

Aus der Poliklinik für Kieferorthopädie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchung parodontaler Markerkeime und aMMP-8 während der ersten
sechs Monate der kieferorthopädischen Schienentherapie (Invisalign® Teen) bei
Jugendlichen im Zusammenhang mit IL-1-Polymorphismus

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Eva Elisabeth Wiltrud Peuckert
aus Frankfurt am Main

Mainz, 2019

Tag der Promotion: 30. Juni 2020

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis.....	2
Tabellenverzeichnis.....	4
1 Einleitung.....	5
2 Literaturdiskussion.....	7
2.1 Die Aligner-Therapie mit dem Invisalign®-System.....	7
2.2 Aligner-Therapie bei Jugendlichen (Invisalign® Teen).....	12
2.3 Ätiologie parodontaler Erkrankungen	14
2.4 Parodontale Markerkeime	16
2.5 Aktive Matrixmetalloproteinase-8 (aMMP-8)	18
2.6 IL-1-Polymorphismus	19
2.7 Parodontale Erkrankungen bei Jugendlichen.....	21
2.8 Parodontale Veränderungen während der Aligner-Therapie (Invisalign®)....	22
3 Material und Methoden	25
3.1 Patientenauswahl.....	25
3.2 Studienablauf	26
3.3 Untersuchungsablauf und Probennahme	27
3.4 Laboranalysen.....	31
3.4.1 Analyse der Markerkeime	31
3.4.2 Test auf aMMP-8	32
3.4.3 Untersuchung des IL-1-Polymorphismus.....	33
3.5 Darstellung der Laborergebnisse	36
3.6 Statistische Auswertung	37
4 Ergebnisse.....	40
4.1 Termintreue.....	40
4.2 Untersuchung der Genotypen	41
4.3 Auswertung der Markerkeime	43
4.4 Auswertung aMMP-8.....	51
4.4.1 Unterscheidung nach Visiten	51
4.4.2 Unterscheidung zwischen OK und UK.....	52
4.4.3 Unterscheidung nach Geschlecht.....	54
4.5 Zusammenhang von aMMP-8 und IL-1-Polymorphismus	55

4.6	Bewertung der tatsächlichen Entzündungsneigung	57
5	Diskussion	59
5.1	Methodendiskussion.....	59
5.1.1	Patienten	59
5.1.2	Studienablauf.....	59
5.1.3	Untersuchungsmethoden.....	61
5.2	Ergebnisdiskussion	63
5.2.1	Markerkeime	63
5.2.2	aMMP-8	66
5.2.3	Zusammenhang zwischen Entzündungsneigung und IL-1- Polymorphismus	68
6	Zusammenfassung	71
7	Literaturverzeichnis.....	73
	Anhang.....	84
	Danksagung	86

Abkürzungsverzeichnis

OK = Oberkiefer

UK = Unterkiefer

MBA = Multibracketapparaturen (MB = Multibracket)

GCF = Gingival Crevicular Fluid (Sulkusflüssigkeit)

aMMP-8 = aktive Matrix-Metalloproteinase-8 (Kollagenase 2)

TIMP = tissue inhibitors of matrix metalloproteinase (gewebsständiger Inhibitor der MMPs)

KbE = koloniebildende Einheit

PCR = Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

A.a./ *A. actinomycetemcomitans* = *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa-Komplex)

P.g./ *P. gingivalis* = *Porphyromonas gingivalis*

T.f./ *T. forsythia* = *Tannerella forsythia*

T.d./ *T. denticola* = *Treponema denticola*

P.i./ *P. intermedia* = *Prevotella intermedia*

P.m./ *P. micra* = *Parvimonas micra*

F.s./ *F. spp.* = *Fusobacterium spp.*

C.r./ *C. rectus* = *Campylobacter rectus*

E.n./ *E. nodatum* = *Eubacterium nodatum*

E.c./ *E. corrodens* = *Eikenella corrodens*

C.s./ *C. spp.* = *Capnocytophaga spp.*

Abb. = Abbildung

Tab. = Tabelle

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Patientenbeispiel für eingesetzte Invisalign®-Schienen	7
Abbildung 2: Beispiele für Ansichtsmöglichkeiten im ClinCheck (Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Dr. T. Drechsler)	8
Abbildung 3: Beispiel für Durchbruchskompensatoren (Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Dr. T. Drechsler).....	13
Abbildung 4: Invisalign® Teen-Schiene mit blauem Indikatorpunkt zur besseren Überprüfung des Tragezeitverhaltens des Patienten (Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Dr. T. Drechsler).....	13
Abbildung 5: Übersicht der Ramfjord-Zähne, die zur Probennahme gewählt wurden (Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Dr. T. Drechsler).....	28
Abbildung 6: Probennahme mit Papierspitzen im mesialen Approximalraum (Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Dr. T. Drechsler)	28
Abbildung 7: Probennahme mit Papierstreifen im distalen Approximalraum (Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Dr. T. Drechsler)	29
Abbildung 8: Steriles Wattestäbchen, Probenröhrchen und Schutztüte für Gentest des IL-1-Polymorphismus (Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Dr. T. Drechsler).....	29
Abbildung 9: Gesammelte Poolproben getrennt nach Untersuchung auf Markerkeime und aMMP-8 sowie jeweils OK und UK in Transportbox mit Schutztüte (Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Dr. T. Drechsler)	30
Abbildung 10: Punktediagramm zur Darstellung der Termintreue: tatsächliche Termine der Visiten der einzelnen Patienten (Punkte) und geplante Termine (Linien); blau = V1, grün = V2, gelb = V3, rot = V4.....	40
Abbildung 11: Balkendiagramm der Anzahl männlicher und weiblicher Patienten mit Genotyp 1 bis 4	42

Abbildung 12: Balkendiagramm der Konzentrationen der einzelnen Markerkeime unterteilt nach OK und UK sowie nach Visiten 1 bis 4.....	44
Abbildung 13: Sankey-Diagramm der Veränderungen der Konzentrationen von <i>Parvimonas micra</i> im OK im Verlauf von Visite 1 bis 4 in Prozent.....	45
Abbildung 14: Sankey-Diagramm der Veränderungen der Konzentrationen von <i>Parvimonas micra</i> im UK im Verlauf von Visite 1 bis 4 in Prozent.....	45
Abbildung 15: Sankey-Diagramm der Veränderungen der Konzentrationen von <i>Campylobacter rectus</i> im OK im Verlauf von Visite 1 bis 4 in Prozent	46
Abbildung 16: Sankey-Diagramm der Veränderungen der Konzentrationen von <i>Campylobacter rectus</i> im UK im Verlauf von Visite 1 bis 4 in Prozent.....	46
Abbildung 17: Sankey-Diagramm der Veränderungen der Konzentrationen von <i>Eikenella corrodens</i> im OK im Verlauf von Visite 1 bis 4 in Prozent.....	47
Abbildung 18: Sankey-Diagramm der Veränderungen der Konzentrationen von <i>Eikenella corrodens</i> im UK im Verlauf von Visite 1 bis 4 in Prozent.....	47
Abbildung 19: Sankey-Diagramm der Veränderungen der Konzentrationen von <i>Capnocytophaga spp.</i> im OK im Verlauf von Visite 1 bis 4 in Prozent	48
Abbildung 20: Sankey-Diagramm der Veränderungen der Konzentrationen von <i>Capnocytophaga spp.</i> im UK im Verlauf von Visite 1 bis 4 in Prozent.....	48
Abbildung 21: Sankey-Diagramm der Veränderungen der Konzentrationen von <i>Fusobacterium spp.</i> im OK im Verlauf von Visite 1 bis 4 in Prozent.....	49
Abbildung 22: Sankey-Diagramm der Veränderungen der Konzentrationen von <i>Fusobacterium spp.</i> im UK im Verlauf von Visite 1 bis 4 in Prozent	50
Abbildung 23: Boxplots aller aMMP-8-Daten (Mittelwert von OK und UK) unterschieden nach den Visiten 1 bis 4.....	51
Abbildung 24: Boxplot der aMMP-8-Konzentrationen [ng/ml] unterteilt nach OK und UK sowie nach Visiten 1 bis 4, die zusätzliche Markierung innerhalb der "Box" stellt das arithmetische Mittel dar.....	53

Abbildung 25: Boxplot der aMMP-8-Werte (Mittelwert von OK und UK) unterschieden nach den Genotypen 1 bis 4 bei Visite 1	55
Abbildung 26: Boxplot der aMMP-8-Werte (Mittelwert von OK und UK) unterschieden nach den Genotypen 1 bis 4 bei Visite 4	56
Abbildung 27: Boxplot der aMMP-8-Werte (Mittelwert von OK und UK) unterschieden nach den Genotypen 1 bis 4 bei den Visiten 1 und 4 mit Markierungen der Grenzwerte von 8 ng/ml (gelb) und 20 ng/ml (rot)	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zeitlicher Ablauf der Studie.....	27
Tabelle 2: Übersicht der entnommenen Proben	30
Tabelle 3: Übersicht der aMMP-8-Konzentrationen in ng/ml im Vergleich nach Geschlecht bei Visiten 1 bis 4	54
Tabelle 4: Übersicht der aMMP-8-Konzentrationen im Vergleich von V1 und V4 für die Genotypen 1 bis 4	57
Tabelle 5: Übersichtstabelle der Konzentrationen der 11 Parodontitis assoziierten Markerkeime unterteilt nach OK und UK sowie Visiten 1 bis 4.....	84

1 Einleitung

Ästhetik und Lebensqualität sind immer wichtiger werdende Faktoren in der modernen Zahnmedizin. Auch während kieferorthopädischer Behandlungen möchten Erwachsene wie auch jugendliche Patienten nicht mehr optisch oder funktionell eingeschränkt werden [1-5]. Herkömmliche Behandlungsmethoden wie festsitzende Multibracketapparaturen (MBA) werden häufig als unattraktiv empfunden und daher auch von Jugendlichen abgelehnt [1, 6, 7]. Das 1997 eingeführte Invisalign®-System (Fa. Align Technology, Santa Clara, Kalifornien, USA) bietet die Möglichkeit einer kieferorthopädischen Behandlung mit durchsichtigen, herausnehmbaren Kunststoffschienen, sogenannten Alignern [8, 9]. Neben festsitzenden lingualen Apparaturen ist die Aligner-Therapie mittlerweile eine etablierte, ästhetische und nahezu unsichtbare kieferorthopädische Behandlungsalternative zu den konventionellen labialen Multibracketapparaturen [10]. Die Behandlung mit Alignern (Invisalign®) wird als die am wenigsten invasive Methode und als sehr diskret empfunden [11].

Nachdem die Aligner-Behandlung mit Invisalign® zunächst nur bei erwachsenen Patienten angewendet werden konnte [12], gibt es seit 2008 auch die Möglichkeit, schon Jugendliche im noch nicht abgeschlossenen Zahnwechsel mit dem auf sie angepassten Invisalign® Teen-System zu behandeln [6, 13].

Bisherige Studien haben mehrere Aspekte der Behandlung mit Alignern, insbesondere mit dem Invisalign®- bzw. Invisalign® Teen-System, untersucht. Die optimale Tragedauer der Schienen ist 22 Stunden am Tag. Da in dieser Zeit die gesamten Zähne sowie auch Bereiche des Zahnfleisches durch diese bedeckt sind, besteht der Verdacht, dass dies zu parodontalen Entzündungen führen könnte [6, 14-17].

Auch wenn chronische parodontale Erkrankungen bei Jugendlichen selten sind [18], können trotzdem hormonelle Veränderungen und mangelnde Mundhygiene zu verschiedenen Formen der Gingivitis und Parodontitis führen [19, 20]. Gerade im jugendlichen Alter, in dem sich auf Grund der zweiten Wechselgebissphase kieferorthopädische Behandlungen anbieten [21], ist eine frühzeitige Diagnostik wichtig, um bereits beginnende Entzündungen zu erkennen [20].

In früheren Studien wurden im Wesentlichen traditionelle klinische Indizes zur Diagnostik verwendet. Dabei wurde festgestellt, dass die Behandlung mit Alignern (Invisalign®- und Invisalign® Teen) zu keiner vermehrten Blutung führte [6, 14, 16, 22, 23]. Da aber solche Erscheinungen erst auftreten, wenn schon eine akute Entzündung besteht bzw. wenn schon destruktive Schädigungen entstanden sind [24, 25], ist noch zu prüfen, ob schon in einem frühen Stadium entzündliche Veränderungen feststellbar sind.

Parodontale Markerkeime wurden bisher bei der Behandlung mit Alignern nur vereinzelt als Verursacher von parodontalen Entzündungen untersucht [14, 22, 26]. Die Analyse der Konzentration des körpereigenen Enzyms aMMP-8 ist eine etablierte Methode, um frühzeitig eine Wirtsreaktion auf entzündliches Geschehen festzustellen [24, 25, 27, 28]. Diese Methode wurde allerdings in Untersuchungen zu Aligner-Behandlungen (Invisalign®- und Invisalign® Teen) bisher nicht angewandt, so dass auch nichts über ihre Aussagekraft in diesem Zusammenhang bekannt ist.

Ob eine parodontale Entzündung entsteht, wie schnell sie sich entwickelt und wie stark sie tatsächlich ausfällt, hängt von verschiedenen Faktoren ab [29, 30]. Ein wichtiger Faktor ist dabei die körpereigene Reaktion auf entzündliche Geschehen. Diese wird durch die genetische Prädisposition, dargestellt durch vom IL-1-Polymorphismus abgeleitete Genotypen, beeinflusst [30-32].

Daher ist das Ziel dieser Studie, die parodontale Entzündungsneigung sowie das individuelle Entzündungsrisiko anhand der Analyse aller 11 Parodontitis-assoziierten Markerkeime sowie der aMMP-8-Konzentration in der Sulkusflüssigkeit während der ersten sechs Monate einer Aligner-Behandlung (Invisalign® Teen) zu untersuchen. Dabei wird auch der genetische Faktor des IL-1-Polymorphismus berücksichtigt.

2 Literaturdiskussion

2.1 Die Aligner-Therapie mit dem Invisalign®-System

Im Jahr 1997 wurde das Invisalign®-System von Align Technology (Santa Clara, Kalifornien, USA) auf dem US-amerikanischen Markt eingeführt. Auf dem deutschen Markt ist es seit Februar 2001 verfügbar [8]. Bei dieser kieferorthopädischen Behandlungsmethode werden Zahnfehlstellungen durch eine Reihe durchsichtiger, herausnehmbarer Kunststoffschienen (Abb. 1), die sogenannten Aligner, korrigiert [9].



