

Aus dem Medizinischen Zentrum für Zahn-, Mund und Kieferheilkunde der Philipps -
Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dr. Neff
Abteilung für Parodontologie
Leiter: Prof. Dr. Arweiler
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

**OPG und RANKL in der Sulkusflüssigkeit und im Speichel bei
Patienten mit behandelter chronischer Parodontitis und
osseointegrierten Implantaten**

INAUGURAL – DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin
dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Julia Katharina Heck

aus
Marburg

Marburg 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 20.05.2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. R. Mengel

Korreferent: Prof. Dr. M. Gente

Für Oma und Opa

1. Einleitung	1
1.1 Funktion und Aufbau des Knochens	3
1.2 Regulation des Knochenstoffwechsels	5
1.3 Das OPG/RANK/RANKL-System	10
1.3.1 RANKL	12
1.3.2 RANK	13
1.3.3 OPG	14
1.4 Zusammensetzung und Aufgabe der Sulkusflüssigkeit	17
1.5 Zusammensetzung und Aufgabe des Speichels	19
2. Ziel der Studie	24
3. Material und Methoden	25
3.1 Patienten	25
3.2 Untersuchungsmethoden	26
3.2.1 klinische Parameter	26
3.2.2 Radiologische Untersuchung	29
3.2.3 Entnahme der Sulkusflüssigkeit	29
3.2.4 Entnahme des Speichels	30
3.2.5 OPG-Proteinanalyse	30
3.2.6 RANKL-Proteinanalyse	32
3.2.7 Studiendesign	33
3.2.8 Statistische Evaluation	33
4. Ergebnisse	34
4.1 klinische Ergebnisse	34
4.2 OPG und RANKL in der Sulkusflüssigkeit	34
4.3 OPG und RANKL im Speichel	35

5. Diskussion	36
5.1 Diskussion der Methode	36
5.1.1 Die Gewinnung der Sulkusflüssigkeit	36
5.1.2 Die Gewinnung des Speichels	42
5.2 Diskussion der Ergebnisse	44
6. Schlussfolgerung	47
7. Zusammenfassung/Summary	48
8. Literaturverzeichnis	51
9. Abkürzungsverzeichnis	72
10. Anhang	74
10.1 Tabellen und Abbildungen	74
10.2 Verzeichnis Akademischer Lehrer	82
10.3 Danksagung	83

1. Einleitung

In den letzten Jahren gibt es zunehmend Hinweise auf Implantatverluste durch biologische, iatrogene, mechanische oder funktionelle Komplikationen (Esposito et al. 1998a/b, Mengel et al. 2007). Allerdings sind die Risikofaktoren, die zum Implantatverlust führen, noch nicht bekannt (Chuang et al. 2002, Mc Dermott et al. 2003). Bezüglich der biologischen Komplikationen zeigen Tierversuche, dass der Biofilm ein wichtiger Faktor bei der Entstehung periimplantärer Entzündungen ist (Berglundh et al. 1992, Schou et al. 1993). Die Plaqueakkumulation verursacht zuerst eine Mukositis, welche als reversible Entzündung des periimplantären Weichgewebes ohne Knochenverlust definiert ist (Albrektsson & Isidor 1994, Zitzman & Berglundh 2008). Eine unbehandelte Mukositis kann zu einer Periimplantitis führen, die durch den entzündlichen Prozess das Implantat umgebenden Weich- und Hartgewebe zerstört (Albrektsson & Isidor 1994).

Da die Mukositis und die Periimplantitis im Anfangsstadium erfolgreich zu behandeln sind, kommt der Früherkennung eine wesentliche Bedeutung zu. Es ist allerdings unklar, welche diagnostischen Verfahren sich neben den klinischen und radiologischen Untersuchungen zur Früherkennung des Knochenabbaus eignen. Sicher kommt hierbei der Sulkusflüssigkeit und dem Speichel eine besondere Bedeutung zu. Im Speichel finden sich zahlreiche Biomarker, wie zum Beispiel MMP-9, MMP-8, IL-1 β und IL-2, die bei einer parodontalen Erkrankung auf eine Gewebedestruktion hinweisen (Ramseier et al. 2009). In der Sulkusflüssigkeit weisen besonders Patienten mit Knochenabbau erhöhte Werte von IL-1 β und Prostaglandine (PGE₂) auf (Offenbacher 1996).

Es gibt bis heute recht wenige Studien, die das OPG/RANKL System in Bezug auf den Alveolarknochen näher untersuchen. Dies ist erstaunlich, da belegt ist, dass der Knochenauf- und abbau durch molekulare Interaktionen des Receptor activator of NF- κ B Ligand (RANKL), Receptor activator of NF- κ B (RANK) und Osteoprotegerin (OPG) reguliert wird (Lerner 2004). RANKL steigert die Anzahl und Aktivität funktionsfähiger Osteoklasten durch Aktivierung des osteoklastären RANK und erhöht damit die Knochenresorption, während OPG durch Neutralisierung von RANKL die Knochenresorption hemmt (Fata et al. 2000).

RANKL ist ein essentielles Zytokin für die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten. Die lösliche Form von RANKL (sRANKL) wird von aktivierten T-

Lymphozyten und Osteoblasten sezerniert (Nakashima et al. 2000, Kong et al. 1999, Wong et al. 1997a). RANKL wird vor allem im Knochen und Knochenmark von verschiedenen skeletalen Zellen wie mesenchymalen Stammzellen, Stromazellen, Osteoblasten, Osteoklasten, Periostzellen und Chondrozyten exprimiert. Eine sehr hohe RANKL-Expression findet sich im lymphatischen Gewebe und bei verschiedenen Malignomen (Anderson et al. 1997; Kartsogiannis et al. 1999; Lacey et al. 1998; Horwood et al. 1998; Wong et al. 1997a; Yasuda et al. 1998b; Xu et al. 2000; Zhang et al. 2001).

RANKL spielt vor allem bei entzündlichen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Es ist belegt, dass aktivierte T-Lymphozyten die Sekretion von RANKL bei Gelenkentzündungen sowie beim Knochen- und Knorpelabbau der chronisch entzündlichen rheumatoiden Arthritis begünstigen (Kong et al. 1999).

Im Gegensatz dazu, ist die OPG Konzentration in der synovialen Flüssigkeit bei Patienten mit rheumatoider Arthritis, verglichen mit der Konzentration bei Patienten mit anderen Formen der Arthritis, geringer (Kotake et al. 2001).

Die Erkenntnisse aus diesen Studien legen nahe, dass auch bei der Osseointegration von dentalen Implantaten das OPG/RANKL-System eine Rolle spielt. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass in der periimplantären Sulkusflüssigkeit bei gesunden und erkrankten Implantaten OPG und RANKL vorhanden sind (Monov et al. 2006; Arikan et al. 2007). Allerdings konnte keine Korrelation der RANKL Werte mit den klinischen Parametern nachgewiesen werden. Es lag allerdings eine positive Korrelation der OPG Werte zu den Entzündungsparametern des Weichgewebes (Gingival Index und Bluten nach Sondieren) vor (Arikan et al. 2008).

Bis heute gibt es wenige Studien über das OPG/RANKL System im Speichel. (Miller et al. 2006; Ramseier et al. 2009, Buduneli et al. 2008).

Bei Patienten mit parodontaler Erkrankung konnte gezeigt werden, dass OPG und RANKL im Speichel von Rauchern und Nichtrauchern mit oder ohne parodontaler Erkrankung vorhanden sind und die RANKL Konzentrationen bei Rauchern höher ist als bei den Nichtrauchern (Buduneli et al. 2008).

Zurzeit sind keine Studien bekannt, die eine Korrelation von OPG, RANK und RANKL in der Sulkusflüssigkeit und im Speichel bei Patienten mit osseointegrierten Implantaten untersucht haben.

1.1 Funktion und Aufbau des Knochens

Das Knochengewebe ist ein hoch organisiertes Verbundmaterial und besteht aus anorganischen Mineralstoffen und einer organischen Matrix. Es hat die Aufgabe, als feste Stütze und Schutz für die Weichgewebe des Körpers zu sorgen und dient als Calcium Reservoir. Das Knochengewebe bezieht seine Stabilität aus der speziellen Anordnung von Hydroxylapatit und Kollagenfibrillen. Es werden drei Typen von Knochengewebe je nach physiologischer Entwicklung, Alter, Lokalisation und Funktion unterschieden: Geflechtknochen, Lamellenknochengewebe und Faserknochen (Schwenzer und Ehrenfeld 2000).

Knochen besteht aus Osteozyten und Interzellulärsubstanz. Die Osteozyten befinden sich einzeln in kleinen Knochenzellhöhlen, die von Interzellulärsubstanz umgeben sind. Allseitig besitzen sie lange Fortsätze, die in feinen Knochenkanälchen liegen. Die Knochenkanälchen stehen untereinander in Verbindung und die Fortsätze der Knochenzellen kommunizieren durch die Nexus. Die Interzellulärsubstanz besteht aus einer organischen und anorganischen Matrix. Die organische Matrix setzt sich zu 95% aus Kollagenfasern vom Kollagentyp I zusammen. Die restlichen 5% bestehen aus amorphen Interzellulärsubstanzen, vor allem Glykosaminoglykane und spezielle Proteine z.B. Osteonectin, Osteokalzin.

Die anorganischen Bestandteile lagern sich in die organische Interzellulärsubstanz ein und sorgen so für die Druckfestigkeit des Knochens. Das Hydroxylapatit ist vor allem in Kristallform eingelagert. Die Kristalle sind parallel zu Kollagenfasern angeordnet und umgeben sich an ihrer Oberfläche mit einem Mantel aus gebundenem Wasser.

Der Knochen wird vom Periost bedeckt. Das Periost umhüllt die äußere Oberfläche des Knochens. Es setzt sich aus Bindegewebe zusammen und enthält Gefäße und Nerven. Es hat die Aufgabe, den Knochen zu ernähren und für seine Neubildung zu sorgen (Schiebler et al. 1997).

Der Alveolarfortsatz trägt als Bestandteil des Parodontiums die Zähne und ist Teil des Ober- und Unterkiefers. Die Verbindung von Zahn und Alveole erfolgt über das parodontale Ligament. Die Aufgaben des Alveolarfortsatzes bestehen in der Aufnahme und Verteilung von funktionellen Belastungen, welche auf die Zähne einwirken. Kommt es im Zuge einer fortschreitenden Parodontitis zu einer Resorption

der Alveolen und des parodontalen Ligaments, folgt der Verlust der Zähne (Lindhe et al.1999).

Der knöcherne Stützapparat der Zähne gleicht in seinem anatomischen Aufbau aus Kompakta und Spongiosa dem des restlichen Skeletts. Die Dicke der kortikalen Knochenbedeckung variiert in den verschiedenen vestibulären und oralen Regionen des Ober- und Unterkiefers unterschiedlich stark. Eine weitere kortikale Struktur des zahntragenden Alveolarfortsatzes ist der Alveolarknochen. Der Alveolarknochen ist 0,1-0,4mm dick. Es besteht sowohl die äußere Knochenschicht als auch die innere Alveolenwand aus kompakter Knochensubstanz. Die innere Wand ist dabei recht dünn und mit zahlreichen kleinen Löchern, den Volkmann-Kanälchen, siebartig durchlöchert. Durch diese Öffnungen gelangen Blut- und Lymphgefäße sowie Nerven aus dem Inneren der Schwammschicht oder Spongiosa in den Desmodontalraum. Marginal vereinigen sich die kortikale Knochenbedeckung und die Alveolarwand zu einem teils hauchdünnen Knochenkamm (Wolf et al. 2004). Zwischen Kompakta und Alveolarwand liegt die unterschiedlich dichte Spongiosa, welche den größten Teil der interdentalen Septen ausmacht (Lindhe et al. 1999). Aufgrund wechselnder Anforderungen werden Ober- und Unterkiefer während des gesamten Lebens umgebaut und funktionell neu ausgerichtet.

1.2 Regulation des Knochenstoffwechsels

Der Knochen ist ein metabolisch hoch aktives Organ. Während der gesamten Lebensdauer unterliegt er einem kontinuierlichen Umbauprozess. In einem dynamischen Gleichgewicht wird die osteoklastäre Resorption und die osteoblastäre Produktion von Knochenmatrix koordiniert. Dieser ständige Knochenumbau ist notwendig, um einerseits die strukturelle Integrität des Skeletts zu gewährleisten und andererseits die metabolische Funktion als Kalzium - und Phosphat - Speicher zu erfüllen (Tanaka 2007; Manolagas 2000; Roodman 1996). Knochenumbauvorgänge können durch Mikrotraumata, Veränderungen der mechanischen Belastung und durch hormonelle Antwort auf Veränderungen der Kalzium- und Phosphat-Verfügbarkeit moduliert werden (Raisz 2005).

Der Knochenumbau erfolgt in einer streng regulierten Abfolge von Resorptions - und Formationsschritten. Es werden initial mesenchymale Stammzellen der osteoblastischen Linie durch lokale und systemische Faktoren aktiviert, die mit hämatopoietischen Vorläufern der Osteoklasten interagieren. Diese unterlaufen einen Differenzierungsprozess und fusionieren zu großen multinukleären Osteoklasten. Die funktionsfähigen Osteoklasten lagern sich an die Knochenoberfläche an und erfahren eine Konformationsänderung mit Bildung einer sogenannten „ruffled border“. Auf diese Weise wird ein abgegrenzter Raum gegen das Umgebungsmilieu geschaffen, der durch Sekretion von Wasserstoff - Ionen angesäuert wird. In diesem sauren Milieu werden von den Osteoklasten sezernierte lysosomale Enzyme (z. B. Cathepsin K) aktiv, die alle Komponenten der Knochenmatrix, einschließlich des Kollagens, abbauen (Teitelbaum 2006). Für die Anlagerung der Osteoklasten an den Knochen sind spezifische Veränderungen der „lining“- Zellen der Knochenoberfläche notwendig. Diese kontrahieren und sezernieren proteolytische Enzyme zur Freilegung der mineralisierten Oberfläche. In den durch die osteoklastäre Resorption entstandenen Resorptionslakunen lagern sich zunächst mononukleäre Zellen auf der Knochenoberfläche an, die möglicherweise den Resorptionsprozess vervollständigen und die Knochenbildung durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren initiieren (Raisz 2005). Mesenchymale Stammzellen wandern ein und differenzieren zu funktionsfähigen Osteoblasten. Nach ihrer Differenzierung beginnen diese mit der Deponierung extrazellulärer Matrix in die Resorptionslakunen, die durch Mineralisierung in vollwertiges Knochengewebe

umgewandelt wird (Manolagas 2000). Während dieses Prozesses differenzieren einige der Osteoblasten zu Osteozyten und werden in der Knochenmatrix eingebettet, wo sie künftig als Mechanosensoren fungieren. Andere der an der Oberfläche befindlichen Osteoblasten wandeln sich in flache „lining“- Zellen um, weitere unterliegen der Apoptose (Raisz 2005) (Abb. 1).

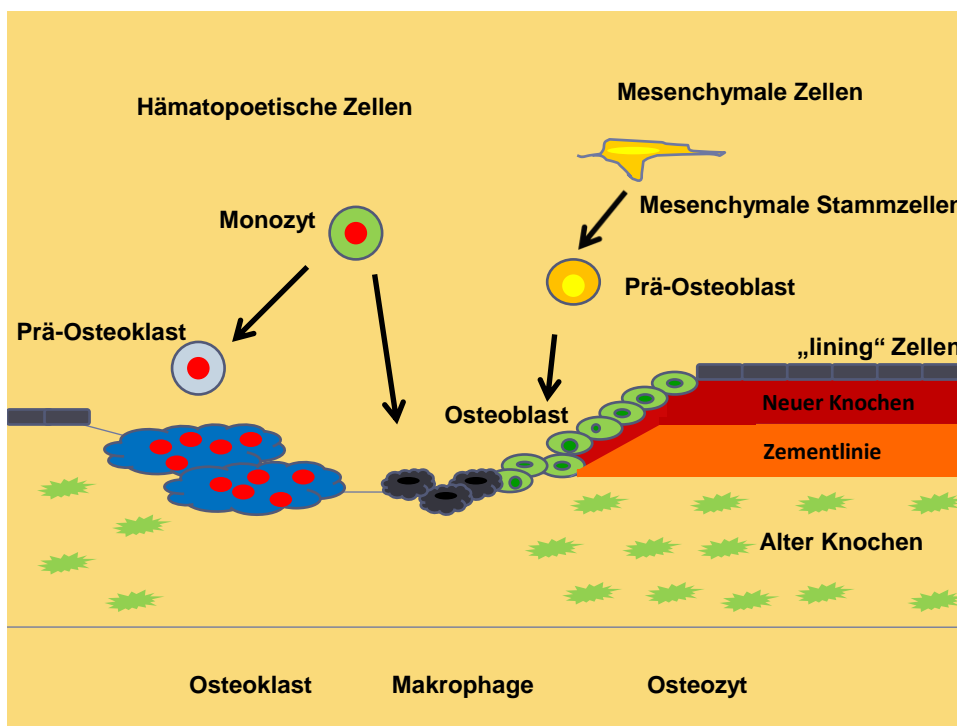


Abb. 1: Knochenhomöostase – Gleichgewicht zwischen Knochenresorption und Knochenbildung: Hämatopoetische Monozyten differenzieren zu Osteoklasten, diese resorbieren den bestehenden Knochen. Ebenfalls von Monozyten abstammende Makrophagen initiieren die Knochenbildung und einwandernde mesenchymale Stammzellen differenzieren zu Osteoblasten. Die Osteoblasten deponieren Knochenmatrix in Resorptionslakunen. Bei der Mineralisierung der Matrix zu neuem Knochengewebe werden die Osteozyten eingemauert. An der Knochenoberfläche differenzieren Osteoblasten zu „lining“- Zellen.

Die Resorptionsphase (2-4 Wochen) ist wesentlich kürzer, als die Knochenneubildung (4-6 Monate). Um die Integrität des Skeletts zu wahren, bedarf es daher einer strengen Regulation der Differenzierung und Aktivität der Osteoklasten. Diese gelten zumal auch als Initiatoren des Knochenumbauzyklus (Tanaka 2007).

Die für die Osteoklastogenese essentiellen Zytokine sind Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) und Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), die unter anderem von Zellen des Knochengewebes produziert werden (Abb. 2). Das RANKL/RANK/OPG-Zytokinsystem ist somit ein zentrales molekulares Regulationssystem des Knochenstoffwechsels.

