

**Akuttresseffekte auf die lokale Entzündungsregulation
am Modell der Gingivitis:
Der Entzündungszustand als moderierende Variable**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors biol. hom.
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von
Ulrike Weik
Giessen 2009

**Aus dem Institut für Medizinische Psychologie
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH,
Standort Gießen**

Leitung: Frau Prof. Dr. Renate Deinzer

Betreuerin: Frau Prof. Dr. Renate Deinzer

- 1. Gutachterin:** Frau Prof. Dr. Renate Deinzer
- 2. Gutachter:** Herr Prof. Dr. Holger Hackstein

Tag der Disputation: 28.05.2010

1	Theoretischer Hintergrund.....	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Stress	3
1.3	Die Entzündungsreaktion	5
1.3.1	Zytokine - die Regulatoren einer Entzündungsreaktion	6
	1.3.1.1 Interleukin-1 β	9
	1.3.1.2 Interleukin-8.....	10
1.3.2	Chronisch entzündliche Erkrankungen und Immunregulation	11
1.3.3	Aktuelle Entwicklungen in der Erforschung der Entzündungsregulation	13
1.4	Stress und Entzündung	15
1.4.1	Moderatoren von Stresswirkungen auf die Entzündungsreaktion	17
	1.4.1.1 Akutstresseffekte auf Immun- bzw. Entzündungsparameter beim Menschen	18
	1.4.1.2 Lokal vs. systemisches Entzündungsgeschehen - Die Bedeutung der Analyse lokaler Entzündungsparameter.....	20
	1.4.1.3 Zeitpunkt des Zusammentreffens von Stress und Entzündungsreaktion.....	22
1.5	Stresseffekte auf lokale Entzündungsprozesse am Modell der plaque- assoziierten Gingivitis.....	26
1.5.1	Ätiopathogenese von Gingivitiden und Parodontiden.....	26
1.5.2	Experimentelle Gingivitis.....	27
1.5.3	Analyse der lokalen Immunantwort im Sulkus-Fluid des Sulkus Gingivalis.....	28
1.5.4	Befundlage zu Stress und Parodontalerkrankungen	30
1.6	Fragestellung.....	32
2	Empirische Studien.....	36
2.1	Allgemeine Methoden.....	37
2.1.1	Studienteilnehmer	37
	2.1.1.1 Einschlusskriterien	37
	2.1.1.2 Ausschlusskriterien	37
2.1.2	Unabhängige Variable: Gingivaler Entzündungszustand.....	38
	2.1.2.1 Experimentelle Gingivitis	38
	2.1.2.2 Chronische Gingivitis	39
2.1.3	Abhängige Variablen: sulkuläres IL-1 β und sulkuläres IL-8	40
2.1.4	Kontrollvariablen: klinische Entzündungszeichen	41
2.1.5	Statistische Datenanalyse.....	42

2.1.6	Ethik.....	42
2.2	Studie 1 – experimentelle vs. chronische Gingivitis.....	43
2.2.1	Spezifische Methoden Studie 1	43
2.2.1.1	Probanden.....	43
2.2.1.2	Untersuchungsablauf.....	43
2.2.1.3	Statistische Datenanalyse	44
2.2.2	Ergebnisse Studie 1	45
2.2.2.1	Unterschiede zwischen experimenteller und chronischer Gingivitis am Ende der vierwöchigen Untersuchungsperiode	45
2.2.2.2	Analyse von Veränderungen über die Zeit bei experimenteller und chronischer Gingivitis.....	49
2.2.3	Diskussion Studie 1	51
2.3	Studie 2 - Entzündungszustand als Moderator der immunologischen Stressreaktion.....	55
2.3.1	Spezifische Methoden Studie 2	55
2.3.1.1	Probanden.....	55
2.3.1.2	Unabhängige Variable: Stress- vs. Ruhebedingung.....	55
2.3.1.3	Kontrollvariablen: Stimmung, Speichelcortisol, Sulkus-Fluid-Volumen	58
2.3.1.4	Untersuchungsablauf.....	59
2.3.1.5	Statistische Datenanalyse.....	59
2.3.2	Ergebnisse Studie 2	61
2.3.2.1	Kontrollvariablen	61
2.3.2.2	Stressinduzierte Veränderungen von sulkulärem IL- β und IL-8.....	67
2.3.3	Diskussion Studie 2	72
2.4	Studie 3 - Akutstresseffekte bei chronischer Gingivitis	75
2.4.1	Spezifische Methoden Studie 3	75
2.4.2	Ergebnisse Studie 3	76
2.4.2.1	Kontrollvariablen	76
2.4.2.2	Stressinduzierte Veränderungen von sulkulärem IL-1 β und IL-8.....	77
2.4.3	Diskussion Studie 3	80
3	Gesamtdiskussion und Ausblick.....	82
4	Literaturverzeichnis	89

Anhang

Erklärung, Abkürzungsverzeichnis, Zusammenfassungen, Publikationen, Deskriptive Statistiken

1 Theoretischer Hintergrund

1.1 Einleitung

Chronisch entzündliche Prozesse gelten heute als wichtiger immunpathogenetischer Faktor bei einer Vielzahl von Erkrankungen, darunter Atherosklerose, Rheumatoide Arthritis, Colitis Ulcerosa, Morbus Crohn, Allergien, Asthma, verschiedene neurodegenerative Erkrankungen wie Multiple Sklerose, Krebs, etc. (Akiyama et al., 2000; Agarwal & Marshall, 2001; Black, 2003; Mercado et al., 2003; Kay & Calabrese, 2004; Brück, 2005; Swaab et al., 2005; Agarwal et al., 2006; Libby, 2006). Entsprechend rückt das genauere Verständnis der Regulation entzündlicher Prozesse ins Zentrum des Forschungsinteresses. Psychosoziale Faktoren, z. B. Stress, gelten dabei als potentielle Moderatoren einer entzündlichen Immunantwort (Black & Garbutt, 2002; Agarwal & Marshall, 2001; Black, 2003; Schwartz et al., 2003; Mawdsley & Rampton, 2005; Agarwal et al., 2006; Bernstein et al., 2006; Mohr & Pelletier, 2006; Straub & Cutolo, 2006; Kern & Ziemssen, 2008). Die Befundlage ist jedoch nicht konsistent und die Studienergebnisse zumindest teilweise widersprüchlich. Nach wie vor werden diese Zusammenhänge vorwiegend tierexperimentell und / oder *in vitro* untersucht, zumeist werden dabei systemische Immun- bzw. Entzündungsmediatoren analysiert. Entzündungsprozesse, die chronifizieren können, stellen jedoch zunächst ein auf lokales Gewebe begrenztes Geschehen dar (Tracey et al., 2002; Hopkins, 2007, Rosas-Ballina & Tracey, 2009). Im Humanbereich werden in experimentellen *in vivo* Studien zudem häufig gesunde Probanden und ihre systemische Reaktion auf einen akuten psychologischen Stressor untersucht, d. h. es liegt kein Entzündungsgeschehen vor. Demnach scheint die Validität dieser Studien hinsichtlich der Untersuchung von Stresseffekten auf entzündliche Prozesse in mehreren Bereichen eingeschränkt.

Ein Forschungsmodell, welches erlaubt lokale Entzündungsprozesse unter ethisch vertretbaren und unter ökologisch validen Bedingungen im Humanexperiment *in vivo* zu erfassen, ist die plaqueinduzierte Gingivitis, d.h. die Zahnfleischentzündung. Eine Gingivitis kann experimentell induziert werden, beim Menschen durch Unterlassung der

Mundhygiene (Løe et al., 1965). Deinzer und ihre Arbeitsgruppe zeigten in mehreren Arbeiten, dass ein mittelfristiger psychischer Stressor zu Veränderungen der lokalen Entzündungsreaktion mit einer stärkeren proinflammatorischen Auslenkung führt (Deinzer et al., 1999; 2000a, 2004a, b; Waschul et al., 2003). Die Ergebnisse dieser Arbeiten, die zeitliche Verläufe einer lokalen Entzündungsreaktion erfassen, zeigen, dass Stress zu einer stärker ausgeprägten lokalen Entzündungsreaktion führt. Weiterhin weisen die Befunde darauf hin, dass die Art bzw. Stärke dieser proinflammatorischen Auslenkung variiert und zwar in Abhängigkeit vom Zeitpunkt, zu welchem Stressor und Entzündungsreaktion (in ihrem Verlauf) zusammentreffen. Dies steht im Einklang mit anderen Studienergebnissen, die Stresseffekte auf Entzündungsprozesse in ihren zeitlichen, dynamischen Aspekten untersuchten (siehe Sorrels & Sapolsky, 2007).

Die vorliegende Arbeit untersucht den moderierenden Einfluss des Entzündungszustands (z. B. kurzzeitig bzw. akut vs. chronisch) auf Akutstresseffekte auf die lokale, d. h. gingivale Entzündungsreaktion und vergleicht dabei messwiederholt zwei verschiedene Entzündungszustände (akut entzündetes und chronisch entzündetes Gewebe). Als Abhängige Variable werden klinische Entzündungszeichen einer lokalen (gingivalen) Entzündung, d. h. einer Gingivitis, sowie zwei proinflammatorische Zytokine (Interleukin-1 β und Interleukin-8) erfasst.

1.2 Stress

Der Begriff Stress ist einerseits ein alltagssprachlicher Begriff, der fast inflationäre Anwendung findet, zugleich ist er ein wissenschaftlicher Fachbegriff, der ausgehend von der Physik mittlerweile in den Natur und Humanwissenschaften weite Verbreitung erfährt. Entsprechend vielgestaltig sind auch die Fachdefinitionen von Stress, die zudem noch dadurch erschwert werden, dass Stress eher *pars pro toto* für ein dynamisches Geschehen steht, als für einen einzelnen, klar definierbaren Zustand. Stress kann sowohl für eine von außen einwirkende Belastung stehen als auch für die interne Repräsentation dieser Belastung oder für die Reaktion auf die Belastung (s. Nitsch, 1981; Deinzer, 2002).

Welcher dieser Betrachtungswinkel im Vordergrund steht und was demnach im jeweiligen Forschungskontext unter Stress verstanden wird, hängt von der zentralen Fragestellung ab. Grob können drei Forschungsstränge unterschieden werden.

Beim **situationsorientierten** Ansatz geht es insbesondere darum, Situationen oder Ereignisse zu identifizieren, die im Allgemeinen als stresshaft interpretiert bzw. wahrgenommen werden. Stress liegt in diesem Ansatz dann vor, wenn eine bestimmte Stressreaktion ausgelöst wird. Der **transaktionale** Ansatz, auf der anderen Seite, analysiert welche inneren Verarbeitungsprozesse dazu führen, dass ein Ereignis als Stress interpretiert wird (Lazarus & Launier, 1978). Stress ist hier ein innerer Zustand des Organismus, dessen Vorliegen erneut über die Stressreaktion beobachtbar wird. Ein dritter, **reaktionsorientierter** Ansatz, ist an den Reaktionen selbst interessiert, die durch ein *a priori* als stresshaft definiertes Ereignis, einen Stressor, ausgelöst werden. Von Stress ist hier also die Rede, wenn der Organismus mit einem Stressor konfrontiert wird (zur Unterscheidung der drei Forschungsstränge siehe vertiefend Nitsch, 1986; Deinzer, 2002). Die vorliegende Arbeit verfolgt einen solchen reaktionsorientierten Forschungsansatz, wenn sie auf immunologischer Ebene körperliche Veränderungen infolge der Applikation eines etablierten akuten Laborstressors untersucht.

Die vorliegende Arbeit steht damit in der Tradition psychoneuroimmunologischer Forschung. Sie interessiert sich für die Wirkungen psychischer Belastungen auf die Immunreaktion, genauer auf Parameter der Entzündungsregulation. Eine solche Forschung erhält dort Bedeutung, wo eine wachsende Anzahl von Publikationen Zusammenhänge zwischen psychischen Belastungen und entzündlichen Erkrankungen zeigen (Black & Garbutt, 2002; Mawdsley & Rampton, 2005; Straub et al., 2005; Agarwal et al., 2006; Kern & Ziemssen, 2008). Ein wichtiges Forschungsziel der Psychoneuroimmunologie besteht darin, die physiologischen Vorgänge, die für diese Zusammenhänge verantwortlich sein können, besser zu verstehen. Genau diesem Ziel verschreibt sich auch die vorliegende Arbeit, die einen bislang noch wenig beleuchteten Aspekt fokussiert: die Effekte psychischer Belastung auf *lokale* Entzündungsregulationsvorgänge *in vivo* beim Menschen.

Zum besseren Verständnis wird nachfolgend die Entzündungsreaktion an sich dargestellt und die diesbezüglich bedeutende Rolle bestimmter Entzündungsmediatoren, der Zytokine, hinsichtlich Auslenkung und Stärke einer Entzündungsreaktion erläutert. Wenn nicht anders gekennzeichnet, beruft sich diese Darstellung auf gängige aktuelle Lehrbuchliteratur (Murphy et al., 2008, Straub et al., 2006; Schütt & Bröker, 2006).

1.3 Die Entzündungsreaktion

Komplexe Organismen weisen verschiedene Abwehrlinien gegen Noxen, d. h. schädliche Reize (Infektionen mit mikrobiellen Erregern, Verletzungen, chemische, physikalische, psychische Reize) auf. Das angeborene und das adaptive Immunsystem stellen solche Abwehrlinien dar (Medzhitov & Janeway, 2000; Cone, 2001). Reagiert das Immunsystem zum ersten Mal auf eine Noxe, so geschieht das zunächst über die primäre Immunantwort. Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems eliminieren das Problem innerhalb weniger Stunden und unmerklich für die bewusste Wahrnehmung des Organismus. Diese Effektormechanismen bestehen auf zellulärer Ebene hauptsächlich aus sich im Gewebe befindlichen Makrophagen, die je nach Gewebe teilweise leicht unterschiedliche Eigenschaften zeigen, was zu verschiedenen Bezeichnungen geführt hat (z. B. Kupffer-Zellen der Leber, Mikrogliazellen des Gehirns oder Langerhans-Zellen der Haut). Es findet sich mehr oder weniger immer eine größere Anzahl ortsansässiger Makrophagen in den Geweben. Ihre Vorläufer, die Monozyten hingegen finden sich eher in der Zirkulation, aus der sie ins Gewebe einwandern können, um dort zu Makrophagen zu differenzieren. Über entsprechende Rezeptoren (z. B. Toll-like Rezeptoren) erkennen diese Zellen verschiedene pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP), die vielen mikrobiellen Erregern gemeinsam sind (Medzhitov & Janeway, 1997; Akira et al., 2001). Ein Antigen wird somit erkannt und phagozytiert. Ist die primäre Immunantwort nicht ausreichend, um die Gefahr zu beseitigen, setzt die angeborene Immunität eine Entzündungsreaktion in Gang. Lokale Zellen (z. B. Epithelzellen und v. a. auch unspezifische Immunzellen wie Makrophagen, im weiteren Verlauf auch zunehmend neutrophile Granulozyten) fordern Unterstützung an, indem sie eine Reihe von Entzündungsmediatoren wie z. B. proinflammatorische Lipidmediatoren (z. B. Prostaglandine, Leukotriene), proinflammatorische Zytokine (z. B. Interleukine, Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α)) und proinflammatorische Chemokine (z. B. IL-8) freisetzen. Dies führt zunächst zur Weitung von Blutgefäßen des betroffenen Gewebes mit erhöhter lokaler Durchblutung sowie zu verlangsamtem Blutstrom. Weiter induzieren diese Vorgänge Zelladhäsion, Diapedese und Chemotaxis, d. h. es kommt zur Extravasation von Immunzellen aus dem Blutstrom in das

betroffene Gewebe. Klinisch ist dieser Prozess gekennzeichnet durch die Hauptmerkmale einer Entzündung: rubor (Röte), calor (Hitze), tumor (Schwellung) und dolor (Schmerz).

Weiter aktivieren Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems parallel das adaptive Immunsystem. Antigenpräsentierende Zellen (APCs), d.h. verschiedene lokal ansässige dendritische Zellen, Makrophagen oder andere phagozytierende Zellen migrieren in die Lymphknoten zur T-Zellaktivierung. T-Zellen werden zunächst nach den von ihnen exprimierten Oberflächenmolekülen (CD4 bzw. CD8) unterschieden. Die CD8⁺T-Zelle hat zytotoxische Eigenschaften und kann infizierte Zellen abtöten. CD4⁺T-Zellen, die T-Helferzellen (TH-Zellen), haben die Aufgabe, eine eingeleitete Entzündungsreaktion zu optimieren. Eine zunächst „naive“ CD4⁺T-Zelle differenziert in Abhängigkeit der bei der Aktivierung vorhandenen Signale auf unterschiedliche Art und Weise. Dies führt zu unterschiedlichen Eigenschaften und Funktionen wie z. B. Verstärkung der primären Entzündungsreaktion oder Aktivierung von B-Zellen. Eine dementsprechende Unterscheidung der TH-Zellen erfolgt hauptsächlich nach dem von diesen Zellen freigesetzten Zytokinspektrum. Aus tierexperimentellen Beobachtungen heraus entstand z. B. das TH1/TH2-Paradigma (Mosman et al., 1986; siehe unten). Diesbezüglich leitende und regulierende Signalfunktion für die TH-Differenzierung haben kostimulierende Faktoren bei der Antigenpräsentation und vor allem das „Zytokinmilieu“, welches während der angeborenen Sequenzen einer Entzündungsreaktion entsteht (Medzhitov & Janeway, 2000; Trinchieri, 2003).

1.3.1 Zytokine - die Regulatoren einer Entzündungsreaktion

Eine Reihe von Immunmediatoren wird allgemein unter dem Begriff „Zytokine“ subsumiert. Es handelt sich dabei um lösliche Polypeptide mit Signalfunktion primär für das Immunsystem aber auch für andere Körpersysteme. Sie werden vorwiegend von Immunzellen aber auch von anderen Körperzellen (z. B. Epithelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten) produziert und freigesetzt. Sie können in verschiedene Unterklassen unterteilt werden, wie z. B. Interferone, Interleukine, Chemokine, koloniestimulierende

Faktoren und Wachstumsfaktoren. Zu wesentlichen Teilen agieren sie lokal in auto- bzw. parakriner Form, unter bestimmten Bedingungen auch endokrin. In jedem Fall ist ihre Wirkung von der Bindung an membranständige Rezeptoren an anderen Zellen bzw. an lösliche Zytokinrezeptoren abhängig. Die zytokininduzierte Aktivierung von Immunzellen variiert dabei mit dem Zytokinmuster oder „Zytokincocktail“, den die Zellen empfangen. Die so aktivierten Zellen reagieren mit der Produktion weiterer löslicher Mediatoren, die je nach Zusammensetzung und Konzentrationen der Cocktailzutaten exzitatorischen oder inhibitorischen Signalcharakter für weitere Effektormechanismen besitzen. In ihrem Zusammenspiel wirken Zytokine pleiotrop, redundant, synergistisch oder auch antagonistisch. Ihnen kommt eine besondere Rolle bei der Kontrolle und Koordination einer Immunantwort zu. Dabei bestimmt offensichtlich das im lokalen Mikromilieu vorherrschende Zytokinspektrum maßgeblich die Richtung, Stärke und Dauer einer Entzündungsreaktion.

Zur Zytokinfreisetzung kommt es zunächst im Zuge der unspezifischen / angeborenen Immunantwort. Bereits hier kann das Zytokinspektrum eher entzündungsfördernd (proinflammatorisch) oder entzündungshemmend (antiinflammatorisch) sein. Die Richtung hängt hierbei vom Antigenprofil bzw. der PAMP-Struktur ab und der dadurch erfolgenden Aktivierung entsprechender Rezeptoren der Zellen der unspezifischen Immunantwort. Dabei produzieren Monozyten / Makrophagen, neutrophile Granulozyten und NK-Zellen z.B. vorwiegend proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , Chemokine wie IL-8, MIP-1 oder MIF und Interferone wie IFN- γ . Mastzellen, eosinophile Granulozyten produzieren dagegen eher antiinflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-10 oder TGF¹.

Der im Zuge der unspezifischen Immunantwort freigesetzte Zytokincocktail bestimmt in der Folge mit, welche Zellpopulationen im Verlauf der adaptiven Immunantwort besonders

¹ Der Korrektheit halber muss hier erwähnt werden, dass die allseits übliche Unterteilung von Zytokinen in pro- und antiinflammatorische Zytokine vereinfachend ist. Abhängig von einer Reihe von Faktoren kann ein einzelnes Zytokin einmal pro- und ein andermal antiinflammatorische Eigenschaften annehmen (Cavaillon, 2001). Der Übersichtlichkeit halber und weil die Einteilung in pro- vs. antiinflammatorisch die Hauptfunktion der betreffenden Zytokine skizziert, wird sie im Folgenden dennoch beibehalten.

in Erscheinung treten (TH1, TH2, TH17, B-Zellen, etc.). Je nachdem, welche dies sind, kommt es wiederum zur Freisetzung bestimmter Zytokinmuster, die ebenfalls grob in pro- und antiinflammatorisch wirksame Muster unterschieden werden können. Antigenprofile bakterieller und viraler Erreger führen beispielsweise in der unspezifischen Immunantwort zu einer starken Freisetzung von IL-12 durch die antigenpräsentierende Zelle (APC). Dies gilt als ein zentraler Trigger für die Ausbildung einer durch TH1-Zellen dominierten adaptiven Immunreaktion. Die durch TH1-Zellen freigesetzten Zytokine (insb. IL-2, IFN- γ , TNF- α) wirken proinflammatorisch (Trinchieri, 2003) und fördern ihrerseits wiederum die Freisetzung weiterer proinflammatorisch wirksamer Zytokine (z.B. IL-1 β , IL-8, TNF- α) durch Immunzellen der unspezifischen Immunität (z. B. NK-Zellen, Makrophagen, Neutrophile).

Im Gegensatz zu Bakterien oder Viren führt das Antigenprofil von Parasiten oder toxischer Substanzen zur erhöhten Ausschüttung von IL-4 durch die APC, was die Ausprägung einer TH2-Antwort wahrscheinlich macht. In deren Folge kommt es zu vermehrter Freisetzung von z. B. IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 (Fearon & Locksley, 1996; Agarwal & Marshall, 2001; Diehl & Rincon, 2002; Trinchieri, 2003). Hierdurch kommt es zur Aktivierung von B-Zellen (neben den T-Zellen der zweite große Arm des adaptiven Immunsystems) mit zunehmender Bildung spezifischer Antikörper. Auch durch die B-Zellen werden Zytokine freigesetzt, die wiederum in die Entzündungsregulation eingreifen können.

Eine weitere für die Entzündungsregulation beim Menschen zentrale Zellgruppe sind die TH17 Zellen. Für diese erst in jüngerer Zeit genauer untersuchten T-Zellgruppe spielt die Freisetzung immunregulatorisch und proinflammatorisch wirksamer Zytokine wie z.B. IL-23, IL-17, IL-6, IL-1 β und TGF- β eine Rolle (Boniface et al., 2008; McGeachy & Cua, 2008; Gaffen & Hajishengallis, 2008). Eine proinflammatorische oder antiinflammatorische Auslenkung einer Immunantwort hängt von der aktuellen Balance der verschiedenen an der Immunreaktion beteiligten Zellpopulationen und den durch sie freigesetzten Zytokinprofilen ab. TH1- und TH2-Reaktionen scheinen sich beispielsweise gegenseitig zu hemmen und damit auch zu regulieren.

Es ist also das komplexe Wechselspiel der an der Immunantwort beteiligten Zellen und Zytokine, das darüber entscheidet, ob, in welchem Ausmaß und für welchen Zeitraum ein Reiz eine Entzündungsreaktion auslöst. Eine Disbalance der verschiedenen Komponenten wird dabei als wesentlicher Faktor für immunpathogenetische Prozesse angesehen, zu denen eine Reihe von chronisch entzündlichen Erkrankungen zählen (Maggi, 1998; Akahoshi et al., 1999; Schulze-Koops et al., 2001). Bevor hierauf das nächste Kapitel näher eingeht, werden die in der vorliegenden Arbeit untersuchten proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-8 etwas genauer beschrieben:

1.3.1.1 Interleukin-1 β

IL-1 β gilt als multifunktionelles Zytokin mit starken proinflammatorischen Eigenschaften. Es wird sehr stark mit entzündlicher Gewebsschädigung in Verbindung gebracht und ist auch bekannt als der stärkste osteoklastenaktivierende Faktor im menschlichen Organismus (Dewhirst et al., 1985; Dinarello, 1996, 1998). In der Blutbahn findet sich unter normalen Umständen kein IL-1 β , es agiert primär lokal. Unter entzündlichen Bedingungen allerdings fördert IL-1 β systemische Entzündungsreaktionen wie z. B. die Akute-Phase-Reaktion mit Freisetzung entsprechender Proteine wie CRP aus der Leber und induziert Fieber. IL-1 β entfaltet seine Wirkung häufig zusammen mit anderen Zytokinen. Als die Hauptquellen von IL-1 β gelten Makrophagen / Monozyten, Neutrophile, B-Zellen, und auch Endothel- und Epithelzellen setzen IL-1 β frei. Durch die Freisetzung von IL-1 β wird die Prostaglandin- und Leukotriensynthese gefördert. Weiterhin stimuliert es die Proliferation von T- und B-Lymphozyten. Zusammen mit TNF- α induziert IL-1 β die Expression von Adhäsionsmolekülen und fördert somit die Extravasation von Zellen sowie die Freisetzung von IL-8 (Ishikawa & Miyazaki, 2005; Haringman et al., 2005; Baggiolini & Clark-Lewis, 1992). Aufgrund der potentiell schädigenden Effekte von IL-1 β auf den Organismus wird seine Aktivität streng kontrolliert. Zu den körpereigenen Blockademechanismen gehört z. B. der IL-1 Rezeptorantagonist (IL-1RA), der eine Bindung von IL-1 β an entsprechende Zellrezeptoren verhindert (Lennard, 1995). IL-1 β wird bei einer Vielzahl chronisch entzündlicher Erkrankungen (neurodegenerative Erkrankungen, Atherosklerose,

Parodontitis, usw.) als pathogenetischer Faktor angesehen (Griffin, 2006; Tansey et al., 2007; McMahon & Hahn, 2007; Church et al., 2008; Elenkov et al., 2008;).

1.3.1.2 Interleukin-8

IL-8 ist ein Chemokin (Baggiolini, 1989). Chemokine bilden genaugenommen eine Unterform der Zytokine. Ihre Besonderheit liegt in ihren chemotaktischen Eigenschaften, die ihre bedeutende Rolle hinsichtlich der Verteilung von Immunzellen innerhalb des Körpers ausmachen. Sie stellen maßgebliche Regulatoren entzündlicher Prozesse dar, indem sie die Migration von Immunzellen ins betroffene Gewebe fördern und die Zellextravasation induzieren. Entsprechend tragen sie deutlich zur Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrats bei (Rollins, 1997; Baggiolini, 1998). Dysregulierte Chemokinfreisetzung stellt einen pathophysiologischen Mechanismus dar, der zur Entstehung von chronisch entzündlichen Erkrankungen führen kann (Baggiolini, 2001; Gerard & Rollins, 2001; Haringman et al., 2004; Charo & Ransohoff, 2006). Chemokine werden grob in zwei Klassen unterteilt: CC- und CXC-Chemokine. Sie unterscheiden sich primär dadurch, dass sie auf verschiedene Arten von Immunzellen wirken (Rollins, 1997; Haringman et al., 2004). IL-8 als typisches CXC-Chemokin hat starke proinflammatorische Eigenschaften (Bruch-Gerharz et al., 1996) mit vornehmlicher Wirkung auf Neutrophile aber auch auf andere Immunzellen, indem es diese Zellen aus der Blutbahn ins betroffene Gewebe führt (Baggiolini et al., 1995; Gerszten et al., 1999). Im Zusammenspiel mit anderen Zytokinen wirkt IL-8 entgegen der Apoptose von Neutrophilen und verlängert deren Lebenszeit (Ishikawa & Miyazaki, 2005). IL-8 wird auch mit neoplastischen Prozessen in Verbindung gebracht, was auf seine angiogenetischen Eigenschaften zurückzuführen ist (Xie, 2001; Brat et al., 2005; Strieter et al., 2005). *In vitro* Studien zeigen IL-8-assoziierte Tumorprogression z. B. bei Lungenkrebs und Melanom (Zhu et al., 2004; Huang et al., 2002). Bei einer Reihe von entzündlichen Erkrankungen finden sich erhöhte Konzentrationen von IL-8 (z. B. Atherosklerose; Simonini et al., 2000; Libby, 2006) darunter auch Gingivitis und Parodontitis (Gamonal et al., 2000, 2001; Zhang et al., 2002). Studien an tierexperimentellen Modellen zur Atherosklerose zeigen außerdem, dass IL-8-neutralisierende Antikörper die Entwicklung einer akuten Entzündung hemmen können (Mukaida et al., 1998).

1.3.2 Chronisch entzündliche Erkrankungen und Immunregulation

Chronisch entzündliche Prozesse gelten heute als zentraler pathogenetischer Faktor bei einer Vielzahl von Erkrankungen wie Atherosklerose, Rheumatoide Arthritis, Colitis Ulcerosa, Morbus Crohn, Parodontitis, Allergien, Asthma, verschiedene neurodegenerative Erkrankungen wie Multiple Sklerose und Krebs etc. (Black & Garbutt, 2002; Kinane & Lappin, 2002; Mercado et al., 2003; Kay & Calabrese, 2004; Brück, 2005; Swaab et al., 2005; Agarwal et al., 2006; Libby, 2006). Sie sind oft durch einen ähnlichen Verlauf gekennzeichnet, bei welchem stabile Krankheitsphasen unterbrochen werden und es zu Exazerbationen und/oder Progression des Krankheitszustands kommt (LeResche & Dworkin, 2002; Straub & Besedovsky, 2003).

Immunpathogenetische Faktoren, die diesen Erkrankungen zugrunde liegen, werden gerne im adaptiven Immunsystem gesucht. So wird z. B. das TH1/TH2-Konzept seit seiner Entwicklung oft zur Erklärung für viele chronisch entzündliche Erkrankungen herangezogen, bei welchen entweder die eine oder andere Subpopulation zu dominieren scheint (Agarwal & Marshall, 2001; Neurath et al., 2002; Gemmell & Seymour, 2004). Eine TH1-Dominanz mit überschießenden proinflammatorischen Reaktionen, Aktivierung zytotoxischer T-Zellen und Zellen des angeborenen Immunsystems mit vorwiegend proinflammatorischer Ausrichtung (z. B. Makrophagen, Neutrophilen, dendritische Zellen) und entsprechender Gewebsdestruktion wurde bisher z. B. bei Autoimmunerkrankungen vermutet (z. B. bei Rheumatoider Arthritis). Im Gegensatz dazu scheint eine TH2-Dominanz mit entsprechendem Zytokinprofil (IL-4, IL-5, IL-13 etc.) bei z. B. atopischen Erkrankungen zu dominieren. Diese auf der Basis von tierexperimentellen Daten gewonnenen Hypothesen zur TH1/TH2-Balance bei verschiedenen Erkrankungen scheinen allerdings der Komplexität der TH-vermittelten Immunreaktion im Humanbereich nicht gerecht zu werden (Boniface et al., 2008; McGeachy & Cua, 2008, Gaffen & Hajishengallis, 2008). Die erst seit einigen Jahren bekannten zusätzlichen TH-Zellen-Subpopulationen (z. B. TH17 oder regulatorische T-Zellen) ergänzen und modifizieren die bisherigen Annahmen über eine jeweilige TH1 oder TH2 Dominanz bei verschiedenen pathophysiologischen Zuständen. Seit der Entdeckung von IL-23 vor ca. fünf Jahren

rückte eine neue Art von TH-Zelllinie in den Vordergrund (Boniface et al., 2008), die sogenannten TH17-Zellen (nach dem von diesen Zellen freigesetzten Leitzytokin IL-17). Ihre vermutete Rolle bei entzündlichen Erkrankungen des Menschen entspricht teilweise der, die bisher einer TH1-Dominanz zugeschrieben wurde. Gerade im Hinblick auf die als autoimmun angesehene entzündlichen Erkrankungen gewinnen TH17-Zellen zunehmend an Bedeutung. Ein wesentlicher Unterschied einer durch diese Zellen dominierten Reaktion gegenüber einer TH1 dominierten Reaktion besteht darin, dass es über eine TH17-Aktivierung auch zu Aktivierung von B-Zellen kommt mit Produktion von Antikörpern. Bisher wurde eine starke Involvierung von B-Zellen eher einer TH2-Reaktion und somit einem eher antiinflammatorisch Reaktionsprofil zugeschrieben. Das Zytokinspektrum einer TH17-Reaktion beinhaltet dabei starke proinflammatorische Auslenkungen (z. B. durch Freisetzung von IL-1 β ; Boniface et al., 2008; McGeachy & Cua, 2008; Pernis, 2009). In diesem Kontext könnten B-Zellen eine bedeutende Rolle spielen, sie gelten als prominente Quelle für IL-1 β (Gemmell & Seymour, 2004). Als weitere für chronisch entzündliche Prozesse bedeutsame T-Zellsubpopulationen gelten die regulatorischen T-Zellen, deren Zytokinprofil hauptsächlich durch TGF- β und IL-10 gekennzeichnet ist und deren Aktivierung starke immunsupprimierende Effekte mit sich bringt (Neurath et al., 2002).

Auch die theoretischen Annahmen zur Ätiologie der Gingivitis und Parodontitis wandeln sich unter Berücksichtigung aktueller immunologischer Erkenntnisse. Erkenntnisse hierzu spielen für die vorliegende Arbeit deshalb eine zentrale Rolle, weil diese am Modell der Gingivitis die Effekte von Stress auf die lokale Freisetzung proinflammatorischer Leitzytokine analysiert (Näheres hierzu weiter unten). Auch für entzündliche Parodontalerkrankungen wurde von einigen Autoren für lange Zeit eine TH1/TH2 Disbalance als ursächlich angenommen mit einem Überwiegen von TH1 bei der Gingivitis und TH2 bei der Parodontitis (Gemmell & Seymour, 2004). Die durchaus uneinheitliche Befundlage ließ allerdings auch hier Zweifel an diesem Konzept aufkommen (Kidd, 2003). Andere TH-Zellpopulationen wurden als bedeutsam diskutiert, allen voran die TH17-Population, zu deren Zytokinprofil unter anderem IL-1 β zählt (Gaffen & Hajishengallis, 2008). Dies ist auch insofern plausibel, als schon lange bekannt ist, dass dem

proinflammatorisch wirksamen IL-1 β eine zentrale Rolle bei der entzündlichen Gewebsdestruktion, die eine Parodontitis kennzeichnet, zukommt (s. unten).

1.3.3 Aktuelle Entwicklungen in der Erforschung der Entzündungsregulation

Nachdem jahrelang die adaptive Immunantwort und die dort angesprochenen TH-Zellpopulationen fokussiert wurden, um ein besseres Verständnis der Immunregulation zu erhalten, scheint heute dem angeborenen Immunsystem wieder mehr Zuwendung zuteil zu werden. Ganz offensichtlich reicht die Betrachtung der Zellen des adaptiven Immunsystems nicht aus, um gesunde und pathologisch veränderte Immunregulationen zu verstehen. Möglicherweise hilft es, wieder mehr die Zellen der angeborenen Immunantwort ins Visier zu nehmen, über die zweifelsohne ebenso Regulations- und damit möglicherweise auch Dysregulationsprozesse eingeleitet werden. Zugleich geraten wieder mehr die eigentlichen Steuerungsinstrumente der Immunreaktion, die Zytokine und andere Entzündungsmediatoren selbst, und ihre Eigenschaften ins Visier der Forschung. Schließlich werden auch diesen pro-, antiinflammatorische oder (gegen-)regulatorische Eigenschaften zugeschrieben. Zentrale Indikatoren einer proinflammatorischen Ausrichtung der Immunreaktion auf einen Reiz stellen hierbei IL-1 β und IL-8 dar, zwei Zytokine, die zunächst im Zuge der angeborenen Immunantwort freigesetzt werden, und dann auch im Zuge einer TH17-Reaktion.