Abbildung 1: Patientenbeispiel für eingesetzte Invisalign®-Schienen

Bereits seit 1945 gibt es das Konzept verschiedener herausnehmbarer Kunststoffschienen ohne Bänder, Brackets oder Drähte [33]. Viele verschiedene Firmen haben seitdem das Konzept der sogenannten Clear Aligner aufgegriffen. Im Jahre 2017 gab es mindestens 27 verschiedene Produkte auf dem Markt weltweit. Schon 2018 ging man von unzähligen mehr aus, da immer mehr Firmen und Start-up-Unternehmen existieren, die Aligner vermarkten. Das Invisalign®-System vereint die Prinzipien der vorhergehenden Forschungen und ist momentan das am weitesten entwickelte [34, 35]. Das Besondere ist die digitale, internetbasierte Planungs- und Herstellungstechnik mit CAD-CAM-Verfahren (Computer-aided design/ Computer-aided manufacturing), wodurch sich dieses System grundlegend von allen anderen unterscheidet [8]. Die Ist-Situation des Patienten wird durch einen Intraoralscan der Zähne bzw. durch eine A-Silikon-Abformung und anschließenden Scan des

entstandenen Modells digitalisiert. An virtuellen dreidimensionalen Modellen werden nun von Zahntechnikern der Firma Align Technology die einzelnen Zähne in die ideale Position ausgerichtet (Soll-Situation). Die Therapie wird in Einzelschritte (Behandlungsphasen) unterteilt und es wird dementsprechend eine Serie von Schienen (Aligner) berechnet. Die Anzahl der Schienen (Aligner-Paare) variiert je nach Schweregrad der Fehlstellung und Komplexität der Zahnbewegungen. Abschließend kann der behandelnde Kieferorthopäde in einem sogenannten ClinCheck noch einmal die geplante Behandlung detailliert kontrollieren und gegebenenfalls mehrfach korrigieren. Der ClinCheck (Abb. 2) veranschaulicht digital den Ablauf der Behandlung sowie das Therapieziel und kann so auch visuell dem Patienten gezeigt werden. Hat der behandelnde Kieferorthopäde die endgültige Therapieplanung abgeschlossen, werden aus den digitalen Daten nun durch ein Stereolithographieverfahren die individuellen Modelle und auf diesen die Schienen (Polyurethan-Schienen) von der Firma Align Technology hergestellt, beschriftet und anschließend an den behandelnden Kieferorthopäden versendet [9, 36, 37].



Abbildung 2: Beispiele für Ansichtsmöglichkeiten im ClinCheck (Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Dr. T. Drechsler)

Die Aligner werden je nach Behandlungsplanung für eine oder für zwei Wochen von den Patienten getragen und dann durch das nächstfolgende Paar ersetzt. Dabei sind sie 22 Stunden am Tag zu tragen und nur zum Essen und für die häusliche Mundhygiene herauszunehmen [36, 37]. Pro Aligner-Paar kann eine Zahnbewegung von maximal 0,25mm bis 0,3mm erreicht werden [38].

Durch die benutzerfreundliche Technologie hat sich das Invisalign®-System schnell im klinischen Praxisalltag etabliert. Die Firma Align Technology verzeichnete im November 2017 den 5-millionsten Patienten und im November 2019 bereits 7,2 Millionen behandelte Patienten weltweit [1, 13, 39].

Grundsätzlich wird zwischen verschiedenen Indikationsbereichen unterschieden. Zum einen wurde von der Deutschen Gesellschaft für Kieferorthopädie (DGKFO) in ihrer Stellungnahme von 2010 ein Hauptindikationsbereich definiert, der dentoalveoläre Korrekturen bei moderatem frontalen Eng- und Lückenstand, Pro- und Retrusion der Front und geringe In- und Extrusion bei stabiler neutraler Interkuspitation umfasst. Für Extrusionsbewegungen, Derotationen (v.a. von Eckzähnen und Prämolaren), Lückenschluss nach Prämolarenextraktion und Zahnretention sind Aligner nur bedingt geeignet [37]. Bei mittelschweren und schwierigen Bewegungen wie vertikalen, rotatorischen und translatorischen Zahnbewegungen müssen zusätzliche Hilfsmittel in Form adhäsiv an den Zähnen befestigter Verankerungselemente verwendet werden. Diese so genannten Attachments und Knöpfchen werden bei fast jeder Invisalign®-Behandlung individuell im ClinCheck geplant und variieren in Form, Größe und Position [36]. Auch Kombinationen mit Gummizügen oder festsitzenden Teilapparaturen sind möglich [36, 37]. Diese Hilfsmittel werden häufig benötigt, um zielgenaue Zahnbewegungen durchführen zu können [40].

Für eine durchgängig „unsichtbare“ Behandlung gibt es auch die Möglichkeit, Lingual- und Aligner-Technik zu kombinieren. Die beiden Systeme lassen sich entweder nacheinander oder sogar gleichzeitig innerhalb eines Kiefers kombinieren [11]. Mittlerweile hat sich das Indikationsspektrum sehr erweitert. Laut Gu et al. hat sich das Invisalign®-System in der Kieferorthopädie als wissenschaftlich evaluierte Technik neben den konventionellen Multibracketapparaturen auch für komplexe Situationen etabliert [41]. Die Firma Align Technology entwickelt das Invisalign®-System immer weiter und erweitert so stetig den Indikationsbereich. Somit kann auch

bei komplexen Behandlungen immer mehr auch auf festsitzende Komponenten verzichtet werden [11]. Auch die DGKFO gab in Ihrer Stellungnahme von 2010 an, dass keine Kontraindikationen formuliert werden können. Durch die Vielfalt der Behandlungsmöglichkeiten ist es aber besonders wichtig, dass nur erfahrene Behandler, die das gesamte kieferorthopädische Spektrum beherrschen, die Aligner-Methode anwenden [37].

Viele bisherige Studien haben sich mit dem direkten Vergleich von Alignern (Invisalign®) mit herkömmlichen festsitzenden Multibracketapparaturen bzw. lingualen Brackets beschäftigt. Dabei wurden verschiedene kieferorthopädische, aber auch andere Aspekte wie Lebensqualität und Mundgesundheit während der Behandlungen untersucht [2, 3, 5, 11, 15-17, 23, 36-38, 42-48].

Ein wichtiger Faktor ist die Intensität und Dauer von Schmerzen, da dies durch die Zahnbewegung ein typischer Effekt während kieferorthopädischer Behandlungen ist [49, 50]. Mehrere Studien zeigten, dass Patienten während der Behandlung mit Alignern weniger und kürzer Schmerzen empfanden als mit festsitzenden Apparaturen [42, 43, 51]. Auch der Konsum von Schmerzmitteln war bei den Aligner-Patienten geringer [42, 44]. Es wurde vermutet, dass dies vor allem daran lag, dass die Aligner herausnehmbar sind und im Allgemeinen als angenehmer empfunden wurden als festsitzende Apparaturen [45, 51].

Sergl et al. stellten fest, dass die Akzeptanz der Apparatur sowie der Behandlung und auch die Mitarbeit des Patienten im direkten Zusammenhang mit der Stärke der Beschwerden standen [51]. Auch andere Studien zeigten, dass Schmerzen durch kieferorthopädische Behandlungen Einfluss auf die Lebensqualität und die tägliche Aktivität hatten und aus diesem Grund viele Patienten die Behandlung mit Alignern bevorzugten [43, 52]. Verschiedene Studien zeigten, dass die Lebensqualität bei der Aligner-Behandlung sehr wenig beeinflusst wurde und sie deutlich besser bewertet wurden, als bei der Behandlung mit festsitzenden Apparaturen [2, 15, 17, 44, 45].

Ein Hauptfaktor ist die ästhetische Überlegenheit der Aligner gegenüber konventionellen Multibracketapparaturen. Auch wenn allgemein eine kieferorthopädische Behandlung gesellschaftlich akzeptiert wird, schränken konventionelle vestibulär angebrachte Brackets aus Metall wie auch aus Keramik die Attraktivität des Patienten ein [46]. Die Ästhetik ist für manche Patienten während

einer Behandlung genauso wichtig wie die Faktoren Komfort, Kosten und Länge der Behandlung [3]. Von vielen Patienten wird sogar eine Behandlung mit sichtbaren Apparaturen strikt abgelehnt [1]. Aligner werden dagegen als sehr ästhetisch und unauffällig empfunden und eignen sich daher auch besonders für Personen des öffentlichen Lebens [17, 37, 44, 47]. Dabei spielt auch die schnelle Gewöhnung hinsichtlich der Phonetik eine entscheidende Rolle. Im Gegensatz zu lingualen Apparaturen sind Patienten mit Alignern im Sprechen deutlich weniger eingeschränkt und gewöhnen sich viel schneller an ihre Behandlung [45]. Orale Symptome wie Zungenraumeinengung, Schleimhautirritationen, Verletzungen an Lippen, Zunge oder Wangen und Schluckbeschwerden traten bei Alignern im Vergleich zu vestibulären oder lingualen Brackets deutlich seltener auf [3, 45].

Auch das Essen ist für Aligner-Patienten deutlich leichter und angenehmer, da sie ihre Schienen herausnehmen können. Patienten mit festsitzenden kieferorthopädischen Apparaturen ist dies natürlich nicht möglich und sie sind zusätzlich durch vermehrte Essenanlagerungen eingeschränkt [3, 15, 17]. Auch die häusliche Mundhygiene ist dadurch bei der Aligner-Therapie deutlich leichter und schneller durchzuführen und uneingeschränkt möglich [17, 37, 48]. Durch Brackets (vestibulär wie lingual) und zusätzliche Komponenten der festsitzenden kieferorthopädischen Apparaturen (wie Bänder, Drähte etc.) stellt die Mundhygiene eine echte Herausforderung dar, sie ist erschwert und erfordert deutlich mehr Zeit [16, 17, 23].

Durch den Vorteil des Herausnehmens der Aligner ergibt sich aber auch ein großer Nachteil. Der Erfolg der Behandlung ist direkt abhängig von der Mitarbeit des Patienten [5, 11, 36]. Kommt es während der Behandlung zu Komplikationen, so dass die folgenden Schienen nicht mehr verwendet werden können, muss die gesamte restliche Behandlung neu geplant und müssen neue zusätzliche Aligner hergestellt werden. Dies ist vor allem mit einem hohen Zeitaufwand verbunden [37, 38, 47]. Auch eine restaurative Zahnbehandlung, die die Form eines Zahnes verändert, ist während der Behandlung ohne Planung zusätzlicher neuer Aligner nicht möglich und muss am besten vor Behandlungsbeginn durchgeführt werden [47]. Im Vergleich zu vielen anderen Behandlungsmethoden ist eine Aligner-Behandlung kostenintensiv und mit hohem technischen und biomechanischen Planungsaufwand verbunden [3, 37].

2.2 Aligner-Therapie bei Jugendlichen (Invisalign® Teen)

Als Richtlinien für den optimalen Zeitpunkt einer kieferorthopädischen Behandlung wurden in der Stellungnahme der DGKFO von 2010 von Kahl-Nieke genannt, dass das Wachstum und der Zahnwechsel für die Therapie genutzt werden und möglichst geringe Belastungen für Patient und Umfeld durch eine Behandlung entstehen sollten. Besonders die zweite Phase des Zahnwechsels im jugendlichen Alter bietet sich für eine erfolgreiche Behandlung an [21]. Die zuvor als Therapie der Wahl angewendete Behandlung mit Brackets wird zunehmend auch schon von Jugendlichen aus ästhetischen und funktionellen Gründen abgelehnt und es werden Aligner bevorzugt [4, 6, 7, 53-55].

Zu Beginn der Einführung des Invisalign®-Systems galten als Voraussetzungen für eine Behandlung, dass der Kiefer ausgewachsen und alle bleibenden Zähne vollständig durchgebrochen sein mussten. Dadurch konnten nur erwachsene Patienten oder Jugendliche mit vollständiger Dentition mit Alignern behandelt werden [12, 56]. Align Technology führte daraufhin 2008 „Invisalign® Teen“ ein. Bis November 2019 wurden schon über 1,7 Millionen Patienten mit Invisalign® Teen behandelt [13, 39]. Dieses System ist auf die individuellen Bedürfnisse dieser Altersgruppe abgestimmt [57]. Um den noch durchzubrechenden Eckzähnen, Prämolaren und zweiten Molaren genügend Platz bereit zu halten, können so genannte Durchbruchkompensatoren (Abb. 3) eingeplant und genutzt werden, wodurch eine Behandlung schon im Zahnwechsel möglich ist [6, 55, 57].



Abbildung 3: Beispiel für Durchbruchskompensatoren (Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Dr. T. Drechsler)

Gehen Schienen verloren oder werden verlegt, sind von vornherein sechs Ersatz-Aligner mit inbegriffen [57]. Da sich in früheren Studien zeigte, dass Jugendliche bei herausnehmbaren Zahnspangen oft die verordnete Tragezeit nicht akzeptierten und umsetzten, waren Behandler und Eltern besorgt, dass sie bei Alignern nicht bereit sind genügend mitzuarbeiten [4, 6]. Daher wurden blaue Indikatoren in die Aligner im Bereich der Molaren integriert (Abb. 4), die während der Tragezeit im Mund von blau zu transparent verblassen [57].



Abbildung 4: Invisalign® Teen-Schiene mit blauem Indikatorpunkt zur besseren Überprüfung des Tragezeitverhaltens des Patienten (Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Dr. T. Drechsler)

Durch einen schnell und einen langsam verblassenden Indikatorpunkt wird sichergestellt, dass sie auch bei verschiedenen Speichelzusammensetzungen anwendbar sind. Der Behandler sowie der Patient können durch die Farbabstufung die Tragezeit abschätzen [58]. In Studien zeigte sich, dass dies zwar zu einer Verbesserung der Patienten-Compliance beitragen konnte, die Indikatorpunkte aber bewusst und unbewusst leicht manipuliert werden können und somit keine objektiven Tragezeit-Nachweise darstellen [59, 60].

Tuncay et al. berichteten, dass auch Jugendliche während der Behandlung mit Alignern von wenig Beschwerden, Schmerzen und Einschränkungen beeinträchtigt waren. Besonders die kurze Behandlungszeit am Stuhl vereinfachte die Therapie. Die Jugendlichen, die in der Studie verblieben, hatten keine Probleme mit der Mitarbeit und waren mit Ihrer Behandlung zufrieden. Tuncay et al. sahen in Invisalign® Teen eine Möglichkeit, jugendliche Patienten zu behandeln, die ansonsten eine kieferorthopädische Behandlung ablehnten [6].

In einzelnen Fallberichten wurde Invisalign® Teen als berechenbare und genau anwendbare Behandlungsmöglichkeit beschrieben, die sogar bei umfangreichen Fehlstellungen (z.B. frontoffener Biss) Vorteile gegenüber festsitzenden Apparaturen zeigte [54, 55, 61]. Brown et al. stellten schon 1991 fest, dass besonders jugendliche Patienten empfindlich auf unangenehme physiologische und psychologische Effekte während einer kieferorthopädischen Behandlung reagierten [62]. Levrini et al. wiesen darauf hin, dass besonders Patienten, die psychisch Schwierigkeiten mit kieferorthopädischen Behandlungen haben, von der Aligner-Therapie profitieren könnten [61].

