinhardt, A., Bucala, R. & Atkins, R. C. (1997a) The pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in immunologically induced kidney disease in the rat. *J.Exp.Med.*, **185**, 1455-1465.
- Lan, H. Y., Yang, N., Metz, C., Mu, W., Song, Q., Nikolic-Paterson, D. J., Bacher, M., Bucala, R. & Atkins, R. C. (1997b) TNF-alpha up-regulates renal MIF expression in rat crescentic glomerulonephritis. *Mol.Med.*, **3**, 136-144.
- Lang, N. P., Nyman, S., Senn, C. & Joss, A. (1991) Bleeding on probing as it relates to probing pressure and gingival health. *J.Clin.Periodontol.*, **18**, 257-261.
- Lange, D. E. (1978) [The use of indices in the diagnosis of periodontal diseases]. *Dtsch.Zahnarztl.Z.*, **33**, 8-11.
- Leech, M., Metz, C., Hall, P., Hutchinson, P., Gianis, K., Smith, M., Weedon, H., Holdsworth, S. R., Bucala, R. & Morand, E. F. (1999) Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheum.*, **42**, 1601-1608.
- Lehmann, L. E., Novender, U., Schroeder, S., Pietsch, T., von Spiegel, T., Putensen, C., Hoefft, A. & Stuber, F. (2001) Plasma levels of macrophage migration inhibitory factor are elevated in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med.*, **27**, 1412-1415.
- Leibur, E., Tuhkanen, A., Pintson, U. & Soder, P. O. (1999) Prostaglandin E2 levels in blood plasma and in crevicular fluid of advanced periodontitis patients before and after surgical therapy. *Oral Dis.*, **5**, 223-228.

- Lekholm, U., Ericsson, I., Adell, R. & Slots, J. (1986) The condition of the soft tissues at tooth and fixture abutments supporting fixed bridges. A microbiological and histological study. *J.Clin.Periodontol.*, **13**, 558-562.
- Lenardo, M. J. & Baltimore, D. (1989) NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell*, **58**, 227-229.
- Leng, L., Metz, C. N., Fang, Y., Xu, J., Donnelly, S., Baugh, J., Delohery, T., Chen, Y., Mitchell, R. A. & Bucala, R. (2003) MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J.Exp.Med.*, **197**, 1467-1476.
- Lie, M. A., van der Weijden, G. A., Timmerman, M. F., Loos, B. G., van Steenberghe, T. J. & van, d., V (1998) Oral microbiota in smokers and non-smokers in natural and experimentally-induced gingivitis. *J.Clin.Periodontol.*, **25**, 677-686.
- Lindemann, R. A., Economou, J. S. & Rothermel, H. (1988) Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. *J.Dent.Res.*, **67**, 1131-1135.
- Lindhe, J., Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1983) Progression of periodontal disease in adult subjects in the absence of periodontal therapy. *J.Clin.Periodontol.*, **10**, 433-442.
- Lindhe, J., Liljenberg, B. & Listgarten, M. (1980) Some microbiological and histopathological features of periodontal disease in man. *J.Periodontol.*, **51**, 264-269.
- Lindhe, J., Karring, T., Lang, N.P. (2003) Clinical periodontology and implant dentistry; fourth edition; Blackwell Munksgaard
- Liou, J. Y., Shyue, S. K., Tsai, M. J., Chung, C. L., Chu, K. Y. & Wu, K. K. (2000) Colocalization of prostacyclin synthase with prostaglandin H synthase-1 (PGHS-1) but not phorbol ester-induced PGHS-2 in cultured endothelial cells. *J.Biol.Chem.*, **275**, 15314-15320.

- Listgarten, M. A. & Helldén, L. (1978) Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. *J.Clin.Periodontol.*, **5**, 115-132.
- Löe, H. & Silness, J. (1963) periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. *Acta Odontol.Scand.*, **21**, 533-551.
- Löe, H., Theilade, E. & Jensen, S. B. (1965) Experimental gingivitis in man. *J.Periodontol.*, **36**, 177-187.
- Loning, T., Albers, H. K., Lisboa, B. P., Burkhardt, A. & Caselitz, J. (1980) Prostaglandin E and the local immune response in chronic periodontal disease. Immunohistochemical and radioimmunological observations. *J.Periodontal Res.*, **15**, 525-535.
- Machuca, G., Rosales, I., Lacalle, J. R., Machuca, C. & Bullon, P. (2000) Effect of cigarette smoking on periodontal status of healthy young adults. *J.Periodontol.*, **71**, 73-78.
- Marcus, A. J., Safier, L. B., Ullman, H. L., Islam, N., Broekman, M. J. & von Schacky, C. (1987) Studies on the mechanism of omega-hydroxylation of platelet 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE) by unstimulated neutrophils. *J.Clin.Invest*, **79**, 179-187.
- 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 for the pathogenesis of periodontal disease. *J.Periodontal Res.*, **25**, 156-163.
- Matsson, L. (1978) Development of gingivitis in pre-school children and young adults. A comparative experimental study. *J.Clin.Periodontol.*, **5**, 24-34.
- Matsson, L. & Goldberg, P. (1985) Gingival inflammatory reaction in children at different ages. *J.Clin.Periodontol.*, **12**, 98-103.
- Matsuda, A., Tagawa, Y., Matsuda, H. & Nishihira, J. (1997) Expression of macrophage migration inhibitory factor in corneal wound healing in rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **38**, 1555-1562.

- Matsuki, Y., Yamamoto, T. & Hara, K. (1991) Interleukin-1 mRNA-expressing macrophages in human chronically inflamed gingival tissues. *Am.J.Pathol.*, **138**, 1299-1305.
- McCracken, G. I., Preshaw, P. M., Steen, I. N., Swan, M., deJager, M. & Heasman, P. A. (2006) Measuring plaque in clinical trials: index or weight? *J.Clin.Periodontol.*, **33**, 172-176.
- Meikle, M. C., Atkinson, S. J., Ward, R. V., Murphy, G. & Reynolds, J. J. (1989) Gingival fibroblasts degrade type I collagen films when stimulated with tumor necrosis factor and interleukin 1: evidence that breakdown is mediated by metalloproteinases. *J.Periodontal Res.*, **24**, 207-213.
- Meinhardt, A., Bacher, M., McFarlane, J. R., Metz, C. N., Seitz, J., Hedger, M. P., de Kretser, D. M. & Bucala, R. (1996) Macrophage migration inhibitory factor production by Leydig cells: evidence for a role in the regulation of testicular function. *Endocrinology*, **137**, 5090-5095.
- Menon, M., Jaroslow, R. N. & Koesterer, R. (1974) The decline of cell-mediated immunity in aging mice. *J.Gerontol.*, **29**, 499-505.
- Meyer-Siegler, K. & Hudson, P. B. (1996) Enhanced expression of macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma metastases. *Urology*, **48**, 448-452.
- Mitchell, R. A., Liao, H., Chesney, J., Fingerle-Rowson, G., Baugh, J., David, J. & Bucala, R. (2002) Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **99**, 345-350.
- Mitchell, R. A., Metz, C. N., Peng, T. & Bucala, R. (1999) Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J.Biol.Chem.*, **274**, 18100-18106.
- Miyamoto, T., Ogino, N., Yamamoto, S. & Hayaishi, O. (1976) Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J.Biol.Chem.*, **251**, 2629-2636.

- Miyauchi, M., Ijuhin, N., Nikai, H., Takata, T., Ito, H. & Ogawa, I. (1992) Effect of exogenously applied prostaglandin E2 on alveolar bone loss--histometric analysis. *J.Periodontol.*, **63**, 405-411.
- Mogi, M., Ootogoto, J., Ota, N. & Togari, A. (2004) Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J.Dent.Res.*, **83**, 166-169.
- Morham, S. G., Langenbach, R., Loftin, C. D., Tiano, H. F., Vouloumanos, N., Jennette, J. C., Mahler, J. F., Kluckman, K. D., Ledford, A., Lee, C. A. & Smithies, O. (1995) Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell*, **83**, 473-482.
- Morimoto, T., Nishihira, J. & Kohgo, T. (2003) Immunohistochemical localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human gingival tissue and its pathophysiological functions. *Histochem.Cell Biol.*, **120**, 293-298.
- Morton, R. S. & Dongari-Bagtzoglou, A. I. (2001) Cyclooxygenase-2 is upregulated in inflamed gingival tissues. *J.Periodontol.*, **72**, 461-469.
- Mundy, G. R. (1989) Local factors in bone remodeling. *Recent Prog.Horm.Res.*, **45**, 507-527.
- Murakami, H., Akbar, S. M., Matsui, H. & Onji, M. (2001) Macrophage migration inhibitory factor in the sera and at the colonic mucosa in patients with ulcerative colitis: clinical implications and pathogenic significance. *Eur.J.Clin.Invest*, **31**, 337-343.
- Murakami, M., Nakatani, Y., Atsumi, G., Inoue, K. & Kudo, I. (1997) Regulatory functions of phospholipase A2. *Crit Rev.Immunol.*, **17**, 225-283.
- Nakashima, K., Roehrich, N. & Cimasoni, G. (1994) Osteocalcin, prostaglandin E2 and alkaline phosphatase in gingival crevicular fluid: their relations to periodontal status. *J.Clin.Periodontol.*, **21**, 327-333.
- Nathan, C. F., Karnovsky, M. L. & David, J. R. (1971) Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes. *J.Exp.Med.*, **133**, 1356-1376.