Die Immunregulation unterliegt auch Einflüssen außerhalb des Immunsystems wie z. B. genetischer Veranlagung, Umwelterfahrungen, Verhalten, usw. Auch psychischer Stress gilt heutzutage als potentiell dysregulierender Faktor einer Immun- bzw. Entzündungsreaktion. Die vorliegende Arbeit untersucht solche Stresseffekte. Ein systematischer Vergleich zweier Arten gingivaler Entzündungen und ihre lokale Reaktion auf Stress stellen den Hauptteil der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen dar. Neben klinischen Entzündungszeichen werden dabei die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-8 erfasst. Neu an diesem Ansatz ist nicht nur, dass Stresseffekte auf unterschiedliche Entzündungszustände verglichen werden. Auch zeichnet sich die

vorliegende Arbeit dadurch aus, dass die Immunparameter nicht in der Blutbahn sondern direkt am Ort der Entzündung und damit auch einem wesentlichen Teil der Entzündungsregulation erfasst werden. Bevor hierauf aber genauer eingegangen wird, befasst sich das nächste Kapitel mit den bisherigen Erkenntnissen zu den Auswirkungen von Stress auf die Entzündungsregulation.

1.4 Stress und Entzündung

Kommt es zu einem Stressereignis, vollzieht sich eine ganze Kaskade von physiologischen Veränderungen, die eine Vielzahl von körperlichen Systemen betreffen können (u. a. im Nerven-, Herz-Kreislauf-, Hormon- und Immunsystem). Psychoneuroimmunologische Forschung analysiert die Interaktionen von drei „Supersystemen“: dem Nervensystem, dem endokrinen System und dem Immunsystem (Tada, 1997; Ader & Kelley, 2007; Straub et al., 2006). Nerven- und Immunsystem interagieren u. a. auf endokrinem Weg, durch Zellmigration immunkompetenter Zellen in das ZNS oder durch sympathische bzw. parasympathische sowie viszerale bzw. somatische Efferenzen und Afferenzen (Besedovsky & Rey, 1996; Straub et al., 2005; Dantzer et al., 2008; Rosas-Ballina & Tracey, 2009). Immunzellen weisen Rezeptoren für Neurotransmitter und Hormone auf ebenso wie Neurone Rezeptoren für Zytokine besitzen (Sanders, 2001; Sanders & Straub, 2002; Pongratz & Sanders, 2006).

Eine Reihe von Übersichtsarbeiten fassen die Forschungsarbeiten aus diesem Bereich zusammen, die in den letzten 20 Jahren eindrucksvoll gezeigt haben, dass Immunreaktionen durch Stress bzw. Stressmediatoren beeinflusst werden können (s. Maier & Watkins, 1998; Elenkov et al., 2000; Agarwal & Marshall, 2001; Black, 2003; Glaser & Kiecolt Glaser, 2005; Straub et al., 2005). Sie haben zudem komplexe Mechanismen aufgezeigt, über welche Nerven-, Hormon- und Immunsystem miteinander interagieren.

Die Forschung konzentrierte sich zunächst auf Einflüsse des sympathoadrenomedullären Systems und der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindendachse (HHNA) als zwei zentrale regulatorische Systeme mit Effekten auf viele andere körperliche Prozesse. So wurde gezeigt, dass Organe des Immunsystems (z. B. Thymus, Lymphknoten usw.) stark sympathisch innerviert sind (v. a. über Noradrenalin und Neuropeptid-Y). Befunde tierexperimenteller Studien und von *in vitro* Studien zeigen, dass nach Freisetzung von Katecholaminen aus den sympathischen Nervenendigungen in die Lymphorgane, diese an von Immunzellen exprimierten Adrenorezeptoren binden. Über diese Wege können Katecholamine die Lymphozytenproliferation und –migration sowie die Produktion und

Sekretion von Zytokinen beeinflussen (Elenkov et al., 2000). Auch andere Neuropeptide, wie z. B. Substanz P scheinen maßgeblich an der Immunregulation gerade im entzündeten Gewebe beteiligt zu sein (Harrison & Geppetti, 2001; Gross et al., 2007; Rosenkranz et al., 2007).

Im Hinblick auf die klassischen Stresshormone, die Katecholamine und die Produkte der HHNA, wurde lange Zeit davon ausgegangen, dass sie immunsuppressiv wirken. Mittlerweise scheint es plausibler anzunehmen, dass, wenn überhaupt, nicht die gesamte Immunfunktion unterdrückt wird, sondern funktionelle Teilsysteme der Immunität verändert werden. So scheinen Katecholamine durch Stimulation von β -Adrenorezeptoren (β -ARs) die Ausbildung einer TH1-Antwort bzw. die Produktion entsprechender proinflammatorischer Zytokine (IL-12, TNF- α , IL-1, IL-6, usw.) zu hemmen und (teilweise dadurch) eine TH2-Antwort zu fördern (Elenkov et al., 2000, 2005; Sanders & Straub, 2002; Godbout & Glaser, 2006; Sanders & Kavelaars, 2007). Hinsichtlich der Effekte einer aktivierten HHNA zeigen sich ähnliche Befunde. Glukokortikoide aus der Nebennierenrinde entfalten ihre Wirkung hauptsächlich durch ihren Einfluss auf das Zytokinspektrum und scheinen ebenso proinflammatorische Aktivität zu unterdrücken und die Ausprägung einer TH2-Antwort zu fördern (Agarwal & Marshall, 1998, 2001; Harbuz et al., 1997; Elenkov, 2004; Godbout & Glaser, 2006; Tait et al., 2008). Über solche biologische Mechanismen soll der Organismus vor einer überschießenden systemischen inflammatorischen Reaktion und deren potentiell schädlichen Auswirkungen auf den Körper geschützt werden (Elenkov & Chrousos, 2002).

Doch gibt es zunehmend Widersprüche. Stress wird nämlich auch mit TH1-Stimulation und einer verstärkten proinflammatorischen Ausrichtung der Immunantwort in Verbindung gebracht. Erkrankungen, die als autoimmun angesehen werden, sind durch eine überschießende Entzündungsreaktion und einer TH1-Dominanz gekennzeichnet. Bei diesen Erkrankungen wird häufig eine Koinzidenz beobachtet zwischen psychischem Stress und Exazerbationen (Solomon & Moos, 1964; Al'Abadie et al., 1994; Harbuz et al., 1997; Elenkov & Chrousos, 2002; Jessop et al., 2004; Straub et al., 2005; Kern & Ziemssen, 2008). Im Tierexperiment konnte nachgewiesen werden, dass Glukokortikoide

nicht ausschließlich eine TH1-unterdrückende Wirkung (McEwen et al., 1997; Spencer et al., 2001), sondern auch proinflammatorische Effekte mit sich bringen können (Elenkov et al., 2005; Munhoz et al., 2006, de Pablos et al., 2006, Frank et al., 2007).

Stresswirkungen auf die Entzündungsreaktion scheinen also nicht einseitig nur immunsuppressiv zu wirken, vielmehr scheint es eine Reihe von Faktoren zu geben, die die Richtung und Stärke von Stresseffekten auf entzündliche Prozesse beeinflussen können. Für Glukokortikoide werden solche Faktoren jüngst in einer Übersichtsarbeit zusammengefasst (Sorrells & Sapolsky, 2007).

Im Hinblick auf die Fragestellung der vorliegenden Arbeit stehen dabei drei solcher Faktoren im Vordergrund: Die Wirkungen von **akutem Stress** (im Gegensatz zu chronischem Stress), b) die Bedeutung der Betrachtung **lokaler Veränderungen** (im Gegensatz zu systemischen Veränderungen), sowie c) die Bedeutung des **zeitlichen Zusammenhangs** zwischen Stress und Entzündungsgeschehen. Der zuletzt genannte Faktor wird in der vorliegenden Arbeit experimentell untersucht, indem Akutstresseffekte auf verschiedene lokale Entzündungszustände verglichen werden.

1.4.1 Moderatoren von Stresswirkungen auf die Entzündungsreaktion

Die wissenschaftliche Untersuchung von Stresseffekten auf das Immunsystem und die Interpretation der Studienergebnisse ist eine Geschichte der Missverständnisse. Es blieben nämlich dabei bisher und bleiben auch immer noch zu viele moderierende Faktoren außer Acht. Dazu gehören z. B. Dosis-Wirkungs-Zusammenhänge. So können Glukokortikoide und auch Katecholamine je nach Dosis pro- bzw. antiinflammatorische Effekte mit sich bringen (De Kloet et al., 1998; Straub et al., 2005; Sorrells & Sapolsky, 2007). Im Hinblick auf die Interpretation vieler Studienergebnisse bezüglich der Effekte von Stress oder Stresshormonen auf das Immunsystem und seinen Funktionen ist es daher bedeutend zwischen pharmakologischen (i. d. R. hohen und meist eher regulierenden) und physiologischen bzw. endogenen (i. d. R. eher geringen und meist eher

immunstimulierenden) Konzentrationen von Stresshormonen zu unterscheiden (Straub et al., 2005).

Weiterhin ist die Dauer eines Stressors bzw. die Dauer erhöhter Stresshormonkonzentrationen eine bedeutende moderierende Variable (Sorrells & Sapolsky, 2007). In der Literatur finden sich hierzu unterschiedliche Unterteilungen von Stressoren nach ihrer Dauer: z. B. akut, wiederholt akut (subakut) oder chronisch (Black, 2003; Segerstrom & Miller, 2004); akut, subchronisch (kürzer als ein Monat) oder chronisch (Agarwal & Marshall, 2001). Experimentelle Daten zu Effekten von chronischem Stress stammen ausschließlich aus Tierexperimenten. Im Humanbereich wird chronischer Stress im quasiexperimentellen Untersuchungsdesign häufig durch die Pflege chronisch erkrankter Angehöriger (z. B. Alzheimer-Demenz Patienten) oder Arbeitslosigkeit operationalisiert. Im Gegensatz zu chronischen Stressoren und ihren Auswirkungen auf Immunfunktionen, sind die Auswirkungen von akutem psychischem Stress auf systemische Immunparameter auch im Humanexperiment oft untersucht. Akuter Stress wird dabei i. d. R. durch Redeparadigmen (öffentliche Rede / Rede vor einer Videokamera) und / oder Kopfrechenaufgaben induziert (Dickerson & Kemeny, 2004; Segerstrom & Miller, 2004; Steptoe et al., 2007). Während weiterhin davon ausgegangen wird, dass chronischer Stress eher antiinflammatorisch wirkt, scheint akuter und zeitlich begrenzter Stress eher proinflammatorisch zu wirken (Straub et al., 2005; Dhabhar, 2002). Zu diesem Ergebnis kommt auch eine Metaanalyse von 293 Studien, die Stresseffekte auf verschiedene Immunfunktionen von Menschen untersuchte (Segerstrom & Miller, 2004). Die vorliegende Arbeit untersucht die Auswirkungen eines akuten psychischen Stressors auf Entzündungsprozesse am Menschen, daher sollen Befunde aus Humanstudien zu Akutstresswirkungen auf verschiedene Immunparameter nachfolgend etwas genauer dargestellt werden.

1.4.1.1 Akutstresseffekte auf Immun- bzw. Entzündungsparameter beim Menschen

Segerstrom & Miller (2004) begutachteten in ihrer Metaanalyse 84 Akutstresstudien am Menschen, die zwischen 1960 und 2001 durchgeführt wurden. Der Großteil der Studien untersuchte dabei stressinduzierte Veränderungen der Anzahl verschiedener Immunzellen

oder die Funktionen dieser Zellen *in vitro* (z. B. NK-Zellen, Granulozyten, TH-Zellen, B-Zellen, usw.). Weniger Studien untersuchten stressinduzierte Veränderungen systemischer Konzentrationen von Immunglobulinen oder Zytokinen. Die Analyse ergab, dass akuter Stress v. a. für das angeborene Immunsystem aktivierend wirkt. Große Effektstärken zeigten sich im Hinblick auf die Anzahl der NK-Zellen und Granulozyten, die als Reaktion auf den Stressor anstiegen. Ähnliches zeigte sich für funktionale Aspekte wie der Aktivität von NK-Zellen. Bezüglich Veränderungen verschiedener Zytokine scheint akuter Stress die systemischen Konzentrationen von IL-6 zu erhöhen. Kein Effekt zeigte sich für IL-1 β . Eine andere Metaanalyse von Steptoe et al., (2007) beinhaltet 30 Humanstudien (1993-2006), die Effekte von akutem Stress auf systemische Immun- bzw. Entzündungsmediatoren, v. a. Zytokine wie IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ analysierten. Dabei wurden die Zytokinkonzentrationen entweder *in vivo* im Serum/Plasma erfasst oder nach Zellstimulation *in vitro*. In 16 dieser Studien setzte sich die jeweilige Stichprobe aus gesunden Männern oder Frauen zusammen, die anderen Studien untersuchten klinische Gruppen (Patienten mit Rheumatoider Arthritis, Multiple Sklerose, kardiovaskulären Erkrankungen, Psoriasis, Depression, Brustkrebs). Metaanalysen wurden für zirkulierendes IL-6 (insgesamt 19 Studien), TNF- α (insgesamt 12 Studien) und IL-1 β (5 Studien) durchgeführt und ergaben robuste Effekte für stressinduzierte Anstiege von IL-6 und IL-1 β , nicht für TNF- α . Die anderen genannten Zytokine wurden in zu wenigen Studien untersucht, um eine Metaanalyse durchzuführen. Studien, die an klinischen Gruppen durchgeführt wurden, zeigen teilweise eine veränderte Immunreaktion auf akuten Stress, teilweise unterscheiden sich Patienten nicht von den Kontrollprobanden.

Insgesamt sprechen diese Metaanalysen für immunstimulierende Effekte von akutem Stress. Hinsichtlich der Zytokine sollte allerdings beachtet werden, dass dieser Effekt im Falle von IL-6 robust zu sein scheint. Für IL-1 β kommen die beiden Metaanalysen zu unterschiedlichen Ergebnissen, möglicherweise aufgrund der geringen Anzahl der Studien, die dieses Zytokin untersuchten. Hinsichtlich TNF- α zeigte sich kein einheitliches Reaktionsmuster auf Akutstress. Dies gilt auch für eine Reihe anderer Zytokine (z. B. IL-8, IL-2), die zudem in nur wenigen Studien untersucht wurden.

Ein möglicher Grund für diese vielfältigen Befunde und daraus resultierender Unklarheit könnte der Tatsache geschuldet sein, dass der Schwerpunkt der Forschungsarbeiten auf systemischen Immun- bzw. Entzündungsparametern liegt. Sicherlich, „...in humans as well as animals the blood is the only easily accessible immune compartment“ (Dhabhar & McEwen, 1996, S. 1680), doch Entzündung ist zunächst ein lokales Geschehen und es ist bekannt, dass viele der untersuchten Entzündungsmediatoren (z. B. Zytokine) zunächst primär lokal agieren und eine Kommunikation mit zentralen Strukturen bereits auf dieser lokalen Ebene erfolgen kann ohne Einbezug des ganzen Systems (Dantzer et al., 2000; Konsman et al., 2000).

Und tatsächlich fällt bei genauerer Betrachtung auf, dass lokales und systemisches Entzündungsgeschehen nicht das gleiche darstellen.

1.4.1.2 Lokal vs. systemisches Entzündungsgeschehen - Die Bedeutung der Analyse lokaler Entzündungsparameter

Ein weiterer wichtiger Moderator ist demnach das untersuchte Kompartiment, d. h. ob die Immunparameter systemisch im Blut oder lokal im Gewebe und in welchem Gewebe erfasst werden. Die Literatur zeigt, dass nur wenige Humanstudien Auswirkungen psychischer Faktoren auf lokales Entzündungsgeschehen *in vivo* untersuchen, der Schwerpunkt liegt eher auf systemischen Indikatoren (siehe Segerstrom & Miller, 2004; Steptoe et al., 2007). Diese Fokussierung auf systemische Immunparameter geht daher einher mit einer deutlichen Validitätseinschränkung, ist doch Entzündungsgeschehen, das chronifizieren kann, zunächst immer ein lokal begrenztes Geschehen (Tracey, 2002; Hopkins, 2007). Lokale regulierende Faktoren beherrschen zunächst das Geschehen. Hierzu zählen neben den Zytokinen und den im Gewebe befindlichen Immunzellen auch die lokale Innervierung und die lokale Freisetzung von Neurotransmittern, und –peptiden (Rosas-Ballina & Tracey, 2009).

Stressmediatoren, von denen gezeigt werden konnte, dass sie systemisch die Freisetzung verschiedener Immunmediatoren reduzieren, können lokal, d.h. im Gewebe durchaus gegensätzliche Effekte zur Folge haben (Calgagni & Elenkov, 2006). Dhabhar und

Kollegen konnten in mehreren Arbeiten zeigen, dass eine kurzfristige stressinduzierte Reduzierung bestimmter Immunzellen in der Zirkulation (z.B. NK-Zellen, Monozyten, T- und B-Zellen) einhergeht mit einer Umverteilung von Immunzellen aus der Zirkulation in bestimmte Organe bzw. Gewebe hin (Dhabhar & McEwen, 1996; Dhabhar, 2002). Immunzellen (Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen usw.), die eine Abwehrlinie gegen eine Noxe darstellen, verlassen unter Stress die Zirkulation, um in das Gewebe einzuwandern, welches am ehesten bedroht wird, den sogenannten „battle-stations“ (Dhabhar, 2002, Viswanathan & Dhabhar, 2005). Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass ein kurzer akuter psychologischer Stress die Chemotaxis fördert, indem er die Expression zellulärer und intrazellulärer Adhäsionsmoleküle induziert (Mills et al., 1996; Goebel et al., 2000; Redwine et al., 2003; Heinz et al., 2003). Bei diesen Vorgängen spielen sicherlich nicht nur Immunzellen eine Rolle, sondern auch andere Körperzellen wie z. B. Epithel- und Endothelzellen, Keratinozyten. Es konnte gezeigt werden, dass auch diese Zellen Zytokine und v. a. Chemokine freisetzen und dadurch zur Initiierung einer Entzündungsreaktion beitragen (Bruch-Gerharz et al., 1995; Kotani et al., 2002; Seeger et al., 2002; Willenberg et al., 2008).

Verkompliziert wird das Bild weiterhin dadurch, dass ein und dieselbe Zellpopulation offensichtlich unterschiedlich auf Stressmediatoren reagiert, je nachdem, in welchem Gewebe sie sich aufhält. So exprimieren zirkulierende Monozyten primär β -ARs, während die im Gewebe ausdifferenzierten Makrophagen mehr α -ARs als β -ARs exprimieren. Eine α -adrenerge Stimulation scheint proinflammatorische Signalfunktion zu besitzen (Johnson et al., 2005), die demnach unter Stress im Gewebe deutlich stärker ausgelenkt sein müsste als in der Zirkulation (Straub et al., 2005). Selbst wenn die genaue Bedeutung dieser Befunde für die lokale Immunregulation noch nicht verstanden ist, zeigen sie doch deutlich, dass auf der Basis von zirkulierenden Immunparametern oder von *in vitro* stimulierten Immunzellen, die aus der Blutbahn isoliert wurden, ein Rückschluss auf lokale immunregulatorische Prozesse kaum möglich ist.

Untersuchungen von Stresseffekten auf lokales Entzündungsgeschehen scheinen demnach unumgänglich zu einem besseren Verständnis, darüber wie Stress dort zu dysregulierten Immunprozessen führen kann. Experimentelle Humanstudien, die Stresseffekte auf lokale

Immunprozesse untersuchen gibt es kaum. Einige Studien betrachten die Zusammenhänge zwischen chronischem Stress und der Immunologie lokaler Wundheilungsprozesse in einem humanen *in vivo* Modell (Kiecolt-Glaser et al., 1995, 2005; Glaser et al., 1999; Yang et al., 2002; Broadbent et al., 2003; Roy et al., 2005). Es zeigten sich dabei negative Zusammenhänge zwischen wahrgenommenem Stress und der lokalen Immunreaktion bzw. -funktion (u. a. geringere Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α).

Im Gegensatz zu einem solch sterilen lokalen Entzündungsprozess untersuchten Deinzer und Mitarbeiter Stresseffekte auf lokale Entzündungsprozesse am Modell der experimentellen Gingivitis, welches auch in der vorliegenden Arbeit Gegenstand der Untersuchung ist (Deinzer et al., 1999, 2000a, 2004; Waschul et al., 2003). Das Modell der Gingivitis erlaubt unter experimentellen Bedingungen die Analyse von Stresseffekten auf die lokale Entzündung, d. h. der Gingivitis, die eine Reaktion des Organismus auf pathogene Erreger darstellt und sich kennzeichnet durch die typischen Entzündungszeichen (Rötung, Schwellung, Erwärmung und erhöhte Blutungsneigung, Schmerzempfindlichkeit, erhöhte Bildung verschiedener proinflammatorischer Zytokine, vermehrter Einstrom von Zellen der angeborenen und später auch adaptiven Immunität ins Gewebe (siehe Kapitel 1.3)). Das Modell der Gingivitis ermöglicht es, eine **lokale Entzündungsreaktion** auf mikrobielle Erreger am Menschen *in vivo* zu untersuchen. Die Ergebnisse der Studien, die Stress- und Entzündungszusammenhänge an diesem Modell untersuchten, deuten auf eine durch Stress erzeugte Erhöhung proinflammatorischer Aktivität (u. a. höhere lokale Konzentrationen von IL-1 β) innerhalb des lokalen Entzündungsgeschehens hin (Deinzer et al., 1999, 2000a, 2004; Waschul et al., 2003). Sie weisen allerdings auch auf einen (weiteren) moderierenden Faktor hin, der die inflammatorische Auslenkung beeinflussen könnte und der in der vorliegenden Arbeit aufgegriffen und nachfolgend erläutert werden soll. Dies ist der Zeitpunkt des Zusammentreffens von Stressor und Entzündungsreaktion.

1.4.1.3 Zeitpunkt des Zusammentreffens von Stress und Entzündungsreaktion

Entzündungsregulation und Stressreaktionen sind beide zeitlich dynamische Prozesse. Die Auslenkungen der an diesen Prozessen beteiligten Variablen können im zeitlichen Verlauf

der Regulation unterschiedliche Richtungen annehmen. Je nachdem, wann im Verlauf einer Entzündungsreaktion der Stressor einsetzt, kann es möglicherweise zu pro- oder antiinflammatorischen Effekten kommen. Aus tierexperimentellen Studien zu (glukokortikoid-induzierten) Stresseffekten auf entzündliche Prozesse ist die Bedeutung des Faktors Zeit seit längerem bekannt (Fleshner et al., 1998; Viswanathan et al., 2005; Sorrells & Sapolsky, 2007). Dabei verändert sich die entzündliche Auslenkung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Antigenstimulation in Relation zum Stressor oder der Gabe von Stresshormonen. Auch im Humanbereich gibt es solche Befunde, die darauf hindeuten, dass es bei zeitlicher Koinzidenz von Stress und Antigenpräsentation (Akutstress in Kombination mit Impfung) zu einer stärker ausgeprägten systemischen proinflammatorischen Auslenkung kommt. In einer doppelblinden und placebo-kontrollierten Studie zeigen Männer als Reaktion auf eine Typhusimpfung eine gesteigerte systemische IL-6-Produktion, wenn sie kurz darauf einer akuten Stresssituation ausgesetzt wurden (Brydon et al., 2009). Auch Frauen zeigen unter Akutstressbedingungen kurz vor einer Grippeimpfung eine gesteigerte Antikörperproduktion als Reaktion auf die Impfung (Edwards et al., 2006).

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zu den Auswirkungen von Examenstress auf die lokale Entzündungsreaktion liefern eben solche Hinweise (Deinzer et al., 1999, 2000a; Waschul et al., 2003). Als Stressor diente dabei die Erste Ärztliche Vorprüfung, die zu erhöhter subjektiver Belastung führt, welche über mehrere Wochen anhält, aber wenige Tage nach der letzten Prüfung wieder mit der, der Kontrollprobanden vergleichbar (Deinzer et al., 2000b, Waschul et al., 2003). Die Gingivitis wurde über das Unterlassen der Mundhygiene (und damit eine erhöhte Erregerlast an der Gingiva durch Plaqueakkumulation) induziert, nachdem zuvor durch Professionelle Zahnreinigung ein entzündungsfreier Zustand hergestellt worden war (Paradigma der sog. experimentellen Gingivitis). Im Verlauf der drei bis vier Wochen Plaqueakkumulation stellen sich dabei sowohl klinische Entzündungszeichen der Gingivitis ein, als auch ein erhöhter IL-1 β -Spiegel im gingivalen Sulkus, ein Zustand, der seine höchste Auslenkung etwa 3 Wochen nach Beginn der experimentellen Gingivitis erfährt. Betrachtet man die Richtung der Stresseffekte, so zeigten die Examensgruppen im Vergleich zu Kontrollen in allen Studien

eine verstärkte proinflammatorische Auslenkung der lokalen Entzündungsreaktion, d. h. höhere gingivale Konzentrationen von IL-1 β . Allerdings zeigen sich auch differenzielle Effekte hinsichtlich des Verlaufs dieser veränderten Entzündungsreaktion in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Beginns der experimentellen Gingivitis, d. h. der Plaqueakkumulation innerhalb der Stressperiode. In Deinzer et al. (2000a) begann die experimentelle Gingivitis am ersten Tag nach Beendigung der Examensphase und es zeigte sich ein signifikanter Haupteffekt Stress in Form eines deutlich stärkeren Anstiegs des sulkulären IL-1 β in der Examensgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei Deinzer et al. (1999) begann die exp. Gingivitis eine Woche vor Beendigung der Examensperiode. Hier zeigte sich der gleiche Haupteffekt, allerdings war der Effekt deutlich größer. Anders verhielt es sich, als die Plaqueakkumulation mitten in der Examensphase startete und somit Stress und Plaqueakkumulation für mehrere Wochen gemeinsam vorlagen (Waschul et al., 2003). In diesem Fall zeigte sich eine Stress-Geschlechts-Interaktion. Während bei den untersuchten Frauen der Stresseffekt auf IL-1 β erhalten blieb, blieb er bei den Männern völlig aus. Insgesamt betrachtet weisen diese Befunde auf die Bedeutung der zeitlichen Beziehung zwischen Stressprovokation und Entzündungsinduktion als weiterer Moderator der immunologischen Stressreaktion hin.

Folgt demnach eine Entzündungsinduktion auf einen Stressor bzw. auf die Gabe von Stresshormonen sprechen im Gegensatz zu den bisherigen Annahmen Human- und Tierstudien für eine proinflammatorische Wirkung von Stress.

Und welche Effekte bringen Stressoren mit sich, die auf ein bereits vorhandenes Entzündungsgeschehen treffen? Befunde aus immunohistologischen Untersuchungen legen nahe, dass sich Art und Ausmaß der Entzündung (z. B. akut vs. chronisch) durch strukturelle Veränderungen der Innervierung des betroffenen Gewebes unterscheiden können. Bei Autoimmunerkrankungen wie z. B. der Rheumatischen Arthritis hat sich gezeigt, dass chronisch entzündetes Gewebe eine geringere Dichte an β -AR im Gegensatz zu α -AR aufweist. Zusätzlich kann es im chronisch entzündeten Gewebe zu einem Verlust von sympathischen Nervenfasern kommen, wodurch dann gleichzeitig sensorische Nervenfasern (v. a. SP⁺-Nervenfasern) dominieren (Miller et al., 2000; Straub, 2006; Koeck et al., 2009). Katecholamine könnten somit möglicherweise ihre potentiell

antiinflammatorische Wirkung nicht mehr adäquat entfalten und zusammen mit der Dominanz von α -AR gar als ein lokales proinflammatorisches Signal wirken (Straub et al., 2005).

Die vorliegende Arbeit wendet sich daher dieser Frage zu und untersucht die moderierende Wirkung des Entzündungszustands auf Akutstresseffekte in einem **humanen *in vivo* Modell** einer **lokalen Entzündung**. Bei diesem humanen *in vivo* Modell handelt es sich um die plaqueinduzierte Gingivitis, die im nächsten Kapitel genauer erläutert wird.

1.5 Stresseffekte auf lokale Entzündungsprozesse am Modell der plaque-assoziierten Gingivitis

1.5.1 Ätiopathogenese von Gingivitiden und Parodontiden

Die Gingiva bildet zusammen mit dem Desmodont, dem Wurzelsegment und dem Alveolarknochen das Parodont, den Zahnhalteapparat. Das Saumepithel, der Teil der Gingiva, der direkt am Zahn anliegt sowie gingivales Gewebe um den gingivalen Sulkus, der Furche zwischen Zahn und Zahnfleisch, sind bedeutende Bereiche, wenn es um immunologische Abwehrmechanismen gegen eindringende mikrobielle Erreger geht.

Bei persistierender Plaqueakkumulation auf der Zahnfläche kommt es zur Herausbildung einer lokalen Entzündungsreaktion, einer Gingivitis, die auf das betroffene gingivale Gewebe beschränkt, d.h. lokal ist. Die aktuell geschätzte Prävalenz der Gingivitis ist äußerst hoch und beträgt ca. 90% in der Bevölkerungsgruppe der 35-44-jährigen in Deutschland (Hoffman, 2006). Ein solcher Entzündungszustand kann über Jahre hinweg anhalten, ohne zu weitreichenden Beschwerden zu führen. Eine Gingivitis ist auch vollständig reversibel, d. h. gingivale Gesundheit kann in der Regel durch vollständige Entfernung der Plaque wiederhergestellt werden. Eine Gingivitis kann aber auch progredieren und zum Abbau der desmodontalen Faserbündel und des Alveolarknochens führen. Ein Entzündungszustand, der, da er nun den gesamten Zahnhalteapparat betrifft, als Parodontitis bezeichnet wird. Klinisch manifestiert sich eine Parodontitis in den meisten Fällen als eine chronisch entzündliche, über Jahre hinweg progredierende Erkrankung, die ebenso wie andere chronisch entzündlichen Erkrankungen gekennzeichnet ist, durch Perioden der Stagnation und Perioden der Exazerbationen (Mercado et al., 2003; Le Resche & Dworkin, 2002). Die Pathogenese einer Parodontitis und speziell der Übergang von einer Gingivitis in eine Parodontitis ist bislang nicht vollständig geklärt. Neben der Rolle bakterieller Virulenzfaktoren wird mehr die Wirtsreaktion selbst bzw. eine gestörte Entzündungsregulation aber auch weitere Vulnerabilitätsfaktoren wie Stress oder Rauchen diskutiert (Kornman et al., 1997; Gemmel & Seymour, 2004).

Manche Studien geben Hinweise, die für eine Dominanz von TH2-Zellen in parodontalen Läsionen sprechen (Yamazaki et al., 1997; Lappin et al., 2001), andere wiederum finden gleiche Anteile beider Subgruppen (Berglundh et al., 2002). Untersuchungen verschiedener Zytokine sind ebenso uneinheitlich und zeigen einmal eine vermehrte Genexpression sowie Produktion proinflammatorischer und TH1-Zytokine (Takeichi et al., 2000; Salvi et al., 1998) ein anders Mal ein verstärktes TH2-Zytokinprofil (Seymour et al., 2001). In ungewöhnlicher Einheitlichkeit zeigt aber eine Vielzahl von Studien einen Zusammenhang zwischen der lokalen Konzentration von IL-1 β und dem parodontalen Entzündungszustand (Toker et al., 2008; Yücel et al., 2008; Fitzsimmons et al., 2009; siehe Barksby et al., 2007). Es sind u. a. diese Befunde und die o. g. Widersprüchlichkeiten zu TH1/TH2 Dominanz, die heute dazu führen, dass davon ausgegangen wird, dass die Parodontitis möglicherweise eine TH17-dominierte Erkrankung sein könnte (Gaffen & Hajishengallis, 2008). Eine Reihe von wichtigen Erkenntnissen zur Ätiopathogenese parodontaler Entzündungen entstammen Untersuchungen mit dem bereits seit 40 Jahren etablierten Modell der experimentellen Gingivitis (Löe et al., 1965), das auch in dieser Arbeit angewandt wird und daher an dieser Stelle genauer erläutert wird.

1.5.2 Experimentelle Gingivitis

Unter „experimenteller Gingivitis“ versteht man das gezielte und kontrollierte Provozieren einer gingivalen Entzündungsreaktion. Ausgehend von einem gingival und parodontal gesunden Zustand wird für einen bestimmten Zeitraum (höchstens vier Wochen) die Mundhygiene unterlassen. Die dadurch entstehenden Anlagerungen mikrobieller Plaque am Zahnfleischrand beantwortet der Organismus mit einer lokalen Entzündungsreaktion, der Gingivitis. Diese manifestiert sich klinisch zunächst in einer Rötung, nach wenigen Tagen dann aber auch in einer erhöhten Blutungsneigung nach drucklosem Sondieren. Ein solcher Entzündungszustand ist nach Wiederaufnahme der Mundhygiene innerhalb von wenigen Tagen vollständig reversibel. Das Modell der experimentellen Gingivitis (Löe et al., 1965) wird bereits seit über 40 Jahren in der zahnmedizinischen Forschung genutzt, um parodontale Entzündungsprozesse zu erfassen. Dabei kann das klinische Ausmaß einer

Gingivitis leicht anhand standardisierter und validierter Beurteilungsverfahren erfasst werden. Lokale immunologische Entzündungsindikatoren können in der Sulkusflüssigkeit bestimmt werden (Daten hierzu siehe unten).

Im Humanversuch darf die Unterlassung der Mundhygiene aus ethischen Gründen allerdings vier Wochen nicht überschreiten. Bei längeren Phasen der Plaqueakkumulation wäre das Risiko für irreversible Schädigungen des Parodontiums oder der Zahnhartsubstanz (Karies) zu groß. Umgekehrt ist davon auszugehen, dass sich Parodontitiden erst auf der Basis einer (aufgrund unzulänglicher häuslicher Mundhygiene) wesentlich längeren Plaquepersistenz und einer entsprechend deutlich länger anhaltenden Gingivitis entwickeln. Es stellt sich daher die Frage, inwieweit eine experimentelle Gingivitis mit einer chronischen Gingivitis vergleichbar ist. Möglicherweise repräsentiert die experimentelle Gingivitis eher einen Zustand akuter Entzündung, während die chronische Gingivitis eher einem chronischen Entzündungszustand entspricht. Da es die chronische Gingivitis ist, aus welcher sich eine Parodontitis entwickelt, wäre es von Vorteil zu wissen, inwieweit sich diese beiden Zustände (experimentelle vs. chronische Gingivitis) ähneln bzw. unterscheiden, und zwar sowohl im Basalzustand als auch in ihrer Reaktion auf einen Stressor.

Genau dies zu analysieren, ist das Ziel der vorliegenden Arbeit. Bevor aber genauer auf diese Fragestellung eingegangen wird, fassen die folgenden beiden Abschnitte Daten zur Analyse lokaler Immunparameter im Sulkus gingivalis sowie Befunde zum Zusammenhang zwischen Stress und Parodontalerkrankungen zusammen.

1.5.3 Analyse der lokalen Immunantwort im Sulkus-Fluid des Sulkus Gingivalis

Ein zentraler Vorteil der Analyse von Stresseffekten auf Entzündungsreaktionen am Modell der Gingivitis besteht darin, dass sich hier die lokale Entzündungsregulation im Humanversuch minimal-invasiv und messwiederholt erfassen lässt. Im Sulkus gingivalis sammelt sich permanent Sulkus-Fluid, ein Transsudat bzw. bei Entzündungen ein Exsudat des umliegenden Gewebes (Delima & Van Dyke, 2003). In dieser Flüssigkeit befinden sich

nachweislich zahlreiche Immun- bzw. Entzündungsmediatoren, die als Indikatoren des Entzündungszustands gelten, darunter eine Reihe von Zytokinen (z. B. IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, TNF- α , TGF- β , MIP-1, etc.; Lamster & Grbic, 1995; Griffiths, 2003; Lamster & Ahlo, 2007).