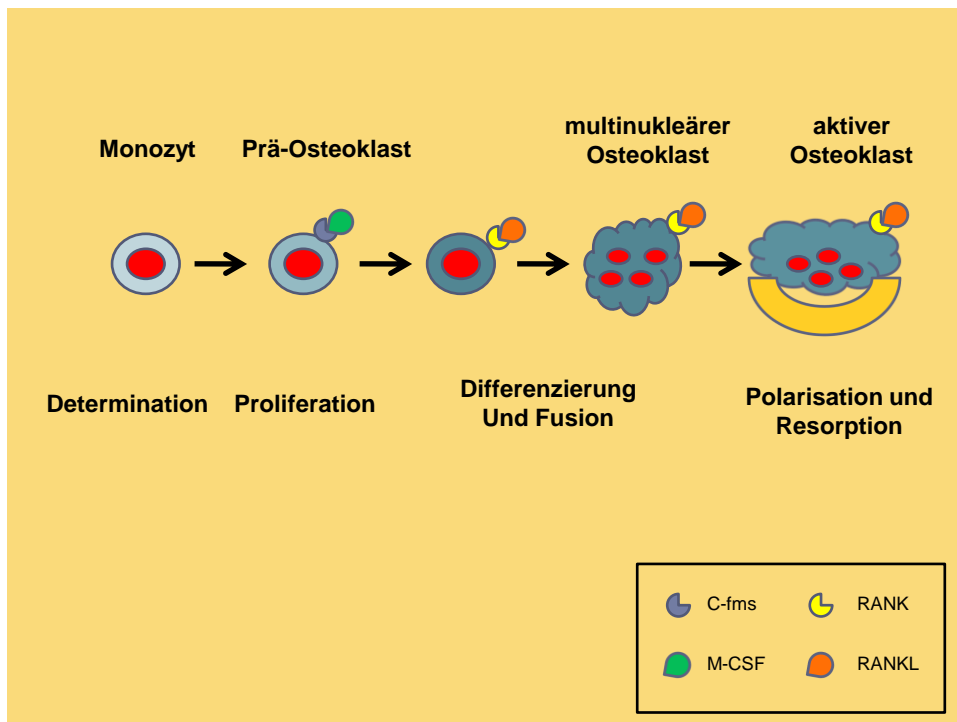


Abb. 2: Entwicklung eines funktionsfähigen Osteoklasten. In der monozytären/makrophagozytären Vorläuferzelle wird durch PU.1 die Expression von c-fms, dem Rezeptor für M-CSF induziert. M-CSF fördert die Proliferation und das Überleben der osteoklastären Vorläuferzellen und wirkt permissiv für RANKL. RANK befindet sich auf Prä-Osteoklasten und Osteoklasten. Seine Aktivierung ist notwendig für die Differenzierung, Fusion, Aktivierung und das Überleben reifer Osteoklasten. Osteoklasten können erst Knochen resorbieren, nachdem die Polarisation durch Kontakt mit Knochengewebe sowie eine Umstrukturierung ihres Zytoskeletts erfolgt ist (Teitelbaum, 2000; Raisz, 2005).

Auf die Bindung von RANKL an seinen Rezeptor RANK folgt eine komplexe intrazelluläre Signaltransduktion. Eine Stimulation von RANK durch RANKL führt zu

einer Rezeptortrimerisierung und der Rekrutierung von Adaptermolekülen wie der Tyrosinkinase c-src und TNF-receptor associated factors (TRAFs). Insgesamt gibt es sechs TRAFs. TRAF6 spielt hierbei eine entscheidende Rolle für die RANKL/RANK-Signaltransduktion (Darnay et al. 1998; Galibert et al. 1998; Wong et al. 1999a). Die Induktion der Genexpression in Osteoklastenvorläufern zur Differenzierung in aktiv resorbierende Osteoklasten erfolgt über die Aktivierung von NF- κ B durch den I κ B-Kinase Komplex (IKK) und über den Nuclear factor of activated T cells 2 (NFAT2). Die NFAT2-Genexpression wird über die TRAF6-abhängige Aktivierung der c-jun N-terminalen Kinase (JNK)/c-fos/c-jun-Signaltransduktionskaskade und den durch Calcineurin aktivierten NFAT1c induziert (Teitelbaum 2006; Doherty et al. 2004, Franzoso et al. 1997, Ogawa et al. 2006; Ikeda et al. 2006; Matsuo et al. 2000; Darnay et al. 1998). Die Steigerung des intrazellulären Kalziums mit nachfolgender Aktivierung von Calcineurin zählt zu den wichtigsten intrazellulären Effekten der RANKL-RANK-Interaktion (Teitelbaum 2006). Die Aktivierung von NFAT1c erfolgt unter anderem über Calcineurin. Antiapoptotische und zytoskeletale Effekte von RANKL werden über die TRAF6/c-src-abhängige Induktion der Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase (PI3K)/Akt/PKB-Signaltransduktionskaskade vermittelt (Wong et al. 1998, 1999; Chaisson et al. 2004; Matsubara et al. 2006; Lee et al. 2002; Wang et al. 2004; Harvey et al. 2007). Weitere an der zellulären Osteoklasten-differenzierung beteiligte intrazelluläre Signalmoleküle sind Mitogen activated protein (MAP)-Kinasen, AP-1 (Lomaga et al. 1999), sowie PU.1, das die Expression des M-CSF-Rezeptors und die ERK1/2-Signaltransduktionskaskade induziert (Teitelbaum et al. 2006; Takayanagi 2005; Anderson et al. 1999; Zhao et al. 2007) (Abb.3).

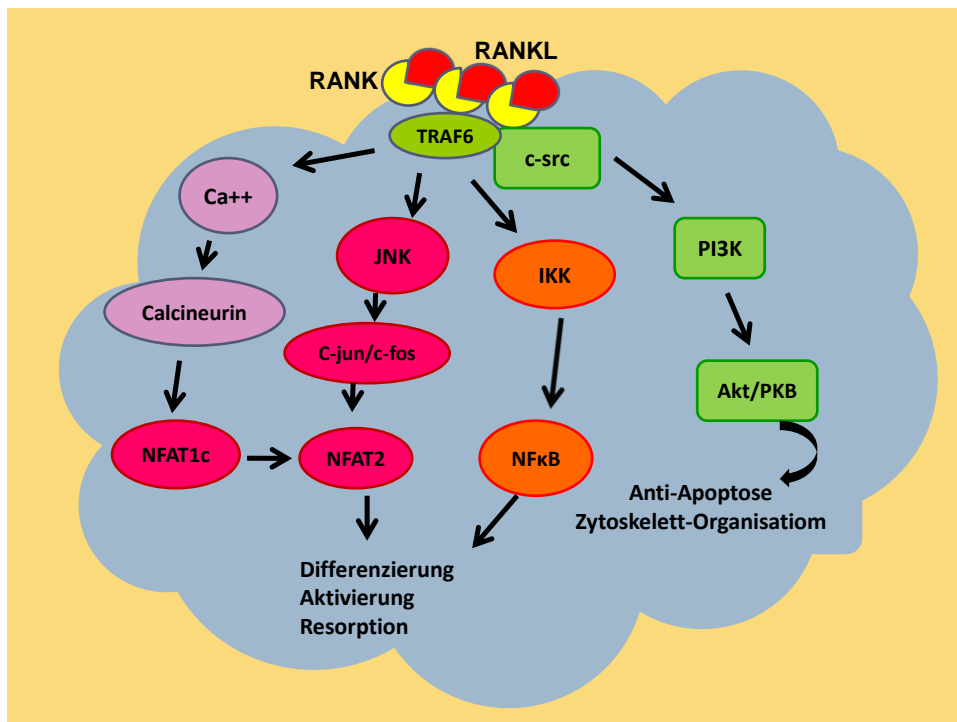


Abb. 3: RANK-Signaltransduktion der Osteoklastogenese: Die durch die RANKL-Bindung initiierte Rezeptortrimerisierung führt zur Rekrutierung von Adaptermolekülen wie c-src und TNF receptor associated factor 6 (TRAF6). Die Signaltransduktion besitzt vier definierte Signalwege. Die Aktivierung von NFAT2 über Calcineurin und die JNK/c-fos/c-jun-Kaskade und die Aktivierung von NF-κB erwiesen sich als essentiell für die Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung. Über eine gemeinsame Rekrutierung von TRAF6 und c-src wird die PI3K/Akt/PKB-Signaltransduktionskaskade aktiviert, die antiapoptotische und zytoskeletale Effekte vermittelt.

Während die permanente und kontrollierte Knochenresorption für physiologische Prozesse wie Knochenwachstum, Zahneruption und für die Knochenheilung nach Traumatisierung notwendig ist, führt eine inadäquat hohe Knochenresorption durch gesteigerte Osteoklastenaktivität zu einem Verlust von Knochenmasse. Dieser übermäßige Prozess bildet die Grundlage der Osteoporose und des Morbus Paget sowie der inflammatorischen Osteolyse bei rheumatoider Arthritis und Parodontitis. Ein Mangel an funktionsfähigen Osteoklasten führt dagegen zu einer ungebremsen Mineralisierung mit verdichteter Knochenmasse im Sinne einer Osteopetrose (Teitelbaum 2000).

1.3 Das OPG/RANK/RANKL-System

Das Zytokinsystem besteht aus den Mitgliedern der Tumor necrosis factor (TNF)-Ligandenfamilie Receptor activator of nuclear factor-kB ligand (RANKL) (Lacey et al. 1998; Yasuda et al. 1998a; Wong et al. 1997b; Anderson et al. 1997), seinem Rezeptor Receptor activator of nuclear factor-kB (RANK) (Anderson et al. 1997) und seinem löslichen Rezeptorantagonisten Osteoprotegerin (OPG) (Simonet et al. 1997; Yasuda et al. 1998b; Kwon et al. 1998; Tan et al. 1997). Es stellt ein für die Knochenzellbiologie und Aufrechterhaltung der Knochenhomöostase und Regulation von Immunfunktionen essentielles Zytokinsystem dar (Teitelbaum 2000; Kong et al. 2000; Schoppet et al. 2007). Verschiedene Studien vermuten ebenfalls eine entscheidende Beteiligung dieses Zytokinsystems an der Homöostase des vaskulären Systems, in dem die Faktoren exprimiert werden (Golledge et al. 2004; Dhore et al. 2001; Collin-Osdoby et al. 2001; Zannettino et al. 2005).

RANKL fördert die Knochenresorption durch Steigerung der Anzahl und Aktivität funktionsfähiger Osteoklasten über Aktivierung seines osteoklastären Rezeptors RANK (Li et al. 2000). Dieser Prozess wird durch seinen löslichen Antagonisten OPG inhibiert. Somit stellen RANKL und OPG essentielle Faktoren der Regulation von Differenzierung, Fusion, Aktivierung und Apoptose von Osteoklasten dar (Suda et al. 1999; Hofbauer et al. 2000; Wong et al. 1999b; Nakamichi et al. 2007; Gardner et al. 2007) (Abb. 4).

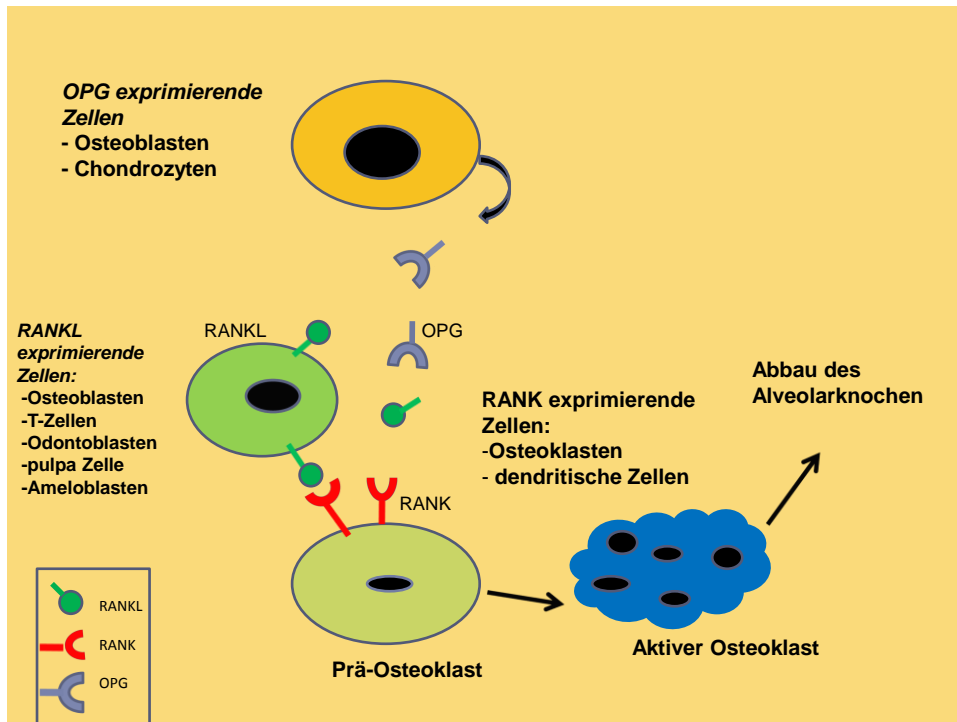


Abb. 4: Das RANKL/RANK/OPG-System. Die Komponenten des RANKL/RANK/OPG-Systems werden von verschiedenen Zelltypen exprimiert. RANKL bindet in löslicher oder zellgebundener Form an seinen Rezeptor RANK und fördert dadurch die Knochenresorption. OPG agiert als neutralisierender löslicher Rezeptor von RANKL und antagonisiert so dessen Effekte, was u.a. einen übermäßigen Abbau von Knochenmasse verhindert. Neben der Knochenhomöostase regulieren diese Zytokine auch Immunfunktionen und scheinen eine Rolle in der vaskulären Homöostase zu spielen, wobei hier OPG als protektiver Faktor vermutet wird.

1.3.1 RANKL

Erstmals wurde RANKL [synonym OPGL, ODF, TRANCE] (Anderson et al. 1997) bzw. TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine) (Wong et al. 1997b) im Jahre 1997 als wichtiges immunologisches Zytokin beschrieben. Ein Jahr später wurde dieses Zytokin als spezifischer Ligand von OPG identifiziert (Lacey et al. 1998; Yasuda et al. 1998b). Eine revidierte Nomenklatur legte die Bezeichnung RANKL für diesen Faktor fest (American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature 2000). RANKL wird vor allem in Knochen und Knochenmark von verschiedenen skeletalen Zellen wie mesenchymalen Stammzellen, Stromazellen, Osteoblasten, Osteoklasten, Periostzellen und Chondrozyten exprimiert. Eine sehr hohe RANKL-Expression findet sich auch im lymphatischen Gewebe und bei verschiedenen Malignomen (Anderson et al. 1997; Kartsogiannis et al. 1999; Lacey et al. 1998; Horwood et al. 1998; Wong et al. 1997a; Yasuda et al. 1998b; Xu et al. 2000; Zhang et al. 2001). Andere nicht-skeletale Zellen mit nachgewiesener RANKL-Expression sind Endothelzellen (Collin-Osdoby et al. 2001), T-Lymphozyten (Josien et al. 1999; Kong et al. 1999b), mesenchymale und epitheliale Zellen des Zahnhalteapparates (Rani et al. 2000), synoviale Fibroblasten (Nakano et al. 2004), monozytäre Zellen (Seta et al. 2008) und verschiedene Tumorzellen (Nagai et al. 2000; Zhang et al. 2001; Fiumara et al. 2001). Die Konzentration an zirkulierendem RANKL wird jedoch hauptsächlich durch den aus dem Knochen freigesetzten Anteil bestimmt (Nakamichi et al. 2007). Beim Menschen ist das RANKL-Gen auf Chromosom 13q14 lokalisiert. Aufgrund unterschiedlicher Polyadenylierungssignale ist die RANKL-mRNA zwischen 2,2 und 2,4 kb lang (Anderson et al. 1997; Wong et al. 1997a). Kodaira et al. (1999) beschrieben beim RANKL-Gen der Maus fünf Exons, die sich über 40 kb des Maus-Genoms verteilen. Im RANKL-Genpromotor wurden Bindungsstellen für Vitamin D und Glukokortikoide (Kitazawa et al. 1999; Kodaira et al. 1999) sowie für cbfa-1, einen Osteoblasten - spezifischen Transkriptionsfaktor (Gao et al. 1998) nachgewiesen. Eine Analyse muriner Zellen zeigte die Existenz drei verschiedener RANKL - Proteinisoformen, eine klassische membrangebundene Form, eine vorwiegend am endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Form und eine lösliche Form ohne Transmembranregion (Ikeda et al. 2001).

Das klassische membrangebundene RANKL-Protein, bestehend aus 317 Aminosäuren und mit einem Molekulargewicht von 38 kDa, weist eine hohe Sequenzhomologie zu anderen TNF-Liganden wie TRAIL, CD40-Ligand und Fas-Ligand auf (Anderson et al. 1997; Lacey et al. 1998; Wong et al. 1997a). Diese RANKL-Form wird posttranslational durch eine TNF- α -converting-enzyme (TACE)-ähnliche Protease an den AS 140 und AS 145 in kürzere Ektodomänvarianten mit ähnlicher Aktivität gespalten (Lum et al. 1999). Die primär sezernierte Form des RANKL-Proteins wurde z.B. in aktivierten T- Lymphozyten (Kong et al, 1999) und in einer Plattenepithelkarzinom-Zelllinie (Nagai et al. 2000) nachgewiesen.

1.3.2. RANK

RANK [synonym ODAR] wurde gemeinsam mit seinem spezifischen Liganden RANKL erstmals 1997 beschrieben (Anderson et al. 1997). Die Namensgebung orientierte sich an NF- κ B (Nuclear factor- κ B), einem seiner intrazellulären Transkriptionsfaktoren. Ein Jahr später wurde RANK erstmals im Zusammenhang mit dem Knochenstoffwechsel erwähnt (Nakagawa et al. 1998) und erhielt unter anderem die Bezeichnung „Osteoclast differentiation and activation receptor“ (ODAR) (Hsu et al. 1999). Nach Beschluss der Konsensuskommission wurde der Begriff RANK verwendet (American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature 2000). RANK wird am stärksten im Knochengewebe und im lymphatischen System exprimiert und findet sich in funktionell aktiver Form vor allem auf Osteoklasten, dendritischen Zellen, B- und T-Lymphozyten und Fibroblasten (Anderson et al. 1997; Green et al. 1999; Hsu et al. 1999; Myers et al. 1999; Nakagawa et al. 1998) sowie auf Endothelzellen (Min et al. 2003), glatten Muskelzellen (Zhang et al. 2002) und malignen Zellen (Fiumara et al. 2001). Ebenso wie der M-CSF- Rezeptor c-fms und der Kalzitoninrezeptor wurde RANK auch als Oberflächenmarker zur Phänotypisierung von Osteoklasten etabliert (Arai et al. 1999; Yamane et al. 2000).

Beim Menschen befindet sich das RANK-Gen auf dem Chromosom 18q22.1. Die humane RANK - mRNA ist 4,5 kb lang, die der Maus 5,5 kb. Aufgrund verschiedener Polyadenylierungssignale gibt es neben der Hauptform beim Menschen noch weitere Formen, die 3,0 kb, 3,5 kb und 5,5 kb lang sind (Anderson et al. 1997; Nakagawa et

al. 1998). Eine konstitutive Aktivierung des RANK - Gens durch Insertionsmutationen im Exon 1 wurde im Zusammenhang mit hereditären Osteopathien beschrieben (Hughes et al. 2000). Zwei Polymorphismen des RANK - Gens (+34863G > A und +35928insdelC) werden als mögliche genetische Faktoren einer geringen Knochendichte (BMD) bei postmenopausalen Frauen vermutet (Koh et al. 2007). Das humane membranständige RANK - Polypeptid besteht aus 616 Aminosäuren und hat Sequenzhomologien zu CD27 und CD40. Eine lange C-terminale intrazelluläre Domäne (383 AS) ermöglicht die Signaltransduktion. Cysteinreiche extrazelluläre Domänen zeigen die Zugehörigkeit zur Familie der TNF- Rezeptoren (Anderson et al. 1997; Simonet et al. 1997).

1.3.3. OPG

Zwei unabhängige Gruppen identifizierten OPG (Simonet et al.1997) bzw. Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF, Tsuda et al. 1997; Yasuda et al. 1998a) erstmals 1997 als ein sezerniertes Mitglied der TNF-Rezeptor (TNFR)- Familie mit namensgebenden Wirkungen. Diese Entdeckung wurde durch weitere Gruppen bestätigt und neue Namen, wie TNF receptor-related molecule-1 (TR1; Kwon et al. 1998; Tan et al. 1997) und Follicular dendritic cell receptor-1 (FDCR-1; Yun et al. 1998) wurden vorgeschlagen. Eine revidierte Nomenklatur legte die Bezeichnung OPG [synonym OCIF, TR1] für das Protein fest (American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature 2000). OPG antagonisiert die RANKL - RANK-vermittelten Wirkungen durch kompetitive Bindung sämtlicher RANKL - Formen als dessen löslicher Rezeptorantagonist (Lacey et al. 1998; Yasuda et al. 1998b; Nakamichi et al. 2007). Die hochaffine Bindung eines OPG-Homodimers an einen RANKL - Homotrimer führt zur Bildung eines stabilen 1:1 Dimer/Trimer-Komplexes. Das OPG-Dimer bindet dabei an zwei RANKL - Moleküle. Die Bindung eines weiteren OPG-Dimers an das dritte RANKL-Molekül ist möglich (2:1 Komplex), allerdings weist diese Bindung eine deutlich geringere Affinität auf. Neben RANKL bindet und neutralisiert OPG einen weiteren TNF-Liganden, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), wobei jedoch die Affinität im Vergleich zu RANKL deutlich geringer ist (Emery et al. 1998).