- Newbrun, E. (1996) Indices to measure gingival bleeding. *J.Periodontol.*, **67**, 555-561.
- Nishihira, J. (2000) Macrophage migration inhibitory factor (MIF): its essential role in the immune system and cell growth. *J.Interferon Cytokine Res.*, **20**, 751-762.
- Noguchi, T., Shiba, H., Komatsuzawa, H., Mizuno, N., Uchida, Y., Ouhara, K., Asakawa, R., Kudo, S., Kawaguchi, H., Sugai, M. & Kurihara, H. (2003) Syntheses of prostaglandin E2 and E-cadherin and gene expression of beta-defensin-2 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Inflammation*, **27**, 341-349.
- Nonnenmacher, C, Kopecz, S., Nüsing, R., Flores-de-Jacoby, L., Mengel, R. (2004) The effect of amine fluoride/ stannous flouride, triclosan and acetylsalicylic acid on experimental gingivitis. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*, **59**, 448-453.
- Nukaga, J., Kobayashi, M., Shinki, T., Song, H., Takada, T., Takiguchi, T., Kamijo, R. & Hasegawa, K. (2004) Regulatory effects of interleukin-1beta and prostaglandin E2 on expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in human periodontal ligament cells. *J.Periodontol.*, **75**, 249-259.
- Obeid, P. & Bercy, P. (2000) Effects of smoking on periodontal health: a review. *Adv.Ther.*, **17**, 230-237.
- Offenbacher, S., Collins, J. G. & Heasman, P. A. (1993a) Diagnostic potential of host response mediators. *Adv.Dent.Res.*, **7**, 175-181.
- Offenbacher, S., Farr, D. H. & Goodson, J. M. (1981) Measurement of prostaglandin E in crevicular fluid. *J.Clin.Periodontol.*, **8**, 359-367.
- Offenbacher, S., Heasman, P. A. & Collins, J. G. (1993b) Modulation of host PGE2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J.Periodontol.*, **64**, 432-444.
- Offenbacher, S., Odle, B. M., Braswell, L. D., Johnson, H. G., Hall, C. M., McClure, H., Orkin, J. L., Strobert, E. A. & Green, M. D. (1989) Changes in

- cyclooxygenase metabolites in experimental periodontitis in *Macaca mulatta*. *J.Periodontal Res.*, **24**, 63-74.
- Offenbacher, S., Odle, B. M., Gray, R. C. & Van Dyke, T. E. (1984) Crevicular fluid prostaglandin E levels as a measure of the periodontal disease status of adult and juvenile periodontitis patients. *J.Periodontal Res.*, **19**, 1-13.
- Offenbacher, S., Odle, B. M. & Van Dyke, T. E. (1986) The use of crevicular fluid prostaglandin E2 levels as a predictor of periodontal attachment loss. *J.Periodontal Res.*, **21**, 101-112.
- Offenbacher, S., Soskolne W. A., Collins J.G. (1991) Prostaglandins and other eicosanoids in gingival crevicular fluid as markers of periodontal disease susceptibility and activity. In: Johnson N.W., ed. *Risk markers for oral disease*. Vol. 3 Cambridge University Press: Cambridge, pp 313-37.
- Ogawa, H., Nishihira, J., Sato, Y., Kondo, M., Takahashi, N., Oshima, T. & Todo, S. (2000) An antibody for macrophage migration inhibitory factor suppresses tumour growth and inhibits tumour-associated angiogenesis. *Cytokine*, **12**, 309-314.
- Ohkawara, T., Nishihira, J., Takeda, H., Asaka, M. & Sugiyama, T. (2005) Pathophysiological roles of macrophage migration inhibitory factor in gastrointestinal, hepatic, and pancreatic disorders. *J.Gastroenterol.*, **40**, 117-122.
- Ohm, K., Albers, H. K. & Lisboa, B. P. (1984) Measurement of eight prostaglandins in human gingival and periodontal disease using high pressure liquid chromatography and radioimmunoassay. *J.Periodontal Res.*, **19**, 501-511.
- Okada, H., Kassai, Y. & Kida, T. (1984) T lymphocyte subsets in the inflamed gingiva of human adult periodontitis. *J.Periodontal Res.*, **19**, 595-598.
- Okada, H., Kida, T. & Yamagami, H. (1983) Identification and distribution of immunocompetent cells in inflamed gingiva of human chronic periodontitis. *Infect.Immun.*, **41**, 365-374.

- Onodera, S., Nishihira, J., Iwabuchi, K., Koyama, Y., Yoshida, K., Tanaka, S. & Minami, A. (2002) Macrophage migration inhibitory factor up-regulates matrix metalloproteinase-9 and -13 in rat osteoblasts. Relevance to intracellular signaling pathways. *J.Biol.Chem.*, **277**, 7865-7874.
- Oppenheim, F. G. (1970) Preliminary observations on the presence and origin of serum albumin in human saliva. *Helv.Odontol.Acta*, **14**, 10-17.
- Overall, C. M., Wiebkin, O. W. & Thonard, J. C. (1987) Demonstration of tissue collagenase activity in vivo and its relationship to inflammation severity in human gingiva. *J.Periodontal Res.*, **22**, 81-88.
- Page, R. C. (1991) The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J.Periodontal Res.*, **26**, 230-242.
- Page, R. C. & Schroeder, H. E. (1976) Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*, **34**, 235-249.
- Patrono, C., Ciabattoni, G., Pugliese, F., Pierucci, A., Blair, I. A. & FitzGerald, G. A. (1986) Estimated rate of thromboxane secretion into the circulation of normal humans. *J.Clin.Invest*, **77**, 590-594.
- Payne, W. A., Page, R. C., Ogilvie, A. L. & Hall, W. B. (1975) Histopathologic features of the initial and early stages of experimental gingivitis in man. *J.Periodontal Res.*, **10**, 51-64.
- Petrovsky, N., Socha, L., Silva, D., Grossman, A. B., Metz, C. & Bucala, R. (2003) Macrophage migration inhibitory factor exhibits a pronounced circadian rhythm relevant to its role as a glucocorticoid counter-regulator. *Immunol.Cell Biol.*, **81**, 137-143.
- Pfeilschifter, J., Seyedin, S. M. & Mundy, G. R. (1988) Transforming growth factor beta inhibits bone resorption in fetal rat long bone cultures. *J.Clin.Invest*, **82**, 680-685.
- Preshaw, P. M., Geatch, D. R., Lauffart, B., Jeffcoat, M. K., Taylor, J. J. & Heasman, P. A. (1998) Longitudinal changes in TCRB variable gene expression and

- markers of gingival inflammation in experimental gingivitis. *J.Clin.Periodontol.*, **25**, 774-780.
- Raisz, L. G., Pilbeam, C. C. & Fall, P. M. (1993) Prostaglandins: mechanisms of action and regulation of production in bone. *Osteoporos.Int.*, **3 Suppl 1**, 136-140.
- Richards, D. & Rutherford, R. B. (1988) The effects of interleukin 1 on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal-ligament and gingival fibroblast. *Arch.Oral Biol.*, **33**, 237-243.
- Rifkin, B. R. & Tai, H. H. (1981) Elevated thromboxane B2 levels in periodontal disease. *J.Periodontal Res.*, **16**, 194-198.
- Roesler, W. J., Vandenbark, G. R. & Hanson, R. W. (1988) Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription. *J.Biol.Chem.*, **263**, 9063-9066.
- Roper, R. L., Conrad, D. H., Brown, D. M., Warner, G. L. & Phipps, R. P. (1990) Prostaglandin E2 promotes IL-4-induced IgE and IgG1 synthesis. *J.Immunol.*, **145**, 2644-2651.
- Rosengren, E., Bucala, R., Aman, P., Jacobsson, L., Odh, G., Metz, C. N. & Rorsman, H. (1996) The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction. *Mol.Med.*, **2**, 143-149.
- Sakai, Y., Masamune, A., Satoh, A., Nishihira, J., Yamagiwa, T. & Shimosegawa, T. (2003) Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of severe acute pancreatitis. *Gastroenterology*, **124**, 725-736.
- Salmon, J. A. & Higgs, G. A. (1987) Prostaglandins and leukotrienes as inflammatory mediators. *Br.Med.Bull.*, **43**, 285-296.
- Sampey, A. V., Hall, P. H., Mitchell, R. A., Metz, C. N. & Morand, E. F. (2001) Regulation of synoviocyte phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 by macrophage migration inhibitory factor. *Arthritis Rheum.*, **44**, 1273-1280.