Zudem weist eine Vielzahl von Studien einen Zusammenhang zwischen einzelnen dieser Parameter und dem klinischen Zustand des Parodonts im Längs- und im Querschnitt nach. So zeigen Patienten mit Parodontitis in der Regel höhere Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine, speziell IL-1 β , als Patienten mit Gingivitis oder gesunde Kontrollprobanden (Yücel et al., 2008; Figueredo et al., 2008; Orozco et al., 2006; Emingil et al., 2005, 2004; Faizuddin et al., 2003; Gamonal et al., 2001). Vergleiche vor und nach einer PA-Behandlung zeigen ähnliche Ergebnisse mit einem Konzentrationsabfall proinflammatorischer Zytokine nach der Behandlung (Thunell et al., 2009; Toker et al., 2008; Tsai et al., 2007; Gamonal et al., 2000). Humanstudien am Modell der experimentellen Gingivitis zeigen im Verlauf der Plaqueakkumulation eine Zunahme klinischer Entzündungszeichen bzw. einen Anstieg proinflammatorischer Immunmediatoren, v. a. IL-1 β (Kinane et al., 1992; Heasman et al., 1993; Nylander et al., 1993; Johnson et al., 1997; Deinzer et al., 1999, 2000a, 2004b; Fransson et al., 1999; Biesbrock & Yeh, 2000; Gonzales et al., 2001; Tsalikis et al., 2002; Zhang et al., 2002; Giannopolou et al., 2003; Waschul et al., 2003; Nonnenmacher et al., 2009)

Interessant ist, dass die lokalen Konzentrationen vieler der im Sulkus-Fluid erfassten Zytokine die Konzentrationen, die im Serum gemessen werden, um etwa den Faktor 1.000 übersteigen. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die im Serum beobachteten Befunde nur schwer auf die Prozesse im Gewebe übertragen werden können. Ein Nachteil der Analyse von Parametern im Sulkus-Fluid besteht darin, dass nur sehr geringe Probenmengen gewonnen werden können. Damit bleibt auch die Anzahl von Parametern, die im Sulkus-Fluid zu einem Messzeitpunkt erfasst werden können, begrenzt, greift man nicht auf teure Multiarray-Verfahren zurück, die für diese Dissertation nicht zur Verfügung standen.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher zwei wichtige proinflammatorische Zytokine analysiert: IL-1 β und IL-8. Von IL-1 β war bereits bekannt, dass es in engem

Zusammenhang mit dem klinischen parodontalen Entzündungsgeschehen steht und auf psychische Belastungen reagiert. Vorangegangene Untersuchungen von Deinzer und Mitarbeiter (Waschul et al., 2003) hatten außerdem gezeigt, dass ein Anstieg von IL-1 β im Sulkus-Fluid nicht von einem Anstieg des IL-1-Rezeptorantagonisten begleitet wird, so dass zumindest auf dieser Ebene eine Gegenregulation nicht zu beobachten war. Mit IL-8 sollte ein Parameter der frühen, angeborenen Immunantwort analysiert werden, nachdem die Analysen der immunologischen und psychoimmunologischen Studien der vergangenen Jahre gezeigt haben, dass eine reine Fokussierung auf die Parameter der adaptiven Immunantwort offensichtlich eine zu starke Begrenzung darstellt, um Mechanismen der Entzündungsregulation verstehen zu können (s. die Diskussion zu TH-Zellpopulationen weiter oben).

1.5.4 Befundlage zu Stress und Parodontalerkrankungen

Das Heranziehen des Gingivitis-Modells in dieser Arbeit rechtfertigt sich insbesondere, wenn bereits andere Studien einen Zusammenhang zwischen Stress und Parodontalerkrankungen nahe legen. Für akademischen Stress und den immunologischen Verlauf einer experimentellen Gingivitis existieren Befunde aus der eigenen Arbeitsgruppe, die weiter oben schon ausführlicher erläutert wurden (Deinzer et al., 1999, 2000a,b, 2004, Waschul et al., 2003). Aber auch für die Parodontitis legt eine Reihe von Untersuchungen einen Zusammenhang zu Stress nahe. Hierzu gehören zahlreiche Querschnittsstudien und wenige Längsschnittstudien aus dem Humanbereich (siehe Boyapati & Wang, 2007; Le Resche & Dworkin, 2002). In Querschnittuntersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen der parodontalen Gesundheit und verschiedenen psychosozialen Faktoren aufgezeigt werden. Neben allgemeinem Stresserleben gilt dies auch für kritische Lebensereignisse (Green et al., 1986; Monteiro da Silva et al., 1996; Croucher et al., 1997), Arbeitsbelastungen und Qualität der Ehe (Marcenes & Sheiham, 1992; Linden et al., 1996), finanzielle Sorgen (Genco et al., 1999), Ängste und Depression (Monteiro da Silva et al., 1996; Vettore et al., 2003; Johannsen et al., 2006, 2007; Rosania et al., 2009), Copingverhalten (Genco et al., 1999; Wimmer et al., 2002, 2005). In

Längsschnittstudien konnte zudem gezeigt werden, dass bei höheren Arbeitsbelastungen ein höherer parodontaler Schaden in den Folgejahren zu erwarten ist (Linden et al., 1996) und dass fehlende soziale Unterstützung und häufiger Ausdruck von Ärger das Parodontitisrisiko erhöhen (Merchant et al., 2003). Noch eindrücklicher zeigen tierexperimentelle Studien, dass Stress und Stressmediatoren die entzündliche Degeneration des Parodonts fördern können. Ausgesprochen systematisch hat hier die Gruppe von Breivik (Breivik et al., 2000a,b, 2005) die Effekte verschiedener Stresshormone auf eine experimentell induzierte Parodontitis untersucht und gezeigt, dass eine erhöhte Verfügbarkeit von Cortisol den parodontalen Breakdown beschleunigt. In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass heftiger Dauerstress bei Ratten und Mäusen zu einer vermehrten Zerstörung des Zahnhalteapparates führt (Gupta et al., 1960; Takada et al., 2004).

Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass die parodontale Entzündungsregulation stresssensitiv ist. Damit eignet sich die Gingivitis auch aus dieser Hinsicht in besonderer Weise als Modell für psychoimmunologische Untersuchungen.

Doch zunehmend wird auch deutlich, dass man nicht allgemein von *den* Effekten von Stress auf das Immunsystem sprechen kann im Sinne einer einheitlichen Ausrichtung und Stärke dieser Effekte. Vielmehr hängen diese offensichtlich von einer Reihe von Faktoren ab, die bereits oben diskutiert wurden. Die Bedeutung des zeitlichen Zusammenhangs zwischen Stress und Entzündung, d. h. der Zeitpunkt des Zusammentreffens von Entzündungsreiz und psychischer Belastung wird in dieser Arbeit experimentell untersucht.

1.6 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit macht sich zum Ziel, zu einem besseren Verständnis der komplexen Zusammenhänge zwischen Stress und Entzündungsregulation beizutragen. Ihre besondere Relevanz erhält diese Aufgabenstellung aufgrund der Tatsache, dass chronisch entzündliche Prozesse eine zentrale Rolle in der Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen darstellen.

Eine Entzündungsreaktion stellt zunächst einmal eine Anpassungsreaktion des Organismus dar, die darauf abzielt, einen schädlichen Reiz zu entfernen und die ursprüngliche Integrität des Körpers wieder herzustellen. Diese Aufgabe übernimmt das Immunsystem mit seinen verschiedenen Zellpopulationen. Zytokine, Immunbotenstoffe, sind dabei die wesentlichen Regulatoren, die die Tätigkeit der verschiedenen Zellpopulationen aufeinander abstimmen. Störungen in dieser Abstimmung, also in der Entzündungsregulation, werden als wichtige Ursache für die Entstehung pathogener chronisch entzündlicher Prozesse gesehen.

Seit vielen Jahren liegt der Fokus der immunologischen Forschung hinsichtlich des Störungsorts vor allem in der Ausbalancierung zweier Zellpopulationen der *adaptiven* Immunantwort, den T-Helferzellen (TH) vom Typ eins und zwei (TH1 und TH2). Eine Reihe von widersprüchlichen Befunden und die Entdeckung zusätzlicher Zellpopulationen hat eine Erweiterung dieses Konzeptes bedingt. Insbesondere TH17-dominierte Immunreaktionen, geraten so ins Zentrum des Interesses. Sie sind gekennzeichnet durch ein stark proinflammatorisches Reaktionsprofil, bei welchem IL-1 β ein Leitzytokin darstellt, das selbst stark proinflammatorische Eigenschaften besitzt.

Allerdings mehren sich auch Hinweise darauf, dass die Prozesse der Entzündungsregulation, und vor allem auch der –dysregulation, möglicherweise schon mit der frühen *angeborenen* Immunantwort auf eine Noxe einsetzen und nicht erst bei der späteren adaptiven Immunantwort. Eine Signalfunktion für eine solche frühe

Immunantwort besitzt z. B. das Chemokin IL-8, das mit seinen starken chemotaktischen Eigenschaften zugleich in hohem Maße proinflammatorisch wirkt.

Psychoneuroimmunologische Forschung hat mittlerweile eine jahrzehntelange Tradition. Sie hat unter anderem aufgezeigt, wie das zentrale Nervensystem direkt über neuronale Verbindungen und indirekt auf endokrinem Wege das Immunsystem und damit auch die Entzündungsregulation beeinflussen kann. Wesentliche Moderatoren sind hierbei die Stresshormone Cortisol, Adrenalin und Noradrenalin, einige Neuropeptide (darunter Neuropeptid Y und Substanz P) sowie die jeweiligen Rezeptoren, die von den Zellen des Immunsystems exprimiert werden. Während psychoimmunologische Forschung zum Zusammenhang von Stress und Entzündung zunächst von einer generell entzündungsdämpfenden Wirkung von Stress ausging, zeigt sich im Verlauf der Jahre jedoch ein wesentlich komplexeres Bild. So verändert sich mit zunehmender Chronizität einer Entzündung nicht nur die Innervation des Gewebes hinsichtlich der Art und der Menge der innervierenden Nervenfasern, auch die Expressierung der entsprechenden Rezeptoren auf den Immunzellen variiert. Bei der Analyse von Stresseffekten auf die Entzündungsregulation muss also deutlich unterschieden werden, wann Stress und Entzündungsgeschehen aufeinander treffen, ob im nichtentzündeten Zustand, im Stadium einer akuten Entzündung oder bei einer persistierenden bzw. chronischen Entzündung.

Auf einen weiteren wesentlichen Punkt, den es zu beachten gilt, weisen neuere immunologische und neuroimmunologische Forschungen hin: Stressinduzierte Veränderungen in der Blutbahn oder in der Reaktion von Immunzellen, die der Blutbahn entnommen wurden, müssen mitnichten repräsentativ sein für die Veränderungen, die parallel hierzu im Gewebe, am Ort einer Entzündung selbst stattgefunden haben. So exprimieren im Blut zirkulierende Monozyten andere Rezeptoren als die ausdifferenzierten Makrophagen im Gewebe, auch erfolgt die Freisetzung der meisten Zytokine, darunter IL-1 β und IL-8 eher parakrin in das entzündete Gewebe als endokrin in die Blutbahn, worauf schon die vielfach höheren Zytokinkonzentrationen im Gewebe hinweisen. Die wenigsten psychoimmunologischen Studien zur Entzündungsregulation untersuchen aber die Effekte von Stress auf Veränderungen im entzündeten Gewebe selbst.

Am Modell der experimentellen Gingivitis hat dies vor einigen Jahren die hiesige Arbeitsgruppe begonnen und festgestellt, dass diese durch eine längerfristige Belastung proinflammatorisch ausgelenkt werden kann, im Sinne einer erhöhten Freisetzung von IL-1 β in den Sulkus gingivalis. Die Stärke des Effektes variierte hier, wie zu vermuten, mit dem Zeitpunkt des Zusammentreffens von Stress und Entzündungsreiz. Ähnliche Daten fehlen für die Wirkungen von Akutstress. Lediglich in einer Arbeit wurden die Effekte einer akuten Belastung auf IL-1 β im Sulkus gingivalis bei einer seit vier Wochen bestehenden experimentellen Gingivitis untersucht (Deinzer et al., 2004).

Die vorliegende Arbeit sucht nun die dort gewonnenen Erkenntnisse zu den Effekten von Stress auf die Entzündungsregulation zu erweitern. Analysiert werden die Effekte von akutem Stress auf die beiden sulkulären Zytokine IL-1 β und IL-8, die beide eine proinflammatorische Auslenkung der Immunantwort signalisieren. Dabei werden unterschiedliche Entzündungszustände miteinander verglichen. Die (relativ kurz bestehende) experimentelle Gingivitis und die wesentlich länger existierende chronische Gingivitis. Da bislang noch nichts dazu bekannt ist, ob und in wiefern sich diese beiden Zustände hinsichtlich ihres Zytokinprofils unterscheiden, erfolgt im Rahmen dieser Arbeit auch dieser Vergleich.

Damit untersucht die vorliegende Arbeit zunächst die folgenden Fragestellungen:

1. Inwieweit unterscheidet sich klinisch und immunologisch (gemessen an den lokalen Konzentrationen von IL-1 β und IL-8) eine experimentelle von einer chronischen Gingivitis? (Studie 1)
2. Inwieweit unterscheiden sich die Effekte von Stress auf sulkuläres IL-1 β und IL-8 bei den beiden Entzündungszuständen? (Studie 2)

Geprüft wird die Hypothese, dass sich die beiden Zustände sowohl im unstimulierten Zustand als auch hinsichtlich der Wirkungen von Stress unterscheiden.

Aufgrund der Ergebnisse zu den ersten Fragestellungen, erfolgt danach noch die Prüfung einer zusätzlichen Fragestellung:

3. Hat eine akute Stressbelastung bei chronischer Gingivitis eine stärkere proinflammatorische Wirkung im Sinne einer erhöhten Freisetzung der Zytokine IL-8 und IL-1 β ?

2 Empirische Studien

Die vorliegende Arbeit setzt sich aus insgesamt drei Studien zusammen. Studie 1 diente der Prüfung der Annahme, dass sich eine vierwöchige experimentell induzierte Gingivitis von einer unter natürlichen Bedingungen vorkommenden chronischen Gingivitis klinisch wie auch immunologisch unterscheidet. Dazu wurden im randomisierten Untersuchungsdesign an zwei Gruppen (experimentelle vs. chronische Gingivitis) im Verlauf einer vierwöchigen Untersuchungsperiode einmal wöchentlich klinische und immunologische Parameter erhoben. Am Ende dieser vier Wochen erfolgte ein statistischer Vergleich dieser beiden gingivalen Entzündungszustände. Zu Klärung der Frage, inwieweit die Dauer der jeweiligen Entzündung Stresseffekte auf die lokale Entzündungsreaktion moderiert, erfolgte in Studie 2 die Analyse von Akutstresseffekten auf diese beiden Entzündungszustände. Dazu unterliefen die Gruppen von Studie 1 am Ende der vierwöchigen Untersuchungsphase an zwei aufeinander folgenden Untersuchungstagen eine Ruhe vs. Stressbedingung. Im Rahmen dieser jeweils vierstündigen Laboruntersuchung wurden die immunologischen Parameter messwiederholt erfasst, d. h. es fanden eine Prästress- und drei Poststressmessungen statt. Auf der Basis der Ergebnisse von Studie 2 kam es zur Durchführung von Studie 3, in der geprüft wurde, ob die chronische Gingivitis nicht nur im Vergleich zur experimentellen Gingivitis, sondern auch für sich allein genommen die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine steigert. Im Folgenden werden die für alle Studien gültigen methodischen Grundlagen erläutert, bevor dann die einzelnen Studien mit ihren methodischen Details, Ergebnissen und Diskussion dargestellt werden.

2.1 Allgemeine Methoden

2.1.1 Studienteilnehmer

Studienteilnehmer waren männliche und weibliche Studierende. Die Rekrutierung der Probanden erfolgte über Aushänge, die über den Campus verteilt wurden und über Internetanzeigen auf der Homepage der Universität.

2.1.1.1 Einschlusskriterien

Um eine Randomisierung der beiden Untersuchungsgruppen „akute“ vs. „chronische“ Entzündung zu ermöglichen, galt als Einschlusskriterium für alle Studienteilnehmer das Vorhandensein einer plaque-assoziierten Gingivitis an mindestens fünf von sechs untersuchten Papillen. Eine plaque-induzierte Gingivitis wurde dann angenommen, wenn die Papille eine Blutungsreaktion auf druckloses Sondieren zeigte und an den an das Zahnfleisch angrenzenden Flächen des Zahnes Plaqueanlagerungen sichtbar waren.

2.1.1.2 Ausschlusskriterien

Aufgrund potentieller Einflüsse auf die gingivale Gesundheit und aufgrund ethischer Erwägungen kamen verschiedene Ausschlusskriterien zum Tragen. Diese Kriterien wurden durch eine zahnmedizinische Untersuchung und über ein anamnestisches Interview abgeklärt und beinhalteten folgende Punkte:

- Verdacht auf eine parodontale Erkrankung (Taschentiefe von mehr als 3,5 mm und/oder gingivale Rezessionen)
- Aktuelle kieferorthopädische oder zahnmedizinische Behandlung
- Unbehandelte Karies
- Defekte Füllungen
- Erkrankungen des Immunsystems
- Aktuelle Infektionen jeglicher Art
- Akute allergische Reaktionen (z. B. Heuschnupfen)

- Gegenwärtige oder vergangene neurologische oder psychiatrische Erkrankungen
- Schwangerschaft
- Rauchen von mehr als 5 Zigaretten pro Tag
- Drogenmissbrauch
- Regelmäßige Einnahme von Medikamenten (einschl. Kalziumantagonisten, Antikonvulsiva, immunstimulierende bzw. –dämpfende Substanzen)
- Einnahme von Antibiotika oder fiebersenkenden Mitteln innerhalb der letzten sechs Wochen vor Studienbeginn bis Studienende
- Anhaltende psychische Belastung innerhalb der sechs Wochen vor den Stressexperimenten (z. B. Vorbereitung auf ein Examen)
- Akute psychische Belastung an den Tagen der Stressexperimente selbst (z. B. Prüfungen, Klausuren, etc.)

2.1.2 Unabhängige Variable: Gingivaler Entzündungszustand

Die Studienteilnehmer wurden den Stufen der Unabhängigen Variablen „gingivaler Entzündungszustand“ (experimentelle Gingivitis vs. chronische Gingivitis) randomisiert zugeordnet. Dabei wurde die Randomisierung von einer Person durchgeführt, die nicht in die Datenerhebung involviert war. Lose mit der entsprechenden Untersuchungsbedingung befanden sich in undurchsichtigen verschlossenen Briefumschlägen, welche in einer nicht einsehbaren Box aufbewahrt wurden, aus der für jeden Probanden ein Los gezogen wurde.

2.1.2.1 Experimentelle Gingivitis

Vor der Induktion der experimentellen Gingivitis wurde zunächst gingivale Entzündungsfreiheit hergestellt. Nach einer professionellen Zahnreinigung zur Entfernung jeglicher Plaque erhielten die Probanden Anweisungen zu Optimierung ihrer häuslichen Mundhygiene (modifizierte Basstechnik; Verwendung von Zahnseide). Die diesbezügliche Compliance der Versuchspersonen wurde bis Studienbeginn zwei Mal wöchentlich kontrolliert. Bei diesen Kontrolluntersuchungen wurde, wenn nötig, die Mundhygieneinstruktion erneut wiederholt und evtl. Plaque erneut entfernt. Alle

Probanden zeigten zum Zeitpunkt des Studienbeginns vollkommene gingivale Gesundheit. Versuchspersonen, die zu diesem Zeitpunkt an einer der zu untersuchenden Stellen auch nur eine Blutungsreaktion nach Sondieren zeigten, wurden von der Teilnahme ausgeschlossen.

Nach Herstellung gingivaler Gesundheit begann die vierwöchige Phase der kontinuierlichen Plaqueakkumulation zur Induktion einer experimentellen Gingivitis. Ab diesem Zeitpunkt unterließen die Probanden für einen Zeitraum von vier Wochen jegliches Mundhygieneverhalten. Bei den in dieser Zeit stattfindenden Kontrollterminen zweimal wöchentlich wurden die Frontzähne der Studienteilnehmenden gereinigt, so dass die Plaqueakkumulation nach außen nicht sichtbar war, was die Akzeptanz dieser Untersuchungsbedingung erhöhte.

2.1.2.2 Chronische Gingivitis

Wenn hier von einer chronischen Gingivitis gesprochen wird, so geschieht dies, um einen anhaltenden permanenten entzündlichen Prozess zu beschreiben, der im Falle der Gingivitis aufgrund permanent vorhandener Antigenbelastung gegeben ist. Eine Ermittlung der genauen Dauer dieses Entzündungsprozesses ist wie bei jeder anderen chronisch entzündlichen Erkrankung, nicht möglich, jedoch gibt es gute Gründe von einem chronischen Entzündungsgeschehen auszugehen. Die Prävalenz der Gingivitis bei 35-44-jährigen Personen in der deutschen Bevölkerung wird auf ca. 90% geschätzt (Hoffmann et al., 2006), obwohl die meisten Menschen mindestens einmal täglich ihre Zähne reinigen. Dies deutet auf mangelnde Mundhygienefähigkeiten hin und tatsächlich konnte gezeigt werden, dass wenn Studierende gebeten wurden ihre Zähne bestmöglich zu putzen, danach noch immer Plaque vorzufinden war und zwar an ca. 80% der Stellen, die an die Gingiva angrenzen (Granrath, 2008, unveröffentlichte Daten). Es ist also anzunehmen, dass Plaque wenn einmal vorhanden über lange Zeit bestehen bleibt, wenn sie nicht durch professionelle Maßnahmen entfernt wird.

Die Probanden dieser Untersuchungsgruppe erfüllten alle das Einschlusskriterium, d. h. das Vorliegen einer plaque-induzierten Gingivitis ermittelt über Plaque-Index und Blutungsreaktionen. Sie blieben hinsichtlich ihrer bestehenden Gingivitis (s.

Einschlusskriterium) völlig unbehandelt und wurden instruiert, ihre Mundhygiene wie bisher durchzuführen. Da diese Mundhygiene auch bislang die Anlagerung von Plaque am Gingivarand und die Entstehung einer Gingivitis erlaubt hatte, bestand die Gingivitis über die Dauer der Untersuchung hinweg fort. Damit repräsentierte diese Gruppe die unter natürlichen Bedingungen vorkommende unbehandelte plaque-assoziierte Gingivitis. Auch diese Gruppe durchlief die zweimal wöchentlich stattfindenden Kontrolluntersuchungen, allerdings ohne jegliche Intervention (z. B. Plaqueentfernung).

2.1.3 Abhängige Variablen: sulkuläres IL-1 β und sulkuläres IL-8

Die beiden Abhängigen Variablen, lokales, d. h. sulkuläres IL-1 β und sulkuläres IL-8 wurden im Sulkus-Fluid (SF) erfasst.

Die Tageszeiten der SF-Entnahmen wurden intraindividuell konstant gehalten. Des Weiteren wurden die Studienteilnehmer instruiert, mind. vier Stunden vor Untersuchungsbeginn aufzustehen; drei Stunden vor einer Untersuchung nicht zu rauchen, nichts zu essen oder zu trinken (bis auf Wasser) und im Zeitraum von 24 Stunden vor einer Untersuchung keine exzessive körperliche Betätigung auszuführen sowie Alkoholkonsum zu vermeiden.

Das Sulkus-Fluid wurde mesio-bukkal und disto-bukkal sowie mesio-palatinal und disto-palatinal an den Zähnen 15, 16, und 25, 26 mittels genormter Filterpapierstreifen (Periopaper®, Harco, New York, NY, U.S.A.) entnommen. Die entsprechenden Zähne wurden zuvor zahnärztlich trocken gelegt, um eine Speichelkontamination zu vermeiden. Ein zuvor markiertes Periopaper® wurde 1 mm in den gingivalen Sulkus eingeführt. Die Verweildauer wurde standardisiert auf 30 Sekunden festgelegt, da in Voruntersuchungen bei kürzerer Verweildauer nur sehr geringe Volumina im unteren Kalibrierungsbereich des Periotron® gesammelt werden konnten, Zeiträume über 30 Sekunden dagegen eine Verdunstung befürchten ließen (Cimasoni, 1983). Die quantitative Bestimmung der aufgenommenen Flüssigkeitsmenge erfolgte mit Hilfe des Periotron® 8000 (Harco, New York, NY, U.S.A.), das zuvor mit Serum unter Zuhilfenahme einer Hamilton-Spritze (0-1

µl) in 0,1µl-Schritten mit Standardvolumina von 0,1-0,9 µl geeicht wurde. Die Kalibrierung wurde mit Humanserum entsprechend dem Herstellervorschlag und dem Vorgehen in anderen Studien (Cimasoni, 1983; Griffith et al., 1992; Rudin et al., 1970) vorgenommen. Jedes Volumen wurde je fünfmal auf ein Periopaper® appliziert, die entsprechenden Periotron®-Werte notiert und eine Standardkurve auf Grundlage einer quadratischen Funktion berechnet. An jedem Untersuchungstag erfolgte eine erneute Kalibrierung (siehe Deinzer et al., 1999). Im sofortigen Anschluss an die Messung wurde der weiße Teil (Filterpapier) des Periopaper® abgeschnitten und mit den übrigen Filterstreifen eines Quadranten und 800 µl PBS-Puffer (mit 0,1% Albumin) in einem auf Eis gelagerten Eppendorf-Gefäß gesammelt. Das Gefäß mit den 16 Filterpapierstreifen wurde dann bei 3000 U/Min für 3 Minuten gekühlt zentrifugiert, die Probe auf Mikrogefäße (Eppendorf) mit einem Fassungsvermögen von 0,5 ml aliquotiert und mittels CO₂-Schnee innerhalb von 5 Minuten nach der Zentrifugation tiefgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80°C aufbewahrt. Die verdünnten SF-Proben wurden nach dem Auftauen auf IL-1β und IL-8 mit kommerziell erhältlichen Sandwich-ELISAs (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, Illinois, USA) analysiert und die Konzentrationen über den Verdünnungsfaktor, welcher sich aus der entnommenen Probenmenge und dem Volumen des Diluenten (800 µl) ergab, berechnet. Die Inter- und Intra-Assayvariationen dieser ELISAs liegen bei unter 10%, die Sensitivität beträgt < 1pg/ml. Voruntersuchungen hatten eine Wiederfindungsrate von 90-110% für dieses Entnahme- und Analyseprotokoll ergeben. Alle SF-Proben einer Person wurden jeweils auf ein und derselben ELISA-Platte untersucht. Die Personen, welche die biochemischen Analysen vornahmen, waren gegenüber der Zugehörigkeit der Proben zu den Untersuchungsgruppen verblindet.

2.1.4 Kontrollvariablen: klinische Entzündungszeichen

Zur Überprüfung des klinischen Zustands der Gingiva wurden die klinischen Entzündungszeichen Plaque und Blutung erfasst. Sichtbare Plaque wurde mittels des Plaque-Index nach Sillness & Loe (modifiziert nach Rateitschak und Mitarbeiter (Rateitschak et al., 1989) erhoben, die gingivale Blutungsneigung über den Papillen-

Blutungs-Index nach Saxer & Mühlemann (modifiziert nach Rateitschak und Mitarbeiter (Rateitschak et al., 1989). Die Untersuchung erfolgte immer durch ein und dieselbe Person, die zuvor an einer anderen mit der Erhebung dieser Parameter vertrauten Person kalibriert worden war.

2.1.5 Statistische Datenanalyse

Die Statistische Datenanalyse erfolgte mit dem Softwarepaket SPSS 15. Für alle inferenzstatistischen Verfahren wurde ein Signifikanzniveau von 5% angelegt. Um die Daten auf Normalverteilung zu prüfen, wurden Kolmogorof-Smirnov-Goodnes-of-Fit-Tests berechnet. Sofern nichts anderes berichtet wird, war die Normalverteilungsvoraussetzung erfüllt. Zur Prüfung der Varianzgleichheit bei t-Tests wurde der Levene's Test berechnet und im Fall der Varianzungleichheit die entsprechende Teststatistik für ungleiche Varianzen herangezogen. Bei Varianzanalysen mit Messwiederholung wurden grundsätzlich Greenhouse-Geisser korrigierte Statistiken berechnet und die Original-Freiheitsgrade gemeinsam mit dem Greenhouse-Geisser ϵ (sofern abweichend von 1) berichtet. Als Effektstärkemaße wurde bei Varianzanalysen das partielle η^2 und bei t-Tests das Effektstärkemaß d nach Cohen (1992) mit 95% Vertrauensintervall (CI 95%) berechnet.

2.1.6 Ethik

Alle Studienteilnehmer wurden vor Studienbeginn ausführlich über Studieninhalte und Studiendesign informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Das Studienprotokoll entspricht den Richtlinien der WHO (Declaration of Helsinki) und wurde von der örtlichen Ethikkommission (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) positiv begutachtet.

2.2 Studie 1 – experimentelle vs. chronische Gingivitis

Studie 1 verfolgte die Fragestellung, ob der Zustand einer chronischen Gingivitis mit dem Zustand einer über vier Wochen währenden experimentellen Gingivitis immunologisch und klinisch vergleichbar ist. Eine solche Vergleichbarkeit wird in der parodontologischen Literatur gelegentlich unterstellt, wenn davon gesprochen wird, dass nach drei bis vier Wochen experimenteller Gingivitis eine etablierte Gingivitis vorläge (z. B. Rateischak et al., 1989). Bisher fehlen aber Studien, die diesen Zustand mit dem einer chronischen Gingivitis im kontrollierten randomisierten Design vergleichen.

2.2.1 Spezifische Methoden Studie 1

2.2.1.1 Probanden

An dieser Studie nahmen 26 Studierende teil, die randomisiert auf die Gruppen experimentelle Gingivitis (6 Männer, 7 Frauen) vs. chronische Gingivitis (7 Männer, 6 Frauen) verteilt wurden.

2.2.1.2 Untersuchungsablauf

Spätestens eine Woche vor Beginn der Verlaufsmessungen wurden die Studienteilnehmer nach dem unter 2.1.2 erläuterten Randomisierungsverfahren auf die beiden Untersuchungsgruppen zugeordnet.

Die Datenerhebung erfolgte mit dem Beginn (Tag 0) der Phase der experimentellen Gingivitis in beiden Gruppen parallel, wöchentlich bis zum Abschluss der Phase der experimentellen Gingivitis nach vier Wochen. Das Studienprotokoll mit Erhebungszeitpunkten, d. h. Probenentnahme zeigt Tabelle 2.2.1. In früheren Untersuchungen hatten sich Hinweise darauf ergeben, dass die Adherence, d. h. die Einhaltung der Instruktionen hinsichtlich der Bedingungen der experimentellen Gingivitis (keine Mundhygiene) bei nur wöchentlichen Untersuchungen möglicherweise gering ist (Waschul et al., 2003). Daher wurden die Probanden in der vorliegenden Studie zweimal wöchentlich einbestellt, wobei nur einmal wöchentlich (d. h. zu jedem zweiten wöchentlichen Termin) eine umfassende

Untersuchung stattfand. Zu den anderen Terminen erfolgte lediglich eine grobe Sichtung der Plaqueanlagerungen sowie bei den Probanden mit experimenteller Gingivitis die Entfernung der Plaque an den Frontzähnen.

Tabelle 2.2.1: schematischer Versuchsablauf Studie 1

Tag	-14 bis -10	-7	-3	0	3	7	10	14	17	21	24	27
EG	PZR	Hygiene	Experimentelle Gingivitis (Plaueakkumulation durch Unterlassung der Mundhygiene)									
CG	Chronische Gingivitis (besteht mindestens bereits seit Studienaufnahme)											
Klinik	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
SF				•		•		•		•		•

Abkürzungen: EG: Gruppe „experimentelle Gingivitis“; CG: Gruppe „chronische Gingivitis“; PZR: Professionelle Zahnreinigung; SF: Sulkusfluidentnahme; Klinik: Erfassung von Plaque- und Blutungsindex. *Jeder Punkt (•) symbolisiert den Tag einer Datenerhebung.*

2.2.1.3 Statistische Datenanalyse

Zur Klärung der Forschungshypothese, ob sich die beiden Entzündungszustände (experimentelle Gingivitis vs. chronische Gingivitis) nach vier Wochen experimenteller Gingivitis unterscheiden, erfolgte ein Gruppenvergleich hinsichtlich der klinischen Entzündungszeichen und der Konzentrationen von IL-1 β und IL-8 zu diesem Zeitpunkt mittels t-Test bzw. bei Voraussetzungsverletzungen nonparametrisch mit exakten Tests. Zur Überprüfung der zeitlichen Stabilität des jeweiligen Entzündungszustands über die vier Wochen hinweg wurden für beide Entzündungszustände separate Varianzanalysen mit den Faktoren Zeit (5) und Geschlecht berechnet.

2.2.2 Ergebnisse Studie 1

Das mittlere Alter der Probanden mit experimenteller Gingivitis betrug $26,23 \pm 4,4$ Jahre, das der Probanden mit chronischer Gingivitis $23,77 \pm 3,5$ Jahre. Die beiden Gruppen unterschieden sich diesbezüglich nicht signifikant voneinander [$t(24) = 1.580$; $p = 0.127$]. Die Abbildungen 2.2.1 bis 2.2.4 zeigen die Veränderungen der klinischen und immunologischen Parameter im Verlauf der vierwöchigen Untersuchung.

2.2.2.1 Unterschiede zwischen experimenteller und chronischer Gingivitis am Ende der vierwöchigen Untersuchungsperiode

Der Gruppenvergleich nach vier Wochen erbrachte folgende Ergebnisse: Die Gruppen zeigten keine Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der blutenden Stellen [$t(24) = 0.959$; $p = 0.347$; $d = 0.38$ (CI95%: -0.399; 1.15)]. Im Hinblick auf stärkere Blutungsreaktionen (PBI von 3 und 4) zeigten in der EG-Gruppe drei Probanden (1m; 2w) solche Reaktionen, in der CG-Gruppe war dies bei fünf Probanden (5w) der Fall. Innerhalb der CG-Gruppe resultierte ein signifikanter Geschlechtsunterschied [$\chi^2(2)=9.479$, exaktes $p = 0.005$]. Innerhalb der Frauen zeigte sich ein fast signifikanter Unterschied zwischen den Gingivitis-Gruppen [$\chi^2(3) = 7.635$, exaktes $p = 0.063$] bei den Männern war dies nicht der Fall (exaktes $p = 0.462$). In der EG-Gruppe zeigten alle Probanden an allen 16 Untersuchungsstellen deutliche Plaqueakkumulation ($PI > 1$). In der CG-Gruppe betraf die Plaqueakkumulation ($PI > 1$) im Mittel 13,6 Stellen (Standardabweichung von ± 3). Der Gruppenvergleich hinsichtlich der Anzahl der Stellen mit Plaque ergab einen signifikanten Unterschied [$t(24)=2.713$; $p=0.019$; $d= 1.06$ (CI95%: 0.243; 1.89)].