2.3 Ätiologie parodontaler Erkrankungen

In der menschlichen Mundhöhle werden circa 1000 verschiedene Bakterienspezies und weit über 500 verschiedene Arten in der subgingivalen Plaque vermutet [63, 64]. Einige haben die Fähigkeit, die Zahnoberflächen zu besiedeln und sich dort zu vermehren. Dadurch entsteht eine Grundlage für weitere Bakterien, wodurch sich eine bakterielle Plaque bildet. Kann sich die Plaque ungehindert weiterentwickeln, entsteht schon nach kurzer Zeit eine Gingivitis [65]. Diese äußert sich durch Rötung, Schwellung, Blutung auf Sondierung, Exsudation, Ulzeration und erhöhte

Taschentiefen ohne Attachmentverlust oder Knochenabbau und ist vollständig reversibel [66, 67]. Durch die erhöhte Bakterienexposition reagiert das Epithel relativ schnell mit Ausschüttung von vasoaktiven Mediatoren wie Histamin und Serotonin. Die dadurch erhöhte Vasodilatation und Gefäßpermeabilität führen zu einer entzündlich-ödematösen Schwellung der Gingiva, einer verstärkten Durchblutung, es wird vermehrt Sulkusflüssigkeit freigegeben und die Leukozyten- sowie Makrophagenmigration werden angeregt. Durch Auflockerung des Saumepithels und die Gingivaschwellung kann es zur Bildung eines subgingivalen Raumes kommen, in den Plaque eindringen kann [64, 65]. Granulozyten bilden im Sulkus eine Barriere gegen die vordringenden Bakterien, und Lymphozyten ermöglichen eine lokale Immunabwehr [65]. Nach ein paar Tagen nimmt die Anzahl der Makrophagen und Granulozyten zu, die Zytokine (z.B. IL-1 β) und Chemokine (z.B. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)) produzieren [31]. Weitere Makrophagen und Lymphozyten werden durch die Chemokinproduktion angelockt. IL-1 β kann die Produktion von Kollagenasen in gingivalen sowie desmodontalen Fibroblasten erhöhen und die Kollagensynthese reduzieren [65]. Matrix-Metalloproteinasen sind wichtig für die physiologische Gewebeerneuerung, können aber auch zur parodontalen Destruktion durch Auflösung von Gewebe führen [64]. Durch anhaltenden Kollagenverlust und Proliferation des Saumepithels entsteht sogenanntes Taschenepithel ohne Attachment zur Zahnoberfläche [64]. Durch den zunehmenden Attachmentverlust entsteht eine vergrößerte Tasche zwischen Zahn und Gingivaepithel, wodurch Bakterien immer weiter nach apikal in die Tasche wandern können und es zu einer fortschreitenden, irreversiblen entzündlichen Zerstörung des Parodonts, der Parodontitis, mit Abbau von Alveolarknochen bis hin zum Zahnverlust kommen kann [25, 67, 68].

Der Schweregrad einer solchen Entzündung hat nicht nur mit der Menge der Plaque zu tun, sondern auch mit der Zusammensetzung der Bakterien [65]. Auch genetische Faktoren (z.B. IL-1-Polymorphismus), Allgemein- und Systemerkrankungen und erhöhter Nikotinkonsum spielen eine entscheidende Rolle [27, 64].

2.4 Parodontale Markerkeime

Es hat sich gezeigt, dass bei der Entstehung parodontaler Erkrankungen nur einige der vielen Bakterienspezies eine entscheidende Rolle spielen [67, 69]. Sie kommen bei Patienten mit destruktiven parodontalen Erkrankungen deutlich häufiger vor als bei Gesunden und werden daher mit der Parodontitis direkt assoziiert [68, 70].

Zu den 11 parodontalpathogenen bzw. Parodontitis-assoziierten Markerkeimen zählen:

- *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* (alte Bezeichnung: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*)
- *Porphyromonas gingivalis*
- *Tannerella forsythia* (alte Bezeichnung: *Bacteroides forsythus*)
- *Treponema denticola*
- *Prevotella intermedia*
- *Parvimonas micra* (alte Bezeichnung: *Peptostreptococcus micros*)
- *Fusobacterium* spp. (z.B. *Fusobacterium nucleatum*)
- *Campylobacter rectus*
- *Eubacterium nodatum*
- *Eikenella corrodens*
- *Capnocytophaga* spp. (*C. suputigena*, *C. gingivalis*, *C. ochracea*) [71-74]

Sie können in 5 Hauptgruppen (Komplexe) unterteilt werden. Die Bakterien *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola* sind sehr eng miteinander verbunden und treten meistens zusammen auf. Sie werden als „roter Komplex“ bezeichnet [72]. Die ersten beiden sind gramnegative anaerobe Stäbchen und sind Leitkeime der aggressiven und chronischen Parodontitis sowie der Periimplantitis [64, 75]. *T. denticola* gehört zu den Spirochäten und ist ein Leitkeim der akuten nekrotisierenden ulzerierenden Gingivitis (ANUG) [64, 74]. Sie sind gewebeinvasiv und haben eine hohe Rezidivgefahr [76].

Prevotella intermedia, *Parvimonas micra* und *Fusobacterium* spp. werden zum „orangenen Komplex“ gezählt. Auch diese werden als eng verbunden definiert [72]. *P. intermedia* und *Fusobacterium* spp. sind gramnegative anaerobe Stäbchen. *P. micra* zählt zu den grampositiven anaeroben Kokken [64]. *P. micra* tritt allgemein selten auf und wird eher bei fortgeschrittener Parodontitis nachgewiesen.

Fusobacterium-Spezies wie *F. nucleatum* treten besonders bei chronischer Parodontitis und akuter nekrotisierender ulzerierender Gingivitis (ANUG) auf. Sie werden aber auch bei gesunden Patienten nachgewiesen. Sie werden auch als Indikatoren der Mundhygiene bezeichnet [76].

Campylobacter rectus und *Eubacterium nodatum* werden dem „orange-assoziierten Komplex“ zugeordnet [72]. Sie gehören zu den grampositiven anaeroben Stäbchen [64].

Dem „grünen Komplex“ gehören u.a. *Eikenella corrodens* und *Capnocytophaga spp.* an [72]. Beide sind gramnegative fakultativ anaerobe Stäbchen [64]. *E. corrodens* gilt als Plaquebildner und Rezidivkeim. Häufig korreliert die Quantität des Keims mit der Taschentiefe [76].

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (*A.a.*) hat keine direkte Verbindung zu den anderen Komplexen und ist ein gramnegatives fakultativ anaerobes Stäbchen [64, 72]. Er tritt besonders bei lokaler aggressiver Parodontitis (juvenile Parodontitis), aber auch bei destruktiver Parodontitis bei Erwachsenen auf [74].

Die Bakterien des grünen sowie orange-assoziierten Komplexes gelten als schwach bis moderat pathogen, sind aber sogenannte Frühkolonisierer, die für weitere Bakterienpezies die Grundlage für die Besiedlung schaffen. Dies machen sie durch Ausbildung von Rezeptoren, mit denen Sie an glatte Zahnoberflächen andocken können [77]. *C. rectus* bildet zudem ein Leukotoxin und greift so schon in einem frühen Stadium das Zahnfleisch an [74].

Die Verbindung zwischen den Frühkolonisierern und stark pathogenen Keimen bilden die Bakterien des orangenen Komplexes. Sie gehen dem roten Komplex voraus und sind schon deutlich pathogener. Sie bilden Toxine und Enzyme, die zu Attachmentverlust und somit zunehmenden Taschentiefen führen [72, 77]. Der Sauerstoff-Partialdruck wird durch ihren Stoffwechsel gesenkt und sie ermöglichen so den anaeroben Bakterien des roten Komplexes sich anzusiedeln (späte Kolonisierung) [77].

Die Bakterien des roten Komplexes sowie *A. actinomycetemcomitans* gelten als sehr stark pathogen und stehen in direktem Zusammenhang mit klinischen Parametern parodontaler Erkrankungen wie erhöhten Taschentiefen und Blutung auf Sondierung

[72, 77]. Sie haben die Fähigkeit, verschiedene Virulenzfaktoren (u.a. Proteasen, Kollagenasen, Lipopolysaccharide, Leukotoxin und immunsupprimierende Faktoren) zu produzieren und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. Interleukine, Tumornekrosefaktor) zu induzieren. Außerdem können sie das Gingivaepithel durchdringen, so direkt in der Wirtszelle wirken und Zellapoptose auslösen. Dadurch verursachen sie Entzündungen, induzieren Gewebeerstörung und hemmen die Gewebereparatur [67, 73, 78, 79]. Sie gelten als stärkste Parodontitismarker [68]. Da sie exogen übertragen werden, ist eine orale Übertragung von Eltern auf Kinder oder zwischen Partnern möglich [75].

2.5 Aktive Matrixmetalloproteinase-8 (aMMP-8)

Matrixmetalloproteinasen (MMP) sind calcium- und zinkabhängige Endopeptidasen, die bei physiologischem pH-Wert und Temperatur aktiv sind [80]. Es gibt insgesamt fast 30 verschiedene MMPs, die sich in Gruppen unterscheiden lassen: Kollagenasen (MMP-1 = Kollagenase-1, MMP-8 = Kollagenase-2, MMP-13 = Kollagenase-3), Gelatinasen (MMP-2, MMP-9), Stromelysine (MMP-3, MMP-10, MMP-11), Matrilysine (MMP-7, MMP-26), membrangebundene MMPs (MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25) und andere [80].

Die Matrixmetalloproteinase-8 (MMP-8) ist die am häufigsten vorkommende MMP, die bei parodontalen Erkrankungen im Gewebe und in der Sulkusflüssigkeit nachgewiesen wurde [25]. Neben der mikrobiologischen Untersuchung der Markerkeime hat sich die Untersuchung auf aMMP-8 als Entzündungsmarker bei parodontalen Erkrankungen in der erweiterten Parodontaldiagnostik bewährt [25, 27, 28].

Durch Virulenzfaktoren parodontalpathogener Bakterien aus supra- oder subgingivaler Plaque wird eine immunoinflammatorische Reaktion des Wirtes hervorgerufen. Polymorphkernige Granulozyten („polymorphonuclear leukocytes“ = PMN) setzen MMP-8 frei, die dadurch aktiviert werden (aMMP-8) [24, 81]. In dieser aktivierten Form baut sie Kollagen des parodontalen Gewebes ab und wird auch mit alveolärer Knochendestruktion assoziiert [24, 27, 80]. MMP-8 ist somit ein körpereigenes Enzym, das maßgeblich bei der Gewebeerstörung bei parodontalen Erkrankungen mitverantwortlich ist [24].

Unter gesunden Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen der Aktivität von MMP-8 und den gewebsständigen Inhibitoren (TIMPs = tissue inhibitors of matrix metalloproteinases) [80]. Bei einer Parodontitis ist das Gleichgewicht in Richtung aMMP-8 verschoben, wodurch der Gewebeabbau erhöht ist [82].

aMMP-8 ist in der gingivalen Sulkusflüssigkeit (GCF = gingival crevicular fluid) sowie aus dem Speichel nachweisbar [28]. In mehreren Studien zeigte sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe der aMMP-8-Konzentration und dem parodontalen Zustand. Dabei sind bei parodontalen Erkrankungen die aMMP-8-Werte signifikant höher als bei gesunden Kontrollgruppen [24, 28, 82].

Mehreren Studien zeigten, dass aMMP-8 auch als Indikator parodontaler Erkrankungen durch Schwangerschaft, Diabetes mellitus, koronare Herzerkrankungen, den rheumatischen Formenkreis und Periimplantitis genutzt werden kann [24]. Auch bei kieferorthopädischen Patienten ist die Untersuchung der aMMP-8-Konzentrationen interessant, da sehr starke mechanische Kräfte bei kieferorthopädischen Zahnbewegungen zu einer erhöhten Produktion von aMMP-8 führen können. Dadurch kann eine aseptische parodontale Entzündung entstehen. Dagegen führt die richtige Stärke der mechanischen Kräfte zu einem ausgeglichenen Verhältnis von aMMP-8 und TIMP, wodurch eine extrazelluläre Matrixregeneration begünstigt wird [83].

Die traditionellen parodontalen Diagnostikmethoden beinhalten klinische Untersuchungen wie Messung der Taschentiefen, Blutungsindex (BOP = bleeding on probing), klinisches Attachmentlevel und Plaqueindex, sowie Röntgenaufnahmen [25]. Diese klinischen Zeichen sind allerdings erst nach längerem Bestehen der Entzündung bzw. sogar erst nach Vorhandensein von teilweise sogar irreversiblen Schäden sichtbar [25, 27]. Die Untersuchung auf aMMP-8 ermöglicht eine viel frühere und auch objektive Methode, um akute Entzündungsgeschehen zu diagnostizieren, schon bevor sie sich überhaupt klinisch zeigen [24, 27].

2.6 IL-1-Polymorphismus

Parodontitis ist eine multifaktorielle Erkrankung, die nicht nur durch äußere Einflüsse bedingt wird, sondern deren Fortschreiten auch durch genetische Komponenten beeinflusst wird [29].

Interleukine gehören zu den wichtigsten immunregulatorischen Zytokinen und werden von verschiedenen Zelltypen und vor allem von Makrophagen produziert. Werden Makrophagen z.B. Lipopolysacchariden ausgesetzt (Virulenzfaktoren parodontalpathogener Bakterien), produzieren sie u.a. Interleukin-1 α (IL-1 α) und Interleukin-1 β (IL-1 β). Diese induzieren eine erhöhte Osteoklastenbildung und eine vermehrte Produktion von MMPs und Prostaglandinen und führen so zu Kollagen- und Knochenabbau. Reguliert werden sie durch ihren Gegenspieler, den IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1ra) [64, 65, 84].

Für Interleukin-1 sind drei verschiedene Gene bekannt: IL-1A und IL-1B kodieren entzündungsfördernde Proteine (IL-1 α und IL-1 β), IL-1RN kodiert ein ähnliches Protein, den Rezeptorantagonisten IL-1ra. Für diese Gene sind Polymorphismen (Abweichungen in der DNA-Sequenz) bekannt. Das heißt, dass an bestimmten Positionen des Gens ein Allel 1 oder ein Allel 2 homozygot oder zusammen heterozygot vorhanden sein kann. Wird der Körper durch parodontalpathogene Keime stimuliert, können bestimmte Kombinationen aus diesen Allelen zu einer Überproduktion von IL-1 α und IL-1 β bzw. zu einer geringeren Produktion von IL-1ra führen [32, 64, 85]. Bedingt durch diese genetischen Unterschiede reagieren manche Menschen bei parodontalen entzündlichen Geschehen auf denselben Reiz stärker als andere [30].