- Sandberg, A. L., Raisz, L. G., Goodson, J. M., Simmons, H. A. & Mergenhagen, S. E. (1977) Initiation of bone resorption by the classical and alternative C pathways and its mediation by prostaglandins. *J.Immunol.*, **119**, 1378-1381.
- Santos, L. L., Lacey, D., Yang, Y., Leech, M. & Morand, E. F. (2004) Activation of synovial cell p38 MAP kinase by macrophage migration inhibitory factor. *J.Rheumatol.*, **31**, 1038-1043.
- Sasaki, E., Pai, R., Halter, F., Komurasaki, T., Arakawa, T., Kobayashi, K., Kuroki, T. & Tarnawski, A. S. (1998) Induction of cyclooxygenase-2 in a rat gastric epithelial cell line by epiregulin and basic fibroblast growth factor. *J.Clin.Gastroenterol.*, **27 Suppl 1**, S21-S27.
- Schroeder, H. E. & Lindhe, J. (1975) Conversion of stable established gingivitis in the dog into destructive periodontitis. *Arch.Oral Biol.*, **20**, 775-782.
- Schroeder, H. E., Munzel-Pedrazzoli, S. & Page, R. (1973) Correlated morphometric and biochemical analysis of gingival tissue in early chronic gingivitis in man. *Arch.Oral Biol.*, **18**, 899-923.
- Sekino, S., Ramberg, P. & Lindhe, J. (2005) The effect of systemic administration of ibuprofen in the experimental gingivitis model. *J.Clin.Periodontol.*, **32**, 182-187.
- Seymour, G. J. & Greenspan, J. S. (1979) The phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in established human periodontal disease. *J.Periodontal Res.*, **14**, 39-46.
- Seymour, G. J., Powell, R. N. & Aitken, J. F. (1983a) Experimental gingivitis in humans. A clinical and histologic investigation. *J.Periodontol.*, **54**, 522-528.
- Seymour, G. J., Powell, R. N., Cole, K. L., Aitken, J. F., Brooks, D., Beckman, I., Zola, H., Bradley, J. & Burns, G. F. (1983b) Experimental gingivitis in humans. A histochemical and immunological characterization of the lymphoid cell subpopulations. *J.Periodontal Res.*, **18**, 375-385.
- Seymour, G. J., Powell, R. N. & Davies, W. I. (1979) Conversion of a stable T-cell lesion to a progressive B-cell lesion in the pathogenesis of chronic

- inflammatory periodontal disease: an hypothesis. *J.Clin.Periodontol.*, **6**, 267-277.
- Sherry, B., Yarlett, N., Strupp, A. & Cerami, A. (1992) Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **89**, 3511-3515.
- Shimizu, T., Abe, R., Nakamura, H., Ohkawara, A., Suzuki, M. & Nishihira, J. (1999a) High expression of macrophage migration inhibitory factor in human melanoma cells and its role in tumor cell growth and angiogenesis. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **264**, 751-758.
- Shimizu, T., Abe, R., Ohkawara, A., Mizue, Y. & Nishihira, J. (1997) Macrophage migration inhibitory factor is an essential immunoregulatory cytokine in atopic dermatitis. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **240**, 173-178.
- Shimizu, T., Abe, R., Ohkawara, A. & Nishihira, J. (1999b) Ultraviolet B radiation upregulates the production of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human epidermal keratinocytes. *J.Invest Dermatol.*, **112**, 210-215.
- Shimizu, T., Mizuno, N., Amano, T. & Hayaishi, O. (1979) Prostaglandin D2, a neuromodulator. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **76**, 6231-6234.
- Shimizu, T., Ohkawara, A., Nishihira, J. & Sakamoto, W. (1996) Identification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human skin and its immunohistochemical localization. *FEBS Lett.*, **381**, 199-202.
- Siegel, B., Weihe, E., Bette, M., Nusing, R. M., Flores-de-Jacoby, L. & Mengel, R. (2007) The effect of age on prostaglandin-synthesizing enzymes in the development of gingivitis. *J.Periodontal Res.*, **42**, 259-266.
- Silness, J. & L oe, H. (1964) Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol.Scand.*, **22**, 121-135.
- Skapski, H. & Lehner, T. (1976) A crevicular washing method for investigating immune components of crevicular fluid in man. *J.Periodontal Res.*, **11**, 19-24.

- Smith, E. F., III, Wise, W. C., Halushka, P. V. & Cook, J. A. (1987) Macrophage eicosanoid formation is stimulated by platelet arachidonic acid and prostaglandin endoperoxide transfer. *Biochim.Biophys.Acta*, **923**, 355-361.
- Smith, W. L. & Lands, W. E. (1972) Oxygenation of polyunsaturated fatty acids during prostaglandin biosynthesis by sheep vesicular gland. *Biochemistry*, **11**, 3276-3285.
- Snyderman, R. (1981) in *Methods for Studying Mononuclear Phagocytes* (Adams, D.O., Edelson, P.J., and Koren, H.S., Eds.) pp 535-547, Academic Press, New York
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Goodson, J. M. & Lindhe, J. (1984) New concepts of destructive periodontal disease. *J.Clin.Periodontol.*, **11**, 21-32.
- Stashenko, P., Fujiyoshi, P., Obernesser, M. S., Probst, L., Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1991) Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease. *J.Clin.Periodontol.*, **18**, 548-554.
- Steinhoff, M., Meinhardt, A., Steinhoff, A., Gemsa, D., Bucala, R. & Bacher, M. (1999) Evidence for a role of macrophage migration inhibitory factor in psoriatic skin disease. *Br.J.Dermatol.*, **141**, 1061-1066.
- Suda, T., Takahashi, N. & Martin, T. J. (1992) Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr.Rev.*, **13**, 66-80.
- Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M. T. & Martin, T. J. (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr.Rev.*, **20**, 345-357.
- Sueda, T., Bang, J. & Cimasoni, G. (1969) Collection of gingival fluid for quantitative analysis. *J.Dent.Res.*, **48**, 159.
- Suido, H., Zambon, J. J., Mashimo, P. A., Dunford, R. & Genco, R. J. (1988) Correlations between gingival crevicular fluid enzymes and the subgingival microflora. *J.Dent.Res.*, **67**, 1070-1074.

- Sun, H. W., Bernhagen, J., Bucala, R. & Lolis, E. (1996) Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **93**, 5191-5196.
- Taguchi, C., Sugita, S., Tagawa, Y., Nishihira, J. & Mochizuki, M. (2001) Macrophage migration inhibitory factor in ocular fluids of patients with uveitis. *Br.J.Ophthalmol.*, **85**, 1367-1371.
- Tatakis, D. N. (1993) Interleukin-1 and bone metabolism: a review. *J.Periodontol.*, **64**, 416-431.
- Tatakis, D. N. & Trombelli, L. (2004) Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. I. Background review and rationale. *J.Clin.Periodontol.*, **31**, 229-238.
- Tozum, T. F., Hatipoglu, H., Yamalik, N., Gursel, M., Alptekin, N. O., Ataoglu, T., Marakoglu, I., Gursoy, U. K. & Eratalay, K. (2004) Critical steps in electronic volume quantification of gingival crevicular fluid: the potential impact of evaporation, fluid retention, local conditions and repeated measurements. *J.Periodontal Res.*, **39**, 344-357.
- Tsai, C. C., Hong, Y. C., Chen, C. C. & Wu, Y. M. (1998) Measurement of prostaglandin E2 and leukotriene B4 in the gingival crevicular fluid. *J.Dent.*, **26**, 97-103.
- Tucker, O. N., Dannenberg, A. J., Yang, E. K., Zhang, F., Teng, L., Daly, J. M., Soslow, R. A., Masferrer, J. L., Woerner, B. M., Koki, A. T. & Fahey, T. J., III (1999) Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res.*, **59**, 987-990.
- Valazza, A., Matter, J., Ogilvie, A. & Cimasoni, G. (1972) [Gingival fluid, gingival inflammation, pocket depth and bone loss]. *SSO.Schweiz.Monatsschr.Zahnheilkd.*, **82**, 824-832.
- Van der Velden, U. (1984) Effect of age on the periodontium. *J.Clin.Periodontol.*, **11**, 281-294.

- Van der Velden, U., Abbas, F. & Hart, A. A. (1985) Experimental gingivitis in relation to susceptibility to periodontal disease. (I.) Clinical observations. *J.Clin.Periodontol.*, **12**, 61-68.
- Vane, J. R. (1976) Prostaglandins as mediators of inflammation. *Adv.Prostaglandin Thromboxane Res.*, **2**, 791-801.
- Von Euler, U. S. (1934) Zur Kenntnis der pharmakologischen Wirkung von Nativsekreten und Extrakten männlicher akzessorischer Geschlechtsdrüsen. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* **175**, 78-84.
- Wada, S., Fujimoto, S., Mizue, Y. & Nishihira, J. (1997) Macrophage migration inhibitory factor in the human ovary: presence in the follicular fluids and production by granulosa cells. *Biochem.Mol.Biol.Int.*, **41**, 805-814.
- Waeber, G., Calandra, T., Roduit, R., Haefliger, J. A., Bonny, C., Thompson, N., Thorens, B., Temler, E., Meinhardt, A., Bacher, M., Metz, C. N., Nicod, P. & Bucala, R. (1997) Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **94**, 4782-4787.
- Wahl, L. M., Olsen, C. E., Sandberg, A. L. & Mergenhagen, S. E. (1977) Prostaglandin regulation of macrophage collagenase production. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **74**, 4955-4958.
- Watanabe, T., Narumiya, S., Shimizu, T. & Hayaishi, O. (1982) Characterization of the biosynthetic pathway of prostaglandin D2 in human platelet-rich plasma. *J.Biol.Chem.*, **257**, 14847-14853.
- Wei, S., Kitaura, H., Zhou, P., Ross, F. P. & Teitelbaum, S. L. (2005) IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J.Clin.Invest*, **115**, 282-290.
- Weiser, W. Y., Temple, P. A., Witek-Giannotti, J. S., Remold, H. G., Clark, S. C. & David, J. R. (1989) Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **86**, 7522-7526.