Die OPG-mRNA-Expression und Proteinsekretion konnte für viele verschiedene normale und maligne Zelltypen (Fiumara et al. 2001; Pettersen et al. 2005) nachgewiesen werden, wobei einige dieser Zellen zusätzlich auch RANKL exprimieren. Im Rahmen des Knochenstoffwechsels wird OPG vor allem von osteoblastären Zellreihen, Stromazellen und Chondrozyten produziert (Kwon et al. 1998; Horwood et al. 1998; Hofbauer et al. 1998). Im Immunsystem findet sich eine starke OPG-Expression im lymphatischen Gewebe, u.a. in Lymphknoten und in der Milz, mit einer OPG-Produktion durch dendritische Zellen und B - Lymphozyten (Yun et al. 1998; Schoppet et al. 2007). Eine ausgeprägte OPG - Expression wurde auch im Gewebe des Zahnhalteapparates (Rani et al. 2000; Sakata et al. 1999; Shiba et al. 2000), der Wand großer Arterien (Simonet et al. 1997) und im Schilddrüsengewebe (Hofbauer et al. 2002) gefunden. Da die extraskelatale OPG-Expression sehr vielfältig ist, eignet sich die OPG - Serumkonzentration nur bedingt für die Einschätzung des Status der Knochenresorption.

Das humane OPG - Gen liegt auf dem Chromosomen 8q23-24 und umfasst 5 Exons über 29 kb (Hilton et al. 2001). Sowohl das OPG - Gen der Maus (Mizuno et al. 1998), als auch das des Menschen (Morinaga et al. 1998) wurden kloniert. Die murine OPG - Gen - Expression beginnt zwischen dem 8. und 9. Tag der Embryogenese (Mizuno et al. 1998a). Die humane OPG - mRNA liegt in verschieden langen Formen vor: hauptsächlich in der 2,9 kb langen Form, seltener in einer 4,2 kb oder 6,5 kb langen Form (Morinaga et al. 1998). Der OPG – Gen - Promotor weist Bindungsstellen für Transforming growth factor (TGF)- β (Thirunavukkarasu et al. 2001) und den osteoblastenspezifischen Transkriptionsfaktor cbfa-1 auf, für den eine OPG-Expression steigernde Funktion nachgewiesen wurde (Thirunavukkarasu et al. 2000).

OPG ist ein basisches Glykoprotein, das entweder als monomere (55-60 kDa) oder homodimere (110-120 kDa) Form über Verknüpfung mittels einer Disulfidbrücke vorliegt. Die biologischen Aktivitäten beider Formen unterscheiden sich jedoch nicht (Merewether et al. 2000; Tomoyasu et al. 1998; Yamaguchi et al. 1998). Als Mitglied der TNFR-Superfamilie weist das OPG-Protein Sequenzhomologie zu anderen TNF-Rezeptoren wie TNFR-2 und CD40 auf (Simonet et al. 1997). Bei manchen Zelltypen wurde auch eine zellgebundene Form des OPG gefunden (Yun et al. 1998). Es konnten jedoch noch keine klassischen hydrophoben Transmembranregionen oder

für diese kodierende Gensequenzen identifiziert werden. Diese kommen typischerweise bei allen anderen TNFR-Superfamilienmitgliedern vor (Simonet et al. 1997; Yamaguchi et al. 1998). OPG setzt sich aus 401 Aminosäuren zusammen und hat ein 21 Aminosäuren langes Signalpeptid (Yasuda et al. 1998a). Die spezifischen Funktionen von OPG werden verschiedenen strukturellen Domänen zugeordnet. Die Charakteristika der TNFR, cysteinreiche Regionen, sind in der N-terminalen Domäne 1 -4 lokalisiert (Baker et al. 1998) und vermitteln die hemmende Wirkung des OPG auf die Osteoklastogenese durch Bindung von RANKL (Simonet et al. 1997; Yamaguchi et al. 1998; Yasuda et al. 1998a). Bei anderen TNFR - Mitgliedern, wie TNFR 1, DR 3, CD95/Fas oder TRAIL nachgewiesene Apoptose-vermittelnde Sequenzen, sogenannte „Death domain homologous“ (DDH)-Regionen, sind in den Domänen 5 und 6 von OPG lokalisiert (Baker et al. 1998; Simonet et al. 1997, Walczak et al. 1997; Chinnaiyan et al. 1996). Tatsächlich konnte die Transduktion apoptotischer Signale durch die OPG-Domänen 5 und 6 gezeigt werden. In diesem Fall wurde Fas mit seiner Transmembranregion zwischen den Domänen 4 und 5 von OPG inseriert und bildete mit OPG ein Fusionsprotein (Yamaguchi et al. 1998). Die für die mögliche Homodimerisierung der OPG-Monomere verantwortlichen Cysteine sind zusammen mit einer Heparin bindenden Domäne in der C-terminalen Domäne 7 lokalisiert (Merewether et al. 2000; Simonet et al. 1997; Tomoyasu et al. 1998; Yamaguchi et al. 1998). Die Heparin bindende Domäne findet sich unter anderem auch bei peptidartigen Wachstumsfaktoren und Signalmolekülen (Zhang et al. 1991) und wird unter anderem als wichtiger Bestandteil der durch OPG geförderten Leukozyten-Endothelzellen Adhäsion vermutet (Zauli et al. 2007).

1.4 Zusammensetzung und Aufgabe der Sulkusflüssigkeit

Die Sulkusflüssigkeit wurde erstmals 1958 von Brill und Krasse als Ausdruck einer Entzündungszunahme bedingt durch eine Permeabilitätserhöhung der unter Sulkus- und Saumepithel gelegenen Gefäße beschrieben.

Sie kommt in geringen Mengen im Parodontalspalt vor und zeigt sowohl Charakteristika eines Transsudates als auch eines Exsudates (Cimasoni 1983).

Es wurde festgestellt, dass an noch gesunder Gingiva kurz vor dem Auftreten der ersten klinisch feststellbaren Anzeichen der Entzündung eine Sulkusflüssigkeitsflussrate messbar ist. Dies wurde mit einer Verschiebung des osmotischen Gleichgewichts in der Initialphase der Entzündung versucht zu erklären (Alfano 1974). Durch Makromoleküle, die sich abgesondert von der subgingivalen Plaque, im Sulkus an dem dortigen Epithel, das als semipermeable Membran wirkt, ansammeln, kommt es zu einem Konzentrationsanstieg in diesem Bereich. Nach den Gesetzen der Osmose kommt es folglich an einer semipermeablen Membran zum Austritt von Flüssigkeit als Transsudat (nicht entzündliche Genese) in den Sulkus.

Eine andere Möglichkeit ist der Austritt von Sulkusflüssigkeit als eine direkte Folge der Verschiebung des Gleichgewichts zwischen der kapillären Filtration und der Absorption von Gewebsflüssigkeit durch Lymphozyten (Pashley 1976). Immer wenn die Filtration die Absorption übersteigt, kommt es entweder zu einer Ansammlung von Flüssigkeit im Gewebe und damit zu einem Ödem oder zum Austritt von Flüssigkeit in den Sulcus gingivae. Auslösend kann demnach eine Beeinflussung des Gefäßendothels bzw. eine Störung der Lymphozyten sein. Dies würde der Flüssigkeit die Eigenschaft eines Exsudates verleihen (entzündliche Genese). Die primäre Voraussetzung ist das Vorhandensein von Plaque und Bakterien. Dies belegten bereits Bickel et al. (1985) und Stoller et al. (1990). Sie konnten zeigen, dass in Abwesenheit von Plaque keine Sulkusflüssigkeit messbar ist, die nachweisbare Menge aber zusammen mit der Plaquakkumulation ansteigt.

Eine weitere Studie konnte zeigen, dass die Plaque mit ihren Abbauprodukten über osmotische Vorgänge zum Austritt von extrazellulärer Flüssigkeit in den Sulkus gingivae führt. Diese Vorgänge beruhen allerdings nicht auf einer entzündlichen Genese. Kommt es aufgrund der schädigenden Wirkung der Mikroorganismen zu einer Entzündung des Parodonts, so folgt dem eine Reihe von spezifischen und histopathologischen Veränderungen. Zwischen dem Saumepithel und dem

angrenzenden Bindegewebe befindet sich ein subepithelialer Gefäßplexus. Dieser entwickelt schon bei geringsten entzündlichen Reaktionen oder einer Traumatisierung eine außergewöhnliche Permeabilität. Daraufhin tritt Flüssigkeit entzündlicher Genese aus den Gefäßen aus und sickert durch das Saumepithel in den Sulkus. Die Hauptbestandteile der Sulkusflüssigkeit leiten sich in diesem Fall vom Plasma, dem Gingivagewebe und den im Gewebe und im Sulkus festsitzenden Mikroorganismen sowie deren Bestandteilen bzw. Stoffwechselprodukten ab (Mengel et al. 1991).

Die Sulkusflüssigkeit enthält eine Vielzahl von Komponenten, die mehr oder weniger in direktem Zusammenhang mit der bevorstehenden oder bereits abgelaufenen Entzündung bzw. Gewebedestruktion stehen. Der Nachweis dieser Komponenten müsste demnach wichtige Informationen über das jeweilige Stadium der Erkrankung liefern. Hierzu zählen zum einen die in der Plaque enthaltenen Bakterien. Wie allgemein bekannt, sind Mikroorganismen vorwiegend der entscheidende ätiologische Faktor bei der Entstehung parodontaler Erkrankungen. Sie können das parodontale Gleichgewicht auf vier verschiedenen Wegen stören (Zafiropoulos et al. 1991):

- durch direkt toxische, vom Bakterium aktiv freigesetzte Stoffwechselprodukte mit oftmals enzymatischem Charakter (Exotoxine)
- durch toxische Bestandteile der Bakterienhülle (Endotoxine)
- durch vom Mikroorganismus produzierte Enzyme, die das Gewebe indirekt schädigen
- durch Stoffwechselprodukte derselben

Eine weitere Komponente der Entzündung bzw. Gewebedestruktion ist die Gewebedestruktion selbst. Der Verlust des Zahnhalteapparates ist charakteristisch für die entzündliche Parodontalerkrankung. Daher liegt der Versuch nahe, über das Auftreten von Stoffwechselprodukten der Gewebedestruktion in der Sulkusflüssigkeit Informationen vom momentanen Erkrankungsverlauf zu erlangen.

Neben der Gewebedestruktion spielt auch das Immunsystem des Wirtes eine entscheidende Rolle. Hierzu zählen zum Beispiel die Immunglobuline, die Interleukine und das Komplementsystem (Zafiropoulos et al. 1991).

Letzteres spielen noch weitere Zellen eine wichtige Rolle. Hierzu zählen besonders die neutrophilen Granulozyten und ihre Enzyme (Zafiroopoulos et al. 1991). Die neutrophilen Granulozyten sind die klinisch bedeutsamsten Effektorzellen akuter Entzündungsprozesse. Sie sind mobile Zellen und folgen chemotaktischen Reizen. Ihre lysomalen Enzyme und die toxischen O_2 - Metabolite wirken innerhalb wie außerhalb der Zelle toxisch auf Mikroorganismen und machen die Granulozyten zu einem wichtigen Instrument der Immunabwehr.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Sulkusflüssigkeit eine viel versprechende Quelle von Markern ist, die eine Vielzahl von interessanten Komponenten enthält.

1.5 Zusammensetzung und Aufgabe des Speichels

Der Speichel ist eine Körperflüssigkeit, die vom menschlichen Organismus im Bereich der Mundhöhle von Speicheldrüsen produziert wird. Die Speicheldrüsen werden in kleine (Glandulae labiales, Glandulae buccales, Glandulae linguales, Glandulae palatinae) und große, paarige Drüsen (Glandulae parotis, submandibularis, sublingualis) unterteilt, deren Sekret der Speichel ist. Den großen Drüsen ist zum einen eine umgebende Bindegewebskapsel gemein, von welcher Bindegewebssepten ins Organinnere ziehen und die einzelnen Lappen und Läppchen bilden. Zum anderen weisen sie ein Parenchym auf, das aus Drüsenendstücken und Ausführungsgängen besteht. Im Bindegewebe verlaufen zahlreiche Blut - und Lymphgefäße sowie Nerven, die sich im Organ selbst stark verzweigen und schließlich um die Drüsenendstücke bzw. Ausführungsgänge dichte Netzwerke aus Kapillaren und Nervenfasern bilden (Junqueira et al. 1996). Drüsenendstücke bestehen aus sezernierenden Zellen, wohingegen sich Ausführungsgänge aus Schalt- und Streifenstücken zusammensetzen. Diese liegen intralobulär sowie interlobulär und münden schließlich in einen Ductus excretorius.

Mit der Sekretion des sogenannten Primärspeichels in den Endstücken beginnt die Speichelbildung. Je nach Aufbau der Endstücke wird ein seröser (dünnflüssig, protein- und enzymreich) oder muköser (schleimig, enzymarm) Speichel gebildet, dessen Elektrolytzusammensetzung sich während des Transports durch die

Ausführungsgänge immer wieder verändert. Besonders in den Streifenstücken wird der Speichel durch Natriumresorption und aktive Abgabe anderer Elemente wie Jod und Kalium modifiziert. In den Ausführungsgängen wird darüber hinaus aktiv Hydrogenkarbonat sezerniert, dessen Gehalt bei Stimulation ansteigt und den Mundspeichel bis auf einen pH-Wert von 7,8 alkalisiert und puffert. Mit steigender Sekretion wird der Speichel immer weniger hypoton.

Die kleinen Speicheldrüsen liegen in der Schleimhaut der Mundhöhle und werden je nach ihrer Lage benannt (Junqueira et al. 1996). Die Glandulae labiales, buccales und molares sind sowohl seröse als auch muköse Drüsen. Die Gll. palatinae sind mukös und die Gll. linguales sind je nach Lokalisation rein serös, mukös oder gemischt.

Die großen Speicheldrüsen liegen bis auf die Gll. sublinguales außerhalb der Mundhöhle, ihr Sekret entleeren sie über Drüsengänge in die Mundhöhle.

Die Ohrspeicheldrüsen (Gll. parotidae = Parotiden) sind die größten der drei großen paarig angelegten Mundspeicheldrüsen. Bei den Ohrspeicheldrüsen handelt es sich um rein seröse Drüsen, die vorwiegend Verdünnungsspeichel liefern. Durch das Kauen werden diese aufgrund ihrer anatomischen Lage massiert und auf diese Weise zur Sekretion angeregt.

Die Gll. submandibulares, die Unterkieferdrüsen, sind hingegen sero-muköse Drüsen, die Verdünnungs- und Schmierseichel produzieren. Die Ductus submandibulares münden vereint mit den Ductus der dritten großen Speicheldrüsen, denen der Gll. sublinguales, im Mundboden unter der Zunge auf den Carunculae sublinguales (Waldeyer et al. 1993). Die Gll. sublinguales sind zusammengesetzte muko-seröse Speicheldrüsen, die vorwiegend zähflüssigen Schleim als Sekret absondern (Samandari et al. 1995). Die nervale Versorgung erfolgt aus dem vegetativen Nervensystem, wobei die sympathische Komponente (adrenerge Fasern) aus den Ganglii cervicales superius stammt und die Produktion eines hoch viskosen Speichels vermittelt. Der parasympathische Anteil mit seinen cholinergen Fasern entstammt den Hirnnerven VII und IX und vermittelt die Produktion eines dünnflüssigen Speichels (Groetz 2002).

Speichel hat die Aufgabe, die Schleimhaut der Mundhöhle und den Mundhöhleninhalt zu befeuchten und gleitfähig zu machen. Desweiteren leitet der Speichel die Verdauung ein, wirkt bakterizid und dient der immunologischen Abwehr. Speichel ist zusammengesetzt aus Wasser (99 %) und organischen und

anorganischen Substanzen, die in ihrer Konzentration stark voneinander abweichen können. Zu den wichtigsten anorganischen Bestandteilen gehören Natrium, Kalium, Kalzium, Phosphat, Chlorid, Magnesium, Hydrogenkarbonat und Fluorid, während Enzyme, Proteine und Glykoproteine (Muzine) zu den organischen Bestandteilen zählen. Am Tag sezernieren die kleinen und die großen paarigen Speicheldrüsen eine Gesamtmenge von 0,5 - 1,0 l Speichel in die Mundhöhle. Es gibt erhebliche tageszeitliche Schwankungen, wobei nachts eine sehr geringe Speichelproduktion zu beobachten ist, die in den Mittags - bis Nachmittagsstunden ein Maximum erreicht (Machtens 1991). Ein Teil des Speichels, der Ruhespeichel, wird kontinuierlich in die Mundhöhle abgesondert. Die Sekretion des Speichels kann durch emotionale, psychische und Umweltfaktoren beeinflusst werden, z. B. durch Aufregung reduziert oder durch Reizung der Geschmacksrezeptoren oder Sinnesnerven gesteigert werden.

Dieser so genannte "Reizspeichel" wird hauptsächlich von den Gll. parotidae sezerniert, da diese über größere Speichelreserven verfügen und auf einen Reiz hin einen Teil ihres Sekretdepots ausschütten können (Seifert et al. 1984). Anhand der Zusammensetzung des Speichels, die letztlich von der Sekretionsrate, dem Stimulationsgrad, der Stimulationsart und -dauer und von der entsprechenden Drüse abhängt, lassen sich die vielen Funktionen des Speichels erkennen (Tab. 1).

Tab. 1: Wichtige physiologische Speichelfunktionen

Antikariogene Wirkung durch	Antiinflammatorische Wirkung (Mukositis und Parodontitis) durch	Unterstützende Wirkung bei der Nahrungs-/Flüssigkeitsaufnahme durch	Sonstige wichtige Funktionen
<ul style="list-style-type: none"> - Mechanische Reinigung der Zahnoberfläche - Remineralisation des Schmelzes durch Kalzium, Phosphat, Fluorid und Statherin - Pufferkapazität (HCO₃-Gehalt, Phosphat und Proteine) und Stabilisierung des pH-Wertes - antibakterielle Effekte kariogener Erreger - Beschichtung der Zahnoberfläche (Glykoproteine, Muzine) 	<ul style="list-style-type: none"> - Antikörper, insbesondere IgA - Lysozym - Laktoferrin - Muzin - Laktoperoxidase - Neuraminsäurereste der Glykoproteine 	<ul style="list-style-type: none"> - Gleitfunktion für Kau- und Schluckakt - Andauung von Nahrung durch Amylasen und Proteasen - Unterstützung der Geschmackspereption - Unterstützung der Regulation des Wasserhaushaltes durch Vermittlung des Durstgefühls 	<ul style="list-style-type: none"> - Mukosalubrifikation für Phonetik und Sprechen - Mukosalubrifikation für Prothesenadaption - Ausscheidungsfunktion für Medikamente, anorganische Substanzen (Jod, Rhodanid), Schwermetalle (Quecksilber) und Keime (Viren)

Der Speichel hat demnach mechanische, fermentative und biologische Funktionen. Er enthält Amylasen für die Kohlehydratspaltung, das Enzym Lysozym für die bakterielle Bekämpfung, den Schleimstoff Muzin für den Schutz der Schleimhaut gegen chemische und mechanische Einwirkung und zur Gleitfähigkeit der Nahrung sowie Elektrolyte, die den Mineralspiegel des Zahnes aufrechterhalten.