Kornman et al. entdeckten 1997 erstmals einen Zusammenhang zwischen den Polymorphismen des IL-1 und der Stärke parodontaler Erkrankungen bei Erwachsenen [84]. Parkhill et al. erkannten bei jungen und ansonsten gesunden Patienten, dass manche Allel-Kombinationen mit früh beginnenden parodontalen Erkrankungen (early onset periodontitis = EOP) assoziiert werden können [86]. Seitdem wurde in mehreren Studien bestätigt, dass das Risiko eine Parodontitis zu entwickeln in einem signifikanten Zusammenhang mit dem IL-1-Polymorphismus steht [29].

Die verschiedenen Kombinationen aus den einzelnen Allel-Ausprägungen können in vier Gruppen unterteilt werden, die jeweils für ein individuelles Parodontitis-Risiko stehen. Diese Gruppen werden als Genotypen 1 bis 4 bezeichnet. Sie vereinfachen dem Behandler die Unterteilung und Einschätzung des genetischen Risikos. Bei Genotyp 1 ist die Produktion des Interleukin-1 sowie des IL-1RN normal. Die Patienten haben eine normale Entzündungsreaktion und dadurch kein erhöhtes

genetisches Risiko für progressive Parodontitis. Genotyp 2 ist durch eine Überproduktion von Interleukin-1 zusammen mit einer normalen IL-1RN-Produktion charakterisiert, wodurch eine erhöhte Entzündungsreaktion und ein erhöhtes genetisches Parodontitisrisiko resultiert. Patienten mit Genotyp 3 haben eine stark erhöhte Entzündungsreaktion und ein stark erhöhtes genetisches Parodontitis-Risiko, da IL-1 überproduziert wird und gleichzeitig die Produktion des entzündungshemmenden IL-1RN verringert ist. Genotyp 4 ist charakterisiert durch eine normale IL-1-Produktion, aber eine erniedrigte Produktion von IL-1RN. Diese Patienten haben eine verringerte Entzündungshemmung. Typisch ist ein häufigeres Auftreten von Periimplantitis [87].

2.7 Parodontale Erkrankungen bei Jugendlichen

Parodontale Erkrankungen gehören zu den häufigsten Infektionserkrankungen [19]. Die Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V) ergab, dass zwar die Anzahl der Menschen mit parodontalen Erkrankungen in Deutschland abgenommen hat, durch die demographische Entwicklung und das steigende Lebensalter aber der prognostizierte Behandlungsbedarf steigt [18]. Da die Prävalenz an einer Parodontitis zu erkranken mit zunehmendem Alter steigt, leiden Jugendliche hauptsächlich an einer Gingivitis ohne dauerhafte Schädigungen [19]. Die Angaben zu parodontalen Erkrankungen bei Kindern und Jugendlichen sind auf Grund von unterschiedlichen Kriterien und Klassifikationen oft widersprüchlich [20]. In der Fünften Deutschen Mundgesundheitsstudie (DMS V) wurden parodontale Erkrankungen bei Kindern und Jugendlichen gar nicht untersucht, da „bei Kindern Parodontalerkrankungen zu selten sind“ [18]. Auch wenn die klassische chronische Parodontitis die größte Prävalenz im Erwachsenenalter hat, können dennoch gingivale und parodontale Erkrankungen schon im Kindes- und Jugendalter auftreten. Besonders die aggressive Parodontitis beginnt in ihrer lokalisierten Form bereits während der Pubertät und kann durch schnelles Fortschreiten der Erkrankung zu frühzeitigem Zahnverlust führen. Beeinflussende Faktoren können hier neben hormonellen Veränderungen und mangelnder Mundhygiene auch erworbene oder angeborene Erkrankungen sein. Daher sollte bei Jugendlichen eine frühzeitige Diagnostik als besonders wichtig angesehen werden, um bereits eine beginnende Gingivitis erkennen zu können [20].

2.8 Parodontale Veränderungen während der Aligner-Therapie (Invisalign®)

Neben der Lebensqualität und funktionellen Faktoren spielt bei einer kieferorthopädischen Behandlung auch die Mundgesundheit in Bezug auf den gesamten Zahnhalteapparat eine entscheidende Rolle. Als großen Vorteil von Alignern sehen viele Autoren die Herausnehmbarkeit, wodurch die häusliche Mundhygiene zu jeder Zeit uneingeschränkt möglich ist [16, 22, 23, 37, 47, 48]. Zudem kann sie schneller und einfacher durchgeführt werden [17]. Außerdem sind zahnärztliche Prophylaxe und Untersuchungen dadurch während der Behandlung normal durchführbar [47]. Boyd et al. stellten 2001 fest, dass Patienten, die vor Behandlungsbeginn eine gute Mundhygiene hatten, diese auch während der Behandlung beibehielten. Sie vermuteten, dass ein großer Motivationsfaktor für eine gute Mundhygiene ist, dass sich durch die Plaque auf der Innenseite der Schienen diese verfärben und Ablagerungen entstehen könnten, was sie undurchsichtig und weniger ästhetisch werden lässt [47]. Eine gleichbleibende bzw. sogar besser werdende Mundhygiene beobachteten auch Schaefer et al. 2010. Die Zahn- sowie die Aligner-Pflege nahm in Bezug auf die Häufigkeit und Dauer stetig zu. Die Patienten in ihrer über 8 Monate begleiteten Studie berichteten sogar von einem „wachsenden Gefühl der Eigenverantwortung bezüglich der eigenen Zahngesundheit“. Weitere Faktoren wie Halitosis, Mundtrockenheit sowie Anzeichen von Gingivitis konnten sie während der Aligner-Behandlung nicht feststellen [15].

In mehreren Studien wurde die parodontale Gesundheit während der Aligner-Behandlung (Invisalign®) mit verschiedenen Indizes untersucht [6, 14-17, 22, 23, 26]. Häufig wurden dabei Aligner-Patienten mit Patienten mit bukkalen oder lingualen Brackets verglichen. Es zeigte sich, dass Aligner-Patienten (Invisalign®) deutlich weniger Plaqueanlagerungen hatten und festsitzende Apparaturen die Anlagerungen sogar begünstigten [14, 16, 17, 22, 23, 26]. Auch die Gingiva war bei Aligner-Patienten deutlich gesünder. In einigen Studien zeigten sich im Verlauf der Behandlung sogar Verbesserungen des Gingivazustandes, während die Werte bei den Patienten mit festsitzenden kieferorthopädischen Apparaturen nahezu gleich blieben oder stiegen [14, 15, 22, 23]. Hier wurde ein Zusammenhang mit der verbesserten häuslichen Mundhygiene vermutet [15, 22]. Auch die Blutungsneigung der Gingiva war allgemein bei Aligner-Patienten im Vergleich zu Patienten mit festsitzenden Apparaturen deutlich geringer [14, 17, 22, 23, 26].

Bei den Untersuchungen der Sulkustiefen ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse. Im Vergleich zu vestibulären Brackets bei Erwachsenen zeigte sich schon nach 6 Wochen, dass die Taschentiefen bei Aligner-Patienten weniger stark ausgeprägt waren. Nach 6 Monaten wurde der Unterschied statistisch signifikant und blieb auch noch nach 12 Monaten bestehen. Die Taschentiefen der Aligner-Patienten sanken sogar leicht mit der Zeit [22]. Im Vergleich zu linguale Brackets waren die Sulkustiefen während der Behandlung (therapiebegleitende Studie; seit mind. 6 Monaten in Behandlung) zuerst noch ähnlich. Erst zum dritten Untersuchungstermin (9-12 Wochen nach der ersten Studien-Untersuchung) und nach wiederholten Mundhygieneinstruktionen waren die Werte im Vergleich in der Lingual-Gruppe signifikant größer [23]. In einer Studie mit jugendlichen Patienten, die mit Invisalign® Teen behandelt und mit gleichaltrigen mit Multibracket-Apparatur behandelten Patienten verglichen wurden, stiegen die Sondierungstiefen bei allen Patienten an. Es zeigte sich aber auch hier, dass die Sulkustiefen bei den mit Multibracket-Apparatur behandelten Patienten deutlich stärker anstiegen als bei denen mit Aligner-Therapie [14].

Parodontitis-assoziierte Markerkeime wurden während der Aligner-Behandlung bis jetzt nur sehr wenig untersucht. In einer Studie wurden *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* und *Tannerella forsythia* bei erwachsenen Aligner- und Multibracket-Apparatur-Patienten aus der subgingivalen Plaque bestimmt. Es stellte sich heraus, dass nach 6 und 12 Monaten der kieferorthopädischen Behandlung die parodontalpathogenen Bakterien bei Patienten mit MBA deutlich, aber nicht signifikant höher waren als bei den Aligner-Patienten [22]. In einer weiteren Studie, in der Aligner (Invisalign®)- und MBA-Patienten mit einem durchschnittlichen Alter von 24,3 Jahren (Mindestalter: 16 Jahre) verglichen wurden, wurden *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* und *T. forsythia* untersucht. Bei keinem Aligner-Patienten trat einer dieser Markerkeime auf. In der MBA-Gruppe trat A.a. allerdings auch nur bei einem einzigen Patienten auf [26]. In einem Vergleich von jugendlichen Aligner(Invisalign® Teen)- mit MBA-Patienten wurden mikrobiologische Proben aus dem Sulkusbereich mit Papierspitzen genommen und auf *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Tannerella forsythia* untersucht. Alle Tests auf diese anaeroben Parodontalkeime waren negativ [14].

Insgesamt wurde daraus geschlossen, dass kein erhöhtes parodontales Risiko durch das Tragen von Alignern bestand [16]. Es war allgemein geringer als bei festsitzenden Apparaturen [14, 23]. Eine Behandlung mit Alignern (Invisalign®) wurde sogar für erwachsene Patienten mit parodontalem Risiko oder parodontalen Problemen als ideal beschrieben [22, 26, 48].

Da sich bei jugendlichen Patienten der Knochen und das parodontale Gewebe noch stark umbaut [21], ist es hier besonders wichtig, auch subgingivale parodontale Risiken genauer zu untersuchen.

Um potentielle Risiken frühzeitig zu erkennen, bevor destruktive Veränderungen überhaupt entstehen können, ist es das Ziel dieser Arbeit, während der ersten 6 Monate einer Aligner-Behandlung (Invisalign® Teen) alle 11 Parodontitis-assoziierten Markerkeime im gesamten Kiefer zu untersuchen und die Entzündungsneigung durch Messung der Konzentration der aktiven Matrixmetalloproteinase-8 (aMMP-8) zu analysieren. Dabei wird auch die genetische Komponente des Interleukin-1-Polymorphismus (IL-1) beachtet, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Genotyp und Entzündungsneigung zu erkennen.

Zum jetzigen Zeitpunkt sind keine Studien bekannt, die alle 11 Parodontitis-assoziierten Markerkeime, sowie aMMP-8 oder den IL-1-Polymorphismus im Einzelnen oder im Zusammenhang während einer Behandlung mit Alignern (Invisalign® Teen) untersucht haben.

3 Material und Methoden

Die Durchführung dieser prospektiven klinischen Studie wurde durch die Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz genehmigt (Ethikantrag Nr.: 837.326.14 (9565)).

3.1 Patientenauswahl

Es wurden insgesamt 24 Patienten mit einer bestehenden Zahnstellungs- bzw. Bissanomalie eingeschlossen, die zu Beginn dieser Studie zwischen 11 und 17 Jahre alt waren und bei denen eine Aligner-Therapie mit Invisalign® Teen im Ober- sowie Unterkiefer geplant war. Hiervon wurden 6 Patienten in der Poliklinik für Kieferorthopädie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz behandelt. 18 Patienten entstammten der Fachpraxis für unsichtbare Kieferorthopädie Dr. Thomas Drechsler in Wiesbaden. Alle Patienten wurden unabhängig von Geschlecht oder ethnischer Zugehörigkeit ausgewählt. Voraussetzung war ein guter allgemeiner Gesundheitszustand, der durch eine anamnestische Befragung vor jeder Probenentnahme durch den Untersucher sichergestellt wurde. Es mussten mindestens 16 natürliche Zähne, einschließlich 8 Frontzähnen vorhanden sein. Zuvor durfte keine Behandlung mit einer festsitzenden kieferorthopädischen Multibracket-Apparatur im OK oder UK durchgeführt worden sein. Die Patienten und ihre Erziehungsberechtigten wurden durch die Prüfarzte mündlich sowie schriftlich über den Ablauf der Studie aufgeklärt und hatten die Möglichkeit Fragen zu stellen. Sie erklärten sich bereit, an keinen anderen klinischen Studien für die Dauer dieser Studie teilzunehmen, keine zusätzlichen professionellen Zahnreinigungen extern durchführen zu lassen sowie ihre bisherigen manuellen oder elektrischen Putzgewohnheiten beizubehalten. Von der Studie ausgeschlossen wurden Patienten mit schweren parodontalen Erkrankungen, charakterisiert durch eitrige Exsudate, Zahnbeweglichkeit oder Rezessionen (zurückgegangene Gingiva), oder bei denen eine Parodontitisbehandlung durchgeführt wurde. Es durften außerdem nicht mehr als drei behandlungsbedürftige kariöse Defekte bestehen. Zwei Wochen vor Studienbeginn durfte kein Antibiotikum eingenommen oder eine professionelle Zahnreinigung durchgeführt worden sein. Die Patienten durften keinen Herzschrittmacher tragen. Des Weiteren durften keine Syndrome und Allgemeinerkrankungen vorliegen. Es durfte keine Schwangerschaft bestehen; der Ausschluss dieser erfolgte durch Befragung der Patienten. Sie durften keine

Allergien gegenüber Färbemitteln/Farbstoffen haben, die in kosmetischen Produkten oder Nahrungsmitteln verwendet werden, und es durften nach Ansicht des behandelnden Zahnarztes auch keine anderen Einwände gegen die Studienteilnahme bestehen. Unzuverlässige und unkooperative Patienten wurden ebenfalls von dieser Studie ausgeschlossen.

Von zuvor 26 Patienten wurden 2 von dieser Studie ausgeschlossen. Bei einem Patienten konnte die erste Untersuchung nicht vor Erhalten der ersten Aligner durchgeführt werden. Beim zweiten Patienten kamen die Proben der letzten Untersuchung postalisch nicht im Labor an.

Das Patientenkollektiv bestand aus 9 weiblichen und 15 männlichen Patienten, die zu Beginn der Behandlung ein durchschnittliches Alter von 14,1 Jahren \pm 1,8 Jahren erreicht hatten, wobei der jüngste 11,2 Jahre alt war und der älteste 17,0 Jahre.

Die weiblichen Patienten waren im Mittel 13,1 Jahre alt und die männlichen 14,7 Jahre. Daraus zeigt sich, dass zu Beginn der Behandlung die weiblichen Patienten im Schnitt 1,6 Jahre jünger waren als die männlichen.