- Weksler, M. E. & Hutteroth, T. H. (1974) Impaired lymphocyte function in aged humans. *J.Clin.Invest*, **53**, 99-104.
- Williams, K. I. & Downing, I. (1977) Prostaglandin and thromboxane production by rat decidual microsomes. *Prostaglandins*, **14**, 813-817.
- Winkel, E. G., Abbas, F., Van der Velden, U., Vroom, T. M., Scholte, G. & Hart, A. A. (1987) Experimental gingivitis in relation to age in individuals not susceptible to periodontal destruction. *J.Clin.Periodontol.*, **14**, 499-507.
- Xie, W. L., Chipman, J. G., Robertson, D. L., Erikson, R. L. & Simmons, D. L. (1991) Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **88**, 2692-2696.
- Yang, N., Nikolic-Paterson, D. J., Ng, Y. Y., Mu, W., Metz, C., Bacher, M., Meinhardt, A., Bucala, R., Atkins, R. C. & Lan, H. Y. (1998) Reversal of established rat crescentic glomerulonephritis by blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF): potential role of MIF in regulating glucocorticoid production. *Mol.Med.*, **4**, 413-424.
- Yin, H., Cheng, L., Langenbach, R. & Ju, C. (2007) Prostaglandin I(2) and E(2) mediate the protective effects of cyclooxygenase-2 in a mouse model of immune-mediated liver injury. *Hepatology*, **45**, 159-169.
- Zachrisson, B. U. (1968) A histological study of experimental gingivitis in man. *J.Periodontal Res.*, **3**, 293-302.
- Zafiropoulos, G. G., Mengel, R. & Flores-de-Jacoby, L. (1991a) [Clinical indices in periodontal diagnosis. A review]. *Dtsch.Zahn Mund Kieferheilkd.Zentralbl.*, **79**, 125-140.
- Zafiropoulos, G. G., Stelzel, M., Mengel, R., Flores-de-Jacoby, L. & Kolb, G. (1991b) [Sulcus fluid in periodontal diagnosis. A review]. *Schweiz.Monatsschr.Zahnmed.*, **101**, 973-985.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACTH	Adreno-Corticotropes-Hormon
AK	Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zellen
API	Approximalraum-Plaque-Index
BNS	Bluten nach Sondieren
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CLP	Cecal Ligation and Puncture
COX	Cyclooxygenase
cPLA2	Zytosolische Phospholipase A2
C5a, C3a	Komplementfaktoren 5a, 3a
ddH ₂ O	double distilled H ₂ O
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK1/ ERK2	Extracellular Signal-Regulated Kinase
GCF	Gingival Crevicular Fluid
GC-MS	Gas Chromatography/ Mass Spectrometry
GI	Gingival Index
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HPA	Hypothalamic-Pituitary Axis
IFN	Interferon
IgE, IgG, IgM	Immunglobulin
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
LTB 4	Leukotrien B4
MAPKs	Mitogen Activated Protein Kinases
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIF	Migration Inhibitory Factor
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MP	Metalloproteinase
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
PBS	Phosphate Buffer Solution
PGE ₂	Prostaglandin E ₂

PI	Plaque Index
PMN	Polymorphkernige Neutrophile Leukozyten
SPEA	Streptococcal Exotoxin A
SPSS	statistical products and service solutions
ST	Sondierungstiefe
Th1/Th2	Abkürzung für ein Subset der T-Helferzellen
TMB	Tetramethylbenzin
TSST-1	Toxic Shock Syndrome Protein
TxA2	Thromboxan A2
WHO	World Health Organization

9. ANHANG

9.1 Materialien und Laborgeräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Geräte wurden von folgenden Firmen bezogen:

- **Amersham Pharmacia Biotech UK**, Buckinghamshire, UK : PGE₂-ELISA
- **Antaeos**, München, Deutschland: Sterile Papierspitzen
- **Boehringer**, Ingelheim, Deutschland: Streptavidin POD Konjugat 500U/ml,
- **NalgeNUNC**, Rochester, New York, USA: F96 Maxisorp NUNC-Immuno Plate
- **Pierce Chemical Co.**, Rockford, Illinois, USA: Superblock Blocking Puffer in TBS
- **R&D Systems**, Minneapolis; Minnesota, USA: monoklonaler, anti-humaner MIF Antikörper, biotinylated Anti-human MIF Antibody, MIF-Standard
- **Sartorius AG**, Göttingen, Deutschland: fein justierbare Waage, zur Verfügung gestellt von der Abt. für Immunologie der Universität Marburg
- **Sigma-Aldrich**, St. Louis, Missouri, USA: o-Phenylenediamine 10mg Tablette

9.2 Tabellen und Abbildungen

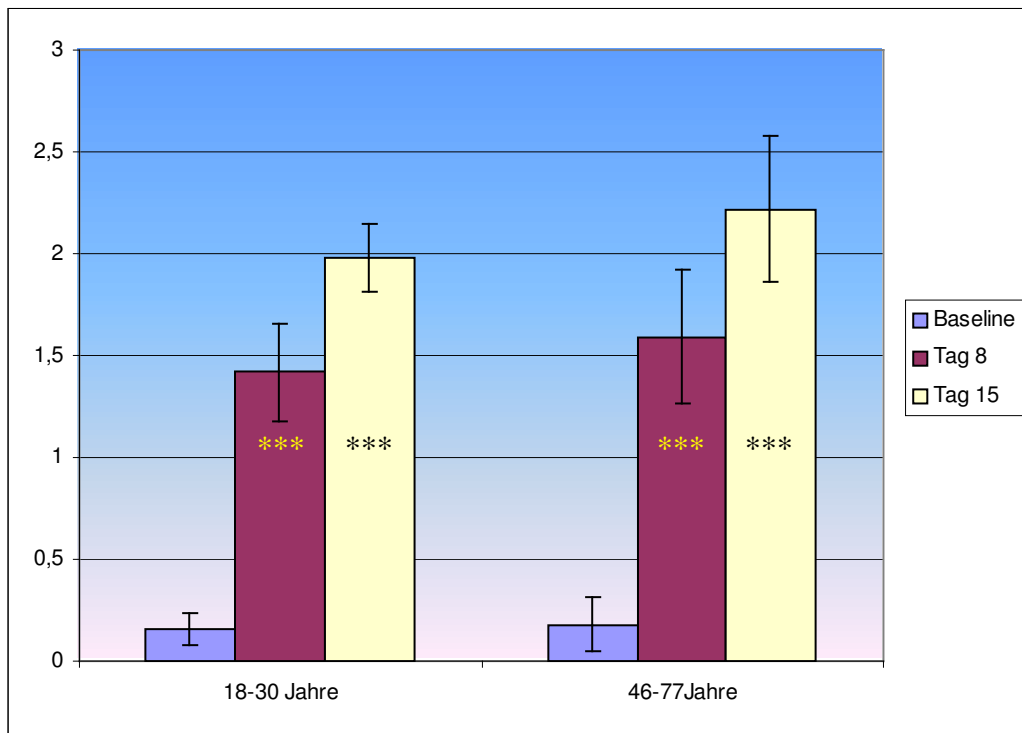


Abb.23: Plaque Index

Der *t*-Test für verbundene Stichproben auf Unterschiede zu den Zeitpunkten zeigt signifikante Anstiege.