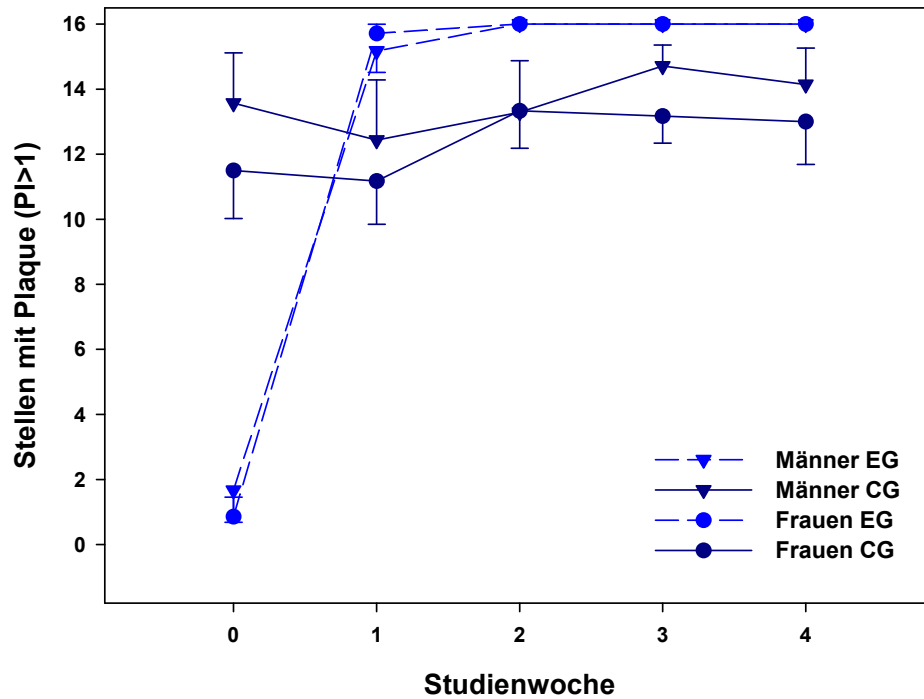


Abbildung. 2.2.1. Anzahl der Stellen mit Plaque.

Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte der Anzahl der Stellen mit Plaque (erfasst über Plaqueindex (PI)) an insgesamt 16 Untersuchungsstellen bei experimenteller Gingivitis (EG; N = 6m, 7w) und bei chronischer Gingivitis (CG; N = 7m, 6w) im Verlauf der vierwöchigen Untersuchungsperiode

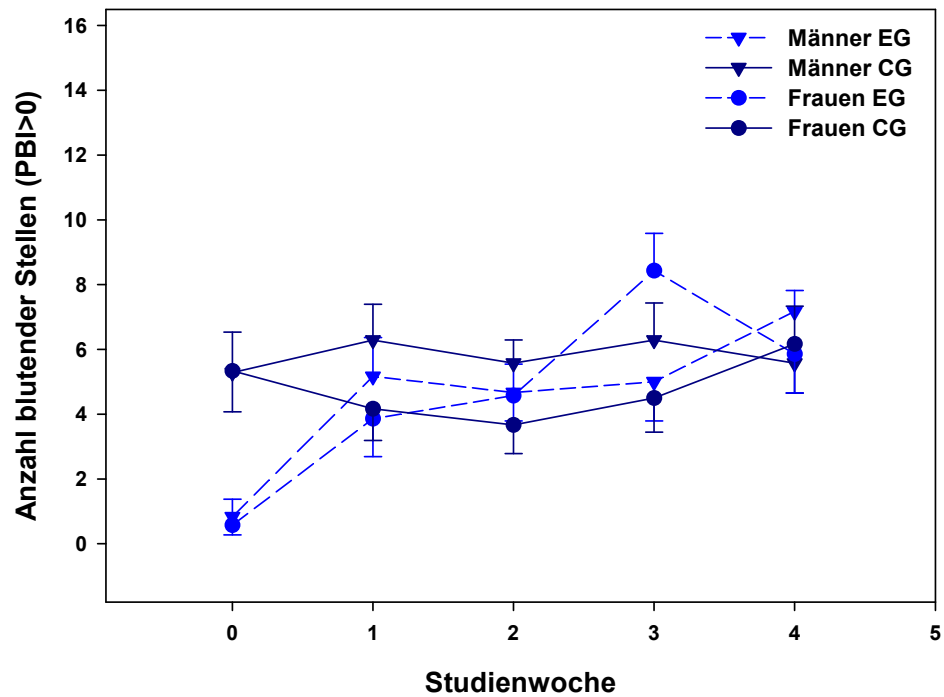


Abbildung 2.2.2. Anzahl der blutenden Stellen.

Mittelwerte und Standardfehler der Anzahl blutender Stellen (erfasst über Papillen-Blutungs-Index (PBI)) an insgesamt 16 Untersuchungsstellen bei experimenteller Gingivitis (EG; N = 6m, 7w) und bei chronischer Gingivitis (CG; N = 7m, 6w) im Verlauf der vierwöchigen Untersuchungsperiode.

Hinsichtlich der sulkulären Konzentrationen von IL-1 β (siehe Abb. 2.2.3) unterschieden sich die Gruppen nach vier Wochen signifikant [$t(24) = 2.258$; $p=0.037$; $d=0.89$ (CI95%: 0.08; 1.7)]. Dabei zeigte die EG-Gruppe höhere Konzentrationen am Ende der EG-Periode als die CG-Gruppe (25.96 ± 12.83 ng/ml vs. 16.94 ± 6.55 ng/ml). Auch die in Abb. 2.2.4 dargestellten Konzentrationen des sulkulären IL-8 unterschieden sich signifikant zwischen den Gruppen [$t(24)=2.137$; $p=0.043$; $d= -0.84$ (CI95%: 0.41; -1.64)]. Allerdings wies hier die EG-Gruppe geringere Konzentrationen auf als die CG-Gruppe (84.61 ± 43.20 ng/ml vs. 54.32 ± 27.30 ng/ml).

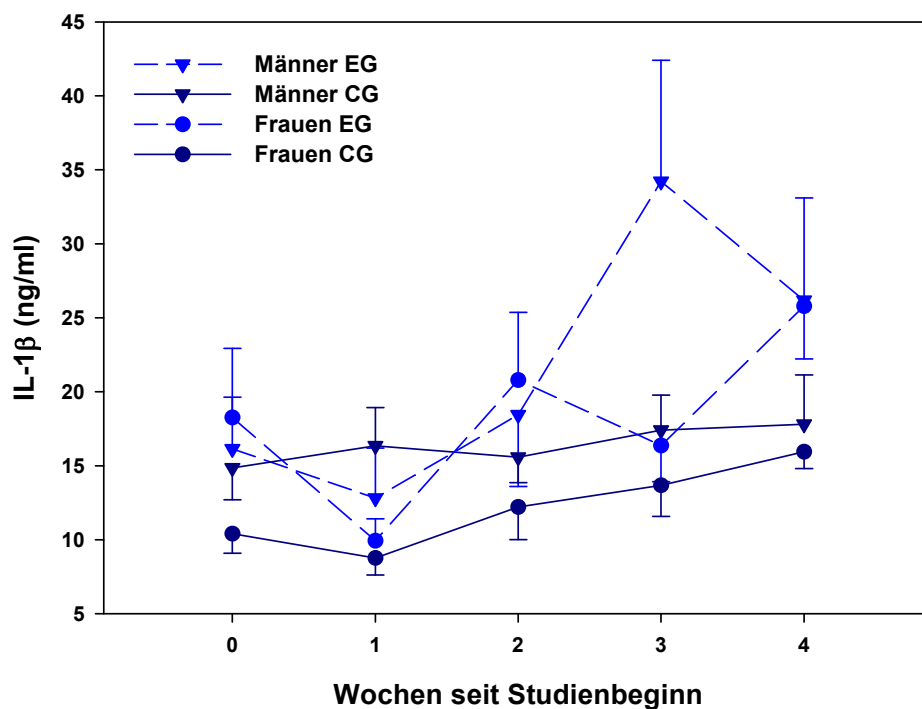


Abbildung 2.2.3. Sulkuläres IL-1 β (ng/ml). Mittelwerte und Standardfehler der Konzentrationen von sulkulärem IL-1 β bei experimenteller Gingivitis (EG; N = 6m, 7w) und bei chronischer Gingivitis (CG; N = 7m, 6w) im Verlauf der vierwöchigen Untersuchungsperiode.

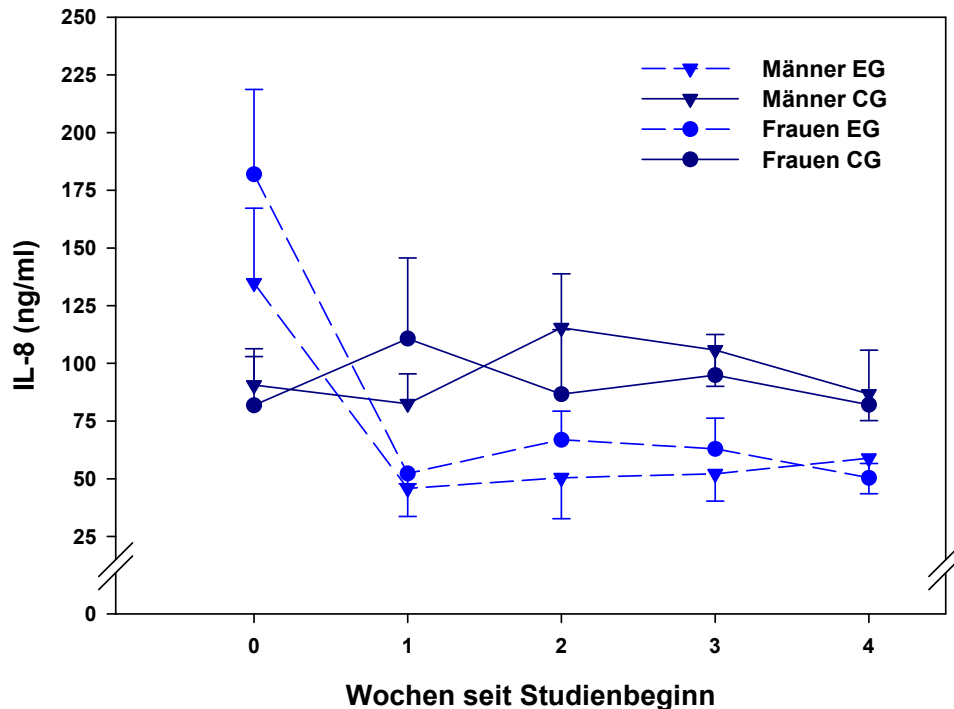


Abbildung 2.2.4. Sulkuläres IL-8 (ng/ml). Mittelwerte und Standardfehler der Konzentrationen von sulkulärem IL-8 bei experimenteller Gingivitis (EG; N = 6m, 7w) und chronischer Gingivitis (CG; N = 7m, 6w) im Verlauf der vierwöchigen Untersuchungsperiode.

2.2.2.2 Analyse von Veränderungen über die Zeit bei experimenteller und chronischer Gingivitis

Zur Überprüfung der Stabilität der jeweiligen Entzündungszustände wurden für jede der beiden Gingivitisgruppen eine Varianzanalyse mit Messwiederholung und den Faktoren Zeit und Geschlecht berechnet.

Innerhalb der Gruppe mit experimenteller Gingivitis ergaben sich signifikante Zeiteffekte für die Anzahl der blutenden Stellen [$F(4/44) = 11.027$; $p < 0.001$; $\eta^2 = 0.50$; $\varepsilon = 0.697$] sowie für die Konzentrationen der beiden Zytokine IL-1 β [$F(4/44) = 5.445$; $p < 0.001$; $\eta^2 = 0.33$; $\varepsilon = 0.718$] und IL-8 [$F(4/44) = 14.18$; $p < 0.001$; $\eta^2 = 0.56$; $\varepsilon = 0.347$]. Die Anzahl der

Stellen mit Plaque wurde aufgrund fehlender Varianz an den letzten drei Messzeitpunkten innerhalb der EG-Gruppe (siehe 2.2.1) keiner Varianzanalyse unterzogen. Für die Konzentrationen des sulkulären IL-1 β ergab sich eine tendenziell signifikante Interaktion Geschlecht x Zeit [F(4/44) = 2.621; p = 0.069; η^2 = 0.19; ϵ =0.718], für die anderen Parameter ergaben sich keine signifikanten Geschlechtseffekte bzw. Interaktionen mit dem Faktor Geschlecht (alle p > 0.17).

Innerhalb der Gruppe mit chronischer Gingivitis zeigten sich weder für die klinischen noch für die immunologischen Parameter signifikanten Zeiteffekte: Plaqueakkumulation [F(4/44) = 1.858; p = 0.168; η^2 = 0.14; ϵ = 0.625], Blutungsreaktionen [F(4/44) = 1.064; p = 0.395; η^2 = 0.09; ϵ = 0.668], IL-1 β [F(4/44) = 2.447; p = 0.09; η^2 = 0.18; ϵ = 0.668] und IL-8 [F(4/44) = 0.842; p = 0.467; η^2 = 0.07; ϵ = 0.640].

2.2.3 Diskussion Studie 1

Ziel von Studie 1 war es im randomisierten kontrollierten Design zwei Arten gingivaler Entzündungszustände (experimentelle vs. chronische Gingivitis) miteinander zu vergleichen. Diese beiden Entzündungszustände spiegeln die gingivale Wirtsantwort auf pathogene Keime wieder, doch es stellt sich die Frage, ob diese jeweiligen Wirtsreaktionen tatsächlich vergleichbar sind. Bei genauer Betrachtung der entsprechenden Bedingungen, unter denen sich die jeweilige gingivale Entzündungsreaktion herausbildet, unterscheiden sich experimentelle und chronische Gingivitis in zumindest drei wesentlichen Aspekten. Einer experimentellen Gingivitis-Periode geht eine Prophylaxemaßnahme zur Entfernung jeglicher Plaque voraus. Diese Maßnahme gleicht einem Eingriff in das lokale Regulationssystem und verändert möglicherweise *per se* die Wirtsantwort auf die nachfolgende Plaqueakkumulation. Ein solcher Eingriff fehlt bei der chronischen Gingivitis. Weiterhin wird bei der experimentellen Gingivitis die Mundhygiene eingestellt, entweder vollständig oder zumindest an den Stellen, die untersucht werden. Menschen mit einer chronischen Gingivitis hingegen putzen sich in der Regel durchaus die Zähne, auch wenn es ihnen nicht gelingt, die vorhandene Plaque komplett zu entfernen. Schließlich ist eine experimentelle Gingivitis aus ethischen Gründen in ihrer Dauer begrenzt. Um eventuelle bleibende Schäden zu vermeiden, sollte nach spätestens 28 Tagen die Mundhygiene wieder hergestellt werden. Die chronische Gingivitis hingegen besteht in der Regel für einen wesentlich längeren Zeitraum (wahrscheinlich häufig über Jahre). Zu klären war in der vorliegenden Studie, ob diese unterschiedlichen Rahmenbedingungen für die Entstehung und Aufrechterhaltung einer Gingivitis auch Auswirkungen auf die immunologische Zusammensetzung des Sulkus-Fluid haben würden.

Tatsächlich ergab der Vergleich dieser beiden gingivalen Entzündungszustände klinisch wie auch immunologisch deutliche Unterschiede. Bei der chronischen Gingivitis waren weniger Stellen mit Plaque besiedelt, wiesen aber gleich viele Stellen wie bei der experimentellen Gingivitis eine erhöhte Blutungsneigung auf, wobei bei Frauen der Gruppe mit chronischer Gingivitis eine Tendenz zu stärkeren Blutungsreaktionen zu beobachten war. Hinsichtlich der sulkulären Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IL-

IL-1 β und IL-8 waren ebenfalls signifikante Unterschiede zu beobachten mit einer höheren Konzentrationen von IL-1 β und einer geringeren Konzentrationen von IL-8 in der Gruppe mit experimenteller Gingivitis verglichen mit der Gruppe mit chronischer Gingivitis. Das Modell der experimentellen Gingivitis, welches in dieser Form in einer Reihe von Studien analysiert wurde (Kinane et al., 1992; Heasman et al., 1993; Nylander et al., 1993; Johnson et al., 1997; Deinzer et al., 1999, 2000a, b; Fransson et al., 1999; Biesbrock & Yeh, 2000; Gonzales et al., 2001; Tsalikis et al., 2002; Zhang et al., 2002; Giannopolou et al., 2003; Waschul et al., 2003; Nonnenmacher et al., 2009) stellt demnach keinen Zustand dar, der mit einer unter natürlichen Bedingungen vorkommenden und in der Klinik häufig beobachtbaren chronischen Gingivitis, vergleichbar ist.

Der zeitliche Verlauf der experimentellen Gingivitis zeigte sich in dieser Studie ähnlich wie auch in anderen Studien (Kinane et al., 1992; Heasman et al., 1993; Deinzer et al., 1999, 2000, 2004; Johnson et al., 1997; Gonzales et al., 2001; Zhang et al., 2002; Waschul et al., 2003) mit einer deutlichen Zunahme von Plaque und Blutungsneigung und einem Anstieg von IL-1 β . Deskriptiv zeigt sich dabei kein kontinuierlicher Anstieg des IL-1 β . Vielmehr zeigen gerade die Frauen erhebliche Schwankungen über die Zeit, die dann auch in einer tendenziell signifikanten Zeit x Geschlecht- Interaktion resultieren. Diskontinuierliche Verläufe der Veränderung von IL-1 β unter experimenteller Gingivitis lassen sich auch bei früheren Studien erkennen (z. B. Kinane et al., 1992; Heasman et al., 1993; Deinzer et al., 2000; Gonzales et al., 2001; Waschul et al., 2003). Diese Befunde weisen darauf hin, dass die IL-1 β -Konzentrationen im Verlauf einer experimentellen Gingivitis starken Schwankungen unterworfen sein können, was die Identifikation zusätzlicher Einflussgrößen auf deren Konzentration (z.B. Stresseffekte) erschweren könnte.

Bemerkenswert ist auch der Verlauf von IL-8 unter der experimentellen Gingivitis. Hier zeigt sich eine rapide Abnahme der Konzentration nach Beginn der Plaqueakkumulation mit danach konstant niedrigen Werten. Dieser Befund entspricht einer Beobachtung von Zhang et al. (2002), die nach drei Tagen Plaqueakkumulation ebenfalls einen rapiden, wenn auch nicht signifikanten Konzentrationsabfall dieses Zytokins berichten. Mehrere

Mechanismen sind denkbar, über die es zu einer solchen plaqueinduzierten Reduzierung der sulkulären IL-8-Konzentration kommen kann. So ist z. B. aus *in vitro* Studien bekannt, dass bestimmte Keime der Plaque (z.B. *Porphyromonas gingivalis*) die Fähigkeit gingivaler Epithelzellen beeinträchtigen können, IL-8 zu produzieren (sog. Chemokinparalyse; Darveau et al., 1998; Huang et al., 2001; Ji et al., 2007). Eine vergleichbare Reduzierung von IL-8 wurde auch bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen unter *Helicobacter pylori* beobachtet (Strömberg et al., 2003; 2005; Marks et al., 2006). Dabei wurde als eine mögliche Ursache eine erhöhte Aktivität regulatorischer T-Zellen diskutiert (Strömberg et al., 2005). Eine andere Ursache für eine solche Reduzierung der IL-8-Freisetzung könnte darin liegen, dass die Produktion von IL-8 durch andere, (gegen-)regulatorische Zytokine gehemmt bzw. unterdrückt wird. Dies konnte *in vitro* z. B. für IL-4, IL-10, IL-13 gezeigt werden, die eine LPS-stimulierte Freisetzung von IL-8 durch neutrophile Granulozyten inhibieren (Wertheim et al., 1993; Kasama et al., 1994; Meda et al., 1994). Neutrophile, die eine bedeutende Quelle für IL-8 darstellen, könnten auch selbst für eine solche Hemmung verantwortlich sein, da mit zunehmender Dichte an neutrophilen Zellen diese Zellen selbst die IL-8-Produktion hemmen. Schließlich wäre auch denkbar, dass bestimmte Signale, die für eine Produktion und Freisetzung von IL-8 notwendig sind, fehlen. Die Synthese von IL-8 wird z. B. durch IL-1 β und TNF- α mediiert (Scapini et al., 2001). Es könnte also auch möglich sein, dass als Gegenregulat steigender proinflammatorischer Zytokine auch entsprechende Antagonisten, z. B. lösliche Rezeptoren für TNF- α vermehrt ausgeschüttet werden und somit die biologische Aktivität dieser Zytokine reduziert wird, was einen entsprechenden Abfall von IL-8 erklären könnte.

Im Gegensatz zur experimentellen Gingivitis erweist sich die chronische Gingivitis als ein über die Zeit stabiler Zustand. Weder hinsichtlich der klinischen Parameter noch hinsichtlich der beiden erfassten Zytokine zeigten sich signifikante Veränderungen über die Zeit. Im Vergleich zur experimentellen Gingivitis zeigt die chronische Gingivitis geringere IL-1 β und erhöhte IL-8-Konzentrationen. Wie aus klinischen Untersuchungen bekannt ist, sind chronisch entzündliche Erkrankungen häufig durch stabile Verläufe gekennzeichnet, die durch Exazerbationen unterbrochen werden können, d. h. es kommt zu überschießenden lokalen Entzündungsreaktionen (Mercado et al., 2003). Gerade die

gegenüber der experimentellen Gingivitis erhöhten IL-8-Spiegel könnten einen Hinweis darauf sein, dass mit zunehmender Chronifizierung des Entzündungsgeschehens die IL-8-Konzentrationen steigen. Tatsächlich zeigen verschiedene Befunde, dass die Schwere der Symptomatik chronisch entzündlicher Erkrankungen mit der Konzentration von IL-8 assoziiert ist (Mazzuchelli et al., 1994; Daig et al., 1996; Gamonal et al., 2000, 2001; Kraan et al., 2000; Mittermaier et al., 2004; Straub et al., 2005).

Zusammengefasst zeigt der Vergleich von experimenteller vs. chronischer Gingivitis, dass sich diese beiden Entzündungszustände auch nach vier Wochen experimenteller Gingivitis immunologisch wie auch klinisch unterscheiden. Damit kann die erste Forschungshypothese angenommen werden. Interessant ist dabei, dass sich nicht nur quantitative Unterschiede hinsichtlich der Zytokinkonzentrationen zeigen. Dies wäre ein Ergebnis, das möglicherweise allein durch die Dauer des Entzündungsprozesses zu erklären wäre. Stattdessen unterscheiden sich die beiden Zustände insofern auch qualitativ, als bei der chronischen Gingivitis zwar erhöhte Werte des proinflammatorischen Zytokins IL-8 aber zugleich reduzierte Werte des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β beobachtet wurden. Dies könnte bedeuten, dass sich das jeweilige Entzündungsgeschehen ganz unterschiedlich gestaltet und unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegt. Dies prüft die folgende Studie, die die Effekte von akutem Stress auf die beiden Zytokine bei experimenteller und chronischer Gingivitis untersucht.

2.3 Studie 2 - Entzündungszustand als Moderator der immunologischen Stressreaktion

Wie einleitend in Kapitel 1.3 dargelegt, kann psychischer Stress eine Immunreaktion provozieren. In Studie 2 soll nun geklärt werden, ob der Entzündungszustand diese in diesem Fall lokale immunologische Stressreaktion beeinflusst. Auf einen solchen moderierenden Einfluss weisen frühere Studien hin (siehe 1.4.1.3). Hier werden sie im randomisierten und kontrollierten Untersuchungsdesign am Menschen untersucht. Geprüft wird die Hypothese, dass Stresseffekte vom Entzündungszustand moderiert werden.

2.3.1 Spezifische Methoden Studie 2

2.3.1.1 Probanden

Untersucht wurden die Probanden von Studie 1. Die unter 2.1.2. bis 2.1.4 beschriebenen Variablen wurden um folgende ergänzt:

2.3.1.2 Unabhängige Variable: Stress- vs. Ruhebedingung

Die Stress- vs. Ruhebedingung dauerte jeweils 30 Minuten und wurde im Messwiederholungsdesign an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Die Abfolge der jeweiligen Bedingung wurde dabei randomisiert und gegenbalanciert. Das Protokoll entspricht dem von Deinzer et al. (2004) und hat sich als zuverlässige Methode zu Provokation einer endokrinen Stressreaktion bewährt (Deinzer et al., 2004; Kleineidam, 1996). Die beiden jeweiligen Bedingungen wurden von zwei verschiedenen Versuchsleitern durchgeführt, die zudem verblindet waren bezüglich des Gingivitiszustands. Bis zu den Untersuchungstagen hatten die Versuchspersonen lediglich die Information, dass eine psychologische Aufgabe auszuführen sei und wussten dementsprechend auch nicht, welche der beiden Bedingungen sie an den jeweiligen Tagen erwartete.

Stressbedingung

Die Stressinduktion erfolgte in einem Beobachtungslabor (ca. 24m²) durch die Antizipation, die Vorbereitung und das Halten einer Rede vor einer Videokamera. In der Mitte des Beobachtungslabors befand sich ein Tisch mit einem Stuhl, auf dem die Versuchsperson saß. Zwei Meter vor dem Tisch stand eine professionelle TV-Kamera, zwei weitere kleine steuerbare Kameras waren an jeweils einer der oberen Raumecken gegenüber des Tisches angebracht und eine dritte befand sich an der oberen Mitte der Wand hinter dem Tisch. Neben dem Beobachtungslabor war ein kleiner Raum mit einer Monitoranlage, von der aus die Versuchsperson über die Kameras vom Versuchsleiter beobachtet wurde. Der Zugang zum Beobachtungslabor führte durch diesen benachbarten Monitorraum, so dass die Probanden beim Betreten des Labors die Beobachtungsanlage sehen konnten. Zu Beginn jeder Stressphase betrat die Versuchsleitung den Beobachtungsraum und leitete die jeweilige Phase über eine entsprechende Instruktion ein. Um eine höchstmögliche Standardisierung der Interaktion zwischen Versuchsleiter und – person zu erhalten, wurden alle Instruktionen vorgelesen. Die Fokussierung der steuerbaren Kameras auf die Versuchsperson erfolgte über die gesamte Dauer der Stressbedingung zu standardisierten Zeiten.

Antizipation der Rede (10 Minuten):

Die Stressbedingung begann mit der Antizipation der Aufgabe, eine Rede zu halten. Die Versuchsleitung führte die Versuchsperson durch den Monitorraum in das Beobachtungslabor und bat sie, am Tisch Platz zu nehmen. Die Versuchsperson erhielt nun eine kurze Information über den Inhalt der Aufgabe, die darin bestünde, eine Rede vorzubereiten und anschließend vor der Kamera zu halten, weitere Informationen würden noch folgen.

Vorbereitung der Rede (10 Minuten):

Nach 10 Minuten war die Antizipationsphase beendet, die Versuchsleitung betrat erneut den Beobachtungsraum und informierte den Probanden über das Thema der Rede („Meine positiven und negativen Eigenschaften, wie ich sie selbst sehe, beurteile und wie sie sich auf mein Leben ausgewirkt haben“). Die Versuchsperson wurde instruiert, eine Rede von

genau 10 Minuten Dauer vorzubereiten und darüber informiert, dass die Rede später auf Video aufgezeichnet und hinsichtlich Inhalt und Form ausgewertet werden würde. Außerdem seien beim Halten der Rede gewisse Kriterien einzuhalten, die die Versuchsperson auf einer Informationstafel vorfand, welche ihr ausgehändigt wurde („Strukturieren Sie Ihre Rede! Begründen Sie Ihre Ansichten! Achten Sie auf klare und genaue Formulierungen! Sprechen Sie in ganzen Sätzen! Sprechen Sie deutlich! Sprechen Sie in normaler Lautstärke und Tonlage! Sprechen Sie in normaler Geschwindigkeit! Kontrollieren Sie Ihre Mimik und Gestik!“).

Nach dieser Instruktion und dem Überreichen der Informationstafel stellte die Versuchsleitung einen Timer auf den Tisch, die die ab jetzt noch verbleibende Vorbereitungszeit anzeigte, forderte die Versuchsperson auf, mit der Redevorbereitungen zu beginnen und verließ das Beobachtungslabor. Für die Vorbereitung waren keine Hilfsmittel (z. B. Papier und Stift) erlaubt und verfügbar.

Halten der Rede (10 Minuten):

Nach Ablauf der Vorbereitungszeit betrat die Versuchsleitung erneut das Labor, forderte die Versuchsperson nun auf, sich vor die Kamera zu stellen und fokussierte diese auf das Gesicht der Versuchsperson. Die Versuchsleitung verließ daraufhin wieder den Raum und forderte die Versuchsperson vom benachbarten Monitorraum aus per Mikrofon dazu auf, mit der Rede zu beginnen und zwar mit den negativen Eigenschaften. Unabhängig von der Qualität der Rede unterbrach die Versuchsleitung zwei Minuten nach Beginn der Rede die Versuchsperson über das Mikrofon, erinnerte an die Kriterien, die bei der Rede einzuhalten seien, wiederholte diese noch einmal und fordert den Probanden dazu auf, noch einmal von vorne zu beginnen. Nach insgesamt 10 Minuten wurde dem Probanden mitgeteilt, dass die Redezeit vorbei sei und er sich wieder setzen könne.

Ruhebedingung

Unter der Ruhebedingung saßen die Probanden 30 Minuten ungestört in einem gemütlich eingerichteten Raum mit Couch und Couchtisch und hatten Gelegenheit, bereitliegende Comics zu lesen.

2.3.1.3 Kontrollvariablen: Stimmung, Speichelcortisol, Sulkus-Fluid-Volumen

Zur Überprüfung, ob die Stressbedingung, d. h. ob das Halten einer Rede vor einer Videokamera eine psychische und körperliche Stressreaktion verursacht, wurden die psychische Befindlichkeit und das Speichelcortisol erfasst.

Psychische Befindlichkeit

Zur Erfassung der psychischen Befindlichkeit gaben die Probanden auf jeweils 10 cm langen visuellen Analogskalen (VAS) für verschiedene Eigenschaftswörter an, wie stark dieses jeweilige Eigenschaftswort ihre aktuelle Stimmung reflektierte. Bei den Eigenschaftswörtern handelt es sich um angestrengt, gestresst, hilflos, bedroht, angespannt, ausgeliefert, verärgert und verunsichert. Die Erfassung der Stimmung erfolgte zu insgesamt vier Messzeitpunkten (vor Ruhe vs. Stressbedingung, unmittelbar sowie 45 und 90 Minuten danach).

Endokrine Stressreaktion

Zur Erfassung der endokrinen Stressreaktion wurden Speichelproben entnommen. Dazu wurden die Studienteilnehmer aufgefordert, ihren Speichel im Mund zu sammeln und dann in ein Gläschen zu spucken. Dieser Vorgang dauerte für jede Speichelprobe drei Minuten. Nach der Speichelsammlung wurde der Speichel im Gläschen mit Salivetten (Sarstedt) aufgenommen. Dieses Vorgehen diente der besseren weiteren Handhabung der Speichelproben, die zur weiteren Analyse bei -20° gelagert wurden. Die Cortisolkonzentrationen wurden über einen kommerziell verfügbaren Lumineszenz Assay (IBL-International, Hamburg, Deutschland) ermittelt mit einer Intraassay-Variation von < 7.8 und einer Interassayvariation von 6.2 bis 11.5%.

Sulkus-Fluid -Volumen

Um auszuschließen, dass mögliche Stresseffekte auf die sulkuläre Zytokinkonzentrationen auf bloße Veränderungen des Sulkus-Fluid-Volumens zurückzuführen sind, wurde dieser Parameter zusätzlich analysiert.

2.3.1.4 Untersuchungsablauf

Am Ende der vierwöchigen Untersuchungszeit folgten die Stressexperimente, d. h. die Probanden aus den beiden Gingivitis-Gruppen durchliefen die akute Laborstressbedingung (Rede vor der Kamera). Dabei mussten zwei Frauen aus der Gruppe mit experimenteller Gingivitis von der Analyse ausgeschlossen werden, da eine davon am Tag vor der Stressapplikation starken familiären Belastungen ausgesetzt war und die andere während der Ruhebedingung im Labor einschlief.

Der Untersuchungsablauf gliederte sich in eine Baselinephase, durch die stabile Ausgangswerte erreicht werden sollten, die Stress vs. Ruhephase und eine Erholungsphase. Dabei waren die Personen, die SF entnahmen gegenüber der Versuchsbedingung (Stress vs. Ruhe) verblindet. Die Versuchsleitung der Stressexperimente unterschied sich außerdem von der Versuchsleitung der Ruhebedingung. Den genauen Ablauf mit den Erhebungszeitpunkten für die verschiedenen Variablen zeigt Tabelle 2.3.1.

Tabelle 2.3.1: Zeitlicher Ablauf der Stress- vs. Ruhebedingung an den beiden aufeinanderfolgenden Untersuchungstagen (Stress vs. Ruhe).

Zeit (min)	-30	-15	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135
Phase	Prästress		Stress vs. Ruhe		Poststress							
SF		•			•			•			•	
Klinik												•
Cortisol		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
VAS		•			•			•			•	

Abkürzungen: SF: Sulkusfludentnahme; Blutung: Blutungsindex; Cortisol: Speichelprobe für Cortisolbestimmung; VAS: visuelle Analogskalen; Jedes x symbolisiert eine Datenerhebung; Rot unterlegter Zeitraum: Zeitraum (30min) der Stress vs. Ruhesituation. **Jeder Punkt (•) symbolisiert den Tag einer Datenerhebung.**

2.3.1.5 Statistische Datenanalyse

Die statistischen Analysen für alle Parameter erfolgten über Kovarianzanalysen mit den Faktoren Stress (Stress- vs. Ruhebedingung), Zeit (drei Poststresszeitpunkte), Gingivitis (experimentelle vs. chronische Gingivitis) und Geschlecht. Die in der Baselinephase erhobenen Werte gingen als Kovariate in die Analysen ein. Zusätzlich erfolgte eine

separate Analyse der Prästresswerte auf Unterschiede an den Stress- vs. Ruhetagen mittels t-Test für abhängige Daten.

Für alle Daten wurden zunächst die Eingangsvoraussetzungen wie Normalverteilung sowie Varianzhomogenität geprüft, die, wenn nicht explizit erwähnt, für alle Daten gegeben waren. Zur besseren Übersicht erfolgt die Darstellung der biologischen Parameter für Männer und Frauen separat. Eine deskriptive Statistik der Daten für entsprechende Gruppenmittelwerte und Standardabweichungen befindet sich im Anhang.

2.3.2 Ergebnisse Studie 2

Aufgrund des Ausschlusses von zwei Frauen (siehe oben) gingen in die Datenanalyse 11 Probanden (6 Männer und 5 Frauen) mit experimenteller Gingivitis und 13 Probanden (7 Männer und 6 Frauen) mit chronischer Gingivitis ein. Das durchschnittliche Alter der Probanden mit experimenteller Gingivitis betrug 26,4 Jahre ($\pm 4,8$), das der Probanden mit chronischer Gingivitis 23,8 Jahre ($\pm 3,5$). Die beiden Gruppen unterschieden sich diesbezüglich nicht signifikant voneinander [$t(22) = 1.538$; $p = 0.142$].

2.3.2.1 Kontrollvariablen

Psychische Befindlichkeit

In Abbildung 2.3.1 sind die subjektiven Einschätzungen der psychischen Befindlichkeit an den beiden Untersuchungstagen (Stress vs. Ruhe) dargestellt. Der Faktor Gruppe (experimentelle vs. chronische Gingivitis) ging nicht in die Analysen mit ein, da keine diesbezüglichen Effekte auf die Stimmung zu erwarten sind. Zwei Befindlichkeitsitems wiesen an den Messzeitpunkten 75 min und 120 min nach Stressinduktion keine Normalverteilung auf. Aus diesem Grund sind diese Messzeitpunkte von der kovarianzanalytischen Analyse ausgeschlossen. Die Auswertung der jeweiligen Items wurde mit dem Zwischensubjektfaktor Geschlecht und dem Innersubjektfaktor Stress (Stress vs. Ruhe) durchgeführt. Die Analyse ergab für alle Befindlichkeitsparameter hochsignifikante Haupteffekte für den Faktor Stress [alle $F > 16.290$; alle $p < 0.001$; alle $\eta^2 > 0.43$]. Bei nur einem Item („ausgeliefert“) ergab die Analyse eine leichte Tendenz für eine Stress x Geschlechts Interaktion ($p=0.09$). Für alle anderen Items fanden sich keinerlei signifikante Geschlechtseffekte oder Stress x Geschlechts Interaktionen [alle $F < 1.450$; alle $p > 0.241$; alle $\eta^2 < 0.07$]. In Tabelle 2.3.2 sind die Effektstärken d der Items zu den einzelnen Messzeitpunkten dargestellt. Da sich bei den mehrstufigen Varianzanalysen keine signifikanten Haupteffekte oder Interaktionen mit dem Faktor Geschlecht ergaben, erfolgt die grafische Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 2.3.1 der Übersicht halber über alle Probanden hinweg.