3.2 Studienablauf

Die Untersuchungen wurden im Zeitraum zwischen Mai 2015 bis September 2017 durchgeführt. Der zeitliche Ablauf der Studie gliederte sich in vier Untersuchungstermine, Visite 1 bis 4 (V1 bis V4) (Tab. 1). Die Studienuntersuchung und Probenentnahme wurden jeweils vor der kieferorthopädischen Untersuchung durchgeführt, die im direkten Anschluss stattfand. Die Patienten wurden angewiesen, zwei Stunden vor ihrem Termin nicht mehr die Zähne zu putzen, keine süßen Getränke zu sich zu nehmen (nur einige Schlucke Wasser) und möglichst nichts mehr zu essen.

Die erste Visite (V1) wurde vor Therapiebeginn durchgeführt. Bevor der Patient seine ersten Aligner erhielt, wurden am selben Tag die ersten Proben entnommen. Der Patient erhielt an diesem Tag die ersten zwei Aligner-Paare jeweils für OK und UK. Diese wurden dann jeweils für zwei Wochen zur Gewöhnung an die Aligner getragen.

Nach diesen ersten 4 Wochen wurden das zweite Mal Proben entnommen (V2). Direkt im Anschluss wurden durch den Kieferorthopäden die Attachments geklebt. Der Patient erhielt nun die drei folgenden Alignerpaare.

Die dritte Visite (V3) fand 6 Wochen nach Kleben der Attachments statt, dementsprechend 10 Wochen nach Erhalt der ersten Aligner.

Visite 4 (V4) wurde ca. 6 Monate nach Erhalt der ersten Aligner durchgeführt.

Visite 1 (V1)	Erhalt der 1. und 2. Aligner
Visite 2 (V2)	Anbringen der Attachments 4 Wochen nach Erhalt der ersten Aligner
Visite 3 (V3)	6 Wochen nach Anbringen der Attachments bzw. 10 Wochen nach Erhalt der ersten Aligner
Visite 4 (V4)	6 Monate nach Erhalt der ersten Aligner

Tabelle 1: Zeitlicher Ablauf der Studie

3.3 Untersuchungsablauf und Probennahme

Bei jeder Visite wurde zuerst der Patient durch den Untersucher befragt, um mögliche Ausschlusskriterien zu erkennen:

- Allgemeiner Gesundheitszustand
- Antibiotikannahme
- Zahnreinigung durch einen anderen Zahnarzt seit dem letzten Termin
- Schwangerschaft
- Teilnahme an anderen Studien
- Starke Verletzungen oder Entzündungen im Mund

Im Anschluss wurden Mundschleimhaut und Gingiva auf Verletzungen und Entzündungen untersucht.

Für die Probenentnahme der gingivalen Sulkusflüssigkeit (GCF-Sample) wurden repräsentativ für das gesamte Gebiss die Zähne 16, 12, 24, 36, 32 und 44 (sogenannte Ramfjord-Zähne) ausgewählt (Abb. 5).



Abbildung 5: Übersicht der Ramfjord-Zähne, die zur Probennahme gewählt wurden
(Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Dr. T. Drechsler)

Vor jeder Probenentnahme wurden die Entnahmestellen vorsichtig mit einer Multifunktionsdüse mit Luft von Speichel befreit und eine Watterolle in der Umschlagfalte platziert, um eine Kontamination der Papierspitzen bzw. -streifen mit Speichel zu vermeiden.

Zur Untersuchung der parodontalen Markerkeime wurde mit Papierspitzen im mesialen Approximalraum dieser Zähne gingivale Sulkusflüssigkeit für 30 Sekunden aufgenommen (Abb. 6). Die Papierspitzen von OK und UK wurden jeweils als Poolprobe separat in einem verschließbaren Kunststoffröhrchen (Probenversandröhrchen) gesammelt.



Abbildung 6: Probennahme mit Papierspitzen im mesialen Approximalraum
(Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Dr. T. Drechsler)

Mit Papierstreifen wurde im distalen Approximalraum der oben genannten Zähne auf die gleiche Weise gingivale Sulkusflüssigkeit zur Untersuchung auf aMMP-8 entnommen (Abb. 7). Auch diese wurden als Poolprobe des OK sowie des UK gesammelt.



Abbildung 7: Probennahme mit Papierstreifen im distalen Approximalraum (Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Dr. T. Drechsler)

Am ersten Untersuchungstermin (V1) wurde zusätzlich ein Mundschleimhautabstrich mit einem Wattestäbchen für die Bestimmung des IL-1-Polymorphismus durchgeführt (Abb. 8).

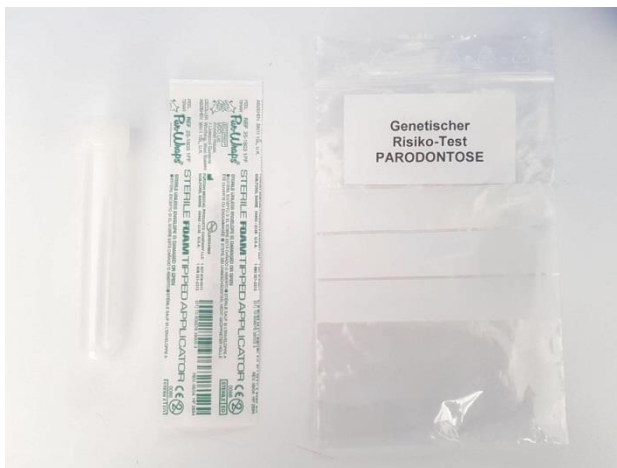


Abbildung 8: Steriles Wattestäbchen, Probenröhrchen und Schutztüte für Gentest des IL-1-Polymorphismus (Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Dr. T. Drechsler)

Alle vier Röhrchen mit entnommener Sulkusflüssigkeit wurden in einer Kunststoffbox gesammelt (Abb. 9), diese mit einem Plastiktütchen geschützt und dieses in einem Umschlag auf postalischem Weg zum Labor (Bioscientia, Institut für medizinische Diagnostik GmbH, Berlin) versandt. Der Mundschleimhautabstrich, der bei der ersten Visite entnommen wurde, wurde ebenso an dieses Labor zur Auswertung gesendet (Tab. 2).



Abbildung 9: Gesammelte Poolproben getrennt nach Untersuchung auf Markerkeime und aMMP-8 sowie jeweils OK und UK in Transportbox mit Schutztüte (Quelle: Mit freundlicher Genehmigung von Dr. T. Drechsler)

Nach jeder Untersuchung wurde eine professionelle Zahnreinigung durchgeführt.

Untersuchung	Mundschleimhaut-abstrich	OK-Sulkusflüssigkeit	UK-Sulkusflüssigkeit	Visiten
Markerkeime		X	X	V1-4
aMMP-8		X	X	V1-4
IL-1-Polymorphismus	X			V1

Tabelle 2: Übersicht der entnommenen Proben

3.4 Laboranalysen

Die Laboruntersuchungen wurden alle durch das Fachpersonal des Labors (Bioscientia, Institut für medizinische Diagnostik GmbH, Berlin) durchgeführt. Sämtliche Informationen zu den entsprechenden Analysen und Vorgehensweisen entstammen den offiziellen Gebrauchsanweisungen der entsprechenden Geräte sowie den ergänzenden Informationen des Labors und sind im Folgenden zusammengefasst [71, 81, 85].

Es wurden entsprechend den drei oben genannten Probenarten folgende Laboruntersuchungen durchgeführt:

- Analyse der 11 Parodontitis-assoziierten Markerkeime
- Test auf aMMP-8
- Untersuchung des IL-1-Polymorphismus

3.4.1 Analyse der Markerkeime

Aus der mit Papierspitzen gewonnenen Sulkusflüssigkeit (GCF-Sample) wurden im Labor manuell mit QiAamp DNA Mini Kit (QIAGEN N.V., Hilden, Deutschland) die Nukleinsäuren aus der bakteriellen DNA extrahiert. Die 11 Parodontitis-assoziierten Markerkeime wurden mit dem DNA-basierten in-vitro Nachweissystem LCD Array Kit BAC-Dent 2.4 (Version: BAC-Dent 2.4 CE V-7.0-2013-GER, Chipron GmbH, Berlin, Deutschland) parallel und qualitativ analysiert.

Mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden aus der gewonnenen extrahierten bakteriellen DNA kleine Bereiche des bakteriellen 16S rRNA-Gens amplifiziert. Dazu wurde ein Mastermix aus drei Primergemischen verwendet (Triplex PCR), die gegen drei verschiedene Regionen des bakteriellen 16S rRNA-Gens gerichtet waren (Primer Mix PA300 – 350 Bp, Primer Mix PA500 – 85 Bp, Primer Mix PA1000 – 300 Bp). Die entstehenden DNA-Fragmente wurden während der PCR mit Biotin markiert.

In einem zweiten Schritt wurden die markierten PCR-Amplifikate an der Oberfläche der LCR-Array-Chips gegen spezies-spezifische DNA-Fängermoleküle (capture probes) hybridisiert. Auf diese Weise können gleichzeitig alle 11 Markerkeime parallel in einer Reaktion unterschieden und nachgewiesen werden. Die PCR-

Amplifikate wurden mit einem Hybridisierungspuffer vermischt (pro Reaktion 22 μ l Hybridisationsbuffer B, 2 μ l Modulator und 10 μ l PCR-Amplifikat) und 28 μ l dieser Lösung in ein Arrayfeld pipettiert. Der Chip wurde für 30 min bei 35 °C in der Feuchtkammer inkubiert. Dabei binden die PCR-Amplifikate an die spezifischen Sonden am Boden der Arraykammer. Die unspezifischen Amplifikate wurden durch Waschschriffe entfernt (3 Waschbehälter mit 150 ml 1-fach Waschpuffer-Arbeitslösung, 10 s in Waschbehälter 1 und 2 gespült und 1 min in Waschbehälter 3 inkubiert; 15 s Chip durch Zentrifugation getrocknet). Es verblieben die spezifisch gebundenen biotynilierten PCR-Fragmente, die mit Streptavidin-Peroxidase-Konjugat inkubiert wurden (sekundäre Markierung). Dazu wurden 28 μ l eines Markierungsgemisches (27 μ l Dilution Buffer, 3 μ l Modulator, 0,2 μ l Label) in die Arrayfelder pipettiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer weiteren Waschung (wie zuvor) wurde zu jedem Arrayfeld 28 μ l Färbelösung (Stain) pipettiert und für 5 min einwirken gelassen. Die Färbung wurde durch Untertauchen des Chips für 10 s in der dritten Waschlösung aus der vorherigen Waschung gestoppt. Durch die Substratpräzipitation (dunkelblauer Niederschlag des umgesetzten Substrats (Stain)) wurden nun die spezifischen DNA-Fragmente sichtbar gemacht.

Die Auswertung erfolgte mit einem SlideScanner und der SlideReader-Software (Analysis Package, Chipron GmbH, Berlin, Deutschland) automatisch an einem PC [71].

3.4.2 Test auf aMMP-8

Die mit Papierstreifen entnommene Sulkusflüssigkeit wurde im Labor mit dem Enzymimmunoassay „dentoELISA aMMP-8“ (dentognostics GmbH, Jena, Deutschland) quantitativ auf aMMP-8 analysiert.

Aus der Probe wurde ein Eluat gewonnen (600 μ l Phosphatpuffer je Probenstreifen in Röhrcchen geben, schwenken und bei Raumtemperatur 5 min einwirken lassen; vor Entnahme der Streifen erneut schwenken) und dieses im Verhältnis 1:50 (10 μ l GCF-Eluat + 490 μ l Phosphatpuffer) verdünnt. Jeweils 100 μ l der Kalibratoren 1-5 (aMMP-8 Konzentrationen von 0,125 ng/ml, 0,25 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1,0 ng/ml, 1,6 ng/ml) sowie der Verdünnungspuffer (Phosphatpuffer), der Positiv-Kontrolle (0,75 ng/ml

aMMP-8) und des Proben-Eluats (2x) wurden in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotitrationsplatten pipettiert. Die Platte wurde verschlossen und 60 min bei 37 °C inkubiert. In den Vertiefungen dieser Platte waren spezifische Antikörper gegen die aktive Matrix-Metalloproteinase-8 fixiert. Die aMMP-8 aus der Sulkusflüssigkeit sowie aus den Kalibratoren bildete mit diesen fixierten Antikörpern Immunkomplexe. Durch dreimaliges Waschen mit jeweils 200 µl einfach Waschpuffer pro Vertiefung wurden die nicht gebundenen Bestandteile entfernt. Im Anschluss wurden in jede Vertiefung 100 µl Peroxidase-Enzymkonjugat (monoklonaler anti-aMMP-8 Antikörper, gekoppelt mit Peroxidase) hinzugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Das Konjugat verband sich mit den fixierten Immunkomplexen. Durch Waschprozesse (3x mit je 200 µl Einfach- Waschpuffer pro Vertiefung) wurden wiederum nicht gebundene Komponenten entfernt. In jede Vertiefung wurden 100 µl TMB-Substrat pipettiert (TMB = 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid) und 15 min auf einem Schüttler (500 rpm) inkubiert. Durch die Peroxidase entstand ein blauer Farbstoff. Dieser schlägt nach Hinzugabe einer Stopplösung (0,25 mol/l Schwefelsäure; 100 µl je Vertiefung) nach gelb um. Die Intensität der Farbe ist proportional zur Konzentration der aMMP-8 in der Probe. In einem Mikrotitrationsplatten-Photometer wurde bei 450 nm die Platte ausgewertet (Referenzwellenlänge 620 nm) [81].

3.4.3 Untersuchung des IL-1-Polymorphismus

Die Analyse des Mundschleimhautabstriches wurde mit dem molekulargenetischen Testsystem „GenoTyp IL-1“ (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Deutschland) durchgeführt. Dieser in-vitro-Test untersucht das Vorhandensein von:

- Allel 1 an Position -889 des IL-1A-Gens
- Allel 2 an Position -889 des IL-1A-Gens
- Allel 1 an Position +3953 des IL-1B-Gens
- Allel 2 an Position +3953 des IL-1B-Gens
- Allel 1 an Position +2018 des IL-1RN-Gens
- Allel 2 an Position +2018 des IL-1RN-Gens

Aus dem Mundschleimhautabstrich wurde zuerst die humane DNA manuell extrahiert. Dafür wurden zu der Probe 200 µl NaOH gegeben und 5 min bei 95 °C erhitzt.

In einem zweiten Schritt wurde eine Multiplex-Amplifikation mit Biotin-markierten Primern durchgeführt. Hierfür wurde ein Mastermix aus 10 µl Amplifikations-Mix A (AM-A: Puffersubstanz, Nukleotide, Taq-Polymerase) und 35 µl Amplifikations-Mix B (AM-B: spezifische Primer, Puffersubstanz, Salze, Farbstoff) hergestellt. Jeweils 45 µl Master-Mix wurden in PCR-Reaktionsgefäße pipettiert. Pro Gefäß wurden 5 µl der DNA-Lösung hinzugegeben. Als Negativkontrolle wurden in ein Gefäß 5 µl Wasser (molecular biology grade) und als Positivkontrolle in ein Gefäß 5 µl Kontroll-DNA (5-20 ng/µl menschliche DNA, die an den drei untersuchten Loci jeweils Wildtyp-Sequenzen trägt) gegeben. Alle Proben wurden in einen Thermocycler gegeben.