* signifikant $p < 0,05$; ** sehr signifikant $p < 0,005$; *** hoch signifikant ($p < 0,001$)

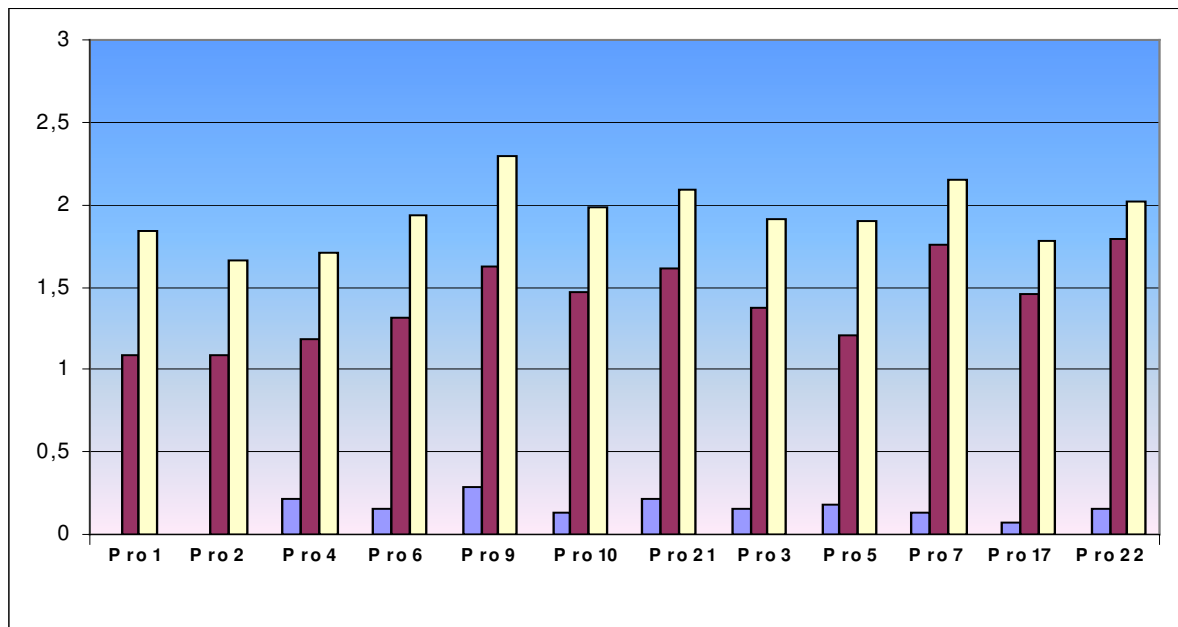


Abb.24: Plaque Index

einzelne Probanden

18-30-Jährige

Pro = Proband

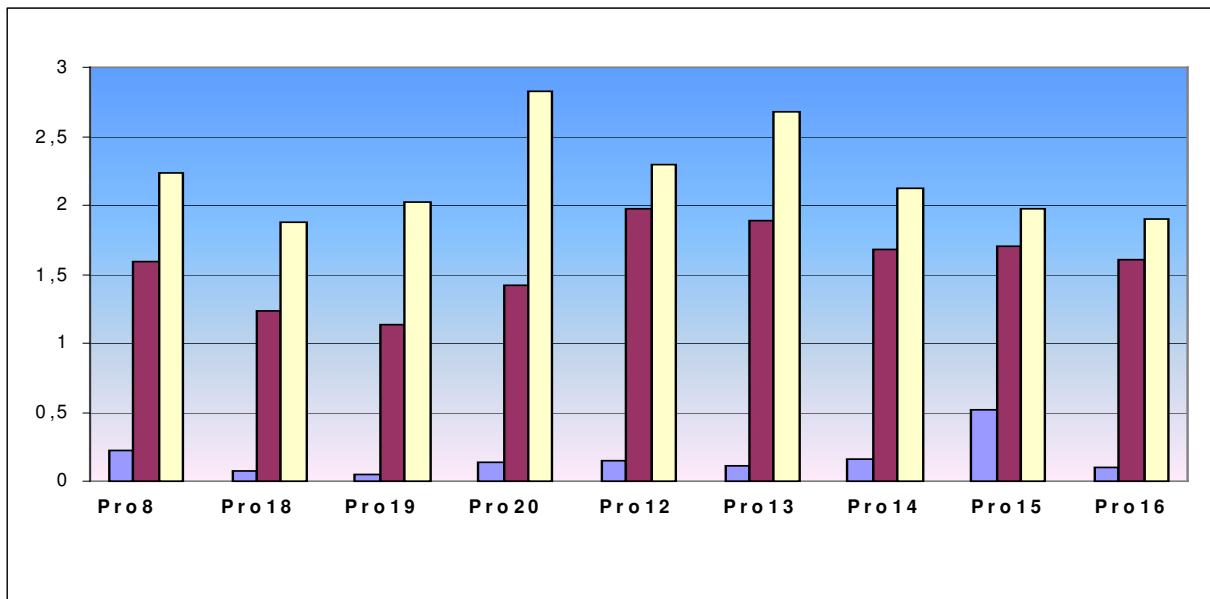


Abb.25: Plaque Index

einzelne Probanden

46-77-Jährige

Pro = Proband

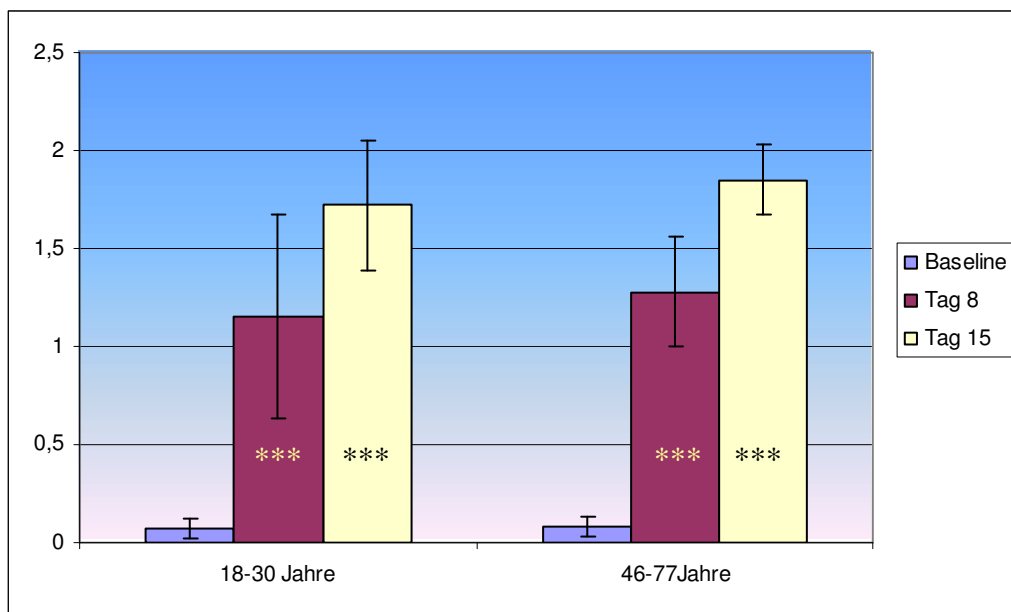


Abb.26: Gingival Index

Der *t*-Test für verbundene Stichproben auf Unterschiede zu den Zeitpunkten zeigt signifikante Anstiege.

* signifikant $p < 0,05$; ** sehr signifikant $p < 0,005$; *** hoch signifikant ($p < 0,001$)