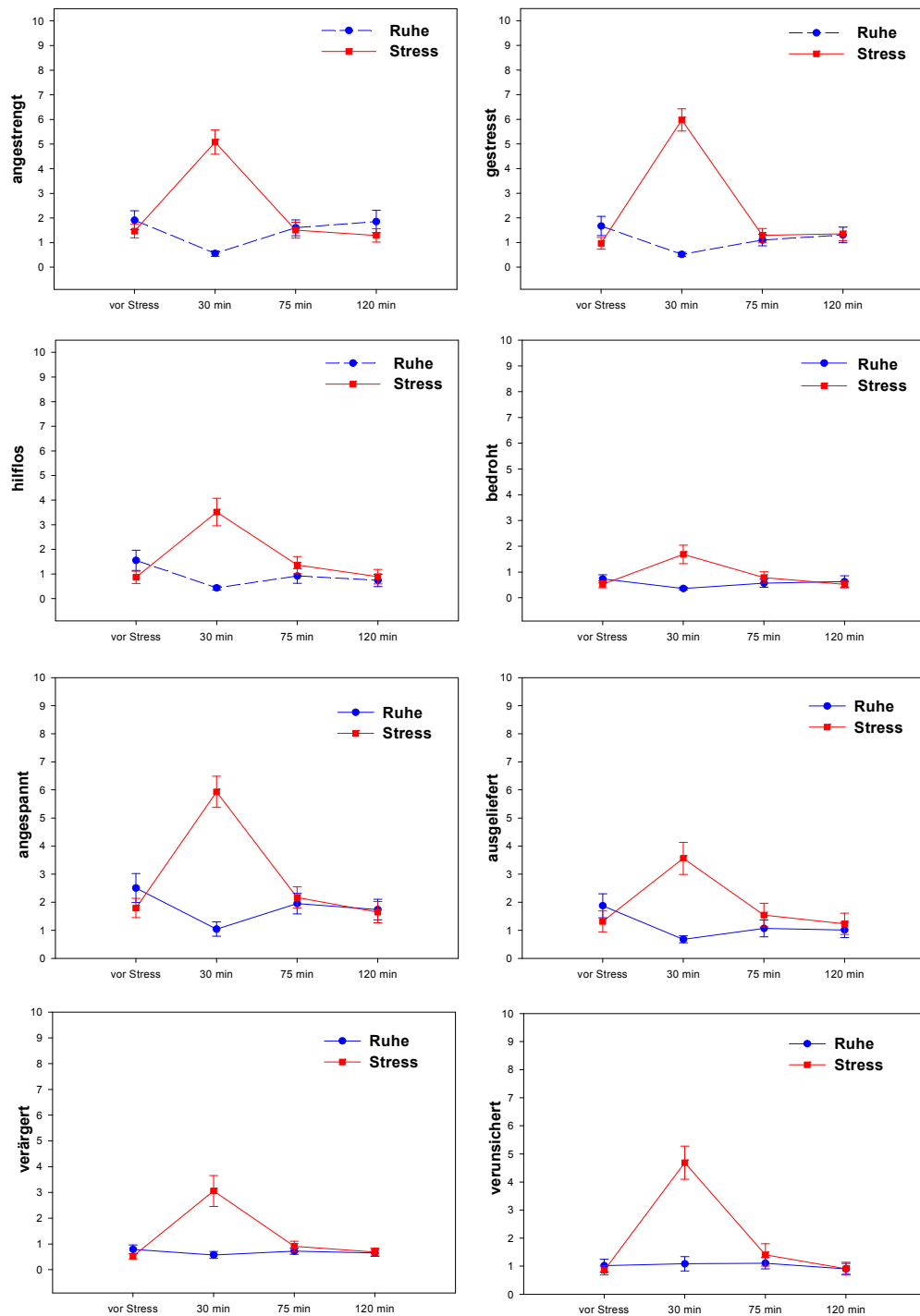


Abbildung 2.3.1. Stresseffekte auf die psychische Befindlichkeit. Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte der psychischen Stressreaktion der Probanden (N = 13m; 11w) an den beiden Untersuchungstagen (Ruhe vs. Stress) vor, unmittelbar nach (30 min) sowie 45 Minuten (75 min) und 90 Minuten (120 min) nach Stress.

Tabelle 2.3.2: Effektstärken d der Stimmungsunterschiede Stress vs. Ruhe zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten für alle Probanden.

Effektstärken d (mit 95% Vertrauensintervallen)				
	prästress	30 min	75 min	120 min
angestrengt	-0.08 [-0.59;0.91]	0.86 [0.26;1.45]	-0.02 [-0.18;0.55]	-0.11 [-0.27;0.46]
gestresst	-0.14 [-0.30;0.43]	1.05 [0.87;1.66]	0.04 [-0.13;0.60]	0.01 [-0.15;0.57]
hilflos	-0.13 [-0.30;0.43]	0.57 [0.40;1.15]	0.09 [-0.08;0.65]	0.03 [-0.13;0.60]
bedroht	-0.04 [-0.21;0.52]	0.26 [0.10;0.83]	0.05 [-0.12;0.61]	-0.02 [-0.18;0.54]
angespannt	-0.13 [-0.29;0.44]	0.88 [0.70;1.48]	0.04 [-0.12;0.61]	-0.02 [-0.18;0.55]
ausgeliefert	-0.10 [-0.27;0.46]	0.53 [0.36;1.10]	0.09 [-0.07;0.66]	0.04 [-0.12;0.61]
verärgert	-0.06 [-0.22;0.51]	0.45 [0.28;1.02]	0.04 [-0.12;0.60]	0.01 [-0.16;0.57]
verunsichert	-0.04 [-0.20;0.53]	0.64 [0.47;1.22]	0.06 [-0.11;0.62]	0.00 [-0.16;0.57]

Endokrine Stressreaktion

Die Erfassung des Speichelcortisols erfolgte zur Überprüfung und Validierung des Stressprotokolls. Die Speichelcortisolkonzentrationen sind in Abbildung 2.3.2 dargestellt. Eine Kovarianzanalyse mit Messwiederholung und den Faktoren Stress, Zeit, Gingivitis und Geschlecht ergab hoch signifikante Haupteffekte für die Faktoren Stress [$F(1/19) = 23.703$; $p < 0.001$; $\eta^2 = 0.56$] und Zeit [$F(8/152) = 23.295$; $p < 0.001$; $\eta^2 = 0.55$; $\epsilon = 0.214$] sowie eine signifikante Stress x Zeit Interaktion [$F(8/152) = 13.905$; $p < 0.001$; $\eta^2 = 0.42$; $\epsilon = 0.171$]. Für die Faktoren Geschlecht und Gingivitis fanden sich weder signifikanten Haupteffekte (alle $F < 0.3$; alle $p > 0.590$; alle $\eta^2 < 0.02$) noch Interaktionen (alle $F < 0.82$; alle $p > 0.46$; alle $\eta^2 < 0.04$).

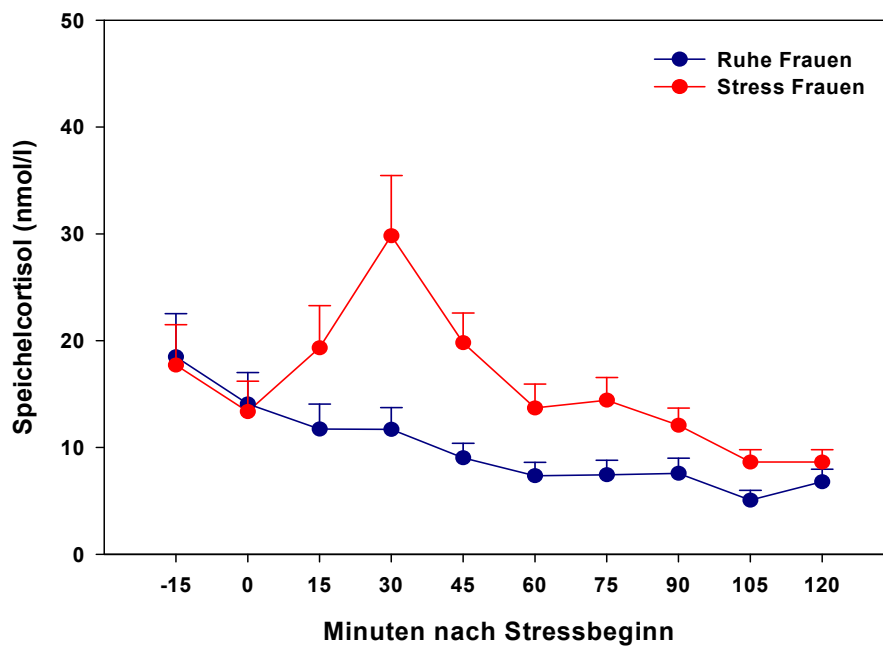
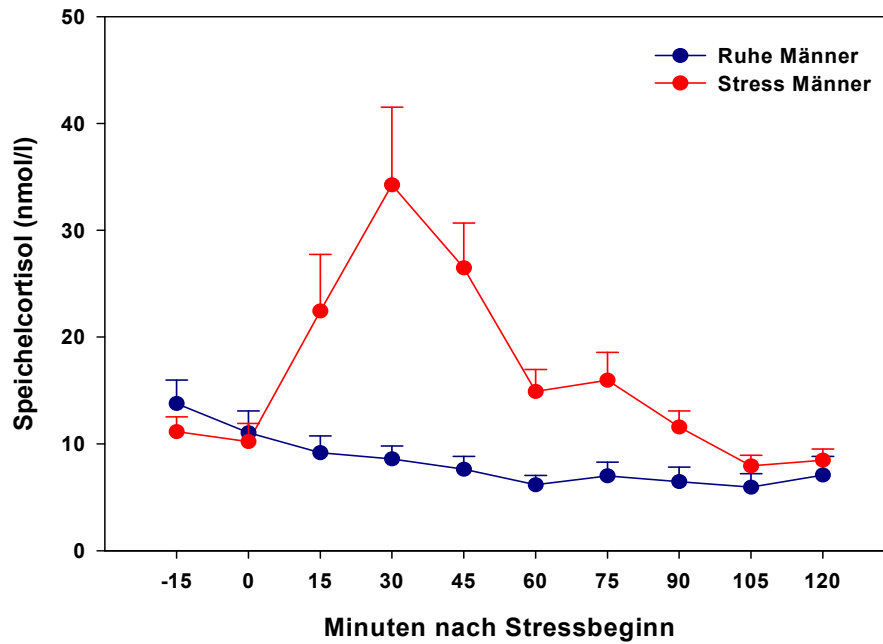


Abbildung 2.3.2. Stresseffekte auf das Speichelcortisol bei Männern (N=13; oben) und Frauen (N=11; unten). Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte der Speichelcortisolkonzentrationen an den beiden Untersuchungstagen (Ruhe vs. Stress). Stressdauer von Minute 0 bis Minute 30.

Sulkus-Fluid-Volumen

Tabelle 2.3.3 zeigt die Prästresswerte des Sulkus-Fluid-Volumens für Männer und Frauen an den beiden Untersuchungstagen (Ruhe vs. Stress) in den beiden Gingivitis-Gruppen. Abbildung 2.3.3 stellt die Poststressverläufe dar.

Tabelle 2.3.3: Prästresswerte des Sulkus-Fluid-Volumen (μl) an den beiden Untersuchungstagen (Ruhe vs. Stress) bei experimenteller Gingivitis (EG; N = 6m, 5w) oder chronischer Gingivitis (CG; N = 7m, 6w).

	Ruhe (M \pm s)	Stress (M \pm s)	t	p
EG				
Männer	3.38 \pm 0.21	3.01 \pm 0.33	1.819	0.129
Frauen	3.26 \pm 0.51	3.11 \pm 0.43	0.592	0.586
CG				
Männer	2.20 \pm 0.73	2.47 \pm 0.44	-1.176	0.284
Frauen	2.90 \pm 0.83	2.18 \pm 0.49	3.514	0.017

Die Kovarianzanalyse mit Messwiederholung ergab keine signifikanten Haupteffekte oder Interaktionen der Faktoren Stress, Gingivitis, Geschlecht und Zeit (alle $F < 2.275$, alle $p > .145$, alle $\eta^2 < 0.11$).

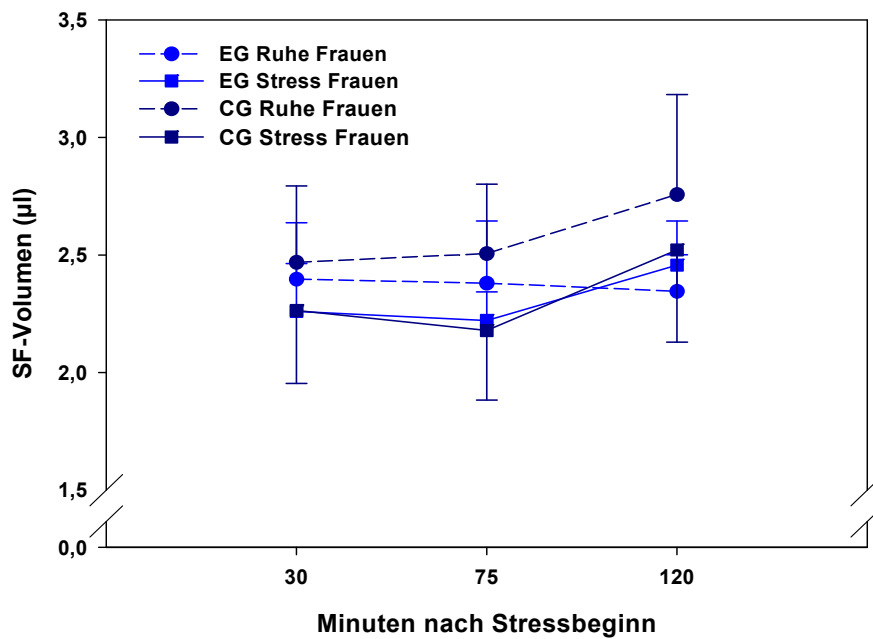
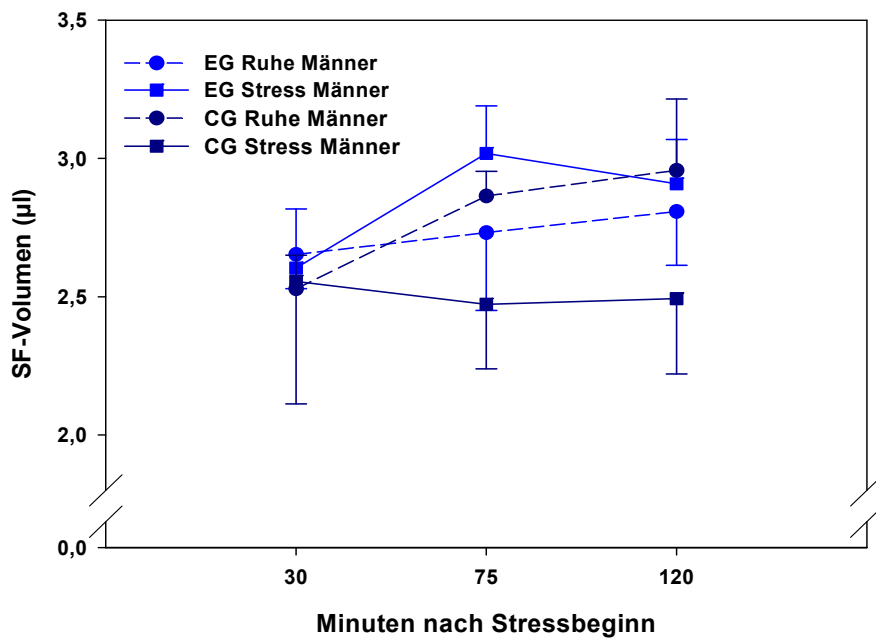


Abbildung 2.3.3 Sulcus-Fluid-Volumen (μl) bei Männern (oben) und Frauen (unten). Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte des SF-Volumens an den beiden Untersuchungstagen (Ruhe vs. Stress) bei experimenteller Gingivitis (EG; N = 6m, 5w) und bei chronischer Gingivitis (CG; N = 7m, 6w).

2.3.2.2 Stressinduzierte Veränderungen von sulkulärem IL- β und IL-8

Sulkuläres IL-1 β

Die Prästresskonzentrationen von sulkulärem IL-1 β sind in Tabelle 2.3.4 dargestellt. Abbildung 2.3.4 zeigt die Differenzwerte Stress-Ruhe der Poststresskonzentrationen des sulkulären IL-1 β in den jeweiligen Gingivitis-Gruppen. Eine Kovarianzanalyse mit Messwiederholung und den Faktoren Stress, Gingivitis, Geschlecht und Zeit ergab einen hochsignifikanten Zeiteffekt [$F(2/38) = 21.154$; $p = 0.000$; $\eta^2 = 0.53$; $\epsilon = 0.704$] sowie signifikante Interaktionen Stress x Gingivitis [$F(1/19) = 4.907$; $p = 0.039$; $\eta^2 = 0.21$], Zeit x Gingivitis [$F(2/38) = 4.448$; $p = 0.033$; $\eta^2 = 0.19$; $\epsilon = 0.704$] und Stress x Zeit [$F(2/38) = 4.566$; $p = 0.021$; $\eta^2 = 0.20$; $\epsilon = 0.881$]. Die 3-fache Interaktion Stress x Zeit x Geschlecht zeigte eine tendenziell signifikantes Ergebnis ($p = 0.054$). Darüber hinaus ergaben sich keine weiteren Effekte (alle $F < 2.300$, alle $p > .144$, alle $\eta^2 < 0.11$).

Tabelle 2.3.4: Prästresswerte von sulkulärem IL-1 β an den beiden Untersuchungstagen (Ruhe vs. Stress) bei Männern und Frauen mit experimenteller Gingivitis (EG; N = 6m, 5w) oder mit chronischer Gingivitis (CG; N = 7m, 6w).

	Ruhe (M \pm s)	Stress (M \pm s)	t	p
EG				
Männer	24.21 \pm 17.93	25.51 \pm 13.65	-0.490	0.645
Frauen	17.47 \pm 7.04	18.13 \pm 10.59	-0.099	0.926
CG				
Männer	13.72 \pm 7.31	13.75 \pm 4.21	-0.019	0.985
Frauen	13.42 \pm 5.58	11.53 \pm 2.90	1.173	0.294

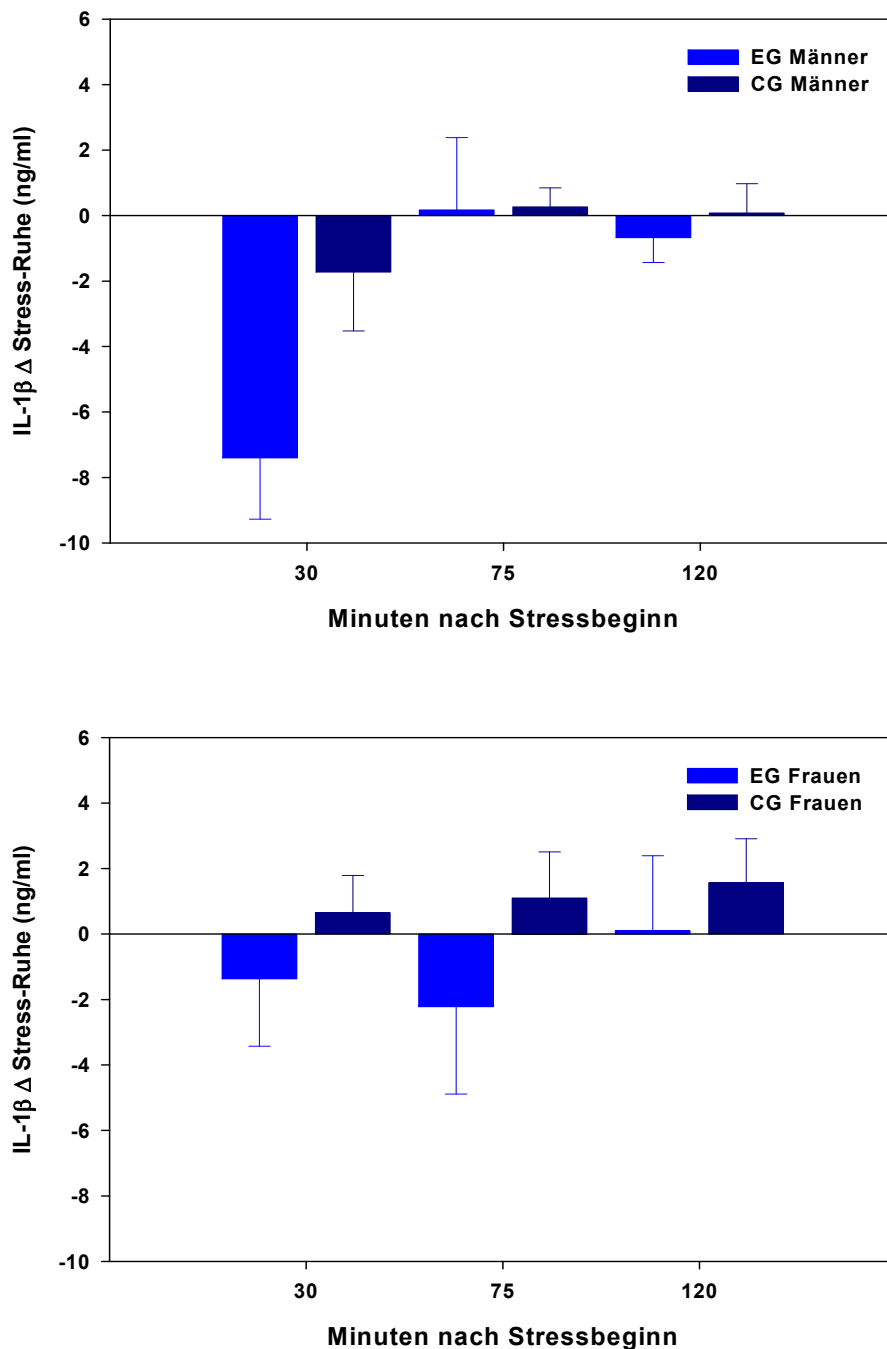


Abbildung 2.3.4. Akutstresseffekte auf sulkuläres IL-1 β bei Männern (oben) und Frauen (unten). Mittlere Differenzwerte Stress-Ruhe und Standardfehler der mittleren Differenzwerte der Poststresskonzentrationen von sulkulärem IL-1 β bei experimenteller Gingivitis (EG; N = 6m, 5w) und bei chronischer Gingivitis (CG; N = 7m, 6w).

Sulkuläres IL-8

Die Prästresskonzentrationen von sulkulärem IL-8 sind in Tabelle 2.3.5 dargestellt. Abbildung 2.3.5 zeigt die Poststresskonzentrationen von IL-8. Eine Kovarianzanalyse mit Messwiederholung und den Faktoren Stress, Gingivitis, Geschlecht und Zeit zeigte außer einer signifikanten Interaktion Zeit x Gingivitis [$F(2/38) = 4.521$, $p = 0.021$, $\eta^2 = 0.19$, $\epsilon = 0.913$] keine signifikante Effekte (alle $F < 2.585$, alle $p > .123$, alle $\eta^2 < 0.130$).

Tabelle 2.3.5: Prästresswerte von sulkulärem IL-8 an den beiden Untersuchungstagen (Ruhe vs. Stress) bei Männer und Frauen mit experimenteller Gingivitis (EG; N = 6m, 5w) oder mit chronischer Gingivitis (CG; N = 7m, 6w).

	Ruhe (M ± s)	Stress (M ± s)	t	p
Exp. Gingivitis				
Männer	56.21 ± 33.03	78.56 ± 27.02	-3.089	0.027
Frauen	67.36 ± 19.47	59.60 ± 42.81	0.321	0.765
Chron. Gingivitis				
Männer	103.96 ± 41.71	83.95 ± 21.26	1.596	0.162
Frauen	115.68 ± 130.59	100.45 ± 71.92	0.400	0.705

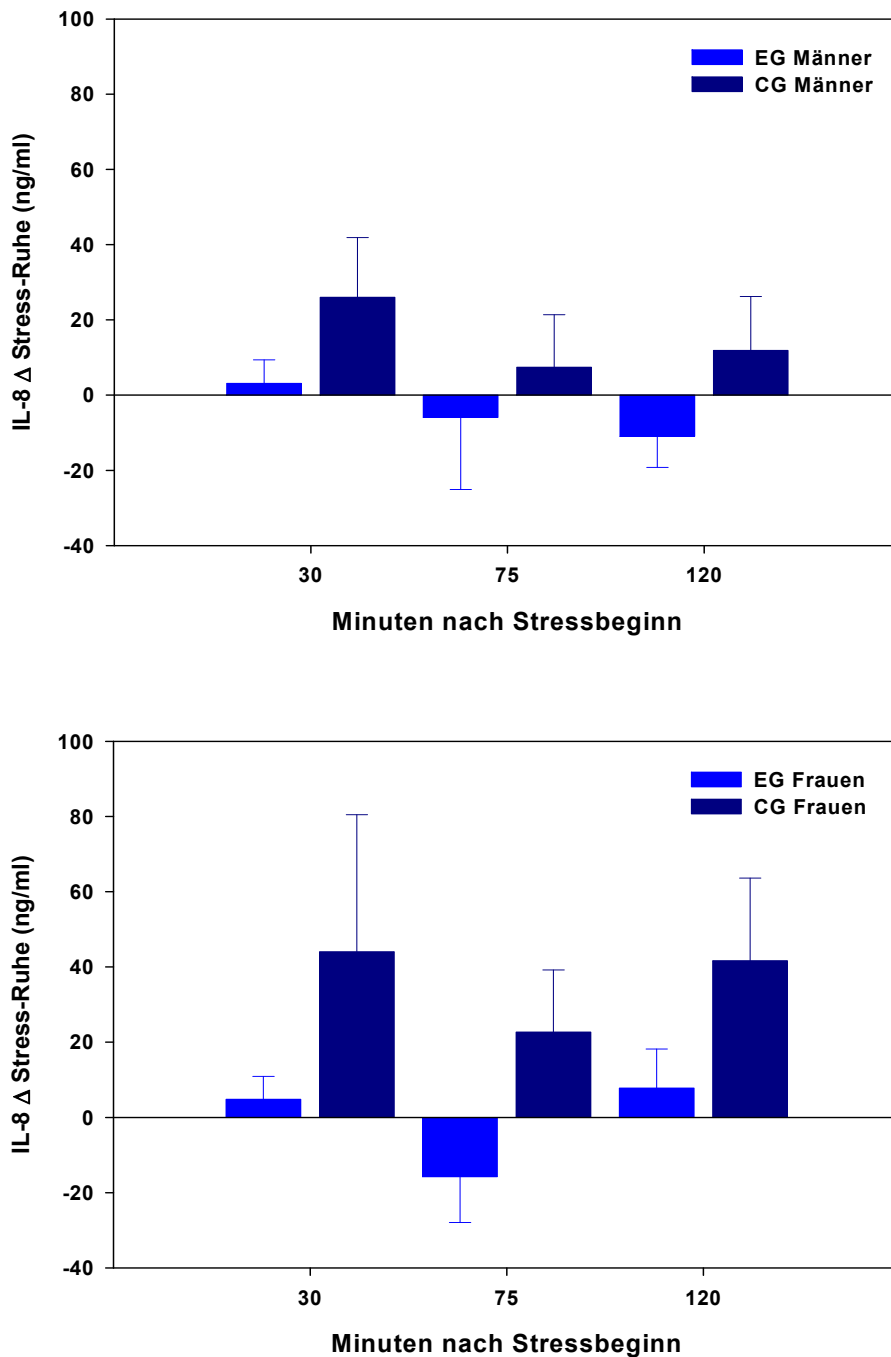


Abbildung 2.3.5. Akutstresseffekte auf sulkuläres IL-8 bei Männern (oben) und Frauen (unten). Mittlere Differenzwerte Stress-Ruhe und Standardfehler der mittleren Differenzwerte der Poststresskonzentrationen von sulkulärem IL-1 β bei experimenteller Gingivitis (EG; N = 6m, 5w) und bei chronischer Gingivitis (CG; N = 7m, 6w).

Tabelle 2.3.6 stellt zusammenfassend die Effektstärken der Unterschiede zwischen experimenteller und chronischer Gingivitis hinsichtlich der immunologischen Stressreagibilität (Differenz Stress-Ruhe) zu den drei Poststresszeitpunkten dar.

Tabelle 2.3.6: Effektstärken d der Unterschiede in den sulkulären Konzentrationen von IL-1 β und IL-8 zwischen chronischer Gingivitis (CG; N = 7m, 6w) und experimenteller Gingivitis (EG; N = 6m, 5w) hinsichtlich der Stresseffekte (Differenzen Stress-Ruhe) an den drei poststress-Messzeitpunkten.

Effektstärken d [mit 95% Vertrauensintervallen]				
CG vs. EG				
	IL-1 β		IL-8	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen
0 min poststress	0.90 [-0.24;2.05]	0.41[-0.33;1.61]	0.56 [-0.07;1.76]	0.48 [-0.26;1.68]
45 min poststress	0.02 [-0.59;1.11]	0.54 [-0.20;1.75]	0.25 [-0.36;1.35]	0.89 [0.10;2.14]
90 min poststress	0.22 [-0.39;1.31]	0.27 [-0.46;1.46]	0.58 [-0.05;1.70]	0.64 [-0.11;1.86]

2.3.3 Diskussion Studie 2

Ziel von Studie 2 war die Analyse des Entzündungszustands als potentiellm Moderator von Stresseffekten auf die lokale Entzündungsreaktion. Dazu durchliefen die Studienteilnehmer im randomisiert-gegenbalancierten Untersuchungsdesign an zwei aufeinanderfolgenden Tagen eine Stress- vs. Ruhebedingung. Der in der vorliegenden Arbeit angewandte akute Laborstressor erwies sich erneut als äußerst effektiver Stressor (siehe Deinzer et al., 2004a). Im Vergleich zur Ruhebedingung führte das Halten einer Rede vor einer Videokamera zu starken psychischen Reaktionen sowie deutlichen Anstiegen der Konzentrationen des Speichelcortisols aller Studienteilnehmer unabhängig von Geschlecht und Gingivitis. Da sich keine Effekte auf die Sulkus-Fluid-Volumina einstellten, kann davon ausgegangen werden, dass Veränderungen der sulkulären Zytokinkonzentrationen nicht auf veränderte Sulkus-Fluid-Fließraten zurückgeführt werden können (Lamster & Grbic, 1995).

Die Analyse von Stresseffekten auf die lokale Entzündungsreaktion ergab angesichts signifikanter Haupteffekte und Interaktionen, dass der Entzündungszustand die Stresseffekte moderiert. Die vorliegenden Daten weisen auf eine stärkere proinflammatorische Ausrichtung von Stresseffekten bei chronischer Gingivitis im Vergleich zu experimenteller Gingivitis hin. Die Effektstärken erreichen dabei mittlere bis große Werte, Männer und Frauen weisen etwas unterschiedliche Zeitverläufe auf.

Dieser Befund ergänzt das Ergebnis von Studie 1, indem er zeigt, dass sich die beiden untersuchten Entzündungszustände nicht nur im basalen Zustand unterscheiden, sondern sich zusätzlich auch durch eine unterschiedliche Stressreagibilität auszeichnen. Wie bereits in der Diskussion von Studie 1 vermutet, ergibt sich demnach auch eine unterschiedliche Regulation dieser beiden Zustände unter Stimulationsbedingungen.

In der Gruppe mit experimenteller Gingivitis zeigen die deskriptiven Daten einen Abfall von IL-1 β in der Stress- im Vergleich zur Ruhebedingung. Nach dem Befund von Deinzer et al. (2004a) stellt dies zunächst ein widersprüchliches und nicht erwartetes Ergebnis dar.

Dort führte der gleiche akute Laborstressor in einer Gruppe nach vierwöchiger experimenteller Gingivitis zu signifikantem Anstieg von sulkulärem IL- β (Deinzer et al., 2004a). Eine Erklärung dafür könnte in einem unterschiedlichen methodischen Vorgehen hinsichtlich der Durchführung der experimentellen Gingivitis liegen. In der vorliegenden Arbeit bestand diese in einer vollständigen Unterlassung der Mundhygiene wohingegen sie in der Vorgängerstudie im Split-Mouth-Design durchgeführt wurde, d. h. die Probanden unterließen die Mundhygiene nicht vollständig, sondern nur an zwei Quadranten. An den anderen Quadranten wurde eine normale Mundhygiene aufrecht erhalten. In der vorliegenden Studie kam es innerhalb der ersten Woche nach Unterlassung der Mundhygiene, zu einer deutlichen Plaqueakkumulation, die alle 16 Untersuchungsstellen betraf. Dies war in der Studie von Deinzer et al. (2004a) nicht der Fall, sondern die Probanden wiesen tatsächlich eine geringere Plaqueakkumulation auf, von der nicht alle untersuchten Stellen betroffen waren. Es wäre demnach denkbar, dass diese Methode zu einem Entzündungszustand führte, der sich von der experimentellen Gingivitis der vorliegenden Arbeit unterscheidet. Somit könnte der vermeintliche Widerspruch zu diesen Daten durchaus widerspiegeln, was das Hauptergebnis der vorliegenden Studien ist: Unterschiedliche Entzündungszustände bewirken auch eine unterschiedliche immunologische Stressreagibilität.

Interessant an den vorliegenden Befunden ist die stärkere proinflammatorische Auslenkung der Stressreaktion innerhalb der Gruppe mit chronischer Gingivitis. Im Vergleich zur experimentellen Gingivitis, die eine artifiziell herbeigeführte Entzündung widerspiegelt, stellt die chronische Gingivitis ein Entzündungsgeschehen dar, welches unter natürlichen Bedingungen ent- und besteht und der Entwicklung einer Parodontitis vorausgeht. Aus klinischer Sicht ist demnach dieser Entzündungszustand wesentlich relevanter. Die beobachtete stärkere proinflammatorische Auslenkung der Stressreaktion bei chronischer Gingivitis stellt womöglich einen Mechanismus dar, über welchen der Zusammenhang zwischen Stress und Parodontitis vermittelt wird. Die Frage, ob diese durch Stress verursachte proinflammatorische Auslenkung für sich alleine Bestand hat oder sich nur im Vergleich zur experimentellen Gingivitis zeigt, kann allerdings durch die vorliegende Studie 2 nicht eindeutig beantwortet werden: Die Testpower reicht bei einer

Stichprobengröße von 13 Personen nicht aus, um die hier beobachteten Effektstärken statistisch bedeutsam erscheinen zu lassen. Tatsächlich ergibt eine Kovarianzanalyse mit Messwiederholung, die sich auf die Gruppe mit chronischer Gingivitis beschränkt, ein empirisches Signifikanzniveau von $p=0.09$ für den Haupteffekt Stress und die Abhängige Variable IL-8. Um die Testpower zu erhöhen, wurde daher in einer weiteren Studie die Gruppe mit chronischer Gingivitis um weitere 12 Probanden ergänzt, um diese dann gemeinsam mit den Probanden mit chronischer Gingivitis aus Studie 2 hinsichtlich der Effekte von Stress auf die lokalen Zytokinkonzentrationen auszuwerten.