Der Speichel spielt in der Diagnostik von Krankheiten eine immer größere Rolle und könnte in der Zukunft die Blutentnahme ablösen. Zurzeit wird der Bluttest immer noch als zuverlässiger Nachweis zur Bestätigung der Diagnose benötigt. Aber ein hoher Prozentsatz von Verdachtsdiagnosen kann schnell, einfach und wirksam mit einem Speicheltest abgeklärt werden. So gibt es mittlerweile bestimmte Tests für den Nachweis einer HIV-Infektion. Im Gegensatz zur Blutentnahme ist die Speichelentnahme non-invasiv und jederzeit durchführbar. Für Patienten verringern sich eventuelle Ängste vor der Entnahme und erleichtern somit das Sammeln von Proben über einen längeren Zeitraum. Außerdem ist das Sammeln von Speichelproben gegenüber Blutproben im Bezug auf das Übertragungsrisiko von HIV oder Hepatitis Viren unbedenklich. Des Weiteren ist Speichel leichter zu lagern, da er im Gegensatz zur Blutprobe nicht gerinnen kann. Orale Flüssigkeiten, wie der Speichel, können als „Spiegel des Körpers“ gesehen werden. Miniaturisierte, handgehaltene Diagnoseapparate mit hochempfindlichem Nachweissystem sind hierfür erforderlich und in der Forschung. Diese Tests weisen derzeit jedoch nur Biomarker nach, die dann im Speichel auftreten, wenn die entsprechende Krankheit bereits manifest ist. Das Ziel ist es, Diagnoseverfahren für den Speichel zu entwickeln, die zur Risikoerkennung oder Früherkennung eingesetzt werden können. So könnten bestimmte Erkrankungen schon vor deren Ausbruch behandelt und somit verhindert werden (Lee et al. 2009).

Es bedarf jedoch noch viel Arbeit, bis das Ziel von einer technisch perfekten Diagnostik für den Speichel realisierbar wird.

2. Ziel der Studie

Das Ziel dieser Studie war der Nachweis von OPG und RANKL in der Sulkusflüssigkeit und im Speichel bei behandelten GCP Patienten mit osseointegrierten Implantaten. Außerdem sollte überprüft werden, ob eine Korrelation zwischen OPG, RANKL und den klinischen Parametern sowie zwischen der Sulkusflüssigkeit und dem Speichel vorliegt.

3. MATERIAL und METHODEN

3.1 Patienten

An der vorliegenden Studie nahmen 8 teilbezahnte Patienten (47 ± 13 Jahre, 2 Männer und 6 Frauen) mit einer behandelten generalisierten chronischen Parodontitis (GCP) und osseointegrierten Implantaten teil. Die Definition der parodontalen Erkrankungen basiert auf den Kriterien der American Academy of Periodontology (Armitage 1999). Alle Patienten wurden in der Abteilung für Parodontologie des Medizinischen Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universität Marburg systematisch parodontal behandelt. Dies beinhaltete eine parodontale Vorbehandlung mit anschließender parodontalchirurgischer Behandlung und Recall. Trotz parodontaler Behandlung konnten einige Zähne nicht erhalten werden und wurden extrahiert. Im Anschluss wurden 18 Implantate¹ (OK 10, UK 8, Frontzahnbereich 8, Seitenzahnbereich 10) inseriert. Die Insertion und Freilegung der Implantate, sowie die prothetische Versorgung erfolgte in der Abteilung für Parodontologie gemäß den Richtlinien des Herstellers (Mengel et al. 2007). Anschließend wurden alle Patienten in ein 3-monatiges Recallsystem aufgenommen. Zu jedem Recalltermin wurden die Patienten zur Optimierung der Mundhygiene neu motiviert und instruiert. Zusätzlich erhielten die Patienten eine professionelle Zahnreinigung. Die Verweildauer der Implantate betrug 3 bis 10 Jahre.

Im Verlauf der Beobachtungszeit wiesen alle Patienten eine gute Mundhygiene auf ($API \leq 20\%$) (Lange 1978). Bei allen Patienten lag die Sondierungstiefe an den Zähnen und Implantaten bei ≤ 3 mm ohne Bluten nach Sondieren. Die radiologische Untersuchung unmittelbar vor der letzten klinischen Untersuchung ergab an mindestens 50% der mesialen und distalen Zahnflächen einen Knochenabbau von bis zu 30%. Die Implantate wiesen im Verlauf der Beobachtungszeit keine Mucositis oder Periimplantitis auf. Die radiologische Analyse ergab einen Knochenabbau ≤ 2 mm.

Als Kontrollgruppe wurden 7 parodontal gesunde Probanden (37 ± 5 Jahre, 3 Männer und 4 Frauen) ohne Implantate untersucht. Die Sondierungstiefe an den Zähnen der

¹ Osseotite, 3i Implant Innovations, West Palm Beach, FL, USA

Kontrollgruppe lag bei $\leq 3\text{mm}$ ohne BNS. Alle Probanden wiesen eine gute Mundhygiene auf ($\text{API} \leq 20\%$).

Alle Kontrollen und Patienten erfüllten folgende Kriterien: keine systemischen Erkrankungen (z.B. Diabetes mellitus, kardiovaskuläre Erkrankungen, Osteoporose), keine Schwangerschaft, keine kariösen Läsionen, keine kieferorthopädische Behandlung, keine regelmäßige Einnahme von Medikamenten, keine psychischen Auffälligkeiten, Nichtraucher.

Nach Zustimmung der Ethikkommission und Unterschreiben der Einverständniserklärung wurden die Patienten untersucht. Die vorliegende Studie entspricht den Richtlinien der Deklaration von Helsinki.

3.2 Untersuchungsmethoden

3.2.1 Klinische Parameter

Die klinische Untersuchung erfolgte in der Abteilung für Parodontologie des Medizinischen Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universität Marburg. Die Untersuchung erfolgte durch ein und dieselbe Person, die zuvor auf Reproduzierbarkeit in den Messungen trainiert und getestet wurde. Der Korrelationskoeffizient für wiederholte Messungen lag zwischen 0,79 und 0,95.

An vier Flächen (mesial, distal, bukkal und oral) der Zähne und Implantate wurden jeweils folgende klinische Parameter ermittelt:

1. Gingival-Index (GI) nach Loe & Silness (1963)
2. Plaque-Index (PLI) nach Silness & Loe (1964)
3. Gingivale Rezession (GR)
4. Sondierungstiefe (ST) und BNS
5. Klinischer Attachmentlevel (AL)

Zusätzlich wurde überprüft, zu welchem Grad ein Furkationsbefall oder eine erhöhte Zahn- bzw. Implantatbeweglichkeit besteht.

3.2.1.1 Gingival-Index (GI) nach Loe & Silness (1963):

Zur Erhebung der klinischen Befunde wurde der zu untersuchende Bereich mit Watterollen trockengelegt und der Speichel verblasen. Anschließend wurde die stumpfe Sonde horizontal am Gingivarand entlang geführt. Der Gingival Index wird in Grad 0 bis Grad 3 eingeteilt.

- Grad 0: Die Gingiva ist entzündungsfrei, blass rosa und ohne Auffälligkeiten
- Grad 1: Die Gingiva ist leicht gefärbt und leicht geschwollen
- Grad 2: Die Gingiva ist mäßig entzündet, gerötet und geschwollen. Beim Sondieren blutet es
- Grad 3: Die Gingiva ist schwer entzündet, es liegt eine ausgeprägte Rötung und Schwellung vor, Tendenz zum spontanen bluten besteht

3.2.1.2 Plaque Index (PI) nach Silness & Loe (1964)

Zur Erhebung des Plaque Index (PI), wurde der zu untersuchende Bereich mit Luft getrocknet und mittels einer stumpfen Sonde visuell an den 4 Glattflächen jedes Zahnes und Implantates beurteilt.

Der Plaque Index wird in Grad 0 bis Grad 3 angegeben.

- Grad 0: keine Plaque
- Grad 1: Auf der Gingiva und den benachbarten Zahnflächen befindet sich ein hauchdünner und nicht sichtbarer Plaquefilm, der nach dem Abstreichen mit der Sonde an der Spitze erkennbar ist.
- Grad 2: Im Sulkus, auf den Zahnflächen und entlang des Gingivarandes befinden sich mäßige, mit dem Auge sichtbare, bandförmige Plaqueansammlungen, die nicht den Interdentalraum ausfüllen.
- Grad 3: Auf den Glattflächen befinden sich großflächige, mit dem bloßen Auge erkennbare dicke Plaqueansammlungen, die auch den Interdentalraum ausfüllen.

3.2.1.3 Gingivale Rezession (GR)

Die Gingivale Rezession wurde als Abstand von der Schmelz-Zement-Grenze bis zum Gingivarand gemessen. Am Implantat wurde der Abstand von der Oberkante der Distanzhülse bis zum Gingivalrand gemessen.

3.2.1.4 Sondierungstiefen (ST)

An den vier Glattflächen (mesial, distal, oral, vestibulär) aller Zähne und Implantate wurde bei einem gleich bleibendem Druck von 0,25 Newton der Abstand vom Gingivarand bis zum Sulkus- bzw. Taschenboden gemessen. Die Plasto-O-Probe Parodontalsonde (Plastic Probe G 180 B, Dentsply-Maillefer, Balligues, Switzerland) wurde dabei parallel zur Zahn- bzw. Implantatachse in den Sulkus bzw. die Zahnfleischtasche eingeführt. Der Abstand von Sulkus- bzw. Taschenboden bis Gingivarand wird in Millimeter angegeben.

3.2.1.5 Klinischer Attachmentlevel (AL)

Der klinische Attachmentlevel (AL) ist definiert als die Distanz in mm von der Schmelz-Zement-Grenze bis zum Sulkus- bzw. Taschenboden (Nyam & Lindhe 1986). An den Implantaten wurde anstelle der Schmelz-Zement-Grenze die Oberkante der Distanzhülse als Bezugspunkt gewählt. Die Messung erfolgte mit der Plast-O-Probe Parodontalsonde (Plastic Probe G 180 B, Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland).

3.2.2 Radiologische Evaluation

Unmittelbar vor der klinischen Untersuchung und Probenentnahme der Sulkusflüssigkeit und Speichel wurden die letzten radiologischen Aufnahmen der Zähne und Implantate durchgeführt. Die radiologische Untersuchung der GCP Patienten wurde von einer Person standardisiert in Form von Einzelfilmaufnahmen in der Parallelwinkeltechnik durchgeführt. Die Einzelfilme wurden in Dias gerahmt, mittels eines Dia-Scanners (Agfa Snap Scan, Agfa, Köln, Deutschland) mit 675 Pixeln digitalisiert und im Windows Format als Bitmap-Datei gespeichert. Die Auswertung der digitalisierten Röntgenbilder erfolgte mit Hilfe der Gendex/Digora Windows Software (Digora-Gendex, Version 1.51, Stuttgart, Deutschland). Die metrische Bestimmung des Knochenabbaus wurde linear über die in der Software integrierte Funktion „Abstandmessung“ durchgeführt. Dazu erfolgte an den Zähnen jeweils mesial und distal eine relative Bestimmung des Knochenabbaus in Prozent durch die Messung des Abstandes von der Schmelz-Zement-Grenze zum Apex. An den Implantaten wurde der Knochenabbau als Abstand von der marginalen Knochengrenze zur mesialen und distalen Implantatschulter gemessen. Dieser Wert wurde in Relation zum metrischen Maß eines Implantatwindungsganges gesetzt. Die Auswertung aller Röntgenbilder wurde von einer Person durchgeführt, die nicht an der klinischen Untersuchung beteiligt war.

3.2.3 Entnahme der Sulkusflüssigkeit

Vor Entnahme der Proben erfolgte die Entfernung vorhandener supragingivaler Plaque mit sterilen Küretten und der zu untersuchende Bereich wurde mit Watterollen und Luftpüster trocken gelegt. An den Zahnflächen (n=24) und Implantatflächen (n=18) der Patienten, sowie an den Zahnflächen (16,21,24,36,41,44) der Kontrollgruppe (n= 39) wurde jeweils mesial und distal ein Filterpapierstreifen² in den Sulkus appliziert und für 30 sec. belassen. Nach Entnahme des Filterpapierstreifens wurde das Volumen mit Hilfe einer Mikrowaage³ bestimmt. Hierbei wurde der Filterpapierstreifen vor und nach Probenentnahme gewogen und die Differenz

² Periopaper®, Proflow Inc. Amityville, NY, USA

³ LE 225D-0CE, Firma Sartorius. Göttingen

berechnet. Verunreinigte Streifen mit Blut oder Speichel wurden verworfen und erneut entnommen. Nach Entnahme aller Proben, wurden diese einzeln in ein Eppendorfgefäß mit 200µl PBS Lösung appliziert und nach dem Zentrifugieren bei -80°C eingefroren.

3.2.4 Entnahme des Speichels

Zur Entnahme der Speichelprobe applizierte der Patient eine sterilen Wattenrolle⁴ mit dem Eindrückstopfen in den Mund und kaute diese 60 sec. Anschließend wurde die Watterolle mit der Zunge zurück in das Salivetten-Einhängegefäß gesteckt, innerhalb einer Stunde zentrifugiert (1000 rpm) und bei -80°C eingefroren. Alle Proben wurden früh am Morgen (ca. 8h) innerhalb der ersten Stunde nach dem Aufwachen gesammelt.

3.2.5 OPG-Proteinanalyse

Zur OPG Analyse im Speichel und in der Sulkusflüssigkeit wurde ein Osteoprotegerin ELISA Kit⁵ (Sandwich-Prinzip) eingesetzt. Dieser besitzt eine Nachweisgrenze für OPG von 0,14 pmol/l und der Inter-Assay Variationskoeffizient beträgt 6-8 %. Verwendet werden zwei spezifische Antikörper gegen OPG, wobei der Bindeantikörper an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte gekoppelt ist. Dieser bindet das OPG in der Probe. Der lösliche, biotinylierte Detektionsantikörper lagert sich von der anderen Seite her an das OPG an. Unspezifisch gebundenes Material wird durch einen Waschgang entfernt. Über ein Streptavidin-Peroxidase/TMB-System wird das OPG quantifiziert. Es erfolgt eine photometrische Messung der Absorption der chromogenen Verbindung bei 450 nm und parallel dazu die Erstellung einer Standardkurve der Absorptionen versus bekannter Standardkonzentrationen (25; 12,5; 6,25; 3,13 pmol/l). Hieraus werden die Konzentrationen der Proben ermittelt. In Vorbereitung des ELISAs wurde das Waschpufferkonzentrat 1:20 mit DEPC-Wasser

⁴ Salivette®, Firma Sarstedt, Nümbrecht

⁵ Firma Immundiagnostik (Bensheim, Deutschland)

verdünnt. Zur Erstellung der Standardkurve wurde die OPG-Stocklösung (500 pmol / l) mit Zellkulturmedium 1:20 vorverdünnt, dieser Ansatz diente als Standard mit der höchsten Konzentration (S1 = 25 pmol/l). Ausgehend von dieser Stocklösung wurde eine Verdünnungsreihe mit 1:2 Verdünnungsschritten (S2 = 12,5 pmol/l, S3 = 6,25 pmol/l, S4 = 3,13 pmol/l) und reinem Zellkulturmedium (S5 = 0 pmol/l) hergestellt. In die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden jeweils 100 µl Assaypuffer vorgelegt und 50 µl Standard in Doppelwerten sowie die Proben in Dreifachwerten hinzupipettiert. Nach Zugabe von jeweils 50 µl des löslichen Detektionsantikörpers in die Vertiefungen wurde die Mikrotiterplatte nach vorsichtigem Durchmischen 18-24 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt der Mikrotiterplatte verworfen, diese fünfmal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen und nach der letzten Waschung auf Saugpapier ausgeschlagen. Im nächsten Schritt wurden je 200 µl Konjugat (Streptavidin, Peroxidase-markiert) in die Vertiefungen pipettiert, nachfolgend die Mikrotiterplatte 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und nach abgelaufener Inkubationszeit erneut dem Waschvorgang unterzogen. Nach diesem zweiten Waschgang wurden 200 µl TMB (Tetramethylbenzidin)-Lösung in die Vertiefungen gegeben, die die Quantifizierungsreaktion auslösten. Diese stellt sich als OPG-konzentrationsabhängige Blaufärbung der Lösung dar. Nach 15-20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde durch die Zugabe von 50 µl Stopplösung je Vertiefung die Reaktion unter Farbumschlag von blau nach gelb beendet. Nach kurzem Mischen wurde sofort die Extinktion in einem Mikrotiterplattenphotometer bei $\lambda = 450$ nm gegen eine Referenzwellenlänge $\lambda = 690$ nm gemessen. Ergab sich bei den Proben eine OPG-Konzentration höher als der höchste Standard, so wurden diese mit Waschpuffer verdünnt und einem zweiten Assay unterzogen.

3.2.6 RANKL- Proteinanalyse

Zur Analyse des RANKL Gehaltes im Speichel und in der Sulkusflüssigkeit wurde der total sRANKL (human) ELISA Kit⁶ eingesetzt.

In Vorbereitung des ELISA wurde das Waschpufferkonzentrat 1:10 mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Das Konjugat (Streptavidin – Peroxidase) wurde 1:1000 in Waschpuffer verdünnt und der Detektionsantikörper wurde ebenfalls 1:1000 in Waschpuffer verdünnt. Die Lösungen für die Standardkurve wurden aus dem total sRANKL – Standardkonzentrat (S1) mit verdünntem Waschpuffer in 1:3 Verdünnungsschritten (S2= 100 µl S1 + 200µl verdünnten Waschpuffer; S3= 100µl S2 + 200µl verdünnten Waschpuffer; S4= 100µlS3 + 200µl verdünnten Waschpuffer; S5= 100µl S4 + 200µl verdünnten Waschpuffer) hergestellt. Alle Speichel- und Sulkusflüssigkeitsproben wurden vor dem Einsatz im Test 1:10 in Waschpuffer verdünnt. Die Testdurchführung basierte auf der Sandwich – ELISA Technik, es wurden zwei ausgewählte Antikörper verwendet. Nach den abgeschlossenen Vorbereitungen wurden Teststandards, Kontrollen und verdünnte Patientenproben (Speichel, Sulkusflüssigkeit), die sRANKL enthalten mit der OPG – Lösung in alle Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Das ganze wurde abgedeckt und 16 – 24 Stunden bei 2 – 8°C inkubiert. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind mit hochaffinen, polyklonalen anti – human OPG Antikörper beschichtet. In dem ersten Inkubationsschritt wurde das sRANKL aus der Probe an das OPG gebunden und von dem gekoppelten Fängerantikörper an die Mikrotiterplatte gebunden. Nach dem Ablaufen der Zeit, wurde der Inhalt der Vertiefungen verworfen und 5x mit je 250µl verdünntem Waschpuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Reste vom Waschpuffer durch ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernt. Nach Zugabe von 100µl Detektionsantikörper (ein Biotin – markierter monoklonaler anti – sRANKL Antikörper) in alle Vertiefungen wurde das ganze 2 Stunden bei 18 – 26°C inkubiert. Dort kommt es zur Bildung folgenden Komplexes an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper – humanes OPG – sRANKL – Detektionsantikörper. Der Inhalt der Vertiefungen wurde nach Ablaufen der Zeit verworfen und wieder 5x mit je 250µl verdünntem Waschpuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernt. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines Streptavidin

⁶ Firma Immundiagnostik (Bensheim, Deutschland)

– Peroxidase – Konjugats (100µl), das spezifisch an Biotin bindet. Dieses Konjugat wurde in alle Vertiefungen pipettiert und maximal 1 Stunde bei 2 – 8°C inkubiert. Danach erfolgte erneut die Waschung. Als Peroxidasesubstrat wurde Tetramethylbenzidin (100µl TMB) eingesetzt, in alle Vertiefungen pipettiert und 20 – 30 Minuten bei Raumtemperatur (18 – 26°) im Dunkeln inkubiert. Durch Zugabe von 50µl Säure (Stopplösung) wurde die Enzymreaktion abgestoppt und es kam zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Nach kurzem Mischen wurde sofort die Extinktion in einem Mikrotiterplattenphotometer bei $\lambda = 450\text{nm}$ gegen eine Referenzwellenlänge $\lambda = 620\text{nm}$ (oder 690nm) gemessen.