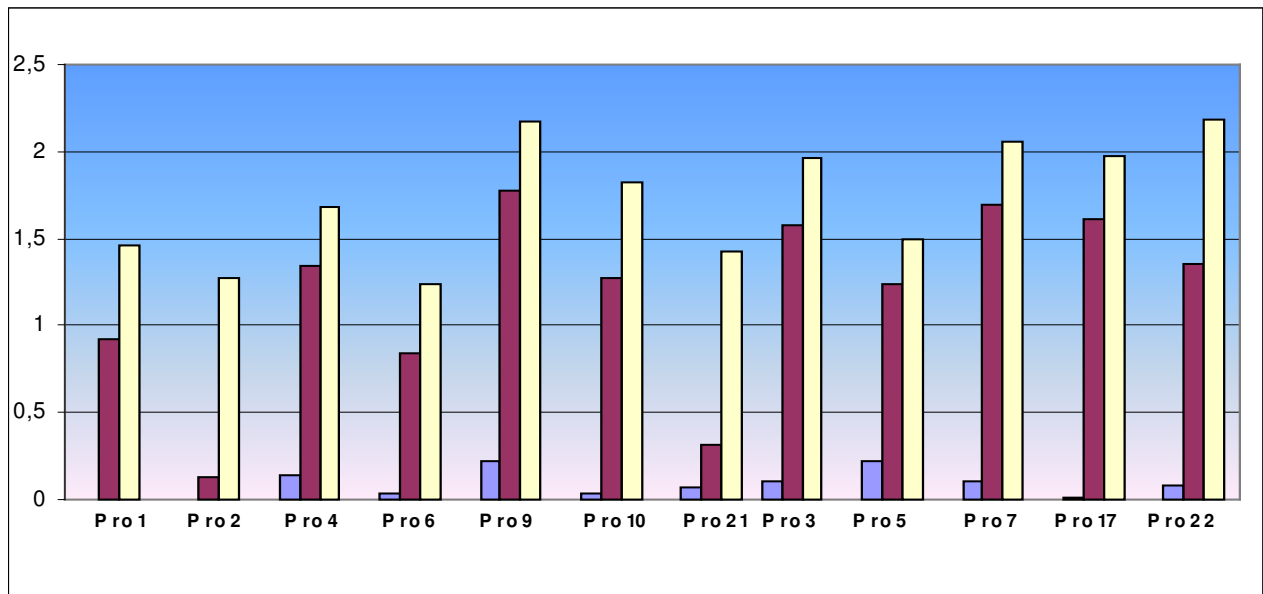


Abb.27: Gingival Index
einzelne Probanden
18-30-Jährige
Pro = Proband

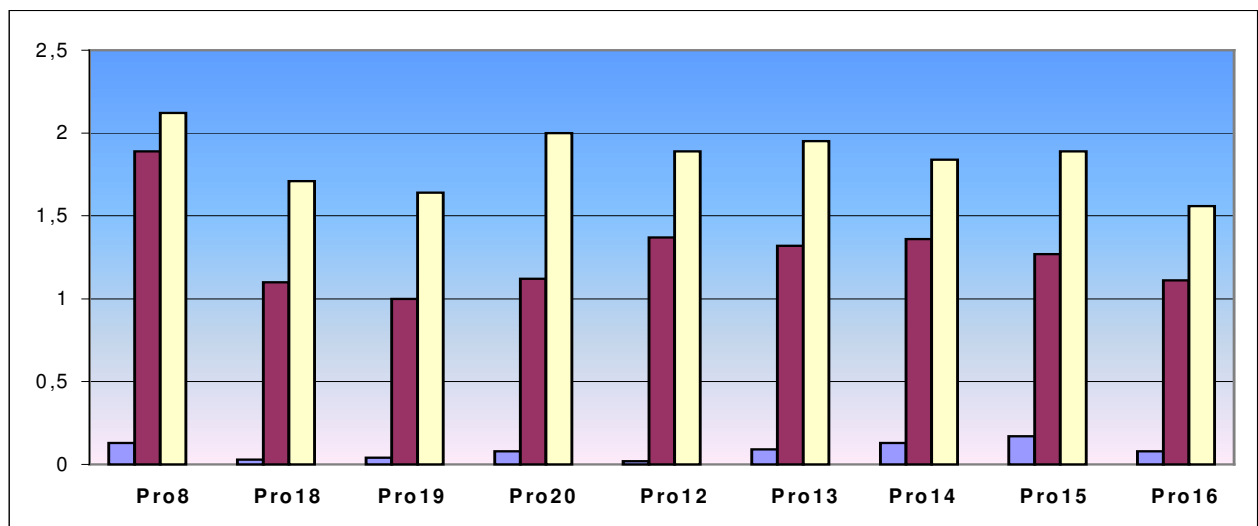


Abb.28: Gingival Index
einzelne Probanden
46-77-Jährige
Pro = Proband

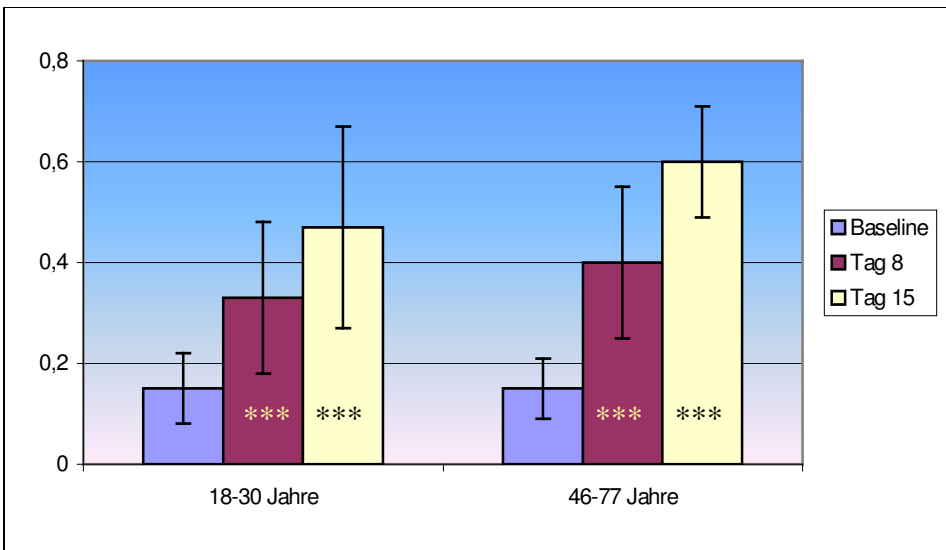


Abb.29: Bluten nach Sondieren

Der *t*-Test für verbundene Stichproben auf Unterschiede zu den Zeitpunkten zeigt signifikante Anstiege.

* signifikant $p < 0,05$; ** sehr signifikant $p < 0,005$; *** hoch signifikant ($p < 0,001$)