2.4 Studie 3 - Akutstresseffekte bei chronischer Gingivitis

2.4.1 Spezifische Methoden Studie 3

Studie 3 fasst die Probanden mit chronischer Gingivitis aus Studie 2 und 12 zusätzlich erhobene Probanden (6 Männer und 5 Frauen) mit chronischer Gingivitis (Einschlusskriterium), die ebenfalls der Stress- und der Ruhebedingung ausgesetzt wurden, zusammen. Das methodische Vorgehen bei der Erhebung der zusätzlichen Probanden entspricht dem Protokoll von Studie 1 und 2 hinsichtlich Ein- und Ausschlusskriterien, dem Ablauf der Stressexperimente sowie der statistischen Auswertung. Lediglich die Beobachtungszeit war kürzer. Da sich in Studie 1 gezeigt hat, dass die chronische Gingivitis ein klinisch wie immunologisch stabiler Zustand ist, wurde die Beobachtungsphase vor den Stressexperimenten auf 10 Tage beschränkt. In dieser Zeit wurde alle zwei Tage überprüft, ob sich der Entzündungszustand als stabil erwies. Dies war bei allen Probanden insoweit erfüllt, als sie konstant über diesen Untersuchungszeitraum hinweg, das Einschlusskriterium (fünf von sechs Papillen mit positivem Blutungsnachweis) erfüllten.

2.4.2 Ergebnisse Studie 3

Die 12 zusätzlich erhobenen Probanden hatten ein durchschnittliches Alter von 23,7 Jahre ($\pm 2,7$). Eine Analyse der an diesen Probanden erhobenen Kontrollvariablen (Befindlichkeit, endokrine Stressreaktion und SF-Volumen) ergab erwartungsgemäß gleiche Befunde wie bereits Studie 2. Nachfolgend wird diesbezüglich die Inferenzstatistik berichtet ohne eine grafische Darstellung der jeweiligen Variablen (deskriptive Statistik für entsprechende Mittelwerte mit Standardabweichungen siehe Anhang).

2.4.2.1 Kontrollvariablen

Psychische Befindlichkeit

Eine Kovarianzanalyse mit den Faktoren Stress und Geschlecht ergab für alle Befindlichkeitsparameter signifikante Haupteffekte für den Faktor Stress [alle $F > 7.020$; alle $p < 0.027$; alle $\eta^2 > 0.43$]. Kein signifikanter Haupteffekt zeigte sich für den Faktor Geschlecht (alle $F < 3.158$; alle $p > 0.110$; alle $\eta^2 < 0.25$). Dies gilt auch für Stress x Geschlechtsinteraktionen (alle $F < 0.725$; alle $p > 0.415$; alle $\eta^2 < 0.08$).

Endokrine Stressreaktion

Alle Probanden zeigten eine deutliche Stressreaktion. Die kovarianzanalytische Auswertung mit den Faktoren Stress, Zeit und Geschlecht ergab signifikante Haupteffekte für die Faktoren Stress [$F(1/9) = 39.408$; $p < 0.001$; $\eta^2=8.14$] und Zeit [$F(8/72) = 11.256$; $p = 0.002$; $\eta^2 = 0.56$; $\varepsilon = 0.197$] sowie eine signifikante Stress x Zeit Interaktion [$F(8/72) = 9.889$; $p = 0.001$; $\eta^2 = 0.52$; $\varepsilon = 0.241$]. Für die Faktoren Geschlecht und Gingivitis fanden sich weder signifikante Haupteffekte (alle $F < 0.295$; alle $p > 0.55$) noch signifikante Interaktionen (alle $F < 0.890$; alle $p > 0.43$).

Sulkus-Fluid-Volumen

Eine Kovarianzanalyse der SF-Volumenwerte mit den Faktoren Stress, Zeit und Geschlecht ergab keine signifikanten Haupteffekte (alle $F < 2.880$; alle $p > 0.10$; alle $\eta^2 < 0.24$) und keine signifikanten Interaktionen (alle $F < 0.735$; alle $p > 0.465$; alle $\eta^2 < 0.08$).

2.4.2.2 Stressinduzierte Veränderungen von sulkulärem IL-1 β und IL-8

Sulkuläres IL-1 β

Eine Kovarianzanalyse mit Messwiederholung und den Faktoren Stress, Geschlecht und Zeit ergab für IL-1 β einen hochsignifikanten Haupteffekt Zeit [$F(1,44) = 19.873$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.48$, $\varepsilon = 0.854$] und keine weiteren Haupteffekte oder Interaktionen (alle $F < 1.1$, alle $p > 0.365$). Tabelle 2.4.1 zeigt die Prästresskonzentrationen von IL-1 β , Abbildung 2.4.1 die Differenzwerte Stress-Ruhe zu den drei Poststresszeitpunkten.

Tabelle 2.4.1: Prästresskonzentrationen von sulkulärem IL-1 β (N = 14m, 11w) an den beiden Untersuchungstagen (Ruhe vs. Stress).

	Ruhe (M \pm s)	Stress (M \pm s)	t	p
Männer	14.62 \pm 6.48	13.97 \pm 5.98	0.299	0.770
Frauen	18.37 \pm 10.58	12.44 \pm 3.20	2.104	0.062

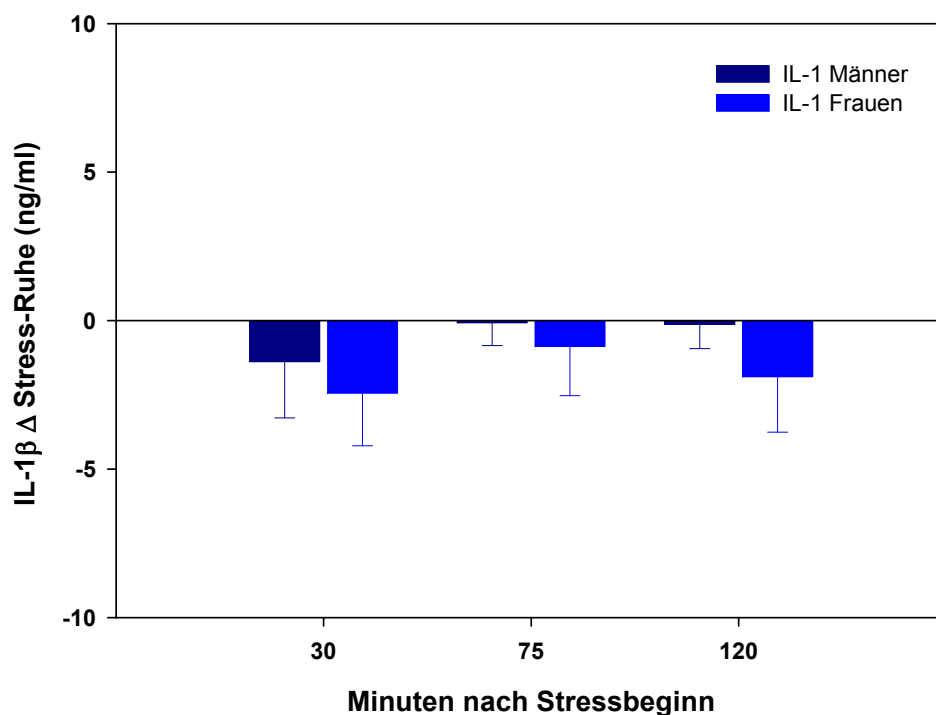


Abbildung 2.4.1. Akutstresseffekte auf sulkuläres IL-1 β bei chronischer Gingivitis. Mittlere Differenzwerte Stress-Ruhe mit Standardfehler der mittleren Differenzen der Poststresskonzentrationen von sulkulärem IL-1 β an den jeweiligen Untersuchungstagen (Ruhe vs. Stress; N = 14m, 11w).

Sulkuläres IL-8

Die Prästresskonzentrationen von sulkulärem IL-8 sind in Tabelle 2.4.2 dargestellt. Abbildung 2.4.2 zeigt die Differenzwerte Stress-Ruhe zu den drei Poststresszeitpunkten. Eine Kovarianzanalyse mit Messwiederholung und den Faktoren Stress, Geschlecht und Zeit ergab einen signifikanten Haupteffekt Stress [$F(1,22) = 4.507$, $p = 0.045$, $\eta^2 = 0.17$] und keine weiteren Haupteffekte oder Interaktionen (alle $F < 1.39$, alle $p > 0.20$).

Tabelle 2.4.2: Prästresskonzentrationen von sulkulärem IL-8 (N = 14m, 11w) an den beiden Untersuchungstagen (Ruhe vs. Stress) bei chronischer Gingivitis.

	Ruhe (M ± s)	Stress (M ± s)	T	p
Männer	101.20 ± 61.33	95.05 ± 46.13	0.354	0.729
Frauen	130.05 ± 113.34	108.51 ± 53.65	0.823	0.430

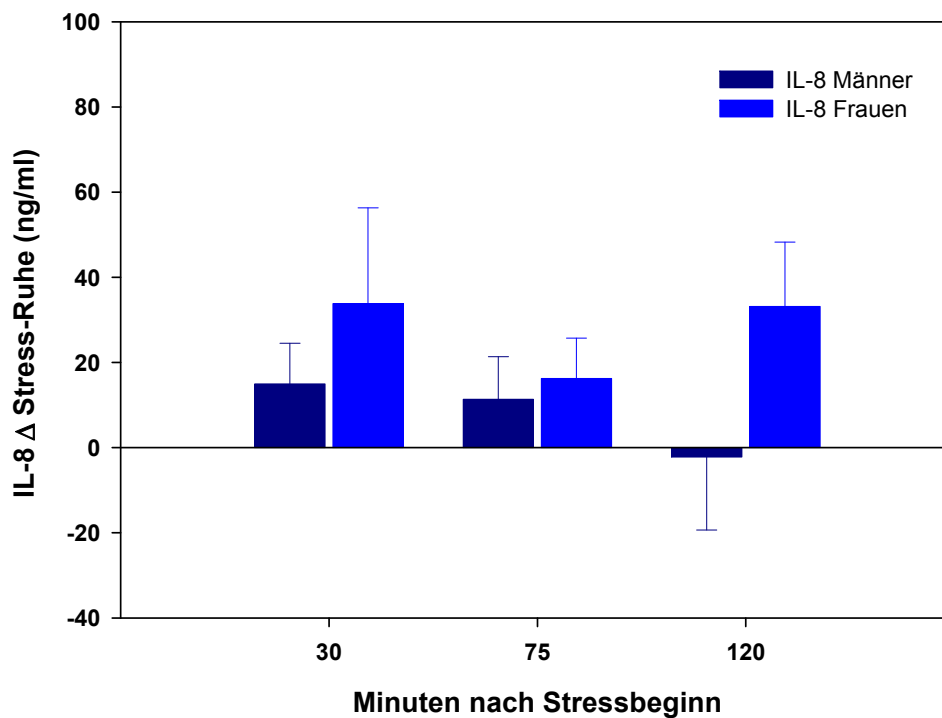


Abbildung 2.4.2. Akutstresseffekte auf sulkuläres IL-8 bei chronischer Gingivitis. Mittlere Differenzwerte Stress-Ruhe mit Standardfehler der mittleren Differenzen der Poststresskonzentrationen von sulkulärem IL-8 an den jeweiligen Untersuchungstagen (Ruhe vs. Stress; N = 14m, 11w).

Tabelle 2.4.3: Effektstärken d der Stresseffekte (Differenzen Stress-Ruhe) in den sulkulären Konzentrationen von IL-1 β und IL-8 bei chronischer Gingivitis (N=14m, 11f) an den drei poststress-Messzeitpunkten.

Effektstärken d [mit 95% Vertrauensintervallen]				
	IL-1 β		IL-8	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen
0 min poststress	-0.18 [-0.92;0.56]	-0.29[-0.65;0.55]	0.25 [-0.03;0.99]	0.27 [-0.09;1.11]
45 min poststress	-0.01 [-0.29;0.73]	-0.12 [-0.48;0.72]	0.17 [-0.11;0.92]	0.21 [-0.15;1.05]
90 min poststress	-0.02 [-0.30;0.72]	-0.22 [-0.58;0.62]	-0.03 [-0.31;0.71]	0.40 [0.03;1.24]

2.4.3 Diskussion Studie 3

In dieser Studie zeigt sich, dass die im Vergleich zur experimentellen Gingivitis beobachtete stärkere proinflammatorische Reaktion auf Stress aus Studie 2 auch für sich genommen Bestand hat. Akuter Stress bewirkt eine Steigerung der Konzentrationen von IL-8 im Sulkus-Fluid. Mehrere Mechanismen sind hierfür denkbar. So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Adrenalin oder β -Adrenozeptoren-Agonisten eine stimulierte Produktion von IL-8 durch verschiedene Zellen erhöhen (Linden, 1996; Kavelaars et al., 1997; Chi et al., 2004). Im vorliegenden Falle ist eine solche „de-novo“-Produktion für den dritten Poststresszeitpunkt denkbar, zu welchem die Frauen eine sehr deutliche Erhöhung der IL-8-Konzentrationen aufweisen. Hinsichtlich der Anstiege unmittelbar nach Stress scheint eine solche „de-novo“-Produktion allerdings unwahrscheinlich, da der Zeitraum hierfür zu kurz ist. Denkbar wäre hier, dass akuter Stress zur Freisetzung von bereits produziertem und gespeichertem IL-8 führt. Für verschiedene Zytokine (z. B. TNF- α , IL-4), darunter auch IL-8, konnte nachgewiesen werden, dass sie in den Kernen verschiedener Zellen (Mastzellen, Granulozyten, Endothelzellen) in gespeicherter Form vorhanden sind (Frangogiannia et al., 1998; Utgaard et al., 1998; Oynebraten et al., 2004; Spencer et al., 2006). Die Degranulation und Freisetzung von Zytokinen können hier durch Neuropeptide wie lokales CRH oder Substanz P induziert werden (Elenkov et al., 2006). Die Applikation eines akuten Stressors von 30-minütiger Dauer führte bei Ratten zu Degranulation von Mastzellen des Herzens, welche über CRH und SP vermittelt wurde (Pang et al., 1998; Singh et al., 1999). Demnach könnte eine neuropeptiderge Stimulation von IL-8 speichernder Zellen ein Mechanismus sein, über welchen akuter Stress eine Konzentrationssteigerung von IL-8 im Sulkus-Fluid bewirken kann. Studien mit Parodontitis-Patienten zeigen, dass diese im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden höhere sulkuläre Konzentrationen von SP aufweisen (Linden et al., 1997; Pradeep et al., 2009), die nach einer Parodontitis-Behandlung signifikant abfallen (Lundy et al., 2000; Pradeep et al., 2009). Die Konzentrationen von SP im Sulkus-Fluid korrelieren dabei mit der Stärke einer Parodontitis (Pradeep et al., 2009) sowie mit sulkulärem IL-8 und IL-1 β (Hanioka et al., 2000).

Hinsichtlich IL-1 β waren dem IL-8 vergleichbare Effekte nicht zu beobachten. Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen, deskriptiv fielen die sulkulären Konzentrationen in der Stressbedingung leicht ab. Insofern besteht auch hier ein Trend, der wie bereits zuvor innerhalb der experimentellen Gingivitis-Gruppe eine eher stressinduzierte Reduzierung der sulkulären IL-1 β -Konzentrationen andeutet, jedoch in beiden Fällen in keiner Form signifikant. Allgemein ist die Befundlage zu Stresseffekten auf IL-1 β äußerst heterogen. Stresseffekte können in verschiedene Richtungen gehen oder gar nicht beobachtet werden (Elenkov et al., 2000; Segerstrom & Miller, 2004). Die Produktion von IL-1 β kann durch viele Faktoren beeinflusst werden. Das vorherrschende lokale Zytokinmilieu mag hier eine Rolle spielen. Von anderen Zytokinen wie z. B. IL-10 konnte gezeigt werden, dass es die Produktion von IL-1 β wie auch TNF- α hemmen kann (Bogdan et al., 1992; Kontoyiannis et al., 2001; Ledebor et al., 2002) und die LPS-induzierten Anstiege in den Konzentrationen von IL-1 β oder TNF- α durch IL-10 reduziert werden können (Bogdan et al., 1992; Ledebor et al., 2002). Wie bereits oben diskutiert ist Entzündungsgeschehen nicht gleich Entzündungsgeschehen. Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass der Entzündungszustand eine moderierende Variable für Stresseffekte darstellt. Umso wichtiger erscheint es demnach, sich verschiedene Entzündungszustände genauer anzuschauen, z. B. auch durch die Erhebung weiterer Zytokine und anderen Entzündungsmediatoren und die Analyse ihrer Veränderungen über die Zeit.

3 Gesamtdiskussion und Ausblick

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Effekte eines akuten Stressors auf lokale Entzündungsprozesse am Modell der Gingivitis, welches die messwiederholte Erfassung lokaler Entzündungsparameter *in vivo* am Menschen erlaubt. Der Fokus der Arbeit lag dabei auf der Analyse von Stresseffekten auf zwei verschiedene lokale Entzündungszustände (zeitlich begrenzte vs. chronische Entzündung), wobei geprüft wurde, ob ein solcher Unterschied die Stresseffekte moderiert. Bei den hier untersuchten gingivalen Entzündungszuständen handelt es sich um die experimentelle Gingivitis, ein Modell, das in der Zahnmedizin seit vielen Jahren genutzt wird, um eine Gingivitis experimentell kontrolliert zu untersuchen und die chronische Gingivitis, die unter natürlichen Bedingungen entsteht und über einen weitaus längeren Zeitraum besteht.

Studie 1 zeigte bei einer Analyse des Verlaufs der klinischen und immunologischen Parameter über einen Zeitraum von vier Wochen, dass sich diese beiden Entzündungszustände hinsichtlich der Wirtsantwort auf mikrobielle Plaque qualitativ und quantitativ unterscheiden. In der experimentellen Gingivitis weisen die sulkulären Konzentrationen von IL-1 β deutliche Fluktuationen auf, vor allem bei den Frauen zeigte sich eine hohe Variabilität, wohingegen die IL-8-Konzentrationen innerhalb der ersten Woche stark abfallen und im weiteren Verlauf auf diesem Niveau verweilen. Im Vergleich dazu zeichnet sich die chronische Gingivitis durch einen relativ stabilen Verlauf der klinischen wie auch der immunologischen Parameter aus, mit geringeren sulkulären Konzentrationen von IL-1 β und leicht erhöhten Konzentrationen von IL-8.

Es konnte demnach gezeigt werden, dass sich die zwei untersuchten gingivalen Entzündungszustände im basalen Zustand, hier untersucht nach einem Zeitraum von vier Wochen, unterscheiden. Die Frage, ob experimentelle und chronische Gingivitis darüber hinaus auch eine unterschiedliche Stressreagibilität aufweisen, wurde in Studie 2 geprüft, indem die Beeinflussbarkeit dieser beiden Zustände durch einen akuten psychischen Stressor untersucht wurde. Diese Fragestellung fokussiert einen Aspekt, der in der jüngeren psychoneuroimmunologischen Forschung verstärkt Beachtung findet: die zeitliche

Dynamik der Interaktionen zwischen Nerven- und Immunsystem. So zeigen eine Reihe tierexperimenteller Studien, dass die Freisetzung proinflammatorischer Entzündungsmediatoren davon abhängt, in welchem zeitlichen Verhältnis Stress bzw. die Applikation von Stresshormonen und die Entzündungsreaktion stehen. Akuter und chronischer Stress bzw. die Verabreichung entsprechender Stresshormone einige Zeit vor einer Entzündungsreaktion bewirkt z. B. eine stärkere proinflammatorische Auslenkung derselben (Smith et al., 2004; Sorrells & Sapolsky, 2007; Frank et al., 2010). In der Humanforschung zeigen die Daten von Deinzer und Kollegen, dass die sulkuläre Il-1 β -Freisetzung sich unterscheidet, je nachdem in welcher Phase einer längeren Examensperiode mit einer Plaqueakkumulation begonnen wird (Deinzer et al., 1999, 2000a; Waschul et al., 2003).

Die vorliegende Analyse von Stresseffekten bestätigte die Annahme, dass der Entzündungszustand tatsächlich Akutstresseffekte auf die lokale Entzündungsreaktion moderiert. Demnach ist auch aus psychoimmunologischer Sicht Entzündungsgeschehen nicht gleich Entzündungsgeschehen, sondern es gilt zwischen unterschiedlichen Entzündungsgeschehen zu unterscheiden (z. B. akut und kurzfristig vs. chronisch und langfristig). Dies wird unter anderem dann bedeutend, wenn es darum geht Stresseffekte auf Entzündungsreaktionen zu untersuchen. Ganz offensichtlich folgen diese nicht einheitlichen Prinzipien, sondern fallen je nach Art der Entzündung ganz unterschiedlich aus.

Die chronische Gingivitis erfährt durch Stress im Vergleich zu experimentellen Gingivitis eine proinflammatorische Auslenkung. Dies stellt insofern einen interessanten Befund dar, da es chronische Entzündungsprozesse sind, die als zentraler pathogenetischer Faktor bei einer Vielzahl von Erkrankungen gelten (Black & Garbutt, 2002; Kinane & Lappin, 2002; Mercado et al., 2003; Kay & Calabrese, 2004; Brück, 2005; Swaab et al., 2002; Agarwal et al., 2006; Libby, 2006) und psychischer Stress als ein potentiell dysregulierender Faktor einer chronischen Entzündungsreaktion diskutiert wird (Straub et al., 2005; Kern & Ziemsen, 2008). Allerdings blieb in Studie 2 offen, ob die chronische Gingivitis *per se* auf Stress mit einer proinflammatorischen Auslenkung der untersuchten

Zytokine reagieren würde, oder ob sich dies nur im Kontrast zur experimentellen Gingivitis darstellen ließe. Aus diesem Grunde wurden in einer weiteren Erhebung (Studie 3) zusätzliche Probanden mit chronischer Gingivitis erhoben, um die Teststärke einer solchen Analyse zu verbessern. Tatsächlich zeigte sich ein signifikanter stressinduzierter Anstieg der sulkulären IL-8-Konzentrationen, welcher kleine bis mittlere Effektstärken erreichte.

Auch wenn die plaque-assoziierte Gingivitis eine eher harmlose entzündliche Erkrankung darstellt, zeigen die Daten, dass es sich dabei um einen lokalen chronisch entzündlichen Prozess handelt, welcher durch Stress beeinflusst werden kann. Interessant wäre es, wenn sich dieser Befund auch auf andere chronisch entzündliche Erkrankungen (z. B. Rheumatoide Arthritis, Parodontitis, Morbus Crohn usw.) übertragbar ließe. Alle diese Erkrankungen zeigen eine positive Assoziation zwischen lokalen bzw. systemischen Konzentrationen von IL-8 und der Krankheitsschwere bzw. -progression (Gamonal et al., 2000, 2001; Daig et al., 1996; Kraan et al., 2000; Mazzuchelli et al., 1994; Mittermaier et al., 2004; Straub et al., 2005). Zudem sind alle diese Erkrankungen auch mit Stress assoziiert (Herrmann et al., 2000; Bernstein et al., 2006; Genco et al., 1999). Betrachtet man die biologischen Funktionen von IL-8, kann der in dieser Arbeit beobachtete stressinduzierte Anstieg sulkulärer Konzentrationen von IL-8 bei chronischer Gingivitis als proinflammatorisches Signal betrachtet werden. Auch wenn dieses für sich alleine genommen möglicherweise zu kurz ist, um eine Progression der Entzündung herbeizuführen, ist davon auszugehen, dass es als ein destabilisierendes Moment im pathologischen Geschehen wirken kann. So betrachtet können die vorliegenden Daten ein Hinweis darauf sein, dass die in der Literatur beobachteten Zusammenhänge zwischen Stress und entzündlichen Erkrankungen (Herrmann et al., 2000; Bernstein et al., 2006; Genco et al., 1999) auch über einen stressinduzierten lokalen Anstieg von IL-8 vermittelt werden können. In der vorliegenden Arbeit wurden als immunologische Parameter zwei Zytokine analysiert, die beide proinflammatorische Eigenschaften besitzen, von denen das eine (IL-8) primär mit der angeborenen Immunität, das andere (IL-1 β) auch mit der adaptiven Immunantwort (Th17) in Verbindung gebracht wird. Die unterschiedliche Auslenkung dieser Zytokine unter verschiedenen Stimulationsbedingungen weist auf die Komplexität der Regulationsmechanismen hin. Die beobachteten Zytokine repräsentieren

allerdings nur einen kleinen Ausschnitt eines sehr komplexen lokalen Entzündungsgeschehens. Um ein umfangreicheres Verständnis der Entzündungsregulation und der Stresswirkungen darauf zu erhalten, sollte das Parameterspektrum in zukünftigen Studien deutlich erweitert werden. Vor allem interessant sind dabei die bereits eingangs dieser Arbeit ausführlich diskutierten regulatorischen und Leitzytokine der unterschiedlichen TH-Zellpopulationen wie IL-2, IL-4, IL10, IL12, IL-17 oder IL-23. Die Analyse eines solchen Zytokinspektrums erfordert allerdings den Einsatz von Multiplexverfahren, mit denen die multiple Analyse mehrerer Parameter aus einer Probe gelingen kann; für multiple Einzelanalysen ist die Probenmenge, die dem Sulkus entnommen werden kann, zu gering, hier muss eine Beschränkung auf einige wenige Parameter, wie in der vorliegenden Arbeit, erfolgen. Multiplexverfahren sind erst seit jüngerer Zeit etabliert und standen für die vorliegende Arbeit auch aus Kostengründen nicht zur Verfügung. In künftigen Studien sollten entsprechende Verfahren, die mittlerweile auch preiswerter geworden sind, benutzt werden, um noch mehr über Stresswirkungen auf die komplexe Regulation von Entzündungsvorgängen zu lernen.

Die in der immunologischen und psychoimmunologischen Forschung üblichen geringen Stichprobengrößen, wie sie auch in dieser Studie vorlagen, sind immer auch geeignet, die Aussagekraft der Daten in Frage zu stellen. Zum einen können Zweifel an der statistischen und internen Validität der Daten angemeldet werden: geringe Stichprobengrößen reduzieren die Teststärke der statistischen Verfahren und können damit vor allem eine fälschliche Ablehnung der Forschungshypothese (Fehler 1. Art) nach sich ziehen. In der vorliegenden Studie konnten allerdings die meisten Forschungshypothesen angenommen werden. Dies kann unter anderem auf die Anwendung strenger Ein- und Ausschlusskriterien zurückgeführt werden, die eine Homogenisierung der Stichprobe und damit (über die Reduzierung der Fehlervarianz) eine Steigerung der Effektstärke bewirkt haben. Alle Studienteilnehmer waren junge und nach eigenen Angaben gesunde Studierende und somit in vielerlei Hinsicht vergleichbar (Anzahl der Stellen mit Gingivitis, keine parodontale Erkrankungen, keine sonstigen systemischen Erkrankungen, Alter, Bildung, Raucherstatus und psychische Belastungen). Zur Kontrolle weiterer unbekannter Störfaktoren erfolgte die Gruppeneinteilung zusätzlich durch Randomisierung. Gemeinsam

mit der Homogenisierung trug dies zur Steigerung der internen Validität der Studien bei. Es sind kaum Alternativerklärungen für die beobachteten Effekte denkbar. Die so vollzogene Optimierung der statistischen und internen Validität ging allerdings zu Lasten der externen Validität, die von einer heterogeneren Stichprobe profitiert hätte. Insofern muss die Übertragbarkeit der Daten auf andere und heterogenere Stichproben in weiteren Studien geprüft werden.

Die Homogenisierung der Stichprobe hat noch einen weiteren Nachteil: durch die Varianzreduzierung ist eine valide Analyse weiterer psychosozialer Korrelate der Stressreagibilität nicht möglich. Eine solche könnte vor allem interessant sein hinsichtlich der Stresseffekte auf IL-8, die nur bei chronischer Gingivitis gefunden wurden. Studien zeigen, dass eine *in vitro* stimulierte Freisetzung von IL-8 durch Monozyten positiv korreliert mit Depressionswerten sowie mit wahrgenommenen Stress und negativer Emotionalität (Suarez et al., 2003, 2004; Marsland et al., 2007). Weiterhin wurden negative Zusammenhänge zwischen sozialer Unterstützung und der monozytären IL-8-Produktion beobachtet (Kiecolt-Glaser et al., 2002; Marsland et al., 2007). Zukünftige Studien sollten prüfen, inwieweit sich solche Zusammenhänge auch zu lokal *in vivo* stimulierten IL-8-Konzentrationen zeigen lassen.

Ogleich es interessant wäre, auch die experimentelle Gingivitis weiter zu analysieren, fiel in dieser Arbeit – bei begrenzten Forschungsmitteln – die Wahl auf eine vertiefende Analyse der chronischen Gingivitis. Maßgeblich war hierbei, dass dieser Entzündungszustand die höhere externe Validität aufweist und auch klinisch eine höhere Relevanz besitzt. Gegen eine weitere Analyse der experimentellen Gingivitis sprach auch die geringe Stabilität der dort beobachteten Zytokinkonzentrationen und ihre große interindividuelle Variabilität, die sich nicht nur in dieser Arbeit sondern auch in vielen anderen Studien gezeigt hat (Kinane et al., 1992; Heasman et al., 1993; Deinzer et al., 2000; Gonzales et al., 2001; Waschul et al., 2003). Dies stellt die Grundannahme in Frage, dass die experimentelle Gingivitis ein wohl definierter Entzündungszustand ist. Vielmehr entsteht der Eindruck, dass ein interindividuell vergleichbarer Zustand hier in wesentlich geringerem Maße vorliegt als bei gingivaler Gesundheit oder eben bei einer chronischen

Gingivitis. Dennoch kann die Analyse der experimentellen Gingivitis Sinn machen und zwar dort, wo es genau um die interindividuelle Variabilität in der frühen Entzündungsantwort geht – diese Aufzuklären stand allerdings nicht im Fokus der vorliegenden Arbeit.

In dieser Arbeit wurden die Effekte einer akuten psychischen Belastung analysiert. Zur Anwendung kam ein Laborstressor, der zwar sozialen Leistungsstress wie er auch in natürlichen Settings vorkommt, simuliert, aber dennoch eine geringere Realitätsnähe aufweist, als natürliche akute Belastungen, wie beispielsweise Konfliktgespräche mit Vorgesetzten oder Prüfungsbelastungen. Mindestens hinsichtlich seiner Effekte auf die Cortisolfreisetzung entspricht dieser Laborstressor allerdings alltagsnäheren Situationen, so dass hier eine Übertragbarkeit angenommen werden kann. Unklar bleibt im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen allerdings, welche Effekte eine längerfristige psychische Belastung auf die Entzündungsregulation hat. Für IL-1 β und experimentelle Gingivitis liegen hier zwar bereits Daten vor (Deinzer et al., 1999, 2000a; Waschul et al., 2003). Effekte von langfristigen Belastungen auf chronische Gingivitis wurden bislang allerdings noch nicht untersucht. Zukünftige Studien sollten sich dieser Frage zuwenden, zumal sich hier möglicherweise weitere Aufschlüsse zum Zusammenhang zwischen Stress und der Exazerbation chronischer Entzündungszustände ergeben würden.

Die vorliegende Arbeit hat den Entzündungszustand als Moderatorvariable von Stresseffekten auf lokale Entzündungsparameter analysiert. Sie hat hierfür das Modell der Gingivitis herangezogen, das die Analyse lokaler Entzündungsparameter minimal-invasiv im Messwiederholungsdesign beim Menschen erlaubt. Zunächst besitzen die vorliegenden Daten daher auch nur Aussagewert für die gingivale Entzündungsregulation. Nicht geklärt ist, ob und inwieweit sich die hier gewonnenen Daten auch auf andere chronisch entzündliche Erkrankungen übertragen lassen. Auch wenn von einem grundlegenden Prinzip der Entzündungsregulation ausgegangen werden muss, so dass von daher eine Übertragbarkeit anzunehmen wäre, zeigen gerade die Daten der vorliegenden Arbeit doch auch, wie vorschnell eine solche Annahme sein kann. Ganz offensichtlich greifen psychische Faktoren unterschiedliche Entzündungszustände auch unterschiedlich an – ob

dies nur hinsichtlich der Chronizität der Entzündungszustände gilt oder auch hinsichtlich ihrer Lokalität bleibt Gegenstand zukünftiger Forschung. Allerdings erlauben nur wenig andere Entzündungszustände in vergleichbar einfacher Weise die messwiederholte Analyse lokaler Entzündungsparameter. Hier kann die Forschung am Modell der chronischen Gingivitis erste Anhaltspunkte über Messzeitpunkte und –parameter liefern, die dann in der aufwändigeren Forschung an anderen Erkrankungen überprüft werden können. Es bietet sich an, am Modell der chronischen Gingivitis zu überprüfen, ob sich Personen, die an einer anderen chronischen entzündlichen Erkrankung leiden, von diesbezüglich Gesunden in der gingivalen Entzündungsregulation unterscheiden. Das Modell der chronischen Gingivitis könnte sich in einem solchen Fall eignen, differentielle Faktoren zu identifizieren, die möglicherweise auch Hinweise auf ätiopathogenetische Mechanismen bei der Entstehung chronisch entzündlicher Erkrankungen liefern.

Zusammenfassend ist es mit der vorliegenden Arbeit erstmals im experimentellen Design gelungen, den Entzündungszustand als Moderatorvariable der lokalen immunologischen Stressreaktion zu identifizieren. Weiterhin wurde gezeigt, dass akuter psychischer Stress bei Vorliegen einer chronischen Gingivitis eine verstärkte Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-8 in den Sulkus gingivalis bewirkt. Damit ist ein Weg aufgezeigt worden, wie Stress in das chronische Entzündungsgeschehen eingreifen kann. Die Tatsache, dass entsprechend proinflammatorische Effekte für die experimentelle Gingivitis nicht zu beobachten waren, unterstreicht, wie wichtig es ist, den Entzündungszustand als Moderatorvariable der immunologischen Stressreaktion in zukünftigen psychoimmunologischen Studien zu kontrollieren und genau zu dokumentieren.

4 Literaturverzeichnis

1. **Ader, R.**, Kelley, K.W., 2007. A global view of twenty years of Brain, Behavior and Immunity. *Brain Behav. Immun.*, 21, 20-22.
2. **Agarwal, B.B.**, Shishodia, S., Sandur, D.K., Pandey, M.K., Sethi, G., 2006. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem. Pharmacol.*, 2, 1-17.
3. **Agarwal, S.K.**, Marshall, G.D., 1998. In vivo alteration in type-1 and type-2 cytokine balance: a possible mechanism for elevated total IgE in HIV-infected patients. *Chem. Immunol.*, 59, 99-105.
4. **Agarwal, S.K.**, Marshall, G.D., 2001. Stress effects on immunity and its application to clinical immunology. *Clin. Exp. Allergy*, 31, 25-31.
5. **Akahoshi, M.**, Nakashima, H., Tanake, Y., 1999. Th1/Th2 balance of peripheral T helper cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis. Rheum.*, 42, 1644-1648.
6. **Akira, S.**, Takeda, K., Kasho, T. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunol*, 2, 675-680.
7. **Akiyama, H.**, Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G.M., Cooper, N.R. et al., 2000. Inflammation and Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging*, 21, 383-421.
8. **Al'Abadie, M.S.**, Kent, G.G., Gawkrödger, D.J., 1994. The relationship between stress and the onset and exacerbation of psoriasis and other skin conditions. *Br. J. Dermatol.*, 130, 199-203.
9. **Baggiolini, M.**, 1989. Neutrophil-activating peptide-1 / interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J. Clin. Invest.* 84, 1045-1049.
10. **Baggiolini, M.**, 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 392, 565-568.
11. **Baggiolini, M.**, 2001. Chemokines in pathology and medicine. *J. Intern. Med.*, 250, 91-104.
12. **Baggiolini, M.**, Clark-Lewis, I., 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS*, 307, 97-101.
13. **Baggiolini, M.**, Loetscher, P., Moser, B., 1995. Interleukin-8 and the chemokine family. *Int. J. Immunopharmacol.*, 17, 103-108.