Der dritte Arbeitsschritt war eine Hybridisierung der einzelsträngigen Amplifikate an die spezifischen Sonden der Teststreifen. Zu 20 µl Denaturierungsreagenz (<2% NaOH, Farbstoff) wurden 20 µl Amplifikat in eine Wannenkavität gegeben, gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dazu wurde 1 ml vorgewärmter (37-45 °C) und gemischter Hybridisierungspuffer (HYB: <10% anionisches Tensid, Farbstoff) gegeben und bis zur einheitlichen Färbung vorsichtig geschwenkt. Ein Membranstreifen wurde nun dort hineingelegt. Die Wanne wurde für 30 min bei 45 °C im TwinCubator inkubiert. Die Membranstreifen waren mit spezifischen Sonden beschichtet, die komplementär zu den amplifizierten Nukleinsäuren sind. Die Amplifikate konnten so an die Sonden binden (Hybridisierung). Danach wurde der Hybridisierungspuffer vollständig entfernt. 1 ml vorgewärmte (37-45 °C) Stringent-Waschlösung (STR: >25% einer quartären Ammoniumverbindung, <1% anionisches Tensid, Farbstoff) wurden hinzugegeben und die Wanne bei 45 °C 15 min im Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde die Stringent-Lösung vollständig entfernt. Der Membranstreifen wurde 1 min mit 1 ml Rinse-Lösung (RIN: Puffersubstanz, <1%NaCl, <1% anionisches Tensid) unter stetiger Bewegung auf einem Horizontalschüttler gewaschen und danach abgeschüttelt. Ein Konjugat-Konzentrat aus Streptavidin-konjugierter alkalischer Phosphatase wurde 1:100 mit einem Konjugat-Puffer (Puffersubstanz, 1% Blocking-Reagenz, <1% NaCl) verdünnt und auf Raumtemperatur temperiert. 1 ml des verdünnten Konjugats wurde zu dem Membranstreifen gegeben und 30 min auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Die Streptavidin-konjugierte alkalische Phosphatase bindet über das Streptavidin an das

Biotin des Amplifikats. Danach wurde die Lösung abgeschüttet und der Membranstreifen zweimal je 1 min mit 1 ml Rinse-Lösung und mit destilliertem Wasser auf dem Horizontalschüttler einmal gewaschen. Ein Substratkonzentrat (<70% Dimethylsulfoxid, <10% 4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid, <10% 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat) wurde 1:100 mit einem Substratpuffer (Puffersubstanz, <1% MgCl₂, <1% NaCl) verdünnt und auf Raumtemperatur temperiert. Zu den Membranstreifen wurde 1 ml des verdünnten Substrats gegeben und lichtgeschützt ohne Schütteln inkubiert. Die gebundene alkalische Phosphatase setzt das zugegebene Substrat in einen Farbstoff um, der auf dem Membranstreifen als Farbniederschlag sichtbar wird. Die Dauer beträgt zwischen 3 und 20 min und ist abhängig von den Testbedingungen (z.B. der Raumtemperatur). Sobald die Banden deutlich sichtbar wurden, wurde mit destilliertem Wasser die Substratreaktion durch zweimaliges Waschen gestoppt. Nach dem Trocknen des Membranstreifens konnte nun mit einer Schablone das entstandene Bandenmuster ausgewertet werden [85].

3.5 Darstellung der Laborergebnisse

Die Laborergebnisse wurden vom Labor auf postalischem Weg in Form von standardisierten Befundblättern übermittelt.

Die Ergebnisse der Analyse der 11 Parodontitis-assoziierten Markerkeime wurden vom Labor in folgender Aufteilung dargestellt:

- Keim nicht nachgewiesen - ($<10^4$ KbE)
- Geringe Keimkonzentration (+) ($=10^4$ KbE)
- Erhöhte Keimkonzentration + ($<10^5$ KbE)
- Stark erhöhte Keimkonzentration ++ ($<10^6$ KbE)
- Sehr stark erhöhte Keimkonzentration +++ ($>10^7$ KbE)

Die Definition der Keimkonzentration war für alle Markerkeime gleich definiert. Nur für *A. actinomycetemcomitans* wurden die Werte mit einer Zehnerpotenz niedriger bewertet (Beispiel: + = 10^4 KbE).

Aufgrund der getrennten Poolproben wurden auch die Ergebnisse von OK und UK getrennt dargestellt.

Die Ergebnisse der Untersuchung auf aMMP-8 wurden in Nanogramm pro Milliliter (ng/ml) angegeben. Dabei wurden untere und obere Grenzwerte von 8 ng/ml und 20 ng/ml definiert. Alle Werte unter 8 ng/ml wurden als „niedriger Bereich, gesund, nicht entzündet“ definiert. Werte ≥ 8 ng/ml wurde als „entzündliches Geschehen im Entnahmebereich“ definiert. Dabei wurde der Bereich zwischen 8 ng/ml und 20 ng/ml als „geringgradig entzündet“ bezeichnet und Werte ≥ 20 ng/ml als „akutes Entzündungsgeschehen“.

Die Ergebnisse der Analyse des IL-1-Polymorphismus zeigten das Vorhandensein (positiv) oder Nichtvorhandensein (negativ) der einzelnen oben aufgeführten sechs Allele und des sich daraus ergebenden Genotyps 1 bis 4.

3.6 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden folgende Programme verwendet:

- SPSS (IBM® SPSS® Statistics, Version 23, IBM Corporation, Armonk, USA, © 1989, 2015)
- SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, © 2002-2012)
- Minitab® 17 (Minitab Inc., USA, © 2013, 2016)

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte explorativ. Die Interpretation der p-Werte ist daher rein deskriptiv.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

- Einhaltung der geplanten Termine und der zeitlichen Abstände zwischen den Visiten 1 bis 4
- Verteilung der Genotypen 1 bis 4 innerhalb der Patientengruppe
- Auftreten der 11 Parodontitis-assoziierten Markerkeime und deren Konzentrationsveränderung im Verlauf der Aligner-Behandlung (Invisalign® Teen)
- Veränderung der aMMP-8-Konzentration als Indikator parodontaler Entzündung
 - insgesamt verglichen von Visite 1 bis 4
 - differenziert nach OK und UK
 - differenziert nach Geschlecht der Patienten
- Zusammenhang von aMMP-8 und IL-1-Polymorphismus
- Bewertung der tatsächlichen Entzündungsneigung

Zur Untersuchung der Termintreue wurde die Anzahl der Wochen seit Visite 1 für jeden Patienten gezählt und daraus Maßzahlen (Mittelwert, Median, Standardabweichung, Minimum, Maximum, Perzentile) berechnet.

Für die Auswertung der Gentests wurden die Häufigkeiten der einzelnen Allele sowie der sich daraus ableitenden Genotypen 1 bis 4 im gesamten Patientenkollektiv in Prozent errechnet. Absolute und relative Häufigkeiten der Genotypen wurden getrennt nach Geschlecht dargestellt. Mit dem Fisher-Test wurde untersucht, ob ein Unterschied in der Verteilung der Genotypen zwischen den Geschlechtern besteht.

An den Visiten 1 bis 4 und nach OK und UK unterschieden wurden die Konzentrationen der einzelnen Markerkeime in fünf diskrete Stufen (0 bis 4) unterteilt und deren absolute und relative Häufigkeiten bestimmt. Mit Vorzeichentest wurde die Veränderung der Konzentrationen im Verlauf der Behandlung für jeweils OK und UK analysiert. Die vollständigen Bakterienspektren zu jeder Visite wurden mit Balkendiagrammen dargestellt. Die zeitliche Veränderung der Konzentrationen von einer Visite zur nächsten wurde für die Keime, die nicht nur vereinzelt in erhöhter Konzentration nachgewiesen wurden, mit Sankey-Diagrammen dargestellt. Dafür wurde das Sankey SAS-Macro von S. Rosanbalm verwendet [88].

Für jeden Patienten wurden an den einzelnen Untersuchungsterminen die Mittelwerte der aMMP-8-Konzentrationen von OK und UK gebildet und daraus Maßzahlen für das gesamte Patientenkollektiv berechnet. Mit Vorzeichenrangtest wurde die Veränderung der gemittelten aMMP-8-Konzentrationen im Verlauf der Behandlung untersucht.

Zur Unterscheidung der aMMP-8-Werte zwischen OK und UK wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Konzentrationen gebildet und verglichen. Mit einem Vorzeichenrangtest wurden die Veränderungen im Verlauf der Behandlung für OK sowie UK untersucht. Zur Analyse eines Unterschiedes zwischen OK und UK an den Visiten 1 bis 4 wurde die Differenz von OK und UK (OK-UK) berechnet und mit einem Vorzeichenrangtest untersucht.

Für eine geschlechterspezifische Unterscheidung der aMMP-8-Werte wurden aus den OK- und UK-Konzentrationen die Mittelwerte gebildet und Maßzahlen (Median, Mittelwert, Standardabweichung) für die männlichen und weiblichen Patienten errechnet und verglichen. Mit einem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test wurde für jede Visite untersucht, ob ein Unterschied zwischen den Geschlechtern besteht.

Um den Zusammenhang zwischen den aMMP-8-Konzentrationen und den Genotypen 1 bis 4 zu untersuchen, wurden aus den Mittelwerten der OK- und UK-aMMP-8-Konzentrationen Maßzahlen (Median, Mittelwert und Standardabweichung) für die jeweiligen Genotypen an den Visiten 1 bis 4 berechnet. Mit einem Vorzeichenrangtest wurde untersucht, ob sich die aMMP-8-Konzentrationen der einzelnen Genotypen am Ende des Untersuchungszeitraumes (V4) im Vergleich zum Beginn der Behandlung (V1) verändert haben.

Die tatsächliche Entzündungsneigung wurde anhand der aMMP-8-Konzentrationen im Vergleich zu zwei Schwellenwerten für jeden Patienten analysiert und die Häufigkeiten für jede Visite berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Terminstreue

Aufgrund der individuellen Koordination zwischen den Patienten und der Poliklinik für Kieferorthopädie der Universitätsmedizin Mainz bzw. der Fachpraxis für unsichtbare Kieferorthopädie Dr. Thomas Drechsler in Wiesbaden wurde die Einhaltung der Termine der Visiten genau kontrolliert. Dazu wurde der zeitliche Abstand zwischen den tatsächlich stattgefundenen Terminen der Visiten 2 bis 4 und Visite 1 (Woche 0) bei jedem Patienten festgehalten. Als ideale Abstände für die Termine wurden definiert und geplant:

- 4 Wochen für Visite 2
- 10 Wochen für Visite 3
- 26 Wochen für Visite 4

Die Anzahl der Wochen wurde für jeden Patienten und jeden einzelnen Termin gezählt. Dabei wurden immer die Wochen, in denen die Termine stattgefunden haben, als ganze Wochen gerechnet.

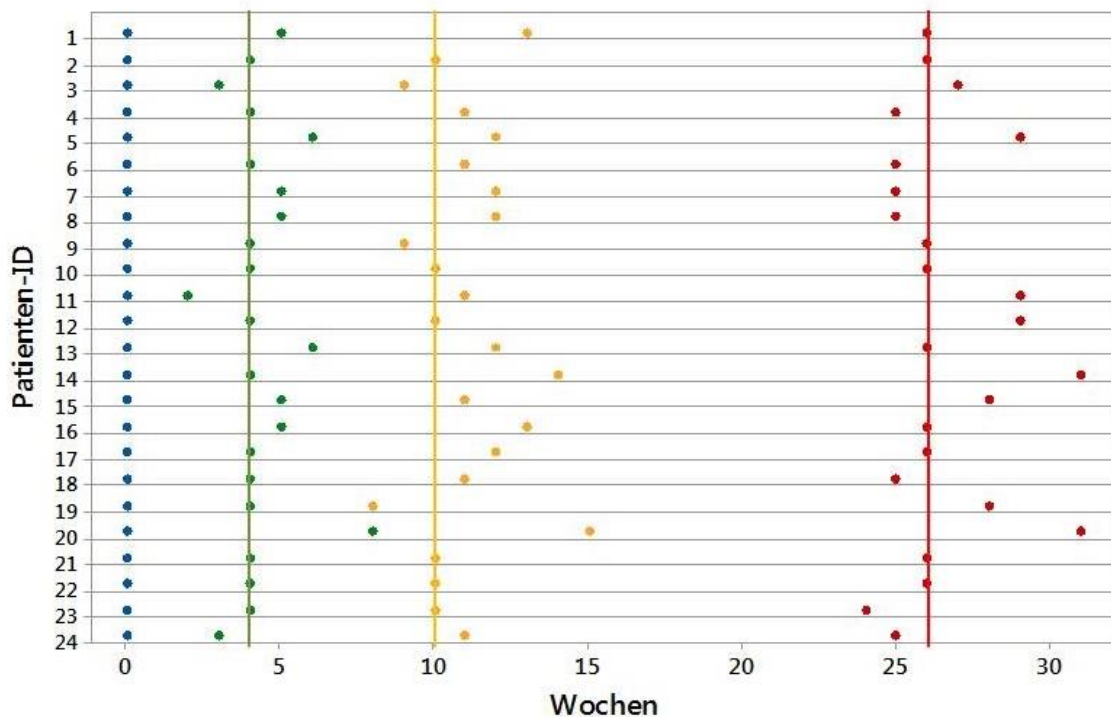


Abbildung 10: Punktediagramm zur Darstellung der Terminstreue: tatsächliche Termine der Visiten der einzelnen Patienten (Punkte) und geplante Termine (Linien); blau = V1, grün = V2, gelb = V3, rot = V4

Die Analyse (Abb. 10) zeigt, dass die Termine im Mittel relativ gut eingehalten wurden. Die Mediane für die zweite und die vierte Visite liegen tatsächlich bei 4 bzw. 26 Wochen. Nur die dritte Visite wurde im Mittel nicht nach den geplanten 10 Wochen durchgeführt; hier lag der Median bei 11 Wochen.

Es zeigte sich, dass mit zunehmender Behandlungsdauer die Streuung der Termintreue zunahm.

4.2 Untersuchung der Genotypen

Zur Bestimmung der Genotypen wurden die einzelnen Allele untersucht. Dabei wurden sie jeweils als „positiv“ (vorhanden) oder „negativ“ (nicht vorhanden) angegeben.

Die Analyse der Häufigkeiten ergab, dass das Allel 1 des Interleukin 1a-889 bei 92 % (n=22) der Probanden vorhanden war und Allel 2 bei 63 % (n=15). Auf das Allel 1 des Interleukin-1 β +3953 wurden 92 % (n=22) positiv getestet und 50 % (n=12) auf das Allel 2. Das Allel 1 des Interleukin-1 RN +2018 war bei 92 % (n=22) vorhanden und das Allel 2 bei 46 % (n=11).