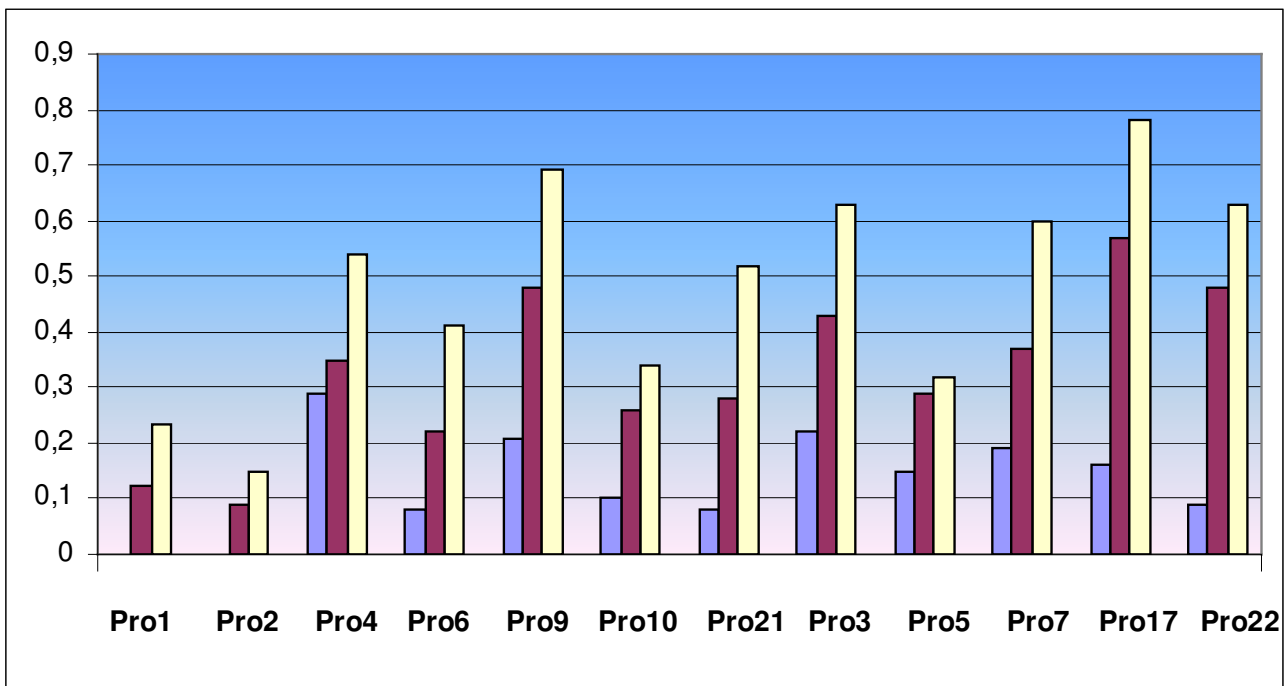


Abb.30: Bluten nach Sondieren

einzelne Probanden

18-30-Jährige

Pro = Proband

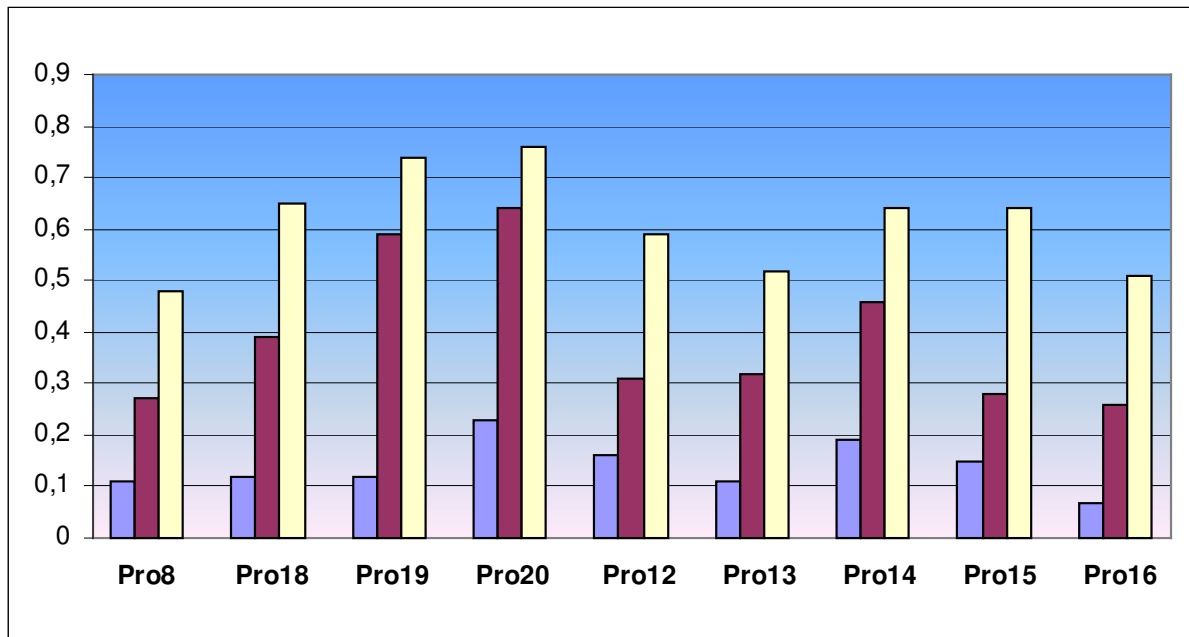
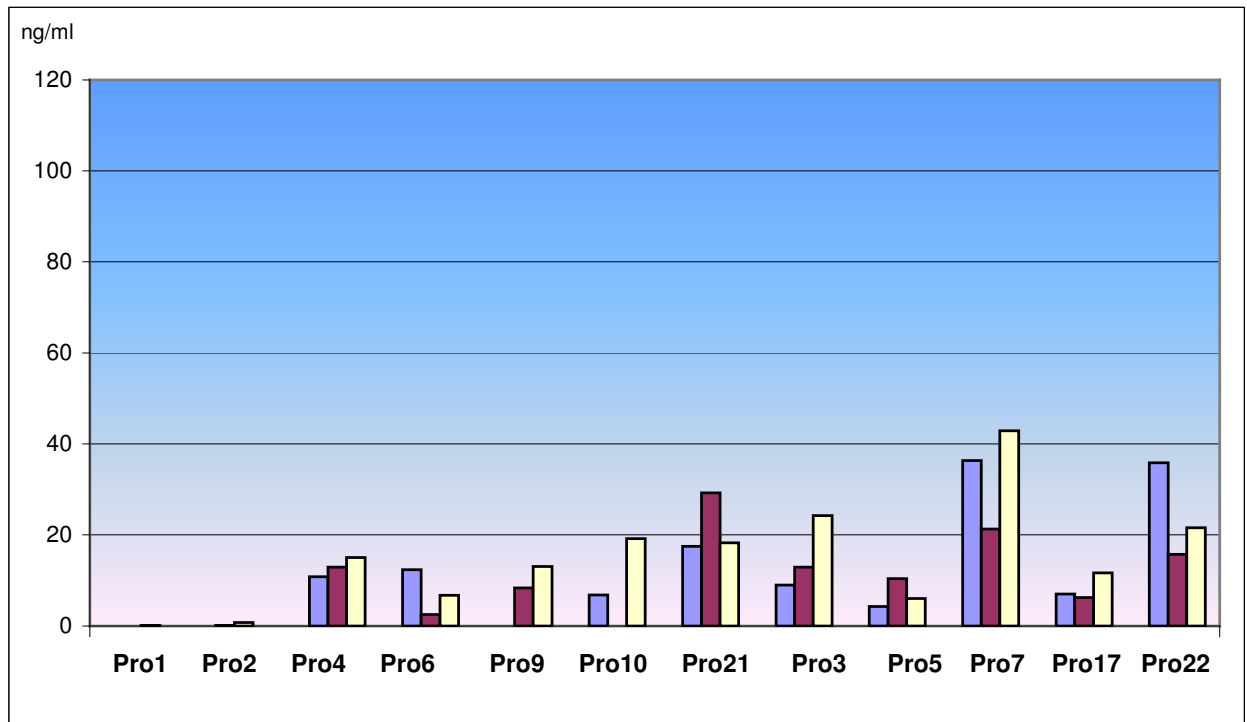