-
14. **Barksby, H.E.**, Lea, S.R., Preshaw, P.M., Taylor, J.J., 2007. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clin. Exp. Immunol.*, 149, 217-225.
 15. **Berglundh, T.**, Liljenberg, B., Lindhe, J., 2002. Some cytokine profiles of T-helper cells in lesions of advanced periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, 29, 705-709.
 16. **Bernstein, C.N.**, Walker, J.R., Fraff, L.A., 2006. On studying the connection between stress and IBD. *Am. J. Gastroenterol.*, 101, 782-785.
 17. **Besedovsky, H.O.**, Del Rey, A., 1996. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr. Rev.*, 17, 64-102.
 18. **Biesbrock, A.**, Yeh, C.H., 2000. Relationship of surface epithelium concentrations of IL-1 alpha and IL-1 beta to clinical inflammation during experimental gingivitis. *Monogr. Oral Sci.*, 17, 20-31.
 19. **Black, P.H.**, 2003. The inflammatory response is an integral part of the stress response: implications for atherosclerosis, insulin resistance, type II diabetes and metabolic syndrome. *Brain Behav. Immun.*, 17, 350-364.
 20. **Black, P.H.**, Garbutt, L.D., 2002. Stress, inflammation and cardiovascular disease. *J. Psychosom. Res.*, 52, 1-23.
 21. **Bogdan, C.**, Paik, J., Vodovotz, Y., Nathan, C., 1992. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *J. Biol. Chem.*, 267, 23301-8.
 22. **Boniface, K.**, Blom, B., Liu, Y.-J., de Waal Malefyt, R., 2008. From interleukin-23 to T-helper 17 cells: human T-helper cell differentiation revisited. *Immunol. Rev.*, 226, 132-146.
 23. **Boyapati, L.**, Wang, H-L., 2007. The role of stress in periodontal disease and wound healing. *Periodontol. 2000*, 44, 195-210.
 24. **Brat, D.J.**, Bellail, A.C., Van Meir, E.G., 2005. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-Oncol.*, 7, 122-133.
 25. **Breivik, T.**, Gundersen, Y., Opstad, P.K., Fonnum, F., 2005. Chemical sympathectomy inhibits periodontal disease in Fischer 344 rats. *J. Periodontal Res.*, 40, 325-330.

-
26. **Breivik, T.**, Opstad, P.K., Gjermo, P., Thrane, P.S., 2000a. Effects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity on periodontal tissue destruction in rats. *Eur. J. Oral Sci.*, 108, 115-122.
 27. **Breivik, T.**, Thrane, P.S., Gjermo, P., Opstad, P.K., 2000b. Glucocorticoid receptor antagonist RU 486 treatment reduces periodontitis in Fischer 344 rats. *J. Periodontal Res.*, 35, 285-290.
 28. **Broadbent, E.**, Petrie, K.J., Alley, P.G., Booth, R.J., 2003. Psychological stress impairs early wound repair following surgery. *Psychosom. Med.*, 65, 865-869.
 29. **Bruch-Gerharz, D.**, Fehsel, K., Suschek, C., Michel, G., Ruzicka, T., Kolb-Bachofen, V., 1996. A proinflammatory activity of interleukin 8 in human skin: expression of the inducible nitric oxide synthase in psoriatic lesions and cultured keratinocytes. *J. Exp. Med.*, 184, 2007-2012.
 30. **Brück, W.**, 2005. The pathology of multiple sclerosis is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage. *J. Neurol.*, 252, Suppl. 5, 3-9.
 31. **Brydon, L.**, Walker, C., Wawrzyniak, A., Whitehead, D., Okamura, H., Yajima, J., Tsuda, A., Steptoe, A., 2009. Synergistic effects of psychological and immune stressors on inflammatory cytokine and sickness responses in humans. *Brain Behav. Immun.*, 23, 217-224.
 32. **Calcagni, E.**, Elenkov, I., 2006. Stress system activity, innate and T helper cytokines, and susceptibility to immune-related diseases. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1069, 62-67.
 33. **Cavaillon, J.M.**, 2001. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell Mol. Biol.*, 47, 695-702.
 34. **Charo, I.F.**, Ransohoff, R.M., 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N. Engl. J. Med.*, 354, 610-621.
 35. **Chi, D.S.**, Fitzgerald, S.M., Pitts, S., Cantor, K., King, E., Lee, S.A., Huang, S.K., Krishnaswamy, G., 2004. MAPK-dependent regulation of IL-1- and beta adrenoceptor-induced inflammatory cytokine production from mast cells: implications for the stress response. *BMC Immunol.*, 21, 5-22.
 36. **Church, L.D.**, Cook, G.P., McDermott, M.F., 2008. Primer: inflammasomes and interleukin 1beta in inflammatory disorders. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, 4, 34-42.
 37. **Cimasoni, G.**, 1983. Crevicular fluid updated. *Monogr. Oral Sci.*, 12(III-VII), 1-15.

-
38. **Cohen, J.A.**, 1992. A power primer. *Psychol. Bull.*, 112, 155-159.
 39. **Cone, J.B.**, 2001. Inflammation. *Am. J. Surg.*, 182, 558-562.
 40. **Cox, G.**, 1995. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J. Immunol.*, 145, 4719-4725.
 41. **Croucher, R.**, Marcenes, W.S., Torres, M., Hughes, W.S., Sheiham, A., 1997. The relationship between life-events and periodontitis. *J. Clin. Periodont.*, 24, 39-43.
 42. **Daig, R.**, Andus, T., Aschenbrenner, E., Falk, W., Scholmerich, J., Gross, V., 1996. Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, 38, 216-222.
 43. **Dantzer, R.**, Konsman, J.P., Bluthé, R.-M., Kelley, K.W., 2000. Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Auton Neurosci*, 85, 60-65.
 44. **Dantzer, R.**, O'Connor, J.C., Freund, G.G., Johnson, R.W., Kelley, K.W., 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat. Rev. Neurosci.*, 9, 46-56.
 45. **Darveau, R.P.**, Belton, C.M., Reife, R.A., Lamont, R.J., 1998. Local chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism für *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.*, 66, 1660-1665.
 46. **De Pablos, R.M.**, Villaran, R.F., Arguelles, S., Herrera, A.J., Venero, J.L., Ayala, A., Cano, J., Machado, A., 2006. Stress increases vulnerability to inflammation in the rat prefrontal cortex. *J. Neurosci.*, 26, 5709-5719.
 47. **Deinzer, R.** Granrath, N., Stuhl, H., Twork, L., Idel, H., Waschul, B., Herforth, A., 2004a. Acute stress effects on local IL-1 β responses to pathogens in a human in vivo model. *Brain Behav. Immun.*, 18, 458-467.
 48. **Deinzer, R.**, 2002. Stress und Parodontitis. Studien zum Einfluss von Stress auf parodontitisrelevante Parameter. Lengerich, Papst Science Publisher.
 49. **Deinzer, R.**, Förster, P., Fuck, L., Herforth, A., Stiller-Winkler, R., Idel, H., 1999. Increase of crevicular interleukin-1 β under academic stress at experimental gingivitis sites and at sites of perfect oral hygiene. *J. Clin. Periodontol.*, 26, 1-8.

-
50. **Deinzer, R.**, Kleineidam, C., Stiller-Winkler, R., Idel, H., Bachg, D., 2000b. Prolonged reduction of salivary immunoglobulin A (sIgA) after a major academic exam. *International J. Psychophysiol.*, 37, 219-232.
 51. **Deinzer, R.**, Kottmann, W., Förster, P., Herforth, A., Stiller-Winkler, R., Idel, H., 2000a. After-effects of stress on crevicular interleukin-1 β . *J. Clin. Periodontol.*, 27, 74-77.
 52. **Deinzer, R.**, Waschul, B., Herforth, A., 2004b. Effects of experimental gingivitis on crevicular PGE2 in a split mouth trial. *J. Clin. Periodontol.*, 31, 501-505.
 53. **Del Rey, A.**, Voigt, K., Besedovsky, H.O., 2006. Bidirektionale Kommunikation zwischen den Hormonachsen und dem Immunsystem. In Rainer H. Straub (Hg.): *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen. Band 1: Physiologische Grundlagen*. Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen.
 54. **Delima, A.J.**, Van Dyke, T.E., 2003. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. *Periodontol. 2000*, 31, 55-76.
 55. **Dewhirst, F.E.**, Stashenko, P.P., Mole, J.E., Tsurumachi, T., 1985. Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: identity with interleukin-1 β . *J. Immunol.*, 135, 2562-2568.
 56. **Dhabhar, F.S.**, McEwen, 1996. Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. *J. Immunol.*, 156, 2608-2615.
 57. **Dhabhar, F.S.**, 2002. Stress-induced augmentations of immune function – the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Brain Behav. Immun.*, 16, 785-798.
 58. **Dhabhar, F.S.**, McEwen, 1997. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav. Immun.*, 11, 286-306.
 59. **Dickerson, S.S.**, Kemeny, M.E., 2004. Acute stressors and cortisol responses: a theoretical integration and synthesis of laboratory research. *Psychol. Bull.*, 130, 355-391.
 60. **Diehl, S.**, Rincon, M., 2002. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol. Immunol.*, 39, 531-536.

-
61. **Dinarello, C.A.**, 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87, 2095-2147.
 62. **Dinarello, C.A.**, 1998. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int. Rev. Immunol.*, 16, 457-499.
 63. **Edwards, K.**, Burns, V., Reynolds, T., Carroll, D., Drayson, M., Ring, C., 2006. Acute stress exposure prior to influenza vaccination enhances antibody response in women. *Brain Behav. Immun.*, 20, 159-168.
 64. **Elenkov**, 2008. Neurohumoral-cytokine interactions: Implications for inflammation, common human diseases and well-being. *Neurochemistry International*, 52, 40-51.
 65. **Elenkov, I.J.**, 2004. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1024, 138-146.
 66. **Elenkov, I.J.**, Chrousos, G.P., 2002. Stress hormones, proinflammatory and anti-inflammatory cytokines and autoimmunity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 966, 290-303.
 67. **Elenkov, I.J.**, Iezzoni, D.G., Daly, A., Harris, A.G., Chrousos, G.P., 2005. Cytokine dysregulation, inflammation and well being. *Neuroimmunomodulation*, 12, 255-269.
 68. **Elenkov, I.J.**, Webster, E.L., Torpy, D.J., Chrousos, G.P., 2006. Stress, corticotrophin-releasing hormone, glucocorticoids and the immune/inflammatory response: acute and chronic effects. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 876, 1-13.
 69. **Elenkov, I.J.**, Wilder, R.L., Chrousos, G.P., Sylverster Vizi, E., 2000. The sympathetic nerve – an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol. Rev.*, 52, 595-638.
 70. **Emingil, G.**, Atilla, G., Baskesen, A., Berdeli, A., 2005. Gingival crevicular fluid EMAP_II, MIP-1alpha and MIP-1beta levels of patients with periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 32, 880-885.
 71. **Emingil, G.**, Atilla, G., Hüseyinov, A., 2004. Gingival crevicular fluid monocyte chemoattractant protein-1 and RANTES levels in patients with generalized aggressive periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 31, 829-834.
 72. **Faizuddin, M.**, Bharathi, S.H., Rohini, N.V., 2003. Estimation of interleukin-1beta levels in the gingival crevicular fluid in health and in inflammatory periodontal disease. *J. Periodont. Res.*, 38, 111-114.

-
73. **Fangogiannis, N.G.**, Lindsey, M.L., Michael, L.H., Youker, K.A., Bressler, R.B., Mendoza, L.H., Spengler, R.N., Wayne Smith, C., Entman, M.L., 1998. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF- α , initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation*, 98, 699-710.
 74. **Farhadi, A.**, Keshavarzian, A., Vand de Kar, L.D., Jakate S., Domm, A., Zhang, L., Shaikh, M., Banan, A., Fields, J.Z., 2005. Heightened responses to stressors in patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.*, 100, 1796-1804.
 75. **Fearon, D.T.**, Locksley, R.M., 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, 272, 50-53.
 76. **Figueredo, C.M.**, Rescala, B., Teles, R.P., Teles, F.P., Fischer, R.G., Haffajee, A.D., Socransky, S.S., Gustafsson, A., 2008. Increased interleukin-18 in crevicular fluid from periodontitis patients. *Oral Microbiol. Immunol.*, 23, 173-176.
 77. **Fitzsimmons, T.R.**, Sanders, A.E., Slade, G.D., Bartold, P.M., 2009. Biomarkers of periodontal inflammation in the Australian adult population. *Aust. Dent. J.*, 54, 115-122.
 78. **Flajnik, M.F.**, Du Pasquier, L., 2004. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends Immunol.* 25, 640-644.
 79. **Fleshner, M.**, Nguyen, K.T., Cotter, C.S., Watkins, L.R., Maier, S.F., 1998. Acute stressor exposure both suppresses acquired immunity and potentiates innate immunity. *Am. J. Physiol.*, 275, R870-R878.
 80. **Frank, M.G.**, Baratta, M.V., Sprunger, D.B., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2007. Microglia serve as a neuroimmune substrate for stress-induced potentiation of CNS proinflammatory cytokine responses. *Brain Behav. Immun.*, 21, 47-59.
 81. **Frank, M.G.**, Miguel, Z.D., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2010. Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to E.coli lipopolysaccharide. *Brain Behav. Immun.*, 24, 19-30.
 82. **Fransson, C.**, Mooney, J., Kinane, D.F., Berghlund, T., 1999. Differences in the inflammatory response in young and old human subjects during the course of experimental gingivitis. *J. Clin. Periodontol.*, 26, 453-460.

-
83. **Fujino, S.**, 2003. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*, 52, 65-70.
 84. **Gaffen, S.L.**, Hajishengallis, G., 2008. A new inflammatory cytokine on the block: rethinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 and IL-17. *J. Dent. Res.*, 87, 817-828.
 85. **Gamonal, J.**, Acevedo, A., Bascones, A., Jorge, O., Silva, A., 2000. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J. Periodontol.*, 71, 1535-1545.
 86. **Gamonal, J.**, Acevedo, A., Bascones, A., Jorge, O., Silva, A., 2001. Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. *J Periodont Res.*, 36, 194 –203.
 87. **Gemmell, E.**, Seymour, G.J., 1998. Cytokine profiles of cells extracted from humans with periodontal diseases. *J. Dent. Res.*, 77, 16-26.
 88. **Gemmell, E.**, Seymour, G.J., 2004. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol. 2000*, 35, 21-41.
 89. **Genco, R.J.**, Ho, A.W., Grossi, S.G., Dunford, R.G., Fedesco, L.A., 1999. Relationship of stress, distress and inadequate coping behaviors to periodontal disease. *J. Periodontol.*, 70, 711-723.
 90. **Gerard, G.**, Rollins, B.J., 2001. Chemokines and disease. *Nat. Immunol.*, 2, 108-115.
 91. **Gerszten, R.E.**, Garcia-Zepeda, E.A., Lim, Y.-C., Yoshida, M., Ding, et al., 1999. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*, 398, 718-723.
 92. **Giannopoulou, C.**, Cappuyns, I., Mombelli, A., 2003. Effect of smoking on gingival crevicular cytokine profile during experimental gingivitis. *J. Clin. Periodontol.*, 30, 996-1002.
 93. **Glaser, R.**, Kiecolt-Glaser, J.K., 2005. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat. Rev. Immunol.*, 5, 243-251.
 94. **Glaser, R.**, Kiecolt-Glaser, J.K., Marucha, P.T., MacCallum, R.C., Laskowski, B.S., Malarkey, W.B., 1999. Stress-Related Changes in Proinflammatory Cytokine Production in Wounds. *Arch. Gen. Psychiatry*, 56, 450-456.

-
95. **Godbout, J.P.**, Glaser, R., 2006. Stress induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer. *J. Neuroimmune. Pharm.* 1, 421-427.
 96. **Goebel, M.U.**, Mills, P.J., 2000. Acute psychological stress and exercise and changes in peripheral leukocyte adhesion molecule expression and density. *Psychosom. Med.*, 62, 664-670.
 97. **Granrath, N.**, 2008. Auswirkungen verschiedener Interventionsstrategien und -modalitäten auf psychologische Mediatoren und klinische Indikatoren des Mundgesundheitsverhaltens: Ergebnisse dreier randomisierter Interventionsstudien [elektronische Ressource]: Universität Düsseldorf, Dissertation, 2006; eingegangen August 7, 2008. Archivserver der Deutschen Nationalbibliothek. Erhältlich unter: http://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id_3546..
 98. **Green, L.W.**, Tryon, W.W., Marks, B., Huryn, J., 1986. Periodontal disease as a function of life events stress. *J. Human Stress*, 12, 32-36.
 99. **Griffin, W.S.**, 2006. Inflammation and neurodegenerative diseases. *Am. J. Clin. Nutr.*, 83, 470s.
 100. **Griffiths, G.S.**, 2003. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol.* 2000, 31, 32-42.
 101. **Gross, K.J.**, Pothoulakis, C., 2007. Role of neuropeptides in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, 13, 918-932.
 102. **Hanioka, T.**, Takaya, K., Matsumori, Y., Matsuse, R., Shizukuishi, S., 2000. Relationship of the substance P to indicators of host response in human gingival crevicular fluid. *J. Clin. Periodontol.*, 27, 262-266.
 103. **Harbuz, M.S.**, Conde, G.L., Marti, O. Lightman, S.L., Jessop, D.S., 1997. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in autoimmunity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 823, 214-224.
 104. **Haringman, J.H.**, Ludikhuize, J., Tak, P.P., 2004. Chemokines in joint disease: the key to inflammation? *Ann. Rheum. Dis.*, 63, 1186-1194.
 105. **Haringman, J.J.**, Oostendorp, R.L., Tak, P.P., 2005. Targeting cellular adhesion molecules, chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis. *Expert Opin. Emerg. Drugs*, 10, 299-310.

-
106. **Harrison, S.**, Geppetti, P., 2001. Substance p. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 33, 555-576.
 107. **Heasman, P.A.**, Collins, J.G., Offenbacher, S., 1993. Changes in crevicular fluid levels of interleukin-1 β , leukotriene B₄, Prostaglandin E₂, Thromboxane B₂ and Tumor Necrosis Factor alpha in experimental gingivitis in humans. *J. Periodont. Res.* 28, 241-247.
 108. **Heinz, A.**, Hermann, D., Smolka, M.N., 2003. Effects of acute psychological stress on adhesion molecules, interleukins and sex hormones: implications for coronary heart disease. *Psychopharmacology*, 165, 111-117.
 109. **Herrmann, M.**, Scholmerich, J., Straub, R.H., 2000. Stress and rheumatic diseases. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, 26, 737-763.
 110. **Hoffmann, T.**, 2006. Krankheits- und Versorgungsprävalenzen. Parodontalerkrankungen. In: Micheelis, W., Schiffner, U. (Hrsg.) *Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV)*. Insitut der Deutschen Zahnärzte (IDZ). Köln: Deutscher Ärzteverlag.
 111. **Hopkins, S.J.**, 2007. Central nervous system recognition of peripheral inflammation: a neural, hormonal collaboration. *Acta Biomed.*, 78, 231-247.
 112. **Huang, G.T.**, Kim, D., Lee, J.K., Kuramitsu, H.K., Haake, S.K., 2001. Interleukin-8 und intercellular adhesion molecule 1 regulation in oral epithelial cells by selected periodontal bacteria: multiple effects of Porphyromonas gingivalis via antagonistic mechanisms. *Infect. Immun.*, 69, 1364-1372.
 113. **Huang, S.**, Mills, L., Mian, B., Tellez, C., McCarthy, M., Yang, X-D., Gudas, J.M., Bar-Eli, M., 2002. Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibt angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma. *Am. J. Pathol.*, 161, 125-134.
 114. **Ishikawa, F.**, Miyazaki, S., 2005. New defence strategies by neutrophils. *Arch. Immuno. Ther. Exp.*, 53, 226-33.
 115. **Jessop, D.S.**, Richards, L.J., Harbuz, M.S., 2004. Effects of stress on inflammatory autoimmune disease: destructive or protective? *Stress*, 7, 261-267.

-
116. **Ji, S.**, Kim, Y., Min, B.-H., Han, S.H., Choi, Y., 2007. Innate immune responses of gingival epithelial cells to nonperiodontopathic and periodontopathic bacteria. *J. Periodont. Res.*, 42, 503-510.
117. **Johannsen, A.**, Rydmark, I., Söder, B., Asberg, M., 2007. Gingival inflammation, increased periodontal pocket depth and elevated interleukin-6 in gingival crevicular fluid of depressed women on long-term sick leave. *J. Periodontal Res.*, 42, 546-552.
118. **Johannsen, A.**, Rylander, G., Söder, B., Asberg, M., 2006. Dental plaque, gingival inflammation, and elevated levels of interleukin6 and cortisol in gingival crevicular fluid from women with stress-related depression and exhaustion. *J. Periodontol.*, 77, 1403-1409.
119. **Johnson, J.D.**, Campisi, J., Sharkey, C.M., Kennedy, S.L., Nickerson, M., Greenwood, B.N., Fleshner, M., 2005. Catecholamines mediate stress-induced increases in peripheral and central inflammatory cytokines. *Neurosci.*, 135, 295-307.
120. **Johnson, T.C.**, Reinhardt, R.A., Payne, J.B., Dyer, J.K., Patil, K.D., 1997. Experimental gingivitis in periodontitis-susceptible subjects. *J. Clin. Periodontol.*, 24, 618-625.
121. **Kavelaars, A.**, van de Pol, M., Zijlstra, J., Heijnen, C.J., 1997. Beta 2-adrenergic activation enhances interleukin-8 production by human monocytes. *J. Neuroimmunol.*, 77, 211-216.
122. **Kay, J.**, Calabrese, L., 2004. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 43, iii2-iii9.
123. **Kern, S.**, Ziemssen, T., 2008. Brain-immune communication psychoneuroimmunology of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 14, 6-21.
124. **Kidd, P.**, 2003. Th1/Th2 balance: The hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Alternat. Med. Rev.*, 3, 223-246.
125. **Kiecolt-Glaser, J.K.**, Loving, T.J., Stowell, J.R., Malarkey, W.B., Lemeshow, S., Dickinson, S.L., Glaser, R., 2005. Hostile marital interactions, proinflammatory cytokine production and wound healing. *Arch. Gen. Psychiatry*, 62, 1377-1384.
126. **Kiecolt-Glaser, J.K.**, Marucha, P.T., Malarkey, W.B., Mercado, A.M., Glaser, R., 1995. Slowing of wound healing by psychological stress. *Lancet*, 347.

-
127. **Kiecolt-Glaser, J.K.**, McGuire, L., Robles, T.F., Glaser, R., 2002. Psychoneuroimmunology: psychological influences on immune function and health. *J. Consult. Clin. Psychol.*, 70, 537-547.
128. **Kin, N.W.**, Sanders, V.M., 2006. It takes nerve to tell T and B cells what to do. *J. Leukoc. Biol.*, 79, 1093-1104.
129. **Kinane, D.F.**, Lappin, D.F., 2002. Immune processes in periodontal disease: a review. *Ann. Periodontol.*, 7, 62-71.
130. **Kinane, D.F.**, Winstanley, F.P., Adonogianiaki, E., Moughal, N.A., 1992. Bioassay of interleukin-1 (Il-1) in human gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *Arch. Oral Bio.*, 37, 153-156.
131. **Kleineidam, Jan Carsten:** Entwicklung eines Laborstressors zur standardisierten Überprüfung der Stressreagibilität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse. Düsseldorf, Univ., Diss., 1996. URN: d-nb.info/gnd/115298401.
132. **Koeck, F.X.**, Bobrik, V., Fassold, A., Grifka, J., Kessler, S., Straub, R.H., 2009. Marked loss of sympathetic nerve fibers in chronic Charcot foot of diabetic origin compared to ankle joint osteoarthritis. *J. Orthop. Res.*, 27, 736-741.
133. **Konsman, J.P.**, Luheshi, G.N., Bluthé, R.M., Dantzer, R., 2000. The vagus nerve mediates behavioural depression, but not fever, in response to peripheral immune signals; a functional anatomical analysis. *Eur J Neurosci*, 12, 4434-4446.
134. **Kontoyiannis, D.**, Kotlyarov, A., Carballo, E., Alexopoulou, L., Blackshear, P.J. et al., 2001. Interleukin-10 targets p38 MAPK to modulate ARE-dependent TNF mRNA translation and limit intestinal pathology. *EMBO J.*, 20, 3760-70.
135. **Kornman, K. S.**, Page, R. C., Tonetti, M.S., 1997. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000*, 14, 33-53.
136. **Kotani, A.**, Hori, T., Matsumura, Y., Uchiyama, T., 2002. Signaling of gp34 (OX40 ligand) induces vascular endothelial cells to produce a CC chemokine RANTES/CCL4. *Immunol. Lett.*, 84, 1.
137. **Kraan, M.C.**, Patel, D.D., Haringman, J.J. Smith, M.D., Weedon, H., Ahern, M.J., Breedveld, F.C., Tak, P.P., 2000. The development of clinical signs of rheumatoid

- synovial inflammation is associated with increased synthesis of the chemokine CXCL8 (interleukin 8). *Arthritis Res.*, 3, 65-71.
138. **Lamster, I.B.**, Ahlo, J.K., 2007. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1098, 216-229.
139. **Lamster, I.B.**, Grbic, J.T., 1995. Diagnosis of periodontal disease based on analysis of the host response. *Periodontol. 2000*, 7, 83-99.
140. **Lappin, D.F.**, MacLeod, C.P., Kerr, A., Mitchel, T., Kinane, D.F., 2001. Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. *Clin. Exp. Immunol.*, 123, 294-300.
141. **Lazarus, R.S.**, Launier, R., 1978. Stress-related transactions between person and environment. In: Pervin, L.A. & Lewis, M. (eds.): Perspectives in interactional psychology. New York: Plenum Press, 287-327
142. **Le Resche, L.**, Dworkin, S.F., 2002. The role of stress in inflammatory disease, including periodontal disease: review of concepts and current findings. *Periodontol. 2000*, 30, 91-103.
143. **Lennard, A.C.**, 1995. Interleukin-1 receptor antagonist. *Crit. Rev. Immunol.*, 5, 77-105.
144. **Libby, P.**, 2006. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.*, 83, 456s-460s.
145. **Linden, G.J.**, McKinnell, J., Shaw, C., Lundy, F.T., 1997. Substance P and neurokinin A in gingival crevicular fluid in periodontal health and disease. *J. Clin. Periodontol.*, 24, 799-803.
146. **Linden, G.J.**, Mullally, B.H., Freeman, R., 1996. Stress and the progression of periodontal disease. *J. Clin. Periodont.*, 23, 675-680.
147. **Löe, J.-**, Theilade, E., Jensen, S.B., 1965. Experimental gingivitis in Man. *J. Periodontol.* 36, 5-15.
148. **Lundy, F.T.**, Mullally, B.H., Burden, D.J., Lamey, P.J., Shaw, C., Linden, G.J., 2000. Changes in substance P and neurokinin A in gingival crevicular fluid in response to periodontal treatment. *J. Clin. Periodontol.*, 526-530.
149. **Maggi, E.**, 1998. The TH1/TH2 paradigm in allergy. *Immunotechnology*, 3, 233-244.

-
150. **Maier, S.F.**, Watkins, L.R., 1998. Cytokines for psychologists: implications for bidirectional immune-to-brain communication for understanding behaviour, mood, and cognition. *Psychol. Rev.*, 105, 83-107.
 151. **Marcenes, S.W.**, Sheiham, A., 1992. The relationship between work stress and oral health status. *Soc. Sci. Med.*, 35, 1511-1520.
 152. **Marks, D.J.B.**, Harbord, M.W.N., Mac Allister, R., Rahman, F.Z., Young, J., Al-Lazikani, B., Lees, W., Novelli, M., Bloom, S., Segal, A.W., 2006. Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation. *Lancet*, 367, 668-678.
 153. **Marshall, G.D.**, Agarwal, S.K., Lloyd, C., Cohen, L., Henninger, E.M., Morris, G.J., 1998. Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical students. *Brain Behav. Immun.*, 12, 297-307.
 154. **Marsland, A.L.**, Sathanoori, R., Muldoon, M.F., Manuck, S.B., 2007. Stimulated production of interleukin-8 covaries with psychological risk factors for inflammatory disease among middle-aged community volunteers. *Brain Behav. Immun.*, 21, 218-228.
 155. **Matsuki, Y.**, Yamamoto, T., Hara, K., 1992. Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA) –expressing cells in human inflamed gingiva by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. *Immunol*, 76, 42-47.
 156. **Mawdsley, J.E.**, Rampton, D.S., 2005. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut*, 54, 1481-1491.
 157. **Mazzucchelli, L.**, Hauser, C., Zraggen, K., Wagner, H., Hess, M., Laissue, J.A., Müller, C., 1994. Expression of interleukin-8 gene in inflammatory bowel disease is related to the histological grade of active inflammation. *Am. J. Pathol.*, 144, 997-1007.
 158. **McEwen**, 1998. Protective and damaging effects of stress mediators. *N. Engl. J. Med.*, 338, 171-179.
 159. **McEwen, B.S.**, Biron, C.A., Brunson, K.W., Bulloch, K., Chambers, W.H., Dhabhar, F.S., Goldfarb, R.H., Kitson, R.P., Miller, A.H., Spencer, R.L., Weiss, J.M., 1997. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Res. Rev.*, 1-2, 79-133.

-
160. **McGeachy, M.J.**, Cua, D.J., 2008. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity*, 28, 445-453.
161. **McMahon, M.**, Hahn, B.H., 2007. Atherosclerosis and systemic lupus erythematosus: mechanistic basis of the association. *Curr. Opin. Immunol.*, 19, 633-639.
162. **Medzhitov, R.**, Janeway, C., 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 91, 295-298.
163. **Medzhitov, R.**, Janeway, C., 2000. Advances in Immunology: Innate Immunity. *New Engl J Med*, 343, 338-344.
164. **Mercado, F.B.**, Marshall, R.I., Bartold, P.M., 2003. Inter-relationships between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, 30, 761-772.
165. **Merchant, A.T.**, Pitiphat, W., Ahemd, B., Kawachi, I., Joshipura, K., 2003. A prospective study of social support, anger expression and risk of periodontitis in men. *J. Am. Dent. Assoc.*, 134, 1591-1596.
166. **Miller, L.E.**, Jüsten, H.P., Schölmerich, J., Straub, R.H., 2000. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB*, 14, 2097-2107.
167. **Mills, P.J.**, Dimsdale, J.E., 1996. The effects of acute psychological stress on cellular adhesion molecules. *J. Psychosom. Res*, 41, 49-53.
168. **Mittermaier, C.**, Dejaco, C., Waldhoer, T., Oefflerbauer-Ernst, A., Miehsler, W. et al., 2004. Impact of depressive mood on relapse in patients with inflammatory bowel disease: a prospective 18-month follow up study. *Psychosom. Med.*, 66, 79-84.
169. **Mohr, D.C.**, Pelletier, D., 2006. A temporal framework for understanding the effects of stressful life events on inflammation in patients with multiple sclerosis. *Brain Behav. Immunol.*, 20, 27-36.
170. **Monteiro Da Silva, A.M.**, Oakley, D.A., Newman, H.N., Nohl, F.S., Lloyd, H.M., 1996. Psychosocial factors and adult onset rapidly progressive periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, 23, 789-794.
171. **Mosman, T.R.**, Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L., 1986. Two types of murine helper t cell clone. *J. Immunol.*, 136, 2348-57.

-
172. **Mukaida, N.**, Matsumoto, T., Yokoi, K., Harada, A., Matsushima, K., 1998. Inhibition of neutrophil-mediated acute inflammation injury by an antibody against interleukin-8 (IL-8). *Inflamm. Res.*, 47, 151-157.
173. **Munhoz, C.D.**, Lepsch, L.B., Kawamoto, E.M., Malta, M.B., Lima Lde S., Avellar, M.C., Sapolsky, R.M., Scavone, C., 2006. Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. *J. Neurosci.*, 26, 3813-3820.
174. **Murphy, K.**, Travers, P., Walport, M., 2008. Janeway's immunobiology, 7. Edition. New York: Garland Science.
175. **Neurath, M.F.**, Finotto, S., Glimcher, L.H., 2002. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat. Med.*, 8, 567-573.
176. **Nitsch, J.R.**, 1981. Stress – Theorien, Untersuchungen, Maßnahmen. Bern: Huber
177. **Nonnenmacher, C.**, Helms, K., Bacher, M., Nüsing, R.M., Susin, C., Mutters, R., Flores-de-Jacoby, L., Mengel, R., 2009. Effect of age on gingival crevicular fluid concentrations of MIF and PGE2. *J. Dent. Res.*, 88, 639-643.
178. **Nylander, K.**, Danielsen, B., Fejerskov, O., Dabelsteen, E., 1993. Expression of the endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) on endothelial cells in experimental gingivitis in humans. *J. Periodontol.*, 64, 55-57.
179. **Orozco, A.**, Gemmell, E., Bickel, M., Seymour, G.J., 2006. Interleukin-1beta, interleukin-12 and interleukin-18 levels in gingival fluid and serum of patients with gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.*, 21, 256-260.
180. **Oynebraten, I.**, Bakke, L., Brandtzaeg, P., Johansen, F.L., Haraldsen, G., 2004. Rapid chemokine secretion from endothelial cells originates from 2 distinct compartments. *Blood*, 15, 314-320.
181. **Pang, X.**, Alexacos, N., Letourneau, R., Seretakis, D., Gao, W., Boucher, W., Cochrane, D.E., Theoharides, T.C., 1998. A neurotensin receptor antagonist inhibits acute immobilisation induced cardiac mast cell degranulation, a corticotrophin-releasing hormone dependent process. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 287, 307-314.
182. **Péne, J.**, et al., 2008. chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated TH 17 lymphocytes. *J. Immunol.*, 180, 7423-7430.

-
183. **Pernis, A.B.**, 2009. Th17 cells in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *J. Intern. Med.*, 265, 644-652.
184. **Pongratz, G.**, Sanders, V.M., 2006. Rezeptoren für Neurotransmitter und Hormone auf und in Immunzellen. In Rainer H. Straub (Hg.): *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen. Band 1: Physiologische Grundlagen*. Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen.
185. **Powrie, F.**, Mason, D., 1988. Phenotypic and functional heterogeneity of CD4 T cells. *Immunol. Today*, 9, 274-277.
186. **Pradeep, A.R.**, Raj, S., Aruna, G., Chowdhry, S., 2009. Gingival crevicular fluid and plasma levels of neuropeptide substance-p in periodontal health, disease and after nonsurgical therapy. *J. Periodontal. Res.*, 44, 232-237.
187. **Rateitschak, K.H.**, Rateitschak, E.M., Wolf, H.F., Hassell, T.M. *Periodontology*. Stuttgart, New York: Thieme, 1989.
188. **Redwine, L.**, Snow, S., Mills, P., Irwin, M., 2003. Acute Psychological Stress: Effects on Chemotaxis and Cellular Adhesion Molecule Expression. *Psychosom. Med.*, 65, 598-603.
189. **Rollins, B.J.**, 1997. Chemokines. *Blood*, 90, 909-928.
190. **Rosa-Ballina, M.**, Tracey, K.J., 2009. Cholinergic control of inflammation. *J. Intern. Med.*, 265, 663-679.
191. **Rosania, A.E.**, Low, K.G., McCormick, C.M., Rosania, D.A., 2009. Stress, depression, cortisol and periodontal disease. *J. Periodontol.*, 80, 260-266.
192. **Rosenkranz, M.A.**, 2007. Substance P at the nexus of mind and body in chronic inflammation and affective disorders. *Psychol. Bull.*, 133, 1007-1037.
193. **Roy, S.**, Khanna, S., Yeh, P.E., Rink, C., Malarkey, W.B., Kiecolt-Glaser, J.K., Laskowski, B., Glaser, R., Sen, C.K., 2005. Wound site neutrophil transcriptome in response to psychological stress in young men. *Gene Expr.*, 12, 273-287.
194. **Rudin, H.J.**, Overdizk, H.F., Rateitschack, K.H., 1970. Correlations between Sulcus Fluid Rate and Clinical and Histological Inflammation of the Marginal Gingiva. *Helv. Odont Acta*, 14, 21- 26.