Die Häufigkeiten des Auftretens der entsprechenden Genotypen 1 bis 4 wurden zum einen im Gesamten betrachtet, nach Geschlecht unterschieden und verglichen (Abb.11).

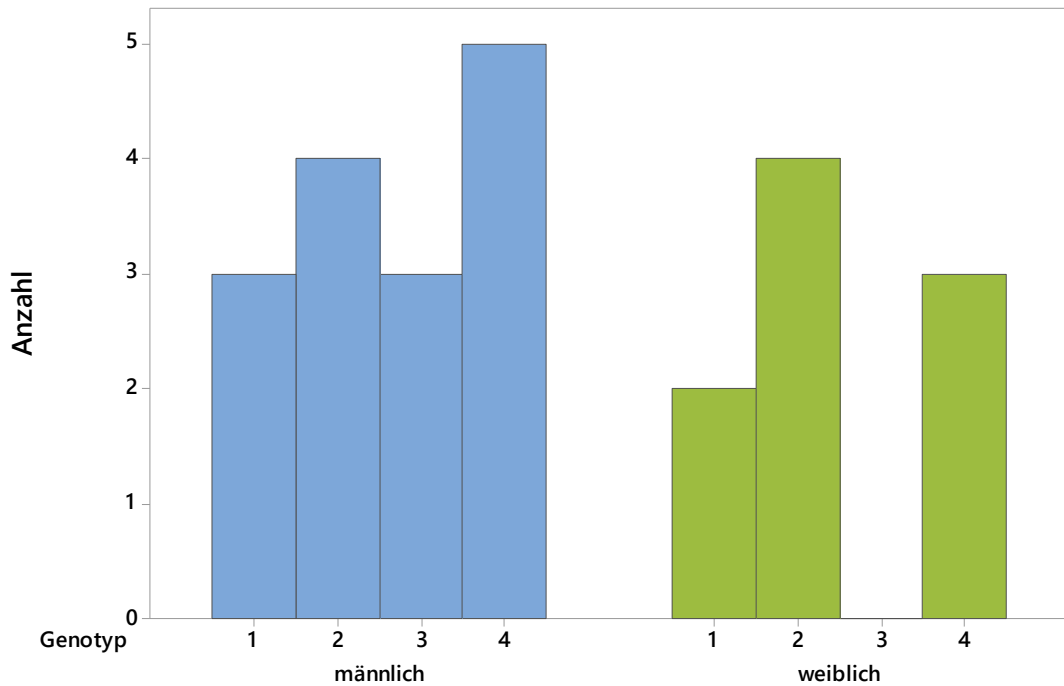


Abbildung 11: Balkendiagramm der Anzahl männlicher und weiblicher Patienten mit Genotyp 1 bis 4

Bei der Betrachtung der einzelnen Genotypen im gesamten Patientenkollektiv treten mit jeweils einem Drittel (jeweils $n=8$) die Genotypen 2 und 4 am häufigsten auf. Der Genotyp 1 steht mit 21 % ($n=5$) an dritter Stelle. Mit lediglich 13 % ($n=3$) tritt der Genotyp 3 am seltensten auf.

Weiterhin wurde untersucht, ob innerhalb der Patientengruppe Unterschiede zwischen Geschlecht und der Verteilung der Genotypen bestehen. Bei den männlichen Patienten beträgt der Anteil an Genotyp 1 und 3 jeweils 20 % (jeweils $n=3$); 27 % ($n=4$) haben Genotyp 2 und 33 % ($n=5$) Genotyp 4. Von den weiblichen Patienten haben 22 % ($n=2$) den Genotyp 1, 44 % ($n=4$) Genotyp 2 und 33 % ($n=3$) Genotyp 4. Der Genotyp 3 trat bei den weiblichen Probanden nicht auf.

Der Fisher-Test zeigt mit $p=0,5683$ keinen Hinweis auf Unterschiede zwischen den männlichen und weiblichen Patienten bezüglich der Genotypen.

4.3 Auswertung der Markerkeime

Für die Auswertung der Markerkeime wurde die Skalierung der Laborergebnisse in numerische Zahlen umgeschrieben.

- Keim nicht nachgewiesen = 0
- Geringe Keimkonzentration = 1
- Erhöhte Keimkonzentration = 2
- Stark erhöhte Keimkonzentration = 3
- Sehr stark erhöhte Keimkonzentration = 4

Die Analyse der Häufigkeiten zeigte, dass *Eubacterium nodatum* kein einziges Mal auftrat. *A. actinomycetemcomitans* sowie der rote Komplex bestehend aus *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola* traten fast gar nicht auf. Der orangene Komplex (*Prevotella intermedia*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium spp.*), *Campylobacter rectus* des orange-assoziierten Komplexes sowie der grüne Komplex (*Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga spp.*) traten deutlich öfter auf. Besonders die Markerkeime *F. spp.*, *C. rectus*, *E. corrodens* und *C. spp.* wurden in vielen Fällen nachgewiesen (Abb. 12 sowie im Anhang Tab. 5).

Mit einem Vorzeichentest wurden die Veränderungen der Keimkonzentrationen zwischen den einzelnen Untersuchungsterminen analysiert. Die Tests wurden für jeden einzelnen Markerkeim durchgeführt. Dabei wurde zwischen OK und UK unterschieden. Die Untersuchungstermine V2, V3 und V4 wurden jeweils mit V1 verglichen, da V1 den Zustand vor Behandlungsbeginn darstellt.

Bei den gar nicht bzw. fast gar nicht vorkommenden Keimen waren dementsprechend auch keine Veränderungen festzustellen. *P. intermedia* trat im OK fast gar nicht auf. Im UK zeigte sich eine minimale, nicht signifikante Erhöhung der Keimzahl (V3_V1: $p=0,1250$; V4_V1: $p=0,2500$).

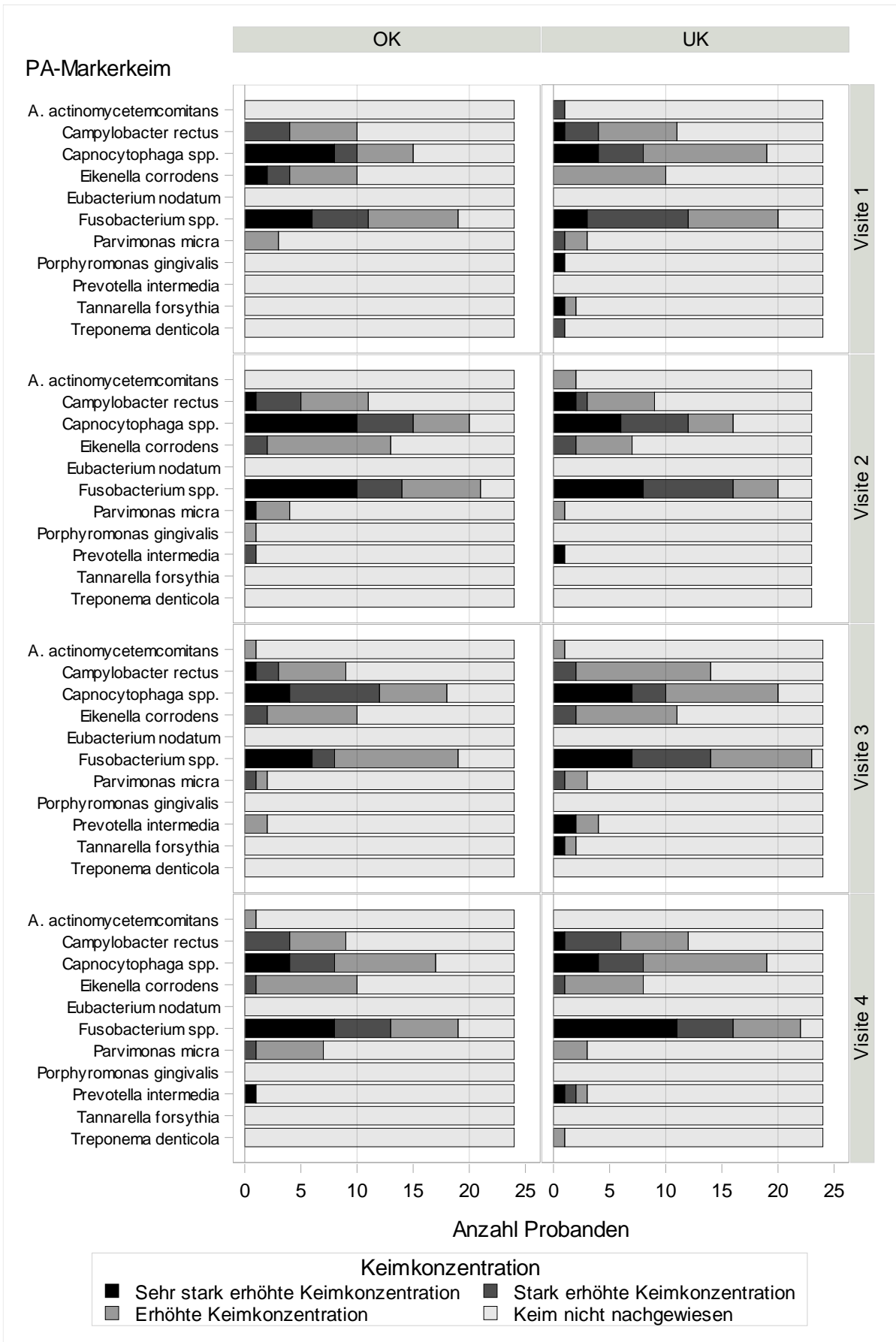


Abbildung 12: Balkendiagramm der Konzentrationen der einzelnen Markerkeime unterteilt nach OK und UK sowie nach Visiten 1 bis 4

Bei einigen Patienten stieg der Wert von *P. micra* im OK und UK leicht an, bei anderen sank er mit der Zeit (symmetrische Veränderung) (Abb. 13, 14).

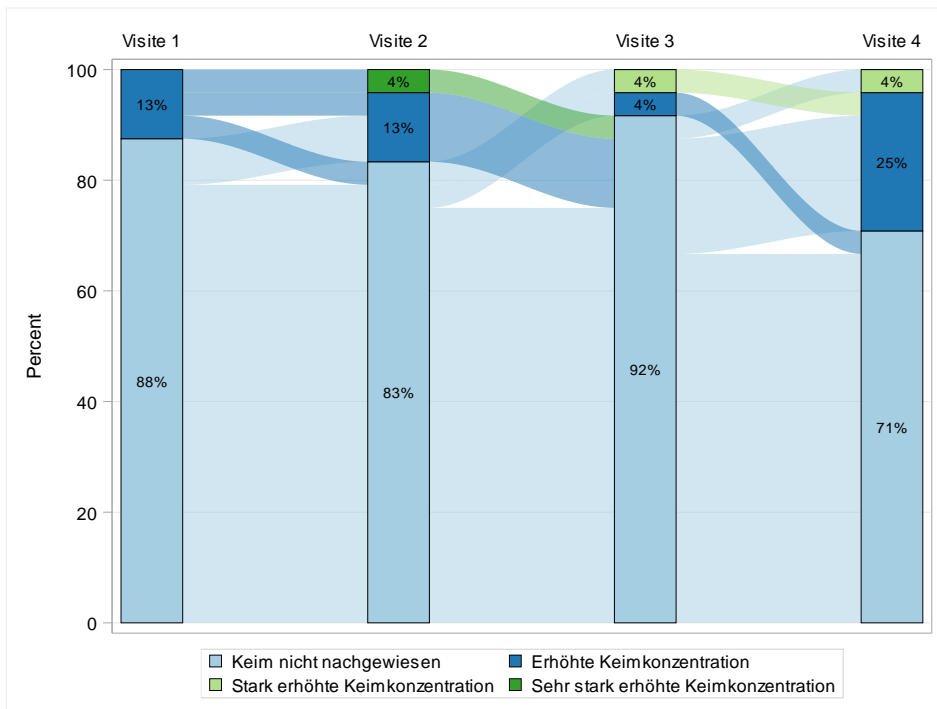


Abbildung 13: Sankey-Diagramm der Veränderungen der Konzentrationen von *Parvimonas micra* im OK im Verlauf von Visite 1 bis 4 in Prozent

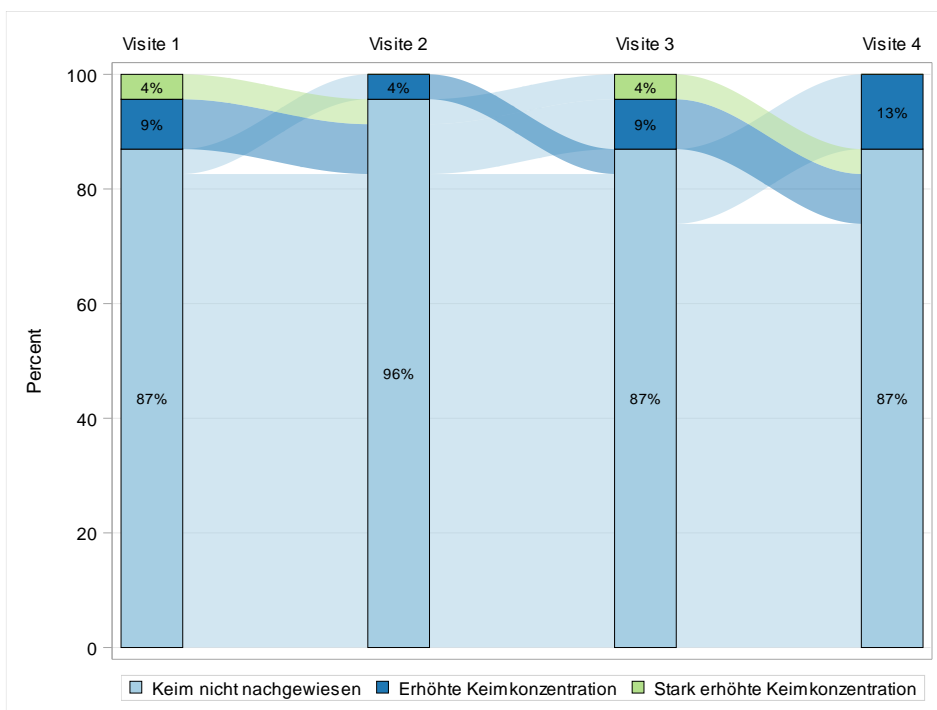


Abbildung 14: Sankey-Diagramm der Veränderungen der Konzentrationen von *Parvimonas micra* im UK im Verlauf von Visite 1 bis 4 in Prozent

Bei *E. corrodens*, *C. spp.* und *C. rectus* waren bei einzelnen Patienten deutliche Veränderungen über die Zeit erkennbar. Bei einigen Patienten wurde eine Zunahme, bei anderen eine Abnahme gemessen. Aber die Verteilung von Zu- und Abnahme war zu allen Zeitpunkten relativ symmetrisch, so dass insgesamt keine Tendenz erkennbar war (Abb. 15-20).