Abb.31: Bluten nach Sondieren

einzelne Probanden

46-77-Jährige

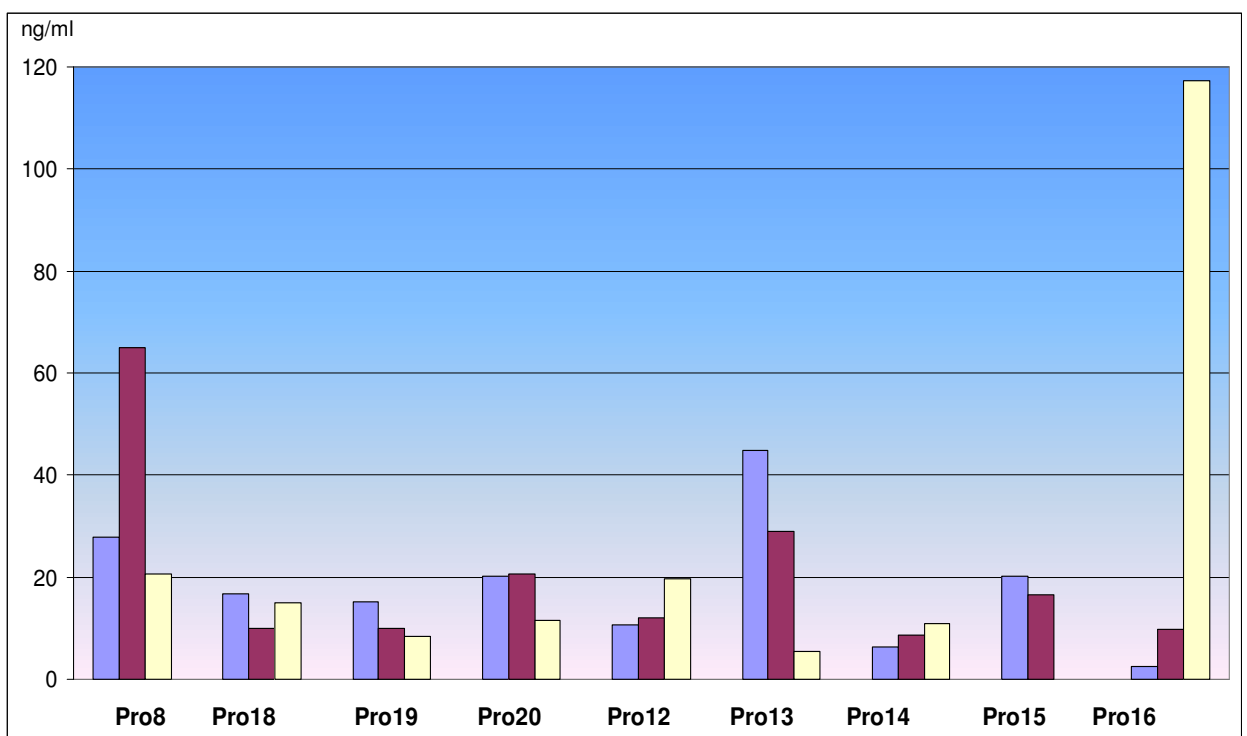
Pro = Proband

**Abb. 32: Prostaglandin E₂**

einzelne Probanden

18-30-Jährige

Pro = Proband

**Abb. 33: Prostaglandin E₂**

einzelne Probanden

46-77-Jährige

Pro = Proband

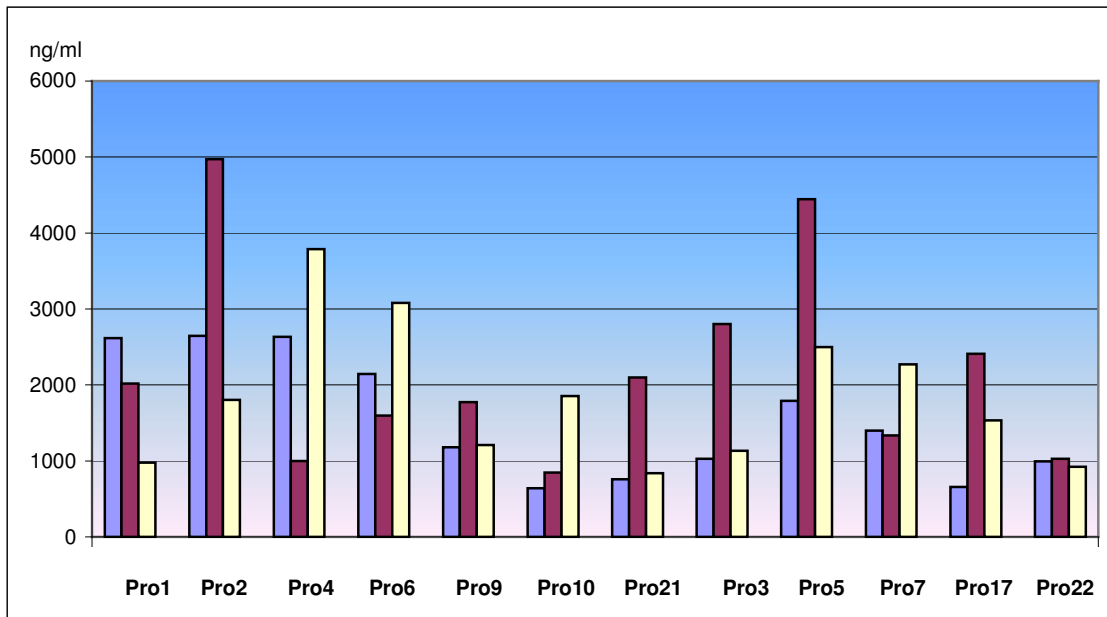


Abb. 34: MIF
einzelne Probanden
18-30-Jährige
Pro = Proband

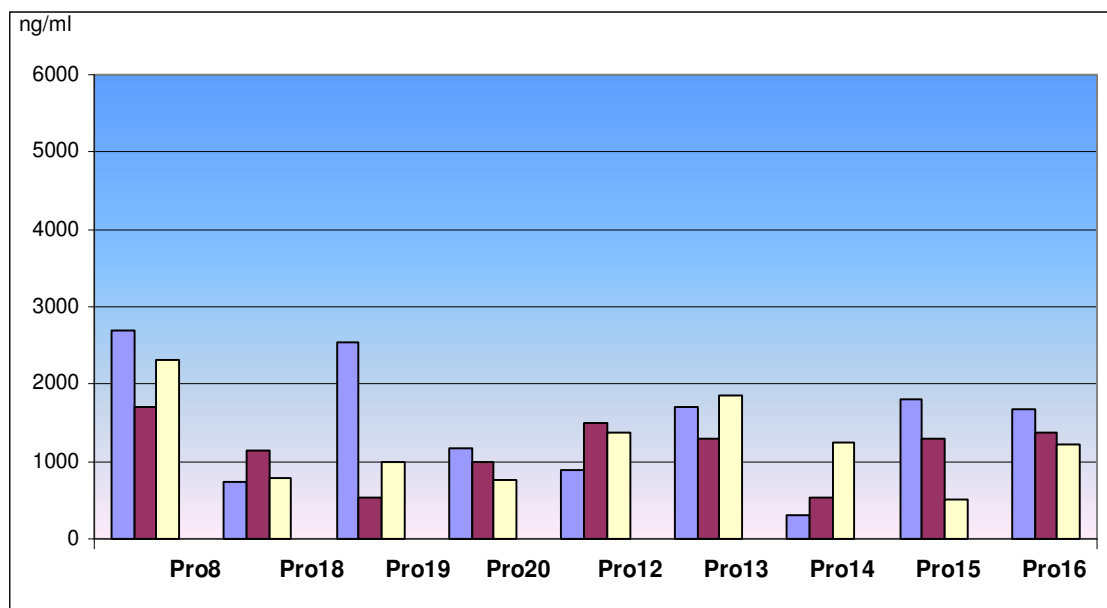


Abb. 35: MIF
einzelne Probanden
46-77-Jährige
Pro = Proband

Korrelationen zwischen PGE₂ und MIF

Dafür wurden für alle Probanden für beide Parameter die Differenzen der Zeitpunkte zwei und eins, sowie drei und zwei errechnet und diese Differenzen korreliert (Tab.10 und 11).

Tab.10 und 11: Korrelationen der Sondierungstiefen (Mittelwerte über alle gemessenen Stellen [mesial, distal, bukkal und palatinal bzw. lingual]) zu den MIF-Werten (nach Zähnen), resp. zu PGE₂ (einmalige Messung zu jedem Zeitpunkt).

Tab.10: Spearmansche Rangkorrelationen Sondierungstiefe / MIF (nach Zähnen)

Zeitpunkt / Zahn	ZP 1	N	ZP 2	N	ZP 3	N
11	0,153	16	-0,456*	20	-0,157	21
14	-0,099	18	0,103	20	-0,249	20
16	-0,241	16	0,156	21	-0,231	19
21	-0,116	18	-0,110	18	-0,664**	21
24	-0,372	14	-0,316	21	0,040	20
26	0,114	13	-0,487*	20	-0,251	20
Gesamt #	-0,432	19	-0,031	21	-0,079	21

* = Signifikanzniveau $\alpha \leq 0,05$; ** = Signifikanzniveau $\alpha \leq 0,01$; # = Korrelationen der Mittelwerte über alle Zähne.

Tab.11: Spearmansche Rangkorrelationen Sondierungstiefe / PGE₂ (nach Zähnen)

Zeitpunkt / Zahn	ZP 1	N	ZP 2	N	ZP 3	N
11	-0,224	19	0,177	21	0,046	19
14	-0,149	19	-0,120	21	0,455	19
16	-0,481*	19	-0,285	21	0,175	19
21	-0,338	19	-0,306	21	0,409	19
24	-0,267	19	0,094	21	0,209	19
26	-0,104	19	0,095	21	0,491*	19
Gesamt #	-0,335	19	0,047	21	0,402	19

* = Signifikanzniveau $\alpha \leq 0,05$; ** = Signifikanzniveau $\alpha \leq 0,01$; # = Korrelationen der Mittelwerte über alle Zähne.

Es waren nur wenige signifikante Korrelationen zu beobachten, die keinem erkennbaren Muster gehorchten. Bei der Korrelation zu PGE_2 dominierten tendenziell anfangs negative Korrelationen, später positive. Die Spearmansche Korrelation zwischen den Differenzen der ersten beiden Zeitpunkte der Parameter PGE_2 und MIF ergab $r = 0,140$ ($p = 0,556$) und war damit nicht signifikant. Für die Spearmansche Korrelation zwischen den Differenzen des zweiten und dritten Zeitpunktes der Parameter PGE_2 und MIF wurde $r = 0,046$ ($p = 0,853$) und damit ebenfalls keine Signifikanz festgestellt. Aufgrund der beobachteten Korrelationen kann nicht von einem zeitlichen Zusammenhang (Steigen/Fallen des einen Parameters bewirkt ein Steigen/Fallen des anderen Parameters) der beiden Parameter ausgegangen werden.

9.3 Lebenslauf

Name:	Kristina Helms
Geburtsdatum:	16.01.1979
Geburtsort:	Hildesheim
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Schulbildung:	1985-1989 Grundschule Wallensen
	1989-1991 Orientierungsstufe Salzhemmendorf
	1991-1998 Gymnasium Alfeld
	1998 Abitur
Berufsausbildung:	Okt.1998-Jan.2004 Studium der Zahnmedizin am Medizinischen Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde an der Philipps-Universität in Marburg
	September 1999 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
	März 2001 Zahnärztliche Vorprüfung
	Dezember 2003 Zahnärztliche Prüfung
	16.01.2004 Approbation als Zahnärztin an der Philipps-Universität in Marburg
Berufstätigkeit:	Juni-Sept. 2004 Vorbereitungsassistentin in freier zahnärztlicher Praxis Dr.Tlatlik/ Northeim
	Okt.2004-Sept.2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für Zahnerhaltung, Präventive Zahnheilkunde und Parodontologie der Georg-August-Universität in Göttingen
	Okt.2006-Juni 2007 Entlastungsassistentin in freier zahnärztlicher Praxis Dres. Ries/ Wertheim
	Seit Juli 2007 Angestellte Zahnärztin in freier zahnärztlicher Praxis Dres. Ries/ Wertheim

9.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten an der Philipps Universität Marburg:

Aumüller, Austermann, Barth, Cetin, Daut, Dibbets, Feuser, Flores-de-Jacoby, Gente, Geus, Höffken, Kern, Koolmann, Lang, Lehmann, Lotzmann, Mengel, Mittag, Neubauer, Pieper, Radsak, Ramaswamy, Röhm, Seitz, Siegel, Stachniss, Steiniger, Stelzel, Stoll, Suske, Umstadt, Walter, Weihe, Wenz, Werner, Westermann

9.5 Danksagung

Im Laufe der Erstellung meiner Dissertation haben mir viele Personen zur Seite gestanden:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Reiner Mengel für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und für die Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit. Auch für die Möglichkeit, meine Arbeit in Madrid auf der Europerio vorstellen zu dürfen, bin ich Prof. Mengel sehr dankbar.

Nicht minder herzlich möchte ich mich bei PD Dr. Michael Bacher für seine fachliche Anleitung bei der Durchführung der MIF ELISAs bedanken. Seine gute Laune, die hin und wieder benötigten Aufmunterungen und sein scheinbar unendliches Fachwissen über MIF haben mir sehr geholfen.

Auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie möchte ich für die freundliche Aufnahme und Hilfestellung bei sämtlichen Problemen danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Rolf M. Nüsing, der mir bei der Auswertung der Prostaglandin-Proben hilfreich zur Seite stand.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Reitze für die freundliche Hilfe bei der statistischen Auswertung der Arbeit bedanken.

Frau Petra Grimmelbein danke ich für die nette Unterstützung und Einweisung in die Versuchsvorbereitungen.

Meinem Freund Daniel möchte ich für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung unserer Studie, für die schnelle Hilfe bei meinen kleinen und großen Computerproblemen und für alles andere ganz herzlich danken.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder für den Rückhalt und die liebevolle Unterstützung in jeglicher Hinsicht und in allen Lebenslagen!

Ebenso möchte ich mich bei allen teilnehmenden Probanden bedanken, die viele Mühen auf sich genommen und diese Studie so erst ermöglicht haben.

9.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel : „**Migration Inhibitory Factor und Prostaglandin E₂ bei experimenteller Gingivitis in verschiedenen Altersgruppen**“ im Medizinischen Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde unter der Leitung von Prof. Dr. R. Mengel ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt. Vorliegende Arbeit wird in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht: „Journal of Dental Research“.

Würzburg, den 01.Juni 2008