War keine Referenzwellenlänge vorhanden, wurde nur bei 450 nm gelesen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers überstieg, musste sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

3.2.7 Studiendesign

Im Anschluss an die Implantation wurden die Patienten alle 3 Monate für 3-10 Jahre sowohl klinisch als auch radiologisch untersucht. Zu jedem Recalltermin wurden die Patienten zur Optimierung der Mundhygiene neu motiviert und instruiert. Zusätzlich erhielten die Patienten eine professionelle Zahnreinigung. Die klinischen Parameter zur statistischen Analyse wurden am Tag der Probenentnahme des Speichels und der Sulkusflüssigkeit erhoben.

3.2.8 Statistische Evaluation

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS.⁷

Die Spearmansche Rangkorrelation (r) wurde berechnet, um die Korrelation zwischen den klinischen und biochemischen Parametern zu ermitteln. Der Mann-Whitney-U-Test wurde zum Gruppenvergleich zweier Gruppen bei nicht normal verteilten Daten und der Wilcoxon-Matched-Pair-Test wurde zum Größenvergleich von zwei verschiedenen Variablen bei nicht normal verteilten Daten angewandt.

⁷ Statistical Package of Social Science, 10.0.5, SPSS, Chicago, IL, USA

4. Ergebnisse

4.1 Klinische Ergebnisse

Bei den GCP Patienten lag die mittlere Sondierungstiefe an den Implantaten bei $2,21 \pm 1,07\text{mm}$ und Bluten nach Sondieren bei $0,16 \pm 0,36$. An den Zähnen lag die mittlere Sondierungstiefe bei $2,52 \pm 0,73\text{mm}$ und Bluten nach Sondieren bei $0,12 \pm 0,16$. Die Gingivale Rezession betrug $\leq 2\text{ mm}$ und der Gingival Index ≤ 1 (Tab. 1).

In der Kontrollgruppe lag die mittlere Sondierungstiefe bei $1,81 \pm 0,32\text{mm}$. Es lag kein Bluten nach Sondieren vor sowie keine Gingivalen Rezessionen. Der Gingival Index lag bei $0,00 \pm 0,00$ (Tab.1).

4.2 OPG und RANKL in der Sulkusflüssigkeit

OPG konnte in der Kontrollgruppe in 17 von 79 Proben ($80,657\text{pmol/l} \pm 120,328\text{pmol/l}$) gemessen werden (Tab.2 und Abb.1). An den Zähnen der GCP Patienten wurde OPG in 10 von 36 Proben ($195,650\text{pmol/l} \pm 284,838\text{pmol/l}$) und an den Implantaten in 11 von 28 Proben ($92,048\text{pmol/l} \pm 131,844\text{pmol/l}$) nachgewiesen. Die OPG Konzentration an den Zähnen war gegenüber den Implantaten und der Kontrollgruppe nicht signifikant erhöht.

RANKL konnte in der Kontrollgruppe in 5 von 78 Proben ($2,797\text{pmol/l} \pm 3,509\text{pmol/l}$) nachgewiesen werden (Tab.2 und Abb. 2). An den Zähnen der GCP Patienten konnte RANKL in 10 von 36 Proben ($24,943\text{pmol/l} \pm 39,182\text{pmol/l}$) und an den Implantaten in 8 von 28 Proben ($50,990\text{pmol/l} \pm 82,545\text{pmol/l}$) gemessen werden. Die RANKL Konzentration an den Zähnen der Kontrollgruppe war deutlich geringer, allerdings statistisch nicht signifikant gegenüber den Zähnen und Implantaten der GCP Patienten. In allen Gruppen lag zwischen der OPG und RANKL Konzentration in der Sulkusflüssigkeit kein signifikanter Zusammenhang vor. Es bestand ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang zwischen OPG, RANKL und den klinischen Parametern.

4.3 OPG und RANKL im Speichel

OPG war in allen Proben ($0,532\text{pmol/l} \pm 0,937\text{pmol/l}$) in der Kontrollgruppe und in 6 von 7 Proben bei den GCP Patienten ($0,375\text{pmol/l} \pm 0,413\text{pmol/l}$) nachweisbar (Tab.3 und Abb.3-4).

RANKL hingegen wurde in 4 von 7 Proben ($0,344\text{pmol/l} \pm 0,482\text{pmol/l}$) in der Kontrollgruppe und in 7 von 8 Proben ($0,141\text{pmol/l} \pm 0,096\text{pmol/l}$) bei den GCP Patienten nachgewiesen.

In beiden Gruppen lag zwischen der OPG und RANKL Konzentration im Speichel kein signifikanter Zusammenhang vor.

Es bestanden ebenfalls keine signifikanten Zusammenhänge zwischen OPG, RANKL und den klinischen Parametern (Tab.4).

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Methode

5.1.1 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 Bakterien, die dem Zahn und der Gingiva in diesem Bereich anhaften, sowie deren Abbauprodukte (Zafiropoulos et al. 1991).

Es kommt im Verlauf der gingivalen Entzündungsreaktion zu einer Steigerung der Gefäßwandpermeabilität. Dies führt zum Austritt von Blutserum in das umgebende Bindegewebe (Exsudat). Von dort sickert es durch das Saume epithel in den Sulkus, wo es Substanzen des entzündlichen Prozesses aufnimmt und als Sulkusflüssigkeit in die Mundhöhle austritt. Die Hauptbestandteile leiten sich in diesem Fall vom Plasma, dem Gingivagewebe und den im Gewebe und im Sulkus befindlichen Mikroorganismen sowie deren Bestandteile bzw. Stoffwechselprodukte ab (Lamster et al. 1985; Kornman 1987; Suido et al. 1988).

Demnach lassen sowohl die Qualität als auch die Quantität der Sulkusflüssigkeit Rückschlüsse auf den Entzündungszustand des Parodonts zu. Es kann nun mit Hilfe unterschiedlicher Verfahren eine Beurteilung der ausgetretenen Sulkusflüssigkeit durchgeführt werden. Die Wahl der Methode richtet sich 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. In der Literatur werden zwei verschiedenen Methoden beschrieben. 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 Sulkus, noch in der Praxis 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.

Bei der Filterpapierstreifen-Methode wird die Sulkusflüssigkeit 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. 5).

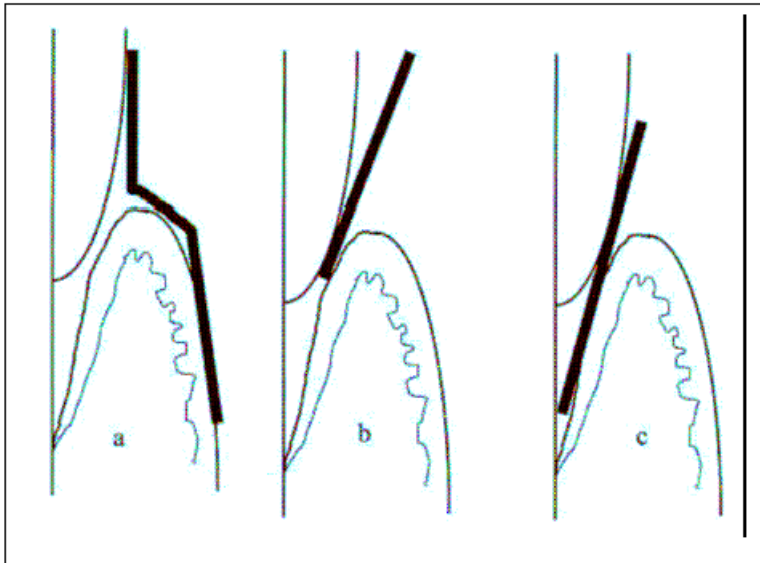


Abb.5. Darstellung der Positionierung der Filterpapierstreifen (Griffiths 2003).

(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 geringe Traumatisierung zu nennen. Die mittels Filterstreifen gewonnenen Proben lassen sich mit verschiedenen Methoden auswerten.

Bei der Ninhydrin-Methode wird der Filterpapierstreifen nach Probenentnahme mit alkoholischer 0,2%iger Ninhydrinlösung blau bis violett eingefärbt, so dass die gefärbte Strecke auf dem Filterpapierstreifen gemessen werden kann. Die blauviolette 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®-Gerät⁸, 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

⁸ OraflowInc., Amityville, New York, USA

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 0,1µl 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 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.

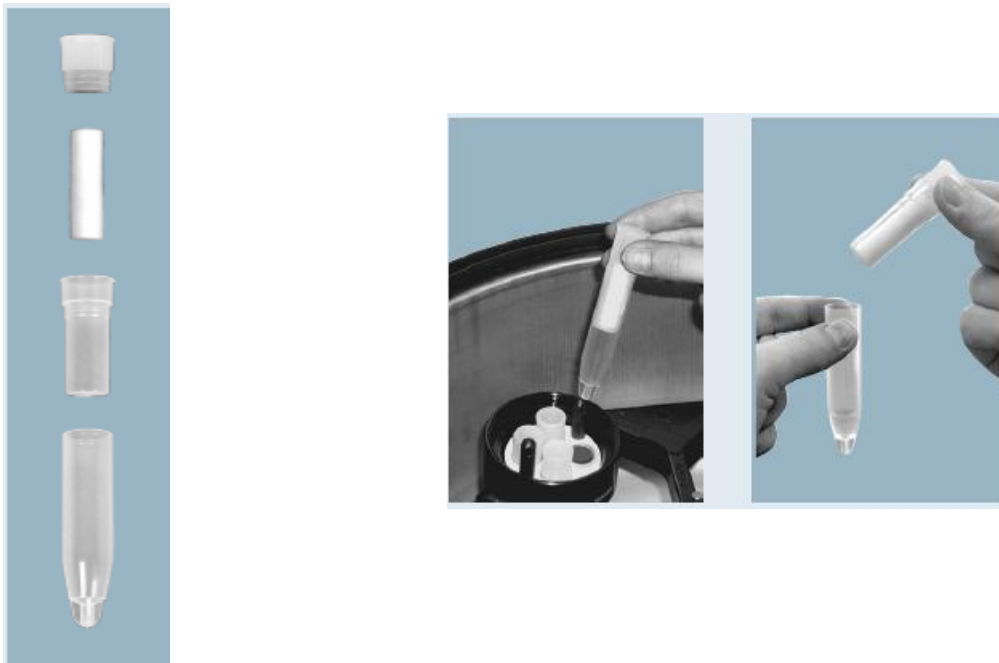
Zur Bestimmung der Sulkusflüssigkeitsmenge wurde in dieser Studie die oben beschriebene Wiegemethode von Filterpapierstreifen verwendet. Die Gewinnung der Sulkusflüssigkeit erfolgte jeweils mesial und distal der Zähne und Implantate. Eine Entnahme mittels Mikropipetten oder Kapillaren kam wegen der sehr 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 OPG und RANKL verfälscht werden, zumal durch die kleinen Volumina solche Fehler noch potenziert werden würden. Die verwendete Waage wurde vor Studienbeginn kalibriert.

5.1.2 Die Gewinnung des Speichels

In der vorliegenden Studie wurde erstmals Speichel von GCP Patienten mit Implantaten entnommen. Im Gegensatz zu voran gegangenen Studien erfolgte das Sammeln der Speichelproben mittels steriler Watterollen⁹ und nicht durch Ausspucken in sterile Röhrchen.

Die Speichelsammlung mittels einer Salivette® erfolgt durch Kauen auf einer sterilen Watterolle. Für die Speichelgewinnung wird die vollgesaugte Watterolle in das Salivetten-Einhängegefäß gesteckt und zentrifugiert. Der nun vorliegende wasserklare Speichel steht für die Analyse zur Verfügung. Aufgrund des speziellen Designs der Salivette® wird eine saubere und hygienische Probengewinnung gewährleistet (Firma Sarstedt).

Abb.6: Darstellung der Speichelentnahme mit einer Salivette® (Firma Sarstedt).



⁹ Salivette®, Firma Sarstedt, Nümbrecht

Diese einfache Methode hat den Vorteil, dass durch den Druck der Watterolle auf die Speicheldrüsen eine erhöhte Speichelsekretion hervorgerufen wird und der Speichelfluss nicht zusätzlich stimuliert werden muss. Außerdem erhält man, im Gegensatz zum Ausspucken, eine recht konstante Speichelmenge. Die Speichelentnahme könnte eine gute Alternative zur herkömmlichen Blutentnahme darstellen. Ein großer Vorteil ist hierbei, dass die Speichelentnahme non-invasiv und jederzeit erhältlich ist. Dadurch verringern sich eventuelle Ängste bei Patienten, was die Probenentnahme über einen längeren Zeitraum erleichtert. Auch für den Behandler verringert sich das Risiko, sich mit ansteckenden Krankheiten wie HIV oder Hepatitis zu infizieren. Hinzu kommt, dass Speichel leichter zu lagern ist, da er im Gegensatz zu Blutproben nicht gerinnen kann.

Orale Flüssigkeiten, wie der Speichel, können als „Spiegel des Körpers“ gesehen werden. Um diesen zu diagnostizieren bedarf es funktionell anspruchsvollen technischen Geräten. Hierbei hat es sich das National Institute of Dental & Craniofacial Research (NIDCR) zur Aufgabe gemacht, die technischen Fortschritte, die zur Identifikation und Validierung von eindeutigen Biomarkern im Speichel wichtig sind, zu fördern. Es bedarf jedoch noch viel Arbeit, bis das Ziel von einer technisch perfekten Diagnostik für den Speichel erreicht wird (Lee et al.2009).

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Beim physiologischen Knochenstoffwechsel spielt das OPG/RANKL-System eine zentrale Rolle, da RANKL, sein zellulärer Rezeptor RANK und der Decoy-Rezeptor Osteoprotegerin ein essentielles Zytokinsystem für die Zellbiologie von Osteoklasten darstellt (Hofbauer 2004). Das Verhältnis von RANKL zu OPG ist dabei essentiell für das Vorliegen von Knochenauf- und abbau. In vielen Fällen führt dabei ein Übergewicht von RANKL zu gesteigerten Resorptionsvorgängen. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass das OPG/RANKL - System auch bei einer Parodontitis eine wichtige Rolle spielt. So konnte in einem Tierversuch gezeigt werden, dass OPG die Knochenresorption bei einer parodontalen Erkrankung hemmt (Teng et al. 2000). In einer klinischen Studie war die OPG Konzentration im parodontal erkranktem Gewebe signifikant herabgesetzt und die RANKL Konzentrationen signifikant erhöht (Crotti et al. 2003). In weiteren klinischen Studien wurden in der Sulkusflüssigkeit erhöhte RANKL Konzentrationen an Zähnen mit Parodontitis im Vergleich zu gesunden Stellen nachgewiesen (Lu et al. 2006 & Mogi et al. 2004). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die OPG Konzentration bei Rauchern und Nichtrauchern mit einer chronischen Parodontitis 4 Wochen nach der initialen Parodontalbehandlung signifikant herabgesetzt wird (Budunelli et al. 2009).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das OPG/RANKL - System an dem Auf- und Abbau des Alveolarknochens bei Patienten mit entzündlichen parodontalen Erkrankung beteiligt ist. Aufgrund dieser Erkenntnisse liegt die Annahme nahe, dass das OPG/RANKL System auch im Knochenstoffwechsel von osseointegrierten Implantaten eine zentrale Rolle spielt. Allerdings ist bis heute nicht bekannt, welchen Einfluss es in der Einheilung dentaler Implantate und Aufrechterhaltung der Osseointegration hat.

In einer klinischen Studie konnte OPG und RANKL in der Sulkusflüssigkeit von osseointegrierten Implantaten (n=86) nachgewiesen werden (Arikan et al. 2008). 79 Implantate wurden anhand der klinischen Parameter als gesund eingestuft, 4 Implantate wiesen Zeichen einer Mucositis und 3 weitere zeigten eine Periimplantitis auf. Da ein Ungleichgewicht zwischen gesunden und kranken periimplantären Verhältnissen vorlag, wurde kein Gruppenvergleich durchgeführt. Von allen Proben (n=86) konnte in 10 Proben (12%) sRANKL nachgewiesen werden, wobei keine Korrelation zu den klinischen Parametern vorlag. OPG konnte in 68 Proben (79%)

nachgewiesen werden und korrelierte signifikant mit der periimplantären Weichgewebsentzündung (Gingival Index und Bluten nach Sondieren). Zwischen OPG und RANKL lagen keine Korrelationen vor.

In einer weiteren Studie wurden insgesamt 84 Proben der SF (Sulkusflüssigkeit) von Patienten (n=19) mit Implantaten (n=42) untersucht (Monov et al. 2006). OPG lag in keiner Probe vor, sRANKL hingegen war in 29 Proben (35%) nachweisbar. Die sRANKL Konzentrationen korrelierten nicht mit den klinischen Parametern.

Kritisch ist zu bemerken, dass alle negativen Proben nicht in der statistischen Analyse berücksichtigt wurden, und keine genauen Aussagen über den periimplantären Gesundheitszustand vorlagen. Weiterhin ist kritisch zu bemerken, dass in beiden oben genannten Studien alle SF Proben gepoolt wurden, was dazu führt, die Nachweisgrenze zu erhöhen.

In der vorliegenden Studie wurden die Proben ohne zu poolen entnommen und einzeln untersucht. Alle Patienten wiesen eine behandelte generalisierte chronische Parodontitis ohne Zeichen einer Mucositis oder Periimplantitis auf. Dies könnte erklären, dass OPG und RANKL in deutlich höheren Konzentrationen gemessen wurde, als in den vorangegangenen Studien. Die hohen Werte deuten darauf hin, dass alle Patienten in der Vergangenheit Knochenabbau aufwiesen und das OPG/RANKL - System dadurch sensibilisiert wurde. Es bleibt allerdings aufgrund der geringen Fallzahl der Studie zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse in weiteren Studien mit höheren Fallzahlen überprüft werden sollten.

Neben der Sulkusflüssigkeit konnte in wenigen Studien OPG und RANKL im Speichel nachgewiesen werden (Buduneli et al. 2008, Miller et al. 2006, Ramseier et al. 2008). In einer klinischen Studie wurde der Speichel von parodontal erkrankten Patienten untersucht (Buduneli et al. 2008). Es zeigte sich, dass bei Rauchern mit behandelter und nicht behandelter Parodontitis höhere RANKL und niedrigere OPG Konzentrationen vorhanden sind als bei Nichtrauchern.

In weiteren Studien wurden der Speichel auf Biomarker (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IIL-10, IL-13, MMP-8, MMP-9, OPG), die zur Diagnostik von parodontalen Erkrankungen von Bedeutung sind, untersucht (Miller et al. 2006, Ramseier et al. 2008). Es scheint, dass sich MMP-8 und IL-1 β als Biomarker für parodontale Erkrankungen eignen. Der Nachweis von OPG konnte nicht mit Entzündungen des parodontalen Weichgewebes und dem Knochenabbau in Zusammenhang gebracht

werden (Miller et al. 2006), allerdings weisen erhöhte OPG Werte auf gesunde parodontale Verhältnisse hin (Ramseier et al. 2008).

In der vorliegenden Studie wurde erstmals Speichel von GCP Patienten mit Implantaten entnommen. Im Gegensatz zu den oben genannten Studien erfolgte das Sammeln der Speichelproben mittels steriler Watterollen¹⁰ und nicht durch Ausspucken in sterile Röhrchen wie in den oben genannten Studien. Diese Methode hat den Vorteil, dass durch den Druck der Watterolle auf die Speicheldrüsen eine erhöhte Speichelsekretion hervorgerufen wird und der Speichelfluss nicht zusätzlich stimuliert werden muss. Außerdem erhält man, im Gegensatz zum Ausspucken, eine konstante Speichelmenge.