-
195. **Salvi, G.E.**, Brown, C.E., Fujihashi, K., 1998. Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis. *J. Periodont. Res.*, 33, 212-225.
 196. **Sanders, V.M.**, 2001. Neurotransmitter receptors on lymphocytes and other lymphoid cells. In: Ader, R., Felten, D.L., Cohen, N. (Hgs.). *Psychoneuroimmunology*. 3. Aufl., San Diego, S. 161-196.
 197. **Sanders, V.M.**, Kavelaars, A., 2007. Adrenergic regulation of immunity. In: Ader, R., Felten, D.L., Cohen, N. (Hrsgs.). *Psychoneuroimmunology*. Academic Press, New York.
 198. **Sanders, V.M.**, Straub, R.H., 2002. Norepinephrine, the beta-adrenergic receptor and immunity. *Brain Behav. Immun.*, 16, 290-332.
 199. **Schulze-Koops, H.**, Kalden, J.R., 2001. The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 15, 677-691.
 200. **Schütt, C.**, Bröker, B., 2006. *Grundwissen Immunologie*. München: Spektrum Akademischer Verlag.
 201. **Schwartz, A.R.**, Gerin, W., Davidson, K.W., Pickering, T.G., Brosschot, J.F., Thayer, J.F., Christenfeld, N., Linden, W., 2003. Toward a causal model of cardiovascular responses to stress and the development of cardiovascular disease. *Psychosom. Med.*, 65, 22-35.
 202. **Seeger, F.H.**, Blessing, E., Gu, L., Bornhold, R., Denger, S., Kreuzer, J., 2002. Fibrinogen induces chemotactic activity in endothelial cells. *Acta Physiol. Scand.*, 176, 109-115.
 203. **Seegerstrom, S.C.**, Miller, G.E., 2004. Psychological Stress and the Human Immune System: A Meta-Analytic Study of 30 Years of Inquiry. *Psychol. Bull.*, 130, 601-630.
 204. **Serhan, C.N.**, Savill, J., 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.*, 2, 1191-1197.
 205. **Seymour, G. J.**, Gemmell, E., Reinhardt, R. A., Eastcott, J., Taubman, M. A., 1993. Immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: cellular and molecular mechanisms. *J. Periodont. Res.*, 28, 478-486.
 206. **Seymour, G.J.** & Gemmell, E., 2001. Cytokines in periodontal disease: Where to from here? *Acta Odontol. Scand.*, 59, 167-173.

-
207. **Simonini, A.**, Moscucci, M., Muller, D., Bates, E.R., Pagani, F.D., Burdick, M.D., Strieter, R.M., 2000. IL-8 is an angiogenic factor in human coronary atherectomy tissue. *Circulation*, 101, 1519-1521.
208. **Singh, L.K.**, Pang, X., Alexacos, N., Letourneau, R., Theoharides, T.C., 1999. Acute immobilisation stress triggers skin mast cell degranulation via corticotrophin-releasing hormone, neurotensin and substance p: a link to neurogenic skin disorders. *Brain Behav. Immun.*, 13, 225-229.
209. **Smith, G.P.**, Stapleton, P.P., Freeman, T.A., Concannon, E.M., Mestre, J.R., Duff, M., Maddali, S., Daly, J.M., 2004. Glucocorticoid pretreatment induces cytokine overexpression and nuclear factor-kappaB activation in macrophages. *J. Surg. Res.*, 116, 253-261.
210. **Solomon, G. F.**, Moos, R. H., 1964. Emotions, immunity, and disease: A speculative theoretical integration. *Arch. Gen. Psychiat.*, 11, 657-674.
211. **Sorrells, S.F.**, Sapolsky, R.M., 2007. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain Behav. Immun.*, 21, 259-272.
212. **Spencer, L.A.**, Melo, R.C., Perez, S.A., Bafford, S.P., Dvorak, A.M., Weller, P.F., 2006. Cytokine receptor mediating trafficking of preformed IL-4 in eosinophils identifies an innate immune mechanism of cytokine secretion. *PNAS*, 103, 3333-8.
213. **Stephoe, A.**, Hamer, M., Chida, Y., 2007. The effects of acute psychological stress on circulating inflammatory factors in humans: a review and meta-analysis. *Brain Behav. Immun.*, 21, 901-912.
214. **Straub, R.H.**, Besedovsky, H.O, 2003. Integrated evolutionary, immunological and neuroendocrine framework for the pathogenesis of chronic disabling inflammatory diseases. *FASEB J*, 17, 2176-83.
215. **Straub, R.H.**, Besedovsky, H.O., Del Rey, A., 2006. Allgemeine Konzepte der Psychoneuroendokrino-Immunologie. In: Rainer Straub (Hg.): Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen. Vandenhoeck & Rubrecht, Göttingen.
216. **Straub, R.H.**, Cutolo, M., 2006. Does stress influence the course of rheumatic diseases? *Clin. Exp. Rheumatol.*, 24, 225-228.

-
217. **Straub, R.H.**, Dhabhar, F.S., Bijlsma, J.W., Cutolo, M., 2005. How psychological stress via hormones and nerve fibres may exacerbate rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 52, 16-26.
218. **Strieter, R.M.**, Burdick, M.D., Gomperts, B.N., Belperio, J.A., Keane, M.P., 2005. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 16, 593-609.
219. **Strömberg, E.**, Edebo, A., Lundin, B.S., Bergin, P., Brisslert, M., Svennerholm, A.M., Lindholm, C., 2005. Down-regulation of epithelial IL-8 responses in *Helicobacter pylori*-infected duodenal ulcer patients depends on host factors, rather than bacterial factors. *Clin. Exp. Immunol.*, 140,117–125.
220. **Strömberg, E.**, Edebo, A., Svennerholm, A.M., Lindholm, C., 2003. Decreased epithelial cytokine responses in the Duodenal Mucosa of *Helicobacter pylori*-infected duodenal ulcer patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 10, 116-124.
221. **Suarez, E.C.**, Krishna, R.R., Lewis, J.G., 2003. The relation of severity of depressive symptoms to monocyte-associated proinflammatory cytokines and chemokines in apparently healthy men. *Psychosom. Med.*, 65, 362-369.
222. **Suarez, E.C.**, Lewis, J.G., Krishnan, R.R., Young, K.H., 2004. Enhanced expression of cytokines and chemokines by blood monocytes to in vitro lipopolysaccharide stimulation are associated with hostility and severity of depressive symptoms in healthy women. *Psychoneuroendocrinology*, 29, 1119-1128.
223. **Swaab, D.F.**, Dubelaar, E.J., Hofman, M.A., Scherder, E.J., van Someren, E.J., Verver, R.W., 2002. Brain aging and Alzheimer's disease; use it or lose it. *Prog. Brain Res.*, 138, 143-373.
224. **Tada, T.**, 1997. The immune system as a supersystem. *Annu. Rev. Immunol.*, 15, 1-13.
225. **Tait, A.S.**, Butts, C.L., Sternberg, E.M., 2008. The role of glucocorticoids and progestins in inflammatory, autoimmune and infectious disease. *J. Leukoc. Biol.*, 84, 924-931.
226. **Takada, T.**, Yoshinari, N., Sugiishi, S., Kawase, H., Yamane, T., Noguchi, T., 2004. Effect of restraint stress on the progression of experimental periodontitis in rats. *J. Periodontol.*, 75, 306-315.

-
227. **Takeichi, O.**, Haber, J., Kawai, T., Smith, D.J., Moro, I., Taubman, M.A., 2000. Cytokine profiles of T-lymphocytes from gingival tissues with pathological pocketing. *J. Dent. Res.*, 79, 1548-1555.
228. **Tansey, M.G.**, McCoy, M.K., Frank-Cannon, T.C., 2007. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp. Neurol.*, 208, 1-25.
229. **Thunell, D.H.**, Tymkiw, K.D., Johnson, G.K., Joly, S., Burnell, K.K., Cavanaugh, J.E., Brogden, K.A., Guthmiller, J.M., 2010. A multiplex immunoassay demonstrates reductions in gingival crevicular fluid cytokines following initial periodontal therapy. *J. Periodont. Res.*, 45, 148-152.
230. **Toker, H.**, Poyraz, O., Eren, K., 2008. Effect of periodontal treatment on IL-1beta, IL-1ra, and IL-10 levels in gingival crevicular fluid in patients with aggressive periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, 35, 507-513.
231. **Tracey, K.J.**, 2002. The inflammatory reflex. *Nature*, 420, 853-859.
232. **Trinchieri, G.**, 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 3, 133-146.
233. **Tsai, C.C.**, Ku, C.H., Ho, Y.P., Ho, K.Y., Wu, Y.M., Hung, C.C., 2007. Changes in gingival crevicular fluid interleukin-4 and interferon-gamma in patients with chronic periodontitis before and after periodontal initial therapy. *Kaohsiung J. Med. Sci.*, 23, 1-7.
234. **Tsalikis, L.**, Parapanisiou, E., Bata-Kyrkou, A., Polymenides, Z., Konstantinidis, A., 2002. Crevicular fluid levels of interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta during experimental gingivitis in young and old adults. *J. Int. Acad. Periodontol.*, 4, 5-11.
235. **Utgaard, J.O.**, Jahnsen, F.L., Bakka, A., Brandtzeag, P., Haraldsen, G., 1998. Rapid secretion of prestored interleukin-8 from Weibel-Palade bodies of microvascular endothelial cells. *J. Exp. Med.*, 188, 1751-6.
236. **Vettore, M.V.**, Leao, A.T., Monteiro Da Silva, A.M., Quintanilha, R.S., Lamarca, G.A., 2003. The relationship of stress and anxiety with chronic periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, 30, 394-402.

-
237. **Viswanathan, K.**, Daugherty, C., Dhabhar, F.S., 2005. Stress as an endogenous adjuvant: augmentation of the immunization phase of cell-mediated immunity. *Internat. Immunol.*, 17, 1059-1069.
238. **Viswanathan, K.**, Dhabhar, F.S., 2005. Stress-induced enhancement of leukocyte trafficking into sites of surgery or immune activation. *PNAS*, 102, 5808-5813.
239. **Waschul, B.**, Herforth, A., Stiller-Winkler, R., Idel, H., Granrath, N., Deinzer, R., 2003. Effects of plaque, psychological stress and gender on crevicular IL-1 β and IL-1ra secretion. *J. Clin. Periodontol.*, 30, 238-248.
240. **Wilder, R.L.**, 1995. Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 13, 307-338.
241. **Willenberg, H.S.**, Asurudeen, I., Schebesta, K., Haase, M., Wess, B., Schinner, S., Raffel, A., Schott, M., Scherbaum, W.A., 2008. The endothelium secretes interleukin-6 (IL-6) and induces IL-6 and aldosterone generation by adrenocortical cells. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 116, S70-74.
242. **Wimmer G.**, Janda, M., Wieselmann-Penkner, K., Jakse, N., Polansky, R., Pertl, C., 2002. Coping with stress: its influence on periodontal disease. *J. Periodontol.*, 73, 1343-1351.
243. **Wimmer, G.**, Köhldorfer, G., Mischak, I., Lorenzoni, M., Kallus, K.W., 2005. Coping with stress: its influence on periodontal therapy. *J. Periodontol.*, 76, 90-98.
244. **Xie, K.**, 2001. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev*, 12, 375-391.
245. **Yamazaki, K.**, Nakajima, T., Kubota, Y., Gemmel, E., Seymour, G.J., Hara, K., 1997. Cytokine messenger RNA expression in chronic inflammatory periodontal disease. *Oral Microbiol. Immunol.*, 12, 281-287.
246. **Yang, E.V.**, Bane, C.M., MacCallum, R.C., Kiecolt-Glaser, J.K., Malarkey, W.B., Glaser, R., 2002. Stress-related modulation of matrix metalloproteinase expression. *J. Neuroimmunol.*, 133, 144-150.
247. **Yücel, O.O.**, Berker, E., Gariboglu, S., Otlu, H., 2008. Interleukin-11, interleukin-1beta, interleukin-12 and the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *Clin. Periodontol.*, 35, 365-370.

-
248. **Zhang, J.**, Dong, H., Kashket, S., Duncan, M.J., 1999. IL-8 degradation by *Porphyromonas gingivalis* proteases. *Microb. Pathog.*, 26, 275-280.
249. **Zhang, J.**, Kashket, S., Lingström, P., 2002. Evidence for the early onset of gingival inflammation following short-term plaque accumulation. *J. Clin. Periodontol.*, 29, 1082-1085.
250. **Zuh, Y.M.**, Webster, S.J., Flower, D., Woll, P.J., 2004. Interleukin-8/CXCL8 is a growth factor for human lung cancer cells. *Br. J. Cancer*, 91, 1970-1976.

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Giessen, 30.12.2009 _____

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigenpräsentierende Zelle
CD	engl.: cluster determinant
CG	chronische Gingivitis
CRP	C-reaktives Protein
EG	experimentelle Gingivitis
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
HHNA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierendrindenachse
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
MIF	Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor
MIP	Makrophagen-Entzündungs-Protein
NK	Natürliche Killerzelle
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
SF	Sulkus-Fluid
SP	Substanz P
TGF	Tumor-Wachstums-Faktor
TH-Zelle	T-Helferzelle
TNF	Tumor Nekrose Faktor
VAS	Visuelle Analogskalen
α -AR	alpa-Adrenozeptoren
β -AR	beta-Adrenozeptoren

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht den moderierenden Einfluss des Entzündungszustands (z. B. kurzzeitig bzw. akut vs. chronisch) auf die lokale immunologische Stressreaktion auf einen akuten psychischen Stressor. Es wird dabei ein Forschungsmodell aus der Zahnmedizin angewendet, welches erlaubt, lokale Entzündungsprozesse unter ethisch vertretbaren und unter ökologisch validen Bedingungen im Humanexperiment *in vivo* messwiederholt zu erfassen: die plaqueinduzierte Gingivitis. Es erfolgte ein systematischer Vergleich von zwei verschiedenen Entzündungszuständen (experimentelle Gingivitis vs. chronische Gingivitis) über einen Zeitraum von vier Wochen. Alle Studienteilnehmer wiesen an den zu untersuchenden Stellen eine Gingivitis auf (Einschlusskriterium). Die Gruppenzuordnung erfolgte randomisiert. Nach Herstellung gingivaler Entzündungsfreiheit unterließ die Gruppe „experimentelle Gingivitis“ für den Untersuchungszeitraum von vier Wochen jegliches Mundhygieneverhalten. Die Gruppe „chronische Gingivitis“ fuhr damit fort wie bisher.

Als Entzündungsparameter wurden in den durchgeführten Studien klinische Entzündungszeichen (über Papillen-Blutungs-Index und Plaque-Index) einer gingivalen Entzündung und zwei proinflammatorische Zytokine (Interleukin (IL)-1 β und IL-8) im Sulkus-Fluid erfasst. Erwartungsgemäß ergab der Vergleich klinische und immunologische Unterschiede. Dabei zeigte sich die chronische Gingivitis als ein relativ stabiler Zustand. Die wöchentlich erfassten Parameter wiesen im Gegensatz zur experimentellen Gingivitis keine signifikanten Schwankungen auf. Am Ende der vierwöchigen experimentellen Gingivitis unterschieden sich die Gruppen hinsichtlich Plaque sowie in den sulkulären Konzentrationen von IL-1 β und IL-8 mit geringeren IL-1 β - und höheren IL-8-Konzentrationen bei chronischer im Vergleich zu experimenteller Gingivitis.

Zur Überprüfung, ob der Entzündungszustand die immunologische Stressreaktion moderiert, wurde eine Stress vs. Redebedingung (öffentliche Rede vs. Ruhe) im Messwiederholungsdesign durchgeführt, die jeweilige Abfolge der beiden Bedingungen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen wurde dabei randomisiert und gegenbalanciert. Neben den sulkulären Zytokinen wurde das Speichelcortisol sowie die psychische Befindlichkeit der Probanden messwiederholt erfasst. Die Probanden zeigten eine deutliche psychische und endokrine Stressreaktion auf den akuten Laborstressor. Hinsichtlich der lokalen immunologischen Reaktion zeigten sich nach dem Stress signifikante Gruppen- und Zeitinteraktionen, die darauf hinweisen, dass die immunologische Stressreaktion moduliert wird und zwar in Abhängigkeit vom Entzündungszustand. Insbesondere bei chronischen gingivalen Entzündungsprozessen führte der hier angewandte Laborstressor zu einem signifikanten Anstieg der sulkulären Konzentrationen von IL-8, was ein proinflammatorisches Signal innerhalb pathologischem Entzündungsgeschehen darstellen könnte.

Mit der vorliegenden Arbeit wird somit erstmals an einem experimentellen Humanmodell *in vivo* gezeigt, dass der Entzündungszustand als Moderatorvariable der lokalen immunologischen Stressreaktion wirkt. Weiterhin lässt sich zeigen, dass akuter Stress beim Vorliegen einer chronischen Gingivitis eine verstärkte Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-8 in den Sulkus gingivalis bewirkt. Damit ist ein Weg aufgezeigt worden, wie Stress in das Entzündungsgeschehen eingreifen kann.

Summary

The present studies were objected to analyze in controlled experiments whether different inflammatory conditions modulate the local immunological stress response in a human model of local inflammation, i.e. plaque-associated gingivitis. Two local inflammatory conditions were compared, i.e. experimental gingivitis vs. chronic gingivitis over a period of four weeks. Subjects were all students and eligible for study participation when they showed clinical signs of plaque-associated gingivitis (plaque and bleeding response) in at least five of six papillae under study. When included in the study students were randomly assigned to either an experimental gingivitis group or a persistent, i.e. chronic gingivitis group. In the experimental gingivitis group gingival health had been established by a prophylactic intervention (plaque removal) at least 10 days prior to study onset. At the beginning of the experimental gingivitis period, students were instructed to refrain from any oral hygiene procedures for a period of four weeks. The chronic gingivitis group represented the common clinical condition of naturally occurring untreated plaque-associated gingivitis. This group continued with its oral health behaviour as usual.

The clinical symptoms of gingival inflammation (via Papillary-Bleeding-Index and Plaque-Index) as well as two proinflammatory cytokines (Interleukin (IL-)1 β and IL-8) in gingival crevicular fluid were measured weekly within this period. As expected the group comparison revealed significant differences with regard to clinical signs and cytokine concentrations. The chronic gingivitis turned out as a fairly stable condition. In contrast to the experimental gingivitis group the parameters did not show any significant variation over the four week period. After the experimental gingivitis period groups differed with regard to plaque and the crevicular concentrations of IL-1 β and IL-8 with higher IL-1 β concentrations and lower IL-8 concentrations in the experimental gingivitis group compared to chronic gingivitis.

In order to prove if immunological stress responses are modulated by different inflammatory conditions, e.g. acute vs. chronic, stress effects on experimental and chronic gingivitis were compared. Stress (public speech) vs. control condition was run in a crossover design. They were applied on two consecutive days in a randomized counterbalanced order. Crevicular fluid, saliva samples and mood were assessed repeatedly. Students showed significant psychological and endocrine stress responses to the acute stressor. With regard to cytokine responses I found significant interaction of group and time, showing that the immunological stress response indeed is modulated by the inflammatory state. Chronic gingivitis showed a stress induced increase of crevicular concentrations of IL-8, possibly indicative for a proinflammatory signal at sites of ongoing inflammation.

In conclusion the present studies show that subjects in different gingivitis condition are not comparable with respect to clinical and immunological parameters. It further shows that the local immunological stress response is modulated by the inflammatory condition and that immunological stress responses can be quite different under acute or chronic inflammatory conditions. To understand more about stress effects on inflammation it thus seems very important to take account of the present inflammatory condition.

Publikationen, die aus diesem Dissertationsvorhaben hervorgegangen sind:

Weik, U., Herforth, A., Kolb-Bachofen, V., Deinzer, R., 2008. Acute stress induces proinflammatory signaling at chronic inflammation sites. *Psychosom. Med.*, 70, 906-912.

Deinzer, R., Weik, U., Kolb-Bachofen, V., Herforth, A., 2007. Comparison of experimental gingivitis with persistent gingivitis: differences in clinical parameters and cytokine concentration. *J. Periodontal. Res.*, 42, 318-24.

Deskriptive Statistik Studie 2

Deskriptive Statistik Studie 2 IL-1 β (ng/ml)

Gingivitis	Geschlecht		N	Mittelwert	Standardabweichung
Exp. Ging.	männlich	vor Kontrollbedingung	6	24,214	17,933
		unmittelbar nach Ruhe	6	21,736	13,086
		45 Minuten nach Ruhe	6	9,884	6,356
		90 Minuten nach Ruhe	6	8,571	4,553
		vor Stress	6	25,512	13,649
		unmittelbar nach Stress	6	14,336	12,525
		45 Minuten nach Stress	6	10,052	7,113
		90 Minuten nach Stress	6	7,893	5,692
	weiblich	vor Kontrollbedingung	5	17,470	7,036
		unmittelbar nach Ruhe	5	12,792	4,518
		45 Minuten nach Ruhe	5	9,581	6,280
		90 Minuten nach Ruhe	5	5,876	2,508
		vor Stress	5	18,133	10,591
		unmittelbar nach Stress	5	11,422	5,957
45 Minuten nach Stress		5	7,360	4,418	
90 Minuten nach Stress		5	5,973	4,409	
Chron. Ging.	männlich	vor Kontrollbedingung	7	13,715	7,310
		unmittelbar nach Ruhe	7	12,147	4,960
		45 Minuten nach Ruhe	7	7,966	4,458
		90 Minuten nach Ruhe	7	8,096	4,849
		vor Stress	7	13,751	4,211
		unmittelbar nach Stress	7	10,419	3,248
		45 Minuten nach Stress	7	8,231	3,850
		90 Minuten nach Stress	7	8,176	4,416
	weiblich	vor Kontrollbedingung	6	13,416	5,577
		unmittelbar nach Ruhe	6	8,738	3,669
		45 Minuten nach Ruhe	6	7,006	1,538
		90 Minuten nach Ruhe	6	5,391	3,040
		vor Stress	6	11,528	2,900
		unmittelbar nach Stress	6	9,386	2,920
45 Minuten nach Stress		6	8,109	3,885	
90 Minuten nach Stress		6	6,959	6,045	

Deskriptive Statistik Studie 2 IL-8 (ng/ml)

Gingivitis	Geschlecht		N	Mittelwert	Standardabweichung
Exp. Ging.	männlich	vor Kontrollbedingung	6	56,208	33,033
		unmittelbar nach Ruhe	6	77,516	48,762
		45 Minuten nach Ruhe	6	88,544	57,000
		90 Minuten nach Ruhe	6	106,065	37,307
		vor Stress	6	78,561	27,024
		unmittelbar nach Stress	6	80,641	50,721
		45 Minuten nach Stress	6	82,604	55,778
		90 Minuten nach Stress	6	95,079	45,523
	weiblich	vor Kontrollbedingung	5	67,359	19,468
		unmittelbar nach Ruhe	5	52,983	16,301
		45 Minuten nach Ruhe	5	70,431	26,518
		90 Minuten nach Ruhe	5	75,588	18,881
		vor Stress	5	59,603	42,807
		unmittelbar nach Stress	5	57,785	13,502
Chron. Ging.	männlich	vor Kontrollbedingung	7	103,955	41,709
		unmittelbar nach Ruhe	7	100,605	43,307
		45 Minuten nach Ruhe	7	95,468	53,561
		90 Minuten nach Ruhe	7	105,566	55,492
		vor Stress	7	83,948	21,255
		unmittelbar nach Stress	7	126,619	58,790
		45 Minuten nach Stress	7	102,878	24,411
		90 Minuten nach Stress	7	117,457	37,224
	weiblich	vor Kontrollbedingung	6	115,683	130,590
		unmittelbar nach Ruhe	6	93,307	64,652
		45 Minuten nach Ruhe	6	95,672	54,600
		90 Minuten nach Ruhe	6	76,475	43,502
		vor Stress	6	100,446	71,920
		unmittelbar nach Stress	6	137,346	147,427
		45 Minuten nach Stress	6	118,389	84,013
		90 Minuten nach Stress	6	118,145	94,976

Deskriptive Statistik Studie 3

Deskriptive Statistik psych. Befindlichkeit (VAS) - (zusätzlich erhobene Probanden Studie 3)

Geschlecht	N	Mittelwert	Standardabweichung		
männlich angestrengt	Ruhe mzp1	7	2,4571	2,18240	
	mzp2	7	,3571	,21492	
	mzp3	7	1,7429	1,67616	
	mzp4	7	1,9000	1,98410	
	angestrengt Stress mzp1	7	3,6286	2,27648	
		mzp2	7	6,6000	1,49666
		mzp3	7	2,2000	1,64215
		mzp4	7	2,4714	2,24923
weiblich angestrengt	Ruhe mzp1	5	1,7800	1,31034	
	mzp2	5	,2400	,08944	
	mzp3	5	,6600	,97622	
	mzp4	5	,4200	,38987	
	angestrengt Stress mzp1	5	1,5200	1,16490	
		mzp2	5	6,5200	3,09225
		mzp3	5	1,0200	,55408
		mzp4	5	1,2400	1,08074

Deskriptive Statistik psych. Befindlichkeit (VAS) - (zusätzlich erhobene Probanden Studie 3)

Geschlecht	N	Mittelwert	Standardabweichung		
männlich gestresst	Ruhe mzp1	7	1,100	0,400	
	mzp2	7	0,571	0,774	
	mzp3	7	0,629	0,395	
	mzp4	7	0,614	0,348	
	gestresst Stress mzp1	7	2,143	1,580	
		mzp2	7	6,686	2,082
		mzp3	7	1,300	0,833
		mzp4	7	1,014	0,689
weiblich gestresst	Ruhe mzp1	5	1,260	0,971	
	mzp2	5	0,280	0,084	
	mzp3	5	0,660	0,654	
	mzp4	5	0,560	0,371	
	gestresst Stress mzp1	5	1,200	0,604	
		mzp2	5	6,320	2,485
		mzp3	5	1,780	2,110
		mzp4	5	0,680	0,444

Deskriptive Statistik Studie 3

Deskriptive Statistik Stimmung (VAS) - (zusätzlich erhobene Probanden Studie 3)

Geschlecht		N	Mittelwert	Standardabweichung
männlich	hilflos Ruhe mzp1	7	0,700	0,574
	mzp2	7	0,386	0,212
	mzp3	7	0,614	0,552
	mzp4	7	0,400	0,231
	hilflos Stress mzp1	7	1,529	0,890
	mzp2	7	5,157	3,452
	mzp3	7	0,957	0,447
	mzp4	7	0,486	0,334
weiblich	hilflos Ruhe mzp1	5	1,080	0,876
	mzp2	5	1,080	1,117
	mzp3	5	1,040	0,615
	mzp4	5	0,660	0,336
	hilflos Stress mzp1	5	1,600	2,528
	mzp2	5	5,240	3,518
	mzp3	5	2,080	1,985
	mzp4	5	1,020	0,581

Deskriptive Statistik Stimmung (VAS) - (zusätzlich erhobene Probanden Studie 3)

Geschlecht		N	Mittelwert	Standardabweichung
männlich	bedroht Ruhe mzp1	7	0,543	0,276
	mzp2	7	0,343	0,172
	mzp3	7	0,600	0,396
	mzp4	7	0,371	0,189
	bedroht Stress mzp1	7	0,386	0,241
	mzp2	7	2,314	1,877
	mzp3	7	0,543	0,387
	mzp4	7	0,286	0,107
weiblich	bedroht Ruhe mzp1	5	0,620	0,835
	mzp2	5	0,260	0,134
	mzp3	5	0,320	0,228
	mzp4	5	0,260	0,089
	bedroht Stress mzp1	5	0,400	0,158
	mzp2	5	1,560	1,422
	mzp3	5	1,460	2,150
	mzp4	5	0,380	0,164

Deskriptive Statistik Studie 3

Deskriptive Statistik Stimmung (VAS) - (zusätzlich erhobene Probanden Studie 3)

Geschlecht		N	Mittelwert	Standardabweichung
männlich	angespannt			
	Ruhe mzp1	7	1,557	1,550
	mzp2	7	0,657	0,793
	mzp3	7	1,143	1,628
	mzp4	7	0,857	0,516
	angespannt			
	Stress mzp1	7	2,571	2,308
	mzp2	7	7,329	1,499
	mzp3	7	1,857	0,842
	mzp4	7	1,443	1,147
weiblich	angespannt			
	Ruhe mzp1	5	1,460	1,043
	mzp2	5	0,600	0,316
	mzp3	5	0,700	0,707
	mzp4	5	0,820	0,545
	Angespannt			
	Stress mzp1	5	2,640	2,350
	mzp2	5	7,480	1,789
	mzp3	5	2,540	2,906
	mzp4	5	1,760	1,078

Geschlecht		N	Mittelwert	Standardabweichung
männlich	ausgeliefert			
	Ruhe mzp1	7	1,000	1,514
	mzp2	7	0,457	0,387
	mzp3	7	0,871	1,224
	mzp4	7	0,343	0,181
	ausgeliefert			
	Stress mzp1	7	1,171	0,665
	mzp2	7	3,871	2,813
	mzp3	7	0,643	0,331
	mzp4	7	0,457	0,326
weiblich	ausgeliefert			
	Ruhe mzp1	5	2,700	2,587
	mzp2	5	0,500	0,406
	mzp3	5	1,720	1,226
	mzp4	5	1,220	1,163
	Ausgeliefert			
	Stress mzp1	5	1,620	1,766
	mzp2	5	4,500	0,596
	mzp3	5	2,240	1,734
	mzp4	5	1,960	1,644

Deskriptive Statistik Studie 3

Deskriptive Statistik Stimmung (VAS) - (zusätzlich erhobene Probanden Studie 3)

Geschlecht	N	Mittelwert	Standardabweichung		
männlich verärgert	Ruhe mzp1	7	0,486	0,273	
	mzp2	7	0,329	0,250	
	mzp3	7	0,457	0,282	
	mzp4	7	0,457	0,237	
	verärgert	Stress mzp1	7	0,486	0,297
		mzp2	7	1,543	1,586
		mzp3	7	0,486	0,273
		mzp4	7	0,443	0,315
	weiblich Verärgert	Ruhe mzp1	5	0,260	0,152
		mzp2	5	0,300	0,158
		mzp3	5	0,260	0,241
		mzp4	5	0,280	0,192
verärgert		Stress mzp1	5	0,240	0,134
		mzp2	5	2,920	2,308
		mzp3	5	1,380	1,556
		mzp4	5	0,300	0,187

Geschlecht	N	Mittelwert	Standardabweichung		
männlich verunsichert	Ruhe mzp1	7	0,914	0,949	
	mzp2	7	0,829	1,006	
	mzp3	7	0,414	0,195	
	mzp4	7	0,429	0,160	
	verunsichert	Stress mzp1	7	1,214	1,084
		mzp2	7	5,971	3,421
		mzp3	7	0,514	0,339
		mzp4	7	0,571	0,407
	weiblich verunsichert	Ruhe mzp1	5	1,180	0,817
		mzp2	5	0,480	0,383
		mzp3	5	0,400	0,308
		mzp4	5	0,520	0,390
verunsichert		Stress mzp1	5	2,400	2,699
		mzp2	5	5,200	3,391
		mzp3	5	1,540	1,903
		mzp4	5	0,600	0,418

Deskriptive Statistik Cortisol (nmol/l) - (zusätzlich erhobene Probanden Studie 3)

Geschlecht	N	Mittelwert	Standardabweichung	
männlich	R_1	7	10,646	6,467
	R_2	7	10,509	8,630
	R_3	7	10,708	9,885
	R_4	7	9,003	5,294
	R_5	7	10,122	8,658
	R_6	7	7,598	2,880
	R_7	7	7,930	3,064
	R_8	7	7,843	4,366
	R_9	7	5,233	2,476
	R_10	7	6,984	3,429
	S_1	7	11,332	10,267
	S_2	7	7,197	6,256
	S_3	7	15,447	14,415
	S_4	7	28,230	18,744
	S_5	7	20,052	7,996
	S_6	7	13,223	6,754
	S_7	7	12,856	5,823
	S_8	7	12,254	7,921
	S_9	7	8,550	3,490
	S_10	7	8,662	3,230
weiblich	R_1	5	13,455	9,498
	R_2	5	8,952	4,718
	R_3	5	8,338	4,305
	R_4	5	9,060	4,425
	R_5	5	8,170	1,737
	R_6	5	5,370	0,829
	R_7	5	6,359	1,701
	R_8	5	5,513	1,153
	R_9	5	3,597	1,052
	R_10	5	4,210	0,950
	S_1	5	10,009	4,602
	S_2	5	7,814	3,228
	S_3	5	14,261	5,232
	S_4	5	21,963	7,439
	S_5	5	19,528	5,153
	S_6	5	13,039	4,360
	S_7	5	11,546	1,144
	S_8	5	10,894	1,208
	S_9	5	6,629	1,907
	S_10	5	7,908	0,994

Deskriptive Statistik Studie 3

Deskriptive Statistik IL-1 β (ng/ml) – Studie 3 (chronische Gingivitis)

Geschlecht		N	Mittelwert	Standardabweichung
männlich	vor Kontrollbedingung	14	14,624	6,478
	unmittelbar nach Ruhe	14	13,339	5,505
	45 Minuten nach Ruhe	14	8,498	3,883
	90 Minuten nach Ruhe	14	7,783	3,752
	vor Stress	14	13,973	5,980
	unmittelbar nach Stress	14	11,948	4,701
	45 Minuten nach Stress	14	8,419	3,261
	90 Minuten nach Stress	14	7,654	3,861
weiblich	vor Kontrollbedingung	11	18,370	10,581
	unmittelbar nach Ruhe	11	12,745	7,840
	45 Minuten nach Ruhe	11	9,524	6,086
	90 Minuten nach Ruhe	11	9,087	7,164
	vor Stress	11	12,436	3,196
	unmittelbar nach Stress	11	10,297	2,877
	45 Minuten nach Stress	11	8,652	3,544
	90 Minuten nach Stress	11	7,197	4,525

Deskriptive Statistik IL-8 (ng/ml) – Studie 3 (chronische Gingivitis)

geschlecht		N	Mittelwert	Standardabweichung
männlich	vor Kontrollbedingung	14	101,199	61,328
	unmittelbar nach Ruhe	14	102,892	36,668
	45 Minuten nach Ruhe	14	93,831	49,166
	90 Minuten nach Ruhe	14	111,775	62,315
	vor Stress	14	95,051	46,130
	unmittelbar nach Stress	14	117,861	50,291
	45 Minuten nach Stress	14	105,193	46,155
	90 Minuten nach Stress	14	109,561	45,528
weiblich	vor Kontrollbedingung	11	130,054	113,344
	unmittelbar nach Ruhe	11	102,601	74,455
	45 Minuten nach Ruhe	11	104,939	49,470
	90 Minuten nach Ruhe	11	93,760	40,862
	vor Stress	11	108,514	53,648
	unmittelbar nach Stress	11	136,433	110,815
	45 Minuten nach Stress	11	121,179	64,424
	90 Minuten nach Stress	11	126,936	77,953