Die Konzentration von OPG und RANKL im Speichel ist im Gegensatz zur Sulkusflüssigkeit deutlich geringer und in beiden Gruppen nahezu identisch. Außerdem konnte sowohl OPG als auch RANKL in fast allen Proben nachgewiesen werden. Anhand der vorliegenden Ergebnisse ist die Rolle des Speichels als Reservoir für OPG und RANKL nicht ausreichend interpretierbar.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass der Nachweis von OPG und RANKL in der Sulkusflüssigkeit und im Speichel ein vielversprechendes diagnostisches Nachweisverfahren für den Knochenstoffwechsel an Zähnen und Implantaten sein kann. Insbesondere sollte die Rolle des OPG und RANKL - Systems in der Etablierung und Aufrechterhaltung einer Osseointegration von Implantaten und der Entstehung von periimplantären entzündlichen Erkrankungen näher untersucht werden.

¹⁰ Salivette®, Firma Sarstedt, Nümbrecht

6. Schlussfolgerung

1. In der Sulkusflüssigkeit konnte in 20-30% der Proben OPG und RANKL nachgewiesen werden. Die RANKL Konzentration an den Implantaten war deutlich erhöht, jedoch statistisch nicht signifikant.
2. Im Speichel konnte in nahezu allen Proben OPG und RANKL in geringen Werten gemessen werden. Die OGP Konzentrationen war in der Kontrollgruppe gegenüber den GCP Patienten leicht erhöht, jedoch statistisch nicht signifikant.
3. In beiden Gruppen lag zwischen der OPG und RANKL Konzentration im Speichel und in der Sulkusflüssigkeit kein signifikanter Zusammenhang vor. Es bestanden ebenfalls keine Korrelationen zwischen OPG, RANKL und den klinischen Parametern.

7. Zusammenfassung

Beim physiologischen Knochenstoffwechsel spielt das OPG/RANKL - System eine zentrale Rolle für das Vorliegen von Knochenauf - und abbau. RANKL fördert die Knochenresorption durch Steigerung der Anzahl und Aktivität funktionsfähiger Osteoklasten über Aktivierung seines osteoklastären Rezeptors RANK. Dieser Prozess wird durch seinen löslichen Antagonisten OPG inhibiert.

Das Ziel der vorliegenden Studie war der Nachweis von OPG und RANKL in der Sulkusflüssigkeit und im Speichel bei Patienten mit dentalen Implantaten.

8 behandelte GCP Patienten mit Implantaten und 7 parodontal gesunde Probanden ohne Implantate waren an der Studie beteiligt. Neben den klinischen Parametern (ST, BNS, GI, GR) wurden Proben der Sulkusflüssigkeit und des Speichel entnommen. Die Untersuchung auf OPG und RANKL erfolgte mittels der ELISA-Technik.

In der Sulkusflüssigkeit bei den GCP Patienten wurde OPG an den Implantaten in 30% ($92,05\text{pmol/l} \pm 131,84\text{pmol/l}$) und an den Zähnen in 27% ($195,65\text{pmol/l} \pm 284,83\text{pmol/l}$) der Proben nachgewiesen. In der Kontrollgruppe war OPG in 22% ($80,66\text{pmol/l} \pm 120,33\text{pmol/l}$) der Proben nachweisbar. RANKL lag bei den GCP Patienten an 23% der Implantate ($50,99\text{pmol/l} \pm 82,55\text{pmol/l}$) und 28% der Zähne ($24,94\text{pmol/l} \pm 39,18\text{pmol/l}$) vor. In der Kontrollgruppe konnte RANKL in 8% ($2,78 \pm 3,51\text{pmol/l}$) der Proben gemessen werden.

Im Speichel der GCP Patienten konnte OPG ($0,38\text{pmol/l} \pm 0,41\text{pmol/l}$) in allen und bei den Kontrollen ($0,53\text{pmol/l} \pm 0,94\text{pmol/l}$) in 6 von 7 Proben gemessen werden. RANKL ($0,141 \pm 0,096\text{pmol/l}$) wurde bei den GCP Patienten in 7 von 8 Proben und bei den Kontrollen ($0,344 \pm 0,482\text{pmol/l}$) in 4 von 7 Proben nachgewiesen. Weder im Speichel noch in der Sulkusflüssigkeit lagen Korrelationen zwischen OPG, RANKL und den klinischen Parametern vor.

Abschließend bleibt festzustellen, dass in der Sulkusflüssigkeit in 20-30% der Proben OPG und RANKL nachweisbar war. Die RANKL Konzentration an den Implantaten der GCP Patienten war deutlich erhöht, jedoch statistisch nicht signifikant.

In nahezu allen Speichelproben konnte OPG und RANKL in geringen Konzentrationen gemessen werden.

Der Nachweis von OPG und RANKL in der Sulkusflüssigkeit und im Speichel ist ein vielversprechendes diagnostisches Nachweisverfahren für den Knochenstoffwechsel an Zähnen und Implantaten. Insbesondere sollte die Rolle des OPG und RANKL-Systems in der Etablierung und Aufrechterhaltung einer Osseointegration von Implantaten und der Entstehung von periimplantären entzündlichen Erkrankungen näher untersucht werden.

Summary

The OPG/RANKL system is critical for physiological bone remodeling as RANKL, its cellular receptor RANK and its decoy receptor OPG crucially regulating osteoclastogenesis. Thus, the ratio of RANKL to OPG determines the rate of bone remodeling. The aim of this study was to determine osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of NF κ B ligand (RANKL) in crevicular fluid and saliva of periodontal healthy subjects and patients with treated generalized chronic periodontitis (GCP) and peri-implant healthy implants.

Samples of crevicular fluids and saliva as well as clinical parameters were collected from 8 GCP patients with implants and 7 periodontal healthy subjects without implants. RANKL and OPG levels were measured using ELISAs.

In GCP patients, OPG was detectable in 30% of the crevicular fluid around implants and in 27% around teeth. In controls, OPG was found in 22% of crevicular fluid. RANKL levels were determined in 23% of crevicular fluid around implants and in 28% around teeth, whereas it was found in 8% of controls. OPG and RANKL were detectable in nearly all saliva samples. In both groups, OPG and RANKL were not correlated with each other in the crevicular fluid or saliva samples. There was no correlation with clinical parameters.

OPG and RANKL were detectable in 20-30% of the crevicular fluid samples. In GCP patients the RANKL levels around implants and the OPG levels around teeth were increased. As a conclusion, the detection of OPG and RANKL in crevicular fluid and saliva may provide a promising diagnostic indicator of bone remodeling for teeth and dental implants. The role of the OPG/RANKL system should be investigated in more detail with respect to the establishment and maintenance of osseointegration of implants and in the development of inflammatory peri-implant diseases.

Nearly all saliva samples contained measureable amounts of OPG and RANKL.

8. Literaturverzeichnis

Albrektsson, T., Isidor, F. Consensus report of sessions IV. In: Lang, N.P., Karring, T., ed. Proceedings of the First European Workshop on Periodontology. London: *Quintessence*, 1994; 365-369.

Alfano, M. The origin of gingival fluid. *Journal of Theoretical Biology* 1974; 47: 127-136.

American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature. Proposed standard nomenclature for new tumor necrosis Factor members involved in the regulation of bone resorption. *Bone* 2000; 27:761-764.

Anderson, M.A., Maraskovsky, E., Billingsley, W.L., Dougall, W.C., Tometsko, M.E., Roux, E.R., Teepe, M.C., DuBose, R.F., Cosman, D., Galibert, L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997; 390: 175-179.

Anderson, K.L., Smith, K.A., Perkin, H., Hermanson, G., Anderson, C.G., Jolly, D.J., Maki, R.A., Torbett, B.E. PU. 1 and the granulocyte-and macrophage colony-stimulating factor receptors play distinct roles in late-stage myeloid cell differentiation. *Blood* 1999; 94: 2310-2318.

Arai, F., Miyamoto, T., Ohneda, O., Inada, T., Sudo, T., Brasel, K., Miyata, T., Anderson, D.M., Suda, T. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-fms and receptor activator of nuclear factor κ B (RANK) receptors. *Journal of Experimental Medicine* 1999; 190: 1741-1754.

Arikan, F., Buduneli, N., Kütükcüler, N. Osteoprotegerin levels in peri-implant crevicular fluid. *Clinical Oral Implants Research* 2008; 19: 283-288.

Armitage, G.C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology* 1999; 4: 1-6.

Baker, S.J., Reddy, E.P. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 1998; 17: 3261-3270.

Bang, J., Rosenbush, C., Ahmad-Zadeh, C. & Cimasoni, G. Isoenzymes of lactic dehydrogenase in human gingival fluid. *Helvetica Odontologica Acta* 1972; 16: 89-93.

Berglundh, T., Lindhe, J., Marinello, C., Ericsson, I. & Liljenberg, B. Soft tissue reaction to the novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* 1992; 3: 1-8.

Bickel, M., Cimasoni, G., Andersen, E. Flow and albumin content of early (pre-inflammatory) gingival crevicular fluid from human subjects. *Archives of Oral Biology* 1985; 30: 599-602.

Brill, N., Krasse, B. The passage of fluid into the clinically healthy gingival pocket. *Acta Odontologica Scandinavica* 1958; 16: 233-245.

Buduneli, N., Biyikoglu, B., Sherrabeh, S., Lappin, D.F. Salvia concentrations of RANKL and osteoprotegerin in smoker versus non-smoker chronic periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology* 2008; 35: 846-852.

Buduneli, N., Buduneli, E., Kütükcüler, N. Interleukin – 17, RANKL, and Osteoprotegerin Levels in Gingival Crevicular Fluid From Smoking and Non-Smoking Patients with chronical periodontitis during initial periodontal treatment. *Journal of Periodontology* 2009; 80: 1274-1280.

Chaisson, M.L., Branstetter, D.G., Derry, J.M., Armstrong, A.P., Tometsko, M.E., Takeda, K., Akira, S., Dougall, W.C. Osteoclast differentiation is impaired in the absence of inhibitor of kB kinase a. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 54841-54848.

Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Yu, G.L., Lyons, R.H., Garg, M., Duan, D.L., Xing, L., Gentz, R., Ni, J., Dixit, V.M. Signal transduction by DR3, a death domain – containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 1996; 274: 990-992.

Chuang, S.K., Wei, L.J., Douglass, C.W., Dodson, T.B. Risk factors for dental implant failure: A strategy for the analysis of clustered failure-time observations. *Journal of Dental Research* 2002; 81:572-577.

Cimasoni, G. The crevicular fluid. *Monographs in Oral Science* 1974; 3: 1-122.

Cimasoni, G. Crevicular Fluid Updated. In: Myers HM (eds): *Monographs in oral science*. Karger Basel 1983; 12: 1-152.

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.

Condacci, I., Cimasoni, G. & Ahmad-Zadeh, C. Alpha 2-macroglobulin in sulci from healthy and inflamed human gingivae. *Infection and Immunity* 1982; 36: 66-71.

Crotti, T., Smith, M.D., Hirsch, R., Soukalis, S., Weedon, H., Capone, M., Ahern, M.J. & Haynes, D. Receptor activator NF κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *Journal of Periodontal Research* 2003; 38: 380-387.

Collin-Osdoby, P., Rothe, L., Anderson, F., Nelson, M., Maloney, W., Osdoby, P. Receptor activator of NF- κ B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 20659-20672.

Curtis, M. A., Gillett, I. R., Griffiths, G. S., Maiden, M. F., Sterne, J. A., Wilson, D. T., Wilton, J. M. & Johnson, N. W. Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases: laboratory markers from analysis of gingival crevicular fluid. *Journal of Clinical Periodontology* 1989; 16: 1-11.

D'Aoust, P. & Landry, R. G. The effect of supragingival plaque on crevicular fluid measurements. *International Dental Journal* 1994; 44: 159-164.

Darnay, B.G., Haridas, V., Ni, J., Moore, P.A., Aggarwal, B.B. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF- κ B (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF- κ B and c-Jun N-terminal kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273: 20551-20555.

Dhore, C.R., Cleutjens, J.P., Lutgens, E., Cleutjens, K.B., Geusens, P.P., Kitslaar, P.J., Tordoir, J.H., Spronk, H.M., Vermeer, C., Daemen, M.J. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2001; 21: 1998-2003.

Doherty, T.M., Fitzpatrick, L.A., Inoue, D., Qiao, J.H., Fishbein, M.C., Detrano, R.C., Shah, P.K., Rajavashisth, T.B. Molecular, endocrine, and genetic mechanisms of arterial calcification. *Endocrine Reviews* 2004; 25: 629-672.

Egelberg, J. Permeability of the dento-gingival blood vessels. 3. Chronically inflamed gingivae. *Journal of Periodontal Research*. 1966; 1: 287-296.

Emery, J.G., McDonnell, P., Burke, M.B., Deen, K.C., Lyn, S., Silverman, C., Dul E., Appelbaum, E.R., Eichman, C., DiPrinzio, R., Dodds, R.A, James, I.E., Rosenberg, M., Lee, J.C., Young, P.R. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273: 14363-14367.

Esposito, M., Hirsch, J.M., Lekholm, U., Thomsen, P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants (I) Success criteria and epidemiology. *European Journal of Oral Sciences* 1998a; 106: 527-551.

Esposito, M., Hirsch, J.M., Lekholm, U., Thomsen, P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants (II) Etiopathogenesis. *European Journal of Oral Sciences* 1998b; 106: 721-764.

Fata, J.E., Kog, Y.Y., Li, J., Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Moorehead, R.A., Elliott, R., Scully, S., Voura, E.B., Lacey, D.L., Boyle, W.J., Khokha, R., Penninger, J.M. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 2000; 103: 41-50.

Fiumara, P., Snell, V., Li, Y., Mukhopadhyay, A., Younes, M., Gillenwater, A.M., Cabanillas, F., Aggarwal, B.B., Younes, A. Functional expression of receptor activator of nuclear factor kappaB in Hodgkin disease cell lines. *Blood* 2001; 98: 2784-2790.

Franzoso, G., Carlson, L., Xing, L., Poljak, L., Shores, E.W., Brown, K.D., Leonardi, A., Tran, T., Boyce, B.F., Siebenlist, U. Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development. *Genes & Development* 1997; 11:3482-3496.

Galibert, L., Tometsko, M.E., Anderson, D.M., Cosman, D., Dougall, W.C. The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF-kB, a member of the TNFR superfamily. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273: 34120-34127.

Gao, Y.-H., Shinki, T., Yuase, T., Kataoka-Enomoto, H., Komori, T., Suda, T., Yamaguchi, A. Potential role of cbfa1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: Regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 252: 697-702.

Gardner, C.R. Morphological analysis of osteoclastogenesis induced by RANKL in mouse bone marrow cell cultures. *Cell Biology International* 2007; 31: 672-682.

Giannopoulou, C., Andersen, E., Demeurisse, C. & Cimasoni, G. Neutrophil elastase and its inhibitors in human gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *Journal of Dental Research* 1992; 71: 359-363.

Golledge, J., McCann, M., Mangan, S., Lam, A., Karan, M. Osteoprotegerin and osteopontin are expressed at high concentrations within symptomatic carotid atherosclerosis. *Stroke* 2004; 35:1636-1641.

Green, E.A., Flavell, R.A. TRANCE-RANK, a new signal pathway involved in lymphocyte development and T cell activation. *Journal of Experimental Medicine* 1999; 189: 1017-1020.

Griffiths, G. S. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontology* 2000; 31: 32-42.

Groetz, K.A. Die trockene Mundhöhle: Ätiologie, Klinik, Diagnostik, Therapie. *ZM* 2002; 92: 46-53.

Harvey, E.J., Li, N., Ramji, D.P. Critical role for casein kinase 2 and phosphoinositide-3-kinase in the interferon- γ -induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other key genes implicated in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2007; 27: 806-812.

Hilton, M.J., Gutierrez, L., Zhang, L., Moreno, P.A., Reddy, M., Brown, N., Tan, Y., Hill, A., Wells, D.E. An integrated physical map of 8q22-q24: Use in positional cloning and deletion analysis of Langer-Giedion syndrome. *Genomics* 2001; 71: 192-199.

Hofbauer, L. C. Die Rolle von RANKL-Ligand und Osteoprotegerin bei Osteoporose. *Journal für Mineralstoffwechsel* 2004; 11 (suppl 2): 15-19.

Hofbauer, L.C, Dunstan, C.R., Spelsberg, T.C., Riggs, B.L., Khosla, S. Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines. *Biochemical Biophysical Research Community* 1998; 250: 776-781.

Hofbauer, L.C., Khosla, S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Boyle, W.J, Riggs, B.L. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *Journal of Bone and Mineral Research* 2000; 15: 2-12.

Hofbauer, L.C., Kluger, S., Kuhne, C.A., Dunstan, C.R., Burchert, A., Schoppet, M., Zielke, A., Heufelder, A.E. Detection and characterization of RANK ligand and osteoprotegerin in the thyroid gland. *Journal of Cellular Biochemistry* 2002; 86: 642-650.

Horwood, N.J., Elliott, J., Martin, T.J., Gillespie, M.T. Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. *Endocrinology* 1998; 4743-4746.

Hsu, H., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Solovyev, I., Colombero, A., Timms, E., Tan, H.-L., Elliott, G., Kelley, M.J., Sarosi, I., Wang, L., Xia, X.-Z., Elliott, R., Chiu, L., Black, T., Scully, S., Capparelli, C., Morony, S., Shimamoto, G., Bass, M.B., Boyle, W.J. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 1999; 96: 3540-3545.

Hughes, A.E., Ralston, S.H., Marken, J., Bell, C., MacPherson, H., Wallace, R.G.H., van Hul, W., Whyte, M.P., Nakatsuka, K., Hovy, L., Anderson, D.M. Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. *Nature Genetics* 2000; 24: 45-48.

Ikeda, F., Nishimura, R., Matsubara, T., Hata, K., Reddy, S.V., Yoneda, T. Activation of NFAT signal in vivo leads to osteopenia associated with increased osteoclastogenesis and bone-resorbing activity. *Journal of Immunology* 2006; 177: 2384-2390.

Ikeda, T., Kasai, M., Utsuyama, M., Hirokawa, K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology* 2001; 142: 1419-1426.

Junqueira, L. C., Carneiro, J. *Histologie. Springer, Berlin* 1996: 515-521.

Kartsogiannis, V., Zhou, H., Horwood, N.J., Thomas, R.J., Hards, D.K., Quinn, J.M.W., Niforas, P., Martin, T.J., Gillespie, M.T. Localization of RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone* 1999; 25: 525-534.

Kitazawa, R., Kitazawa, S., Maeda, S. Promoter structure of mouse RANKL/TRANSC/OPGL/ODF gene. *Biochim Biophys Acta Journal* 1999; 1445: 134-141.

Kodaira, K., Kodaira, K., Mizuno, A., Yasuda, H., Shima, N., Murakami, A., Ueda, M., Higashio, K. Cloning and characterization of the gene encoding mouse osteoclast differentiation factor. *Gene* 1999; 230: 121-127.

Koh, J.M., Park, B.L., Kim, D.J., Kim, G.S., Cheong, H.S., Kim, T.H., Hong, J.M., Shin, H.I., Park, E.K., Kim, S.Y., Shin, H.D. Identification of novel RANK polymorphisms and their putative association with low BMD among postmenopausal women. *Osteoporosis International* 2007; 18: 323-331.

Kohlbecker, G., Grzonka, M. & Gunay, H. Quantitative measurement of sulcus fluid with new self-coloring paper indicator strips: a comparison with Periotron. *Schweizer Monatsschrift für Zahnmedizin* 1989; 99: 414-418.

Kong, Y.-Y., Boyle, W.J., Penninger, J.M. Osteoprotegerin ligand: A regulator of Immune responses and bone physiology. *Immunology Today* 2000; 21: 495-502.

Kong, Y. Y., Feige, U., Sarosi, I., Bolon, B., Tafuri, A., Morony, S., Capparelli, C., Li, J., Elliott, R., McCabe, S., Wong, T., Campagnuolo, G., Moran, E., Bogoch, E.R., Van, G., Nguyen, L. T., Ohashi, P.S., Lacey, D.L., Fish, E., Boyle, W. J. & Penninger, J. M. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999; 402 (6759): 304-309.

Kornman, K. S. (1987) Nature of periodontal diseases: assessment and diagnosis. *Journal of Periodontal Research* 1987; 22: 192-204.

Kotake, S., Uagawa, N., Hakoda, M., Mogi, M., Yano, K., Tsuda, E., Takahashi, K., Furuya, T., Ishiyama, S., Kim, K.J., Saito, S., Nishikawa, T., Takahashi, N., Togari, A., Tomatsu, T., Suda, T. & Kamatani, N. Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheumatism* 2001; 44(5): 1003-1012.

Kwon, B.S., Wang, S., Udagawa, N., Haridas, V., Lee, Z.H., Kim, K.K., Oh, K.O., Greene, J., Li, Y., Su, J., Gentz, R., Aggarwal, B.B., Ni, J. TR1, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB Journal* 1998; 12: 845-854.

Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.-L., Kelley, M.J., Dunstan, C.R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y.-X., Kaufman, S., Sarosi, I. Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J., Boyle, W.J. Osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93: 165-176.

Lamster, I. B., Hartley, L. J. & Vogel, R. I. 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. *Journal of Periodontology* 1985; 56: 13-21.

Lamster, I. B., Oshrain, R. L. & Gordon, J. M. Enzyme activity in human gingival crevicular fluid: considerations in data reporting based on analysis of individual crevicular sites. *Journal of Clinical Periodontology* 1986; 13: 799-804.

Lee, S.E., Woo, K.M., Kim, S.Y., Kim, H.M., Kwack, K., Lee, Z.H., Kim, H.H. The phosphatidylinositol 3-kinase, p38, and extracellular signal-regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation. *Bone* 2002; 30: 71-77.

Lee, J.M., Garon, E., Wong, D.T. Saivary diagnostics. *Orthodontics and Craniofacial Research* 2009; 12: 206-211.

Lerner, U.H. New Molecules in the tumor necrosis Factor Ligand and Receptor Superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 2004; 15: 64-81.

Löe, H. & Silness, J. periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. *Acta Odontologica Scandinavica* 1963; 21: 533-551.

Li, J., Sarosi, I., Yan, X.Q., Morony, S., Capparelli, C., Tan, H.-L., McCabe, S.M., Elliott, R., Scully, S., Van, G., Kaufman, S., Juan, S.C., Sun, Y., Tarpley, J., Martin, L., Christensen, K., McCabe, J., Kostenuik, P., Hsu, H., Fletcher, F., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Boyle, W.J. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proceedings of the National Academy Sciences (USA)* 2000; 97: 1566-1571.

Lindhe, J., Karring, T. Anatomie des Parodonts. In: Lindhe, J., Karring, T., Lang., N.P. (Hrsg.): klinische Parodontologie und Implantologie. *Quintessenz, Berlin Chicago, London 1999; 19-68.*

Lomaga, M.A., Yeh, W.C., Sarosi, I., Duncan, G.S., Furlonger, C., Ho, A., Morony, S., Capparelli, C., Van, G., Kaufman, S., van der Heide, A., Itie, A., Wakeham, A., Khoo, W., Sasaki, T., Cao, Z., Penninger, J.M., Paige, C.J., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Boyle, W.J., Goeddel, D.V., Mak, T.W. TRAF6-deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40 and LPS signaling. *Genes & Development 1999; 13: 1015-1024.*

Lu, H.-K., Chen, Y.-L., Chang, H.-C., Li, C.-L. & Kuo, M.Y.-P. Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research 2006; 41: 354-360.*

Lum, L., Wong, B.R., Josien, R., Becherer, J.D., Erdjument-Bromage, H., Schlöndorff, J., Tempst, P., Choi, Y., Blobel, C.P. Evidence for a role of a tumor necrosis factor- α (TNF- α)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *Journal of Biological Chemistry 1999; 274: 13613-13618.*

Machtens, E. Speicheldrüsenerkrankungen. *Urban&Schwarzenberg, München 1991; 239-266.*

Manolagas, S.C. Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews 2000; 21: 115-137.*

Matsubara, T., Myoui, A., Ikeda, F., Hata, K., Yoshikawa, H., Nishimura, R., Yoneda, T. Critical role of cortactin in actin ring formation and osteoclastic bone resorption. *Journal of Bone and Mineral Metabolism 2006; 24: 368-372.*

Matsuo, K., Owens, J.M., Tonko, M., Elliott, C., Chambers, T.J., Wagner, E.F. Fos1 is a transcriptional target of c-Fos during osteoclast differentiation. *Nature Genetics* 2000; 24: 184-187.

McDermott, N.E., Chuang, S.K., Woo, V., Dodson, T. Complications of dental implants : Identification, frequency and associated risk factors. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 2003; 18: 848-855.

Mengel, R., Stelzel, M., Zimmermann, A. Die Rolle der Sulkusflüssigkeit in der Parodontologie. *Parodontologie* 1991; 3: 261-264.

Mengel, R., Andres, K. & Flores-de-Jacoby, L. Influencing factors in the long-term success of osseointegrated implants. *Zeitschrift für Zahnärztliche Implantologie* 2007; 23: 280-306.

Merewether, L.A., Le, J., Jones, M.D., Lee, R., Shimamoto, G., Lu, H.S. Development of disulfide peptide mapping and determination of disulfide structure of recombinant human osteoprotegerin chimera produced in *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2000; 375: 101-110.

Miller, C.S., King, C.P. Jr., Langu, M.C., Kryscio, R.J., Thomas, M.V. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study, *Journal of the American Dental Association*. 2006; 137: 322-329.

Min, J.K., Kim, Y.M., Kim, E.C., Kim, E.C., Gho, Y.S., Kang, I.J., Lee, S.Y., Kong, Y.Y., Kwon, Y.G. Vascular endothelial growth factor upregulates expression of receptor activator of NF- κ B (RANK) in endothelial cells. Concomitant increase of angiogenic responses to RANK ligand. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 39548-39557.

Mizuno, A., Murakami, A., Nakagawa, N., Yasuda, H., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K. Structure of the mouse osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin gene and its expression in embryogenesis. *Gene* 1998; 215: 339-343.

Mogi, M., Ootogoto, J., Ota, N. & Togari, A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *Journal of Dental Research* 2004; 83: 166-169.

Monov, G., Strbac, G.D., Baron, M., Kandler, B., Watzek, G. & Gruber, R. Soluble RANKL in crevicular fluid of dental implants: a pilot study. *Clinical Implant Dentistry & Related Research* 2006; 8: 135-141.

Morinaga, T., Nakagawa, N., Yasuda, H., Tsuda, E., Higashio, K. Cloning and characterization of the gene encoding human osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor. *European Journal of Biochemistry* 1998; 254: 685-691.

Myers, D.E., Collier, F.M., Minkin, C., Wang, H., Holloway, W.R., Malakellis, M., Nicholson, G.C. Expression of functional RANK on mature rat and human osteoclasts. *FEBS Letters* 1999; 463: 295-300.

Nagai, M., Kyakumoto, S., Sato, N. Cancer cells responsible for humoral hypercalcemia express mRNA encoding a secreted form of ODF/TRANCE that induces osteoclast formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000; 269: 532-536.

Nakagawa, N., Kinoshita, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Yano, K., Morinaga, T., Higashio, K. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 253: 395-400.

Nakamichi, Y., Udagawa, N., Kobayashi, Y., Nakamura, M., Yamamoto, Y., Yamashita, T., Mizoguchi, T., Sato, M., Mogi, M., Penninger, J.M., Takahashi, N. Osteoprotegerin reduces the serum level of receptor activator of NF- κ B ligand derived from osteoblasts. *Journal of Immunology* 2007; 178: 192-200.

Nakashima, T., Kobayashi, Y., Yamasaki, S., Kawakami, A., Eguchi, K., Sasaki, H. und Sakai, H. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappa B ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000; 275: 768-775.

Offenbacher, S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Annals of Periodontology* 1996; 1: 879-925.

Ogawa, T., Ishida-Kitagawa, N., Tanaka, A., Matsumoto, T., Hirouchi, T., Akimaru, M., Tanihara, M., Yogo, K., Takeya, T. A novel role of L-serine (L-Ser) for the expression of nuclear factor of activated T cells (NFAT)2 in receptor activator of nuclear factor kB ligand (RANKL)-induced osteoclastogenesis in vitro. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 2006; 24: 373-379.

Pashley, D.H. A mechanistic analysis of gingival fluid production. *Journal of Periodontal Research* 1976; 11: 121-134.

Pettersen, I., Bakkel, W., Smedsrod, B., Sveinbjornsson, B. Osteoprotegerin is expressed in colon carcinoma cells. *Anticancer Research* 2005; 25: 3809-3816.

Ramseier, C.A., Kinney, J. Herr, A.E., Braun T. Sugai, J.V., Shelburne, C.A., Lindsay, A.R., Tran, H.M., Singh, A.K., Giannobile, W.V. Identification of Pathogen and Host-Response Markers Correlated with Periodontal Disease. *Journal of Periodontology* 2009; 80: 436-446.

Rani, C.S., MacDougall, M. Dental cells express factors that regulate bone resorption. *Molecular Cell Biology Research Communications* 2000; 3: 145-152.

Raisz, L.G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *Journal of Clinical Investigation* 2005; 115: 3318-3325.

Roodman, G.D. Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocrine Reviews* 1996; 17: 308-332.

Sakata, M., Shiba, H., Komatsuzawa, H., Fujita, T., Ohta, K., Sugai, M., Suginaka, H., Kurihara, H. Expression of osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory actor) in cultures of human dental mesenchymal cells and epithelial cells. *Journal of Bone Mineral Research* 1999; 14: 1486-1492.

Samandari, F., Mai, JK. Curriculum Funktionelle Anatomie für Zahnmediziner, *Band I. Quintessenz, Berlin* 1995; 222-229.

Schoppet, M., Henser, S., Ruppert, V., Stubig, T., Al-Fakhri, N., Maisch, B., Hofbauer, L.C. Osteoprotegerin expression in dendritic cells increases with maturation and is NF- κ B-dependent. *Journal of Cell Biochemistry* 2007; 100: 1430-1439.

Schou, S., Holmstrup, P., Stoltze, K., Hjorting-Hansen, E. & Kornman, K.S. Ligature-induced marginal inflammation around osseointegrated implants and ankylosed teeth. Clinical and radiographic observations in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Clinical Oral Implants Research* 1993; 4: 12-22.

Seifert, G., Miehke, A., Haubrich, J. Chilla, R. *Speicheldrüsenkrankheiten. Thieme* 1984, Stuttgart: 8-164.

Shiba, H., Nakanishi, K., Sakata, M., Fujita, T., Uchida, Y., Kurihara, H. Effects of ageing on proliferative ability, and the expressions of secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC) and osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human periodontal ligament cells. *Mechanisms of Ageing and Development* 2000; 117: 69-77.

Silness, J., Løe, H. Periodontal disease in pregnancy. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontologica Scandinavica* 1964; 22: 122-135.

Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Lüthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R., Amgen EST Program, Boyle, W.J. Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89: 309-319.

Skapski, H. & Lehner, T. A crevicular washing method for investigating immune components of crevicular fluid in man. *Journal of Periodontal Research* 1976; 11: 19-24.

Stoller, N.H., Karras, D.C., Johnson, L.R. Reliability of crevicular fluid measurements taken in the presence of supragingival plaque. *Journal of Periodontology* 1990; 61: 670-673.

Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M.T., Martin, T.J. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine Reviews* 1999; 20: 345-357.

Sueda, T., Bang, J. & Cimasoni, G. Collection of gingival fluid for quantitative analysis. *Journal of Dental Research* 1969; 48: 159.

Suido, H., Zambon, J. J., Mashimo, P. A., Dunford, R. & Genco, R. J. Correlations between gingival crevicular fluid enzymes and the subgingival microflora. *Journal of Dental Research* 1988; 67: 1070-1074.

Takayanagi, H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *Journal of Molecular Medicine* 2005; 83: 170-179.

Tan, K.B., Harrop, J., Reddy, M., Young, P., Terrett, J., Emery, J., Moore, G., Truneh, A. Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Gene* 1997; 204: 35-46.

Tanaka, Y., Abe, M., Hiasa, M., Oda, A., Amou, H., Nakano, A., Takeuchi, K., Kitazoe, K., Kido, S., Inoue, D., Moriyama, K., Hashimoto, T., Ozaki, S., Matsumoto, T. Myeloma cell-osteoclast interaction enhances angiogenesis together with bone resorption: a role for vascular endothelial cell growth factor and Osteopontin. *Clinical Cancer Research* 2007; 13: 816-823.

Teitelbaum, S.L. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289: 1504-1508.

Teitelbaum, S.L. Osteoclasts; culprits in inflammatory osteolysis. *Arthritis Research & Therapy*. 2006; 8: 201-208.

Teng, Y., Nguyen, H., Gao, X., Kong, Y.Y., Gorczynski, R.M., Singh, B., Ellen, R.P. & Penninger, J.M. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *Journal of Clinical Investigation* 2000; 106: 59-67.

Thirunavukkarasu, K., Miles, R.R., Halladay, D.L., Yang, X., Galvin, R.J., Chandrasekhar, S., Martin, T.J., Onyia, J.E. Stimulation of osteoprotegerin (OPG) gene expression by transforming growth factor- β (TGF- β): Mapping of the OPG promoter region that mediates TGF- β effects. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 36241-36250.

Thirunavukkarasu, K., Halladay, D.L., Miles, R.R., Yang, X., Galvin, R.J., Chandrasekhar, S., Martin, T.J., Onyia, J.E. The osteoblast-specific transcription factor *cbfa1* contributes to the expression of osteoprotegerin, a potent inhibitor of osteoclast differentiation and function. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 25163-25172.

Tomoyasu, A., Goto, M., Fujise, N., Mochizuki, S., Yasuda, H., Morinaga, T., Tsuda, E., Higashio, K. Characterization of monomeric and homodimeric forms of osteoclastogenesis inhibitory factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 245: 382-387.

Tozum, T. F., Hatipoglu, H., Yamalik, N., Gursel, M., Alptekin, N. O., Ataoglu, T., Marakoglu, I., Gursoy, U. K. & Eratalay, K. Critical steps in electronic volume quantification of gingival crevicular fluid: the potential impact of evaporation, fluid retention, local conditions and repeated measurements. *Journal of Periodontal Research* 2004; 39: 344-357.

Tsuda, E., Goto, M., Mochizuki, S.I., Yano, K., Kobayashi, F., Morinaga, T., Higashio, K. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997; 234: 137-142.

Valazza, A., Matter, J., Ogilvie, A. & Cimasoni, G. Gingival fluid, gingival inflammation, pocket depth and bone loss. *Schweizer Monatsschreiben Zahnheilkunde* 1972; 82: 824-832.

Walczak, H., Degli-Esposti, M.A., Johnson, R.S., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Boiani, N., Timour, M.S., Gerhart, M.J., Schooley, K.A., Smith, C.A., Goodwin, R.G., Rauch, C.T. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO* 1997; 16: 5386-5397.

Waldeyer, A., Mayet, A. Anatomie des Menschen, *Band II. de Gruyter, Berlin-New York* 1993: 194-195.

Wang, M.W.H., Wei, S., Faccio, R., Takeshita, S., Tebas, P., Powderly, W.G., Teitelbaum, S.L., Ross, F.P. The HIV protease inhibitor ritonavir blocks osteoclastogenesis and function by impairing RANKL-induced signaling. *Journal of Clinical Investigation* 2004; 114: 206-213.

Wolf, H.F., Rateitschak, E.M., Rateitschak, K.H. Parodontologie. *Georg Thieme, Stuttgart, New York 2004; 3. Auflage.*

Wong, B.R., Josien, R., Lee, S.Y., Sauter, B., Li, H.L., Steinman, R.M., Choi, Y. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *Journal of Experimental Medicine 1997a; 186: 2075-2080.*

Wong, B.R., Rho, J., Arron, J., Robinson, E., Orlinick, J., Chao, M., Kalachikov, S., Cayani, E., Bartlett, F.S., Frankel, W.N., Young Lee, S., Choi, Y. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-jun N-terminal kinase in T cells. *Journal of Biological Chemistry 1997b; 272: 25190-25194.*

Wong, B.R., Lee, S.Y., Vologodskia, M., Steinman, R.M., Choi, Y. The TRAF family of signal transducers mediates NF- κ B activation by the TRANCE receptor. *Journal of Biological Chemistry 1998; 273: 28335-28359.*

Wong, B.R., Besser, D., Kim, N., Arron, J.R., Vologodskia, M., Hanafusa, H., Choi, Y. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Molecular Cell 1999a; 4: 1041-1049.*

Wong, B.R., Josien, R., Choi, Y. TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function. *Journal of Leukocyte Biology 1999b; 65: 715-724.*

Xu, J., Tan, J.W., Huang, L., Gao, X.H., Laird, R., Liu, D., Wysocki, S., Zheng, M.H. Cloning, sequencing, and functional characterization of the rat homologue of receptor activator of NF- κ B ligand. *Journal of Bone and Mineral Research 2000; 15: 2178-2186.*

Yamaguchi, K., Kinoshita, M., Goto, M., Kobayashi, F., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K. Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273: 5117-5123.

Yamane, T., Kunisada, T., Yamazaki, H., Nakano, T., Orkin, S.H., Hayashi, S.I. Sequential requirements for SCL/tal-1, GATA-2, macrophage colony-stimulating factor, and osteoclast differentiation factor/osteoprotegerin ligand in osteoclast development. *Experimental Hematology* 2000; 28: 833-840.

Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Mochizuki, S.-I., Yano, K., Fujise, N., Sato, Y., Goto, M., Yamaguchi, K., Kuriyama, M., Kanno, T., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): A mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998a; 139: 1329-1337.

Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinoshita, M., Mochizuki, S.-I., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N., Suda, T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 1998b; 95: 3597-3602.

Yun, T.J., Chaudhary, P.M., Shu, G.L., Frazer, J.K., Ewings, M.K., Schwartz, S.M., Pascual, V., Hood, L.E., Clark, E.A. OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. *Journal of Immunology* 1998; 161: 6113-6121.

Zafiroopoulos, G. G., Stelzel, M., Mengel, R., Flores-de-Jacoby, L. & Kolb, G. Sulcus fluid in periodontal diagnosis. A review. *Schweizer Monatsschreiben Zahnmedizin* 1991; 101: 973-985.

Zannettino, A.C., Holding, C.A., Diamond, P., Atkins, G.J., Kostakis, P., Farrugia, A., Gamble J, To, L.B., Findlay, D.M., Haynes, D.R. Osteoprotegerin (OPG) is localized to the Weibel-Palade bodies of human vascular endothelial cells and is physically associated with von Willebrand factor. *Journal of Cell Physiology* 2005; 204: 714-723.

Zauli, G., Corallini, F., Bossi, F., Fischetti, F., Durigutto, P., Celeghini, C., Tedesco, F., Secchiero, P. Osteoprotegerin increases leukocyte adhesion to endothelial cells both in vitro and in vivo. *Blood* 2007; 110: 536-543.

Zhang, J., Fu, M., Myles, D., Zhu, X., Du, J., Cao, X., Chen, Y.E. PDGF induces osteoprotegerin expression in vascular smooth muscle cells by multiple signal pathways. *FEBS Letters* 2002; 521: 180-184.

Zhang, J., Dai, J., Qi, Y., Lin, D.L., Smith, P., Strayhorn, C., Mizokami, A., Fu, Z., Westman, J., Keller, E.T. Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone. *Journal of Clinical Investigation* 2001; 107: 1235-1244.

Zhang, J.D., Cousens, L.S., Barr, P.J., Sprang, S.R. Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor, a structural homolog of interleukin-1b. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 1991; 88: 3446-3450.

Zhao, Q., Shao, J., Chen, W., Li, Y.P. Osteoclast differentiation and gene regulation. *Frontiers of Bioscience* 2007; 12: 2519-2529.

Zitzmann, N. U. & Berglundh, T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *Journal of Clinical Periodontology* 2008; 35: 286-291.

9. Abkürzungsverzeichnis

AL	Attachment Level
BNS	Bluten nach Sondieren
Cbfa-1	Core binding factor a1
CD	Cluster of differentiation
DEPC	Diethylpyrokarbonat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Enzym-gekoppelter Immunabsorptions-Assay)
GCP	Generalisierte chronische Parodontitis
GI	Gingival Index
GII	Glandulae
GR	Gingivale Rezession
IL	Interleukin
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MMP	Matrix Metalloproteinase
MW	Mittelwert
NF-kB	Nuclear factor-kB
OCIF	Osteoclastogenesis inhibitory factor
ODAR	Osteoclast differentiation and activation receptor
ODF	Osteoclast differentiation factor
OPG	Osteoprotegerin
OPGL	Osteoprotegerin-Ligand
PBS	Phosphate Buffer Solution
PGE2	Prostaglandin E2
PI	Plaque Index
RANK	Receptor activator of NF-kB
RANKL	Receptor activator of NF-kB ligand
sRANKL	soluble Receptor activator of NF-kB ligand
SF	Sulkusflüssigkeit
ST	Sondierungstiefe
Std. Abw.	Standard Abweichung
TACE	TNF-a-converting enzyme
TGF	Transforming growth factor

TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	TNF-receptor
TR-1	TNF receptor-related molecule-1
TRAF	TNF-receptor associated factor
TRANCE	TNF-related activation-induced cytokine
WHO	World Health Organization

10. Anhang

10.1 Tabellen und Abbildungen

Tab. 1: klinische Parameter

	GCP Implantate	GCP Zähne	Kontrolle
BNS	0,16 ± 0,36	0,12 ± 0,16	0,00 ± 0,00
ST	2,21 ± 1,07	2,52 ± 0,73	1,81 ± 0,32
GR	1,03 ± 0,81	0,39 ± 0,38	0,00 ± 0,00
GI	0,19 ± 0,39	0,32 ± 0,36	0,00 ± 0,00

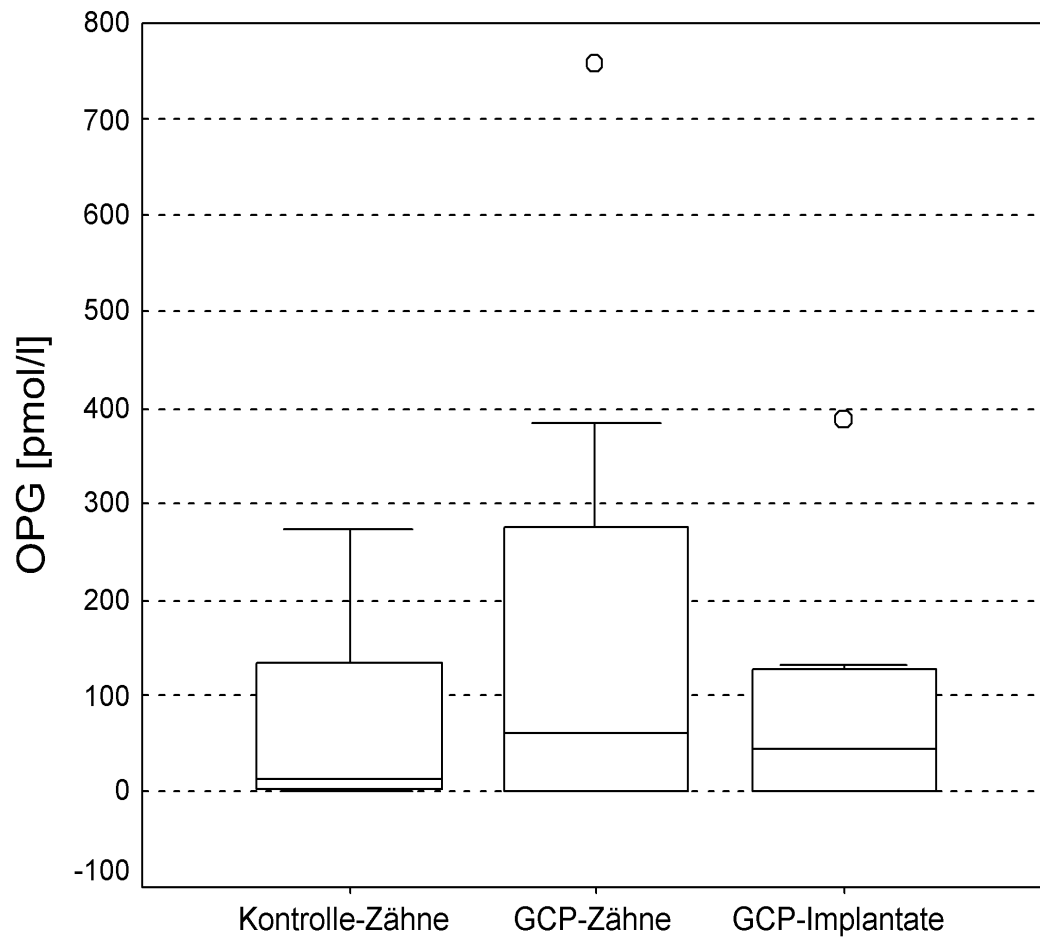
GCP, Generalisierte chronische Parodontitis; BNS, Bluten nach Sondieren; ST, Sondierungstiefen; GR, Gingivale Rezessionen; GI, Gingival Index

Tab. 2: OPG und RANKL in der Sulkusflüssigkeit

						p- Wert		
	Gruppe	N	MW	Std. Abw.	Median	GCP Zähne	GCP Implantate	
OPG	Kontrolle Zähne	7	80.657	120.328	14.170	0.805*	0.955*	
	GCP Zähne	8	195.650	284.838	61.060		0.686 [§]	
	GCP Implantate	8	92.048	131.844	45.320			
RANKL	Kontrolle Zähne	7	2.797	3.509	0.000	0.318*	0.281*	
	GCP Zähne	8	24.943	39.182	2.900		0.398 [§]	
	GCP Implantate	8	50.990	82.545	9.900			

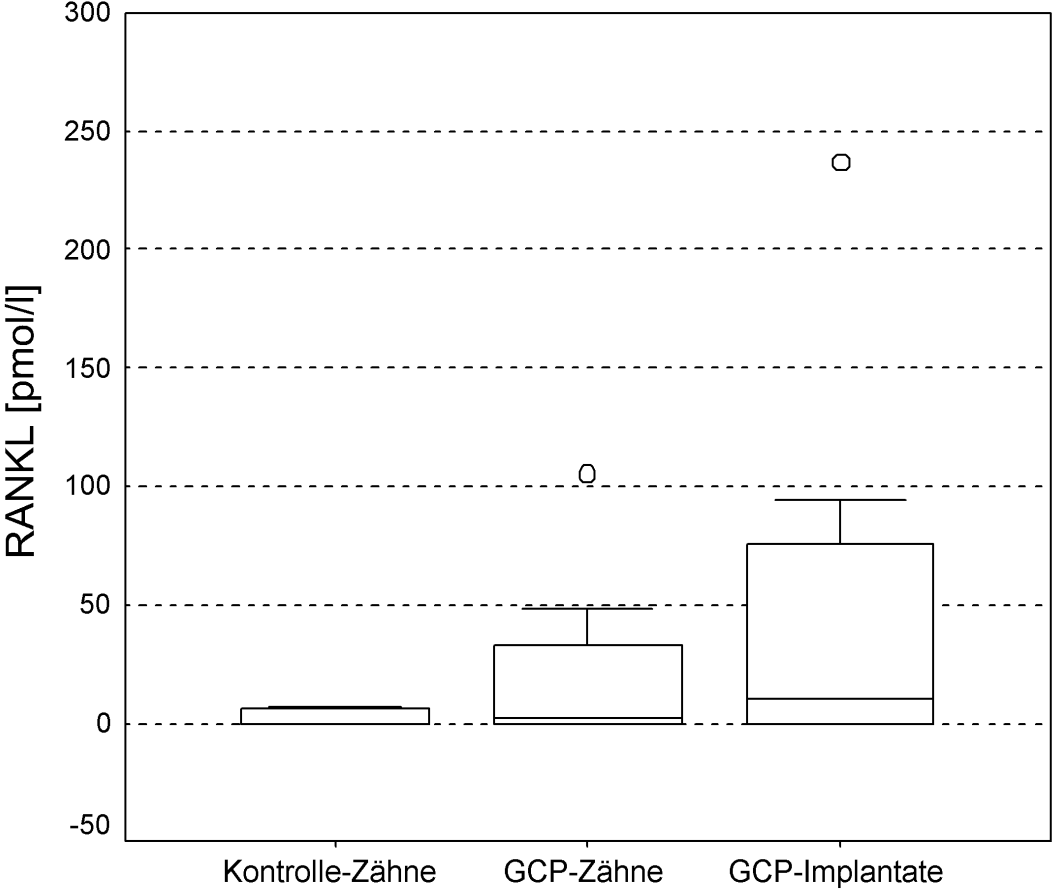
OPG, Osteoprotegerin; RANKL, Receptor Activator of NF-κB ligand; MW, Mittelwert; Std. Abw., Standardabweichung; Median, Medianwert; n, Anzahl; * p-Wert des Mann-Whitney-U-Test; [§] p-Wert des Wilcoxon-Test.

Abb. 1: OPG in der Sulkusflüssigkeit



° = Werte mit mehr als eineinhalb Boxhöhen Abstand vom oberen Rand der Box (Ausreißer)

Abb. 2: RANKL in der Sulkusflüssigkeit



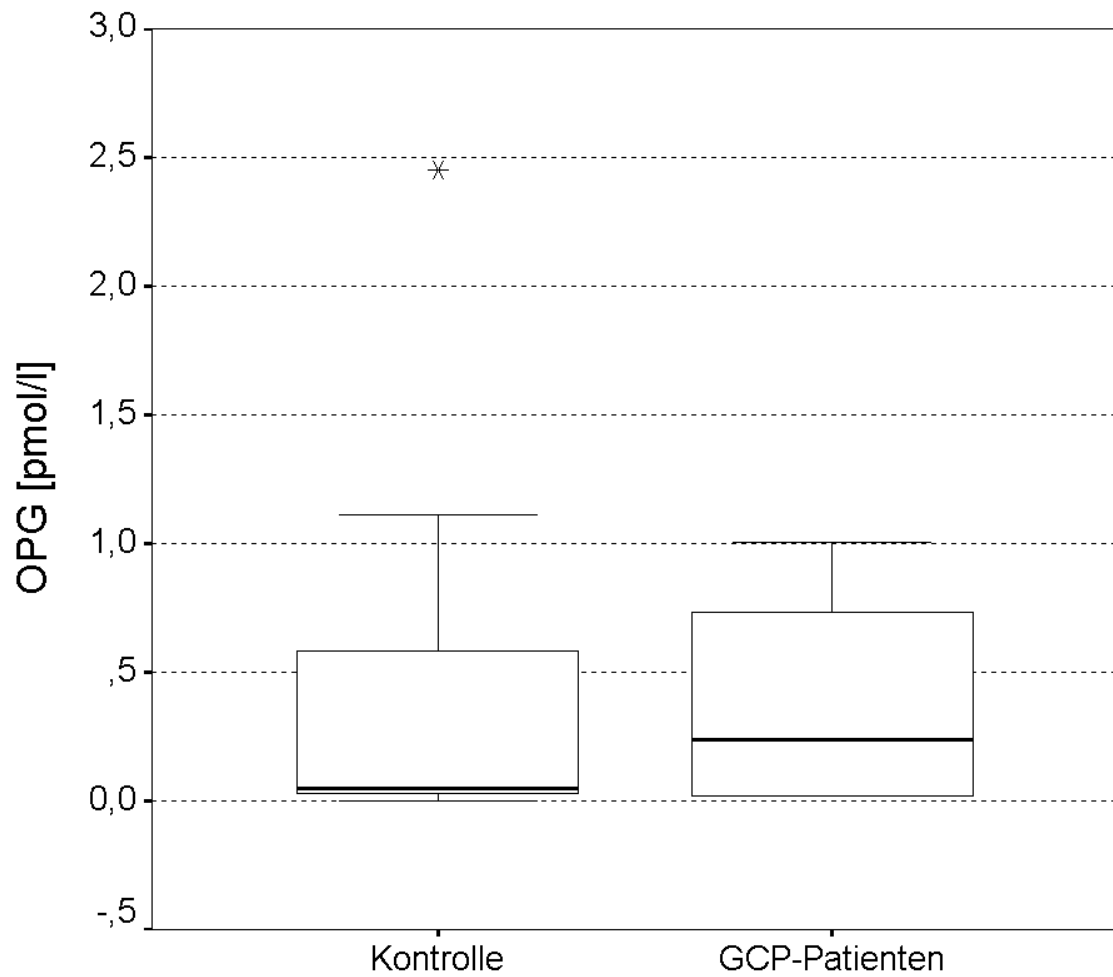
° = Werte mit mehr als eineinhalb Boxhöhen Abstand vom oberen Rand der Box (Ausreißer)

Tab. 3: OPG und RANKL im Speichel

	Gruppe	n	MW	Std. Abw.	Median	p-Wert*
OPG	Kontrolle	7	0.532	0.937	0.049	0.867
	GCP	8	0.375	0.413	0.236	
RANKL	Kontrolle	7	0.344	0.482	0.299	0.613
	GCP	8	0.141	0.096	0.159	

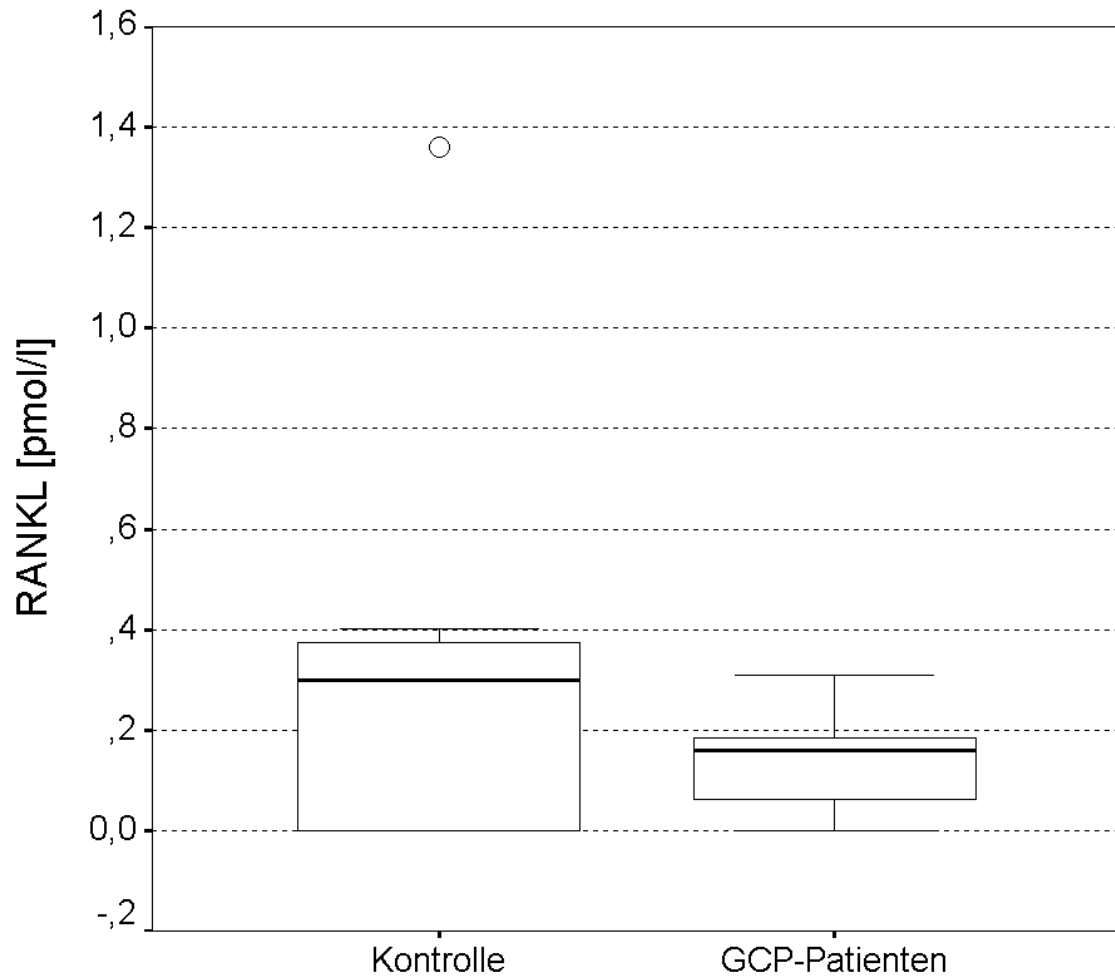
OPG, Osteoprotegerin; RANKL, Receptor Activator of NF- κ B ligand; MW, Mittelwert; Std. Abw., Standardabweichung; n, Anzahl; * p-Wert des Mann-Whitney-U-Test

Abb. 3: OPG im Speichel



* = Werte mit mehr als drei Box höhen Abstand vom oberen Rand der Box (Extremwerte)

Abb. 4: RANKL im Speichel



° = Werte mit mehr als eineinhalb Box höhen Abstand vom oberen Rand der Box (Ausreißer)

Tab. 4: Korrelationen von OPG und RANKL

Sulkus		Speichel		Klinische Parameter			
		OPG	RANKL	ST	BNS	GR	GI
OPG	R	0.447	-0.505	-0.250	-0.116	-0.222	-0.673
	p-Wert*	0.109	0.066	0.390	0.694	0.632	0.097
RANKL	R	0.405	0.052	0.160	0.171	-0.559	0.182
	p-Wert*	0.151	0.860	0.584	0.560	0.192	0.696
Speichel							
OPG	R			-0.097	0.154	0.263	-0.699
	p-Wert*			0.732	0.585	0.528	0.054
RANKL	R			-0.139	0.055	-0.024	0.036
	p-Wert*			0.622	0.847	0.955	0.933

* p-Wert des Tests auf $r=0$; R, Korrelationskoeffizient

RANKL, Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand; OPG, Osteoprotegerin, ST, Sondierungstiefen; BNS, Blüten nach Sondieren; GR, Gingivale Rezessionen; GI, Gingival Index

10.2 Verzeichnis Akademischer Lehrer

Meine Akademischen Lehrer in Marburg waren folgende Damen und Herren Professoren und Privatdozenten:

Aumüller, Austermann, Coca, Dibbets, Feuser, Flores-de-Jacoby, Gente, Holzheidt, Höffken, Jablonski-Momeni, Lehmann, Lill, Löffler, Lotzmann, Mengel, Mittag, Neff, Pieper, Ramaswamy, Stachniss, Stoll, Stelzel, Suske, Umstadt, Weihe, Werner, Westermann

10.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Mengel. Vielen Dank für die Überlassung des Themas, sowie die freundliche Unterstützung und konstruktive Hilfe bei der Anfertigung dieser Dissertation.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hofbauer für die freundliche und fachliche Zusammenarbeit bedanken.

Weiterhin möchte ich Herrn Diplom Mathematiker J. Reitze für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten danken.

Ohne die Mitwirkung der oben genannten Personen, hätte diese Arbeit nicht in der vorliegenden Form erstellt werden können.