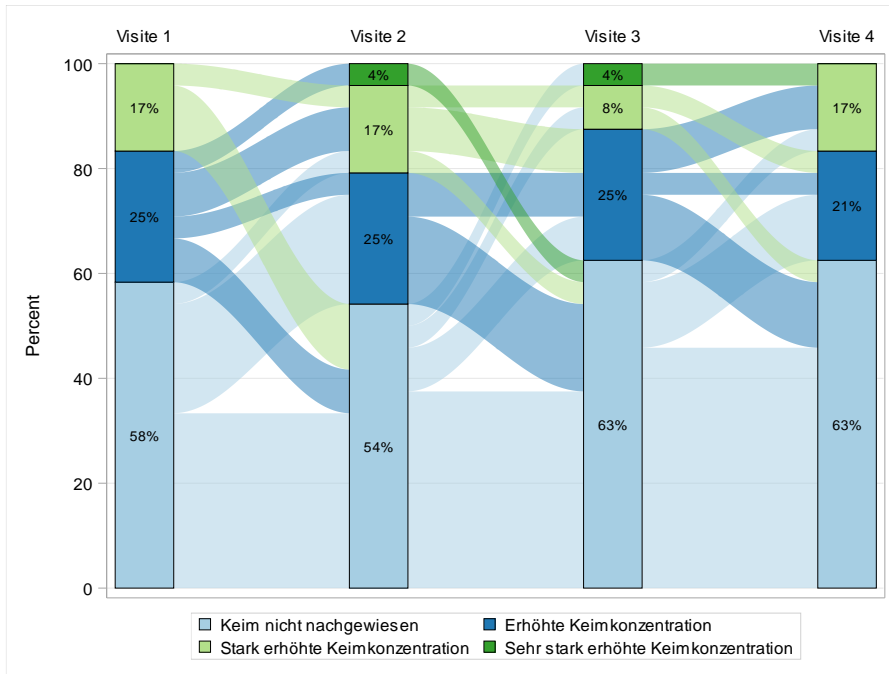


Abbildung 15: Sankey-Diagramm der Veränderungen der Konzentrationen von *Campylobacter rectus* im OK im Verlauf von Visite 1 bis 4 in Prozent

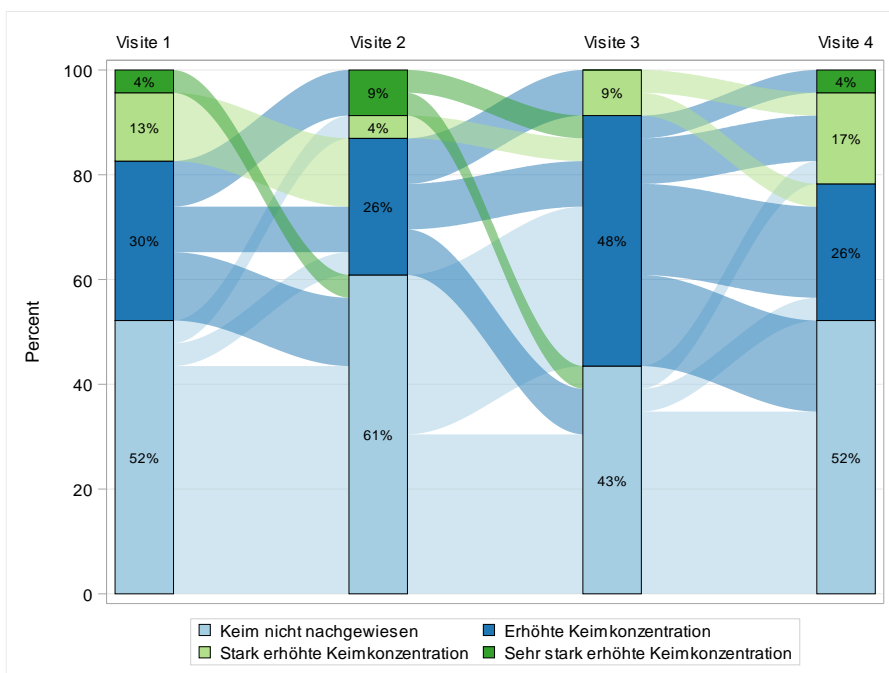


Abbildung 16: Sankey-Diagramm der Veränderungen der Konzentrationen von *Campylobacter rectus* im UK im Verlauf von Visite 1 bis 4 in Prozent

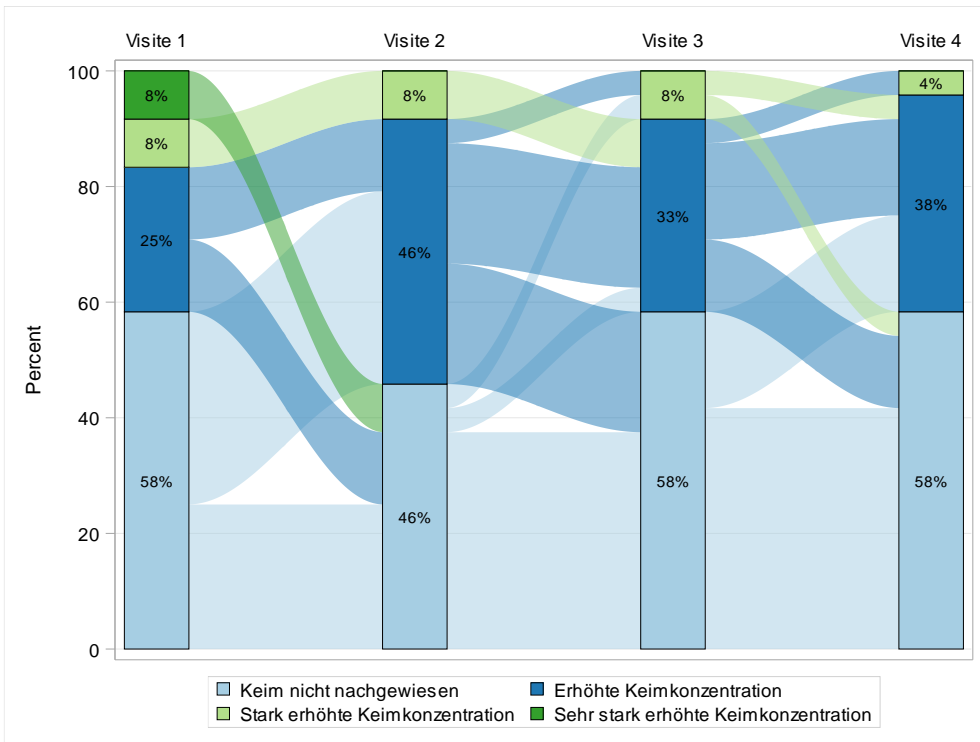


Abbildung 17: Sankey-Diagramm der Veränderungen der Konzentrationen von *Eikenella corrodens* im OK im Verlauf von Visite 1 bis 4 in Prozent

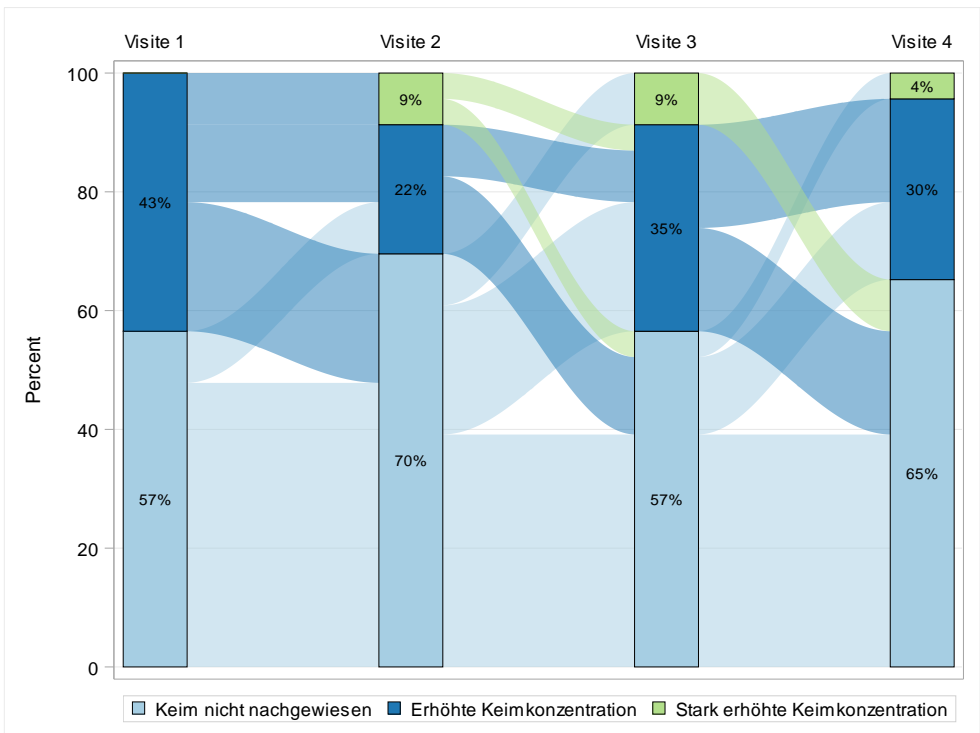


Abbildung 18: Sankey-Diagramm der Veränderungen der Konzentrationen von *Eikenella corrodens* im UK im Verlauf von Visite 1 bis 4 in Prozent

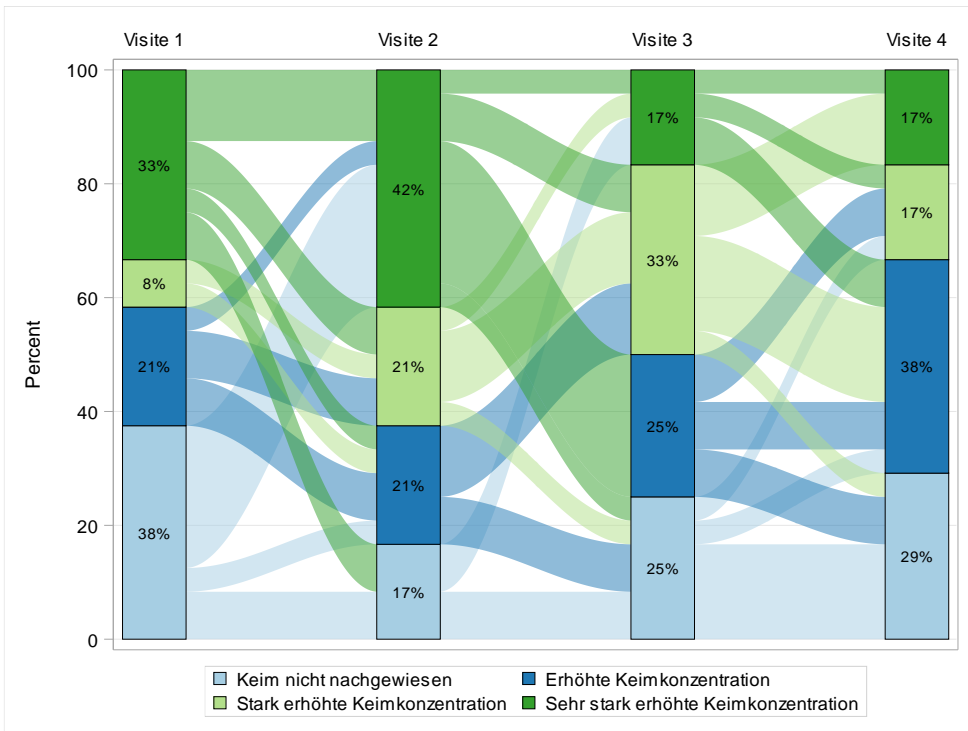


Abbildung 19: Sankey-Diagramm der Veränderungen der Konzentrationen von *Capnocytophaga spp.* im OK im Verlauf von Visite 1 bis 4 in Prozent

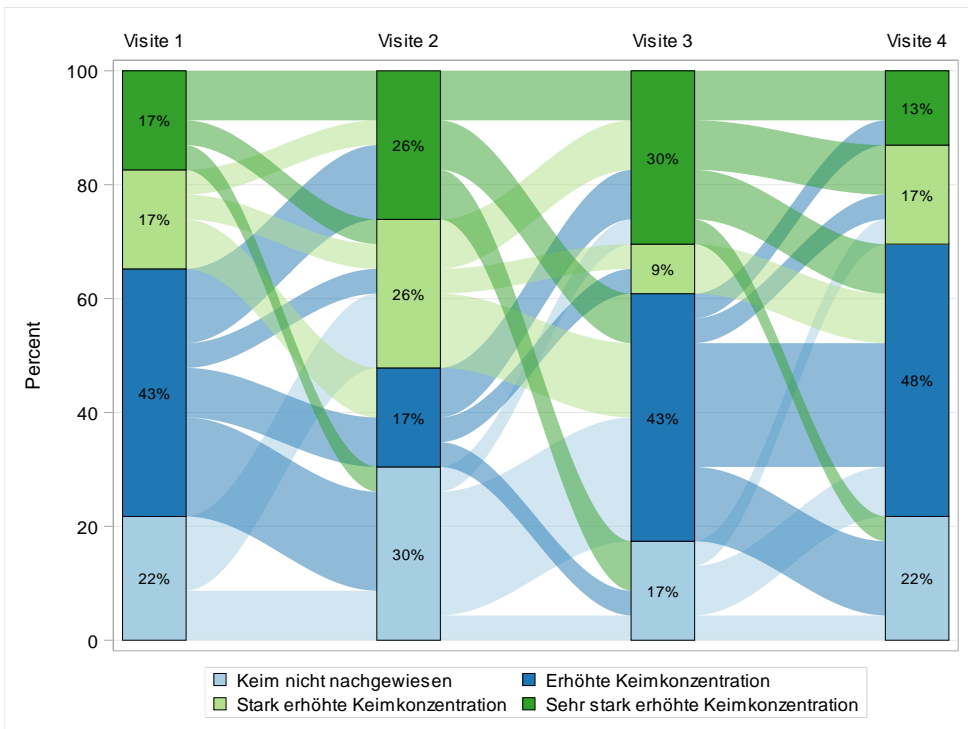


Abbildung 20: Sankey-Diagramm der Veränderungen der Konzentrationen von *Capnocytophaga spp.* im UK im Verlauf von Visite 1 bis 4 in Prozent

Die größten Veränderungen waren bei *Fusobacterium spp.* erkennbar. Auch dort war eine große Streuung bezüglich der Zu- und Abnahme der Keimkonzentrationen erkennbar, aber hier zeigte sich eine Tendenz zur Vermehrung von *F. spp.* im Verlauf der Behandlung. Der Vorzeichentest zeigt im Vergleich von V2 zu V1 im OK eine erste leichte Tendenz der Vermehrung ($p=0,0923$). V3 und V4 im Vergleich zu V1 im OK zeigten dies aber nicht mehr, da die Vermehrung und Reduktion der Keime sehr ausgeglichen war (V3_V1: $p=0,8036$; V4_V1: $p=0,6072$) (Abb. 21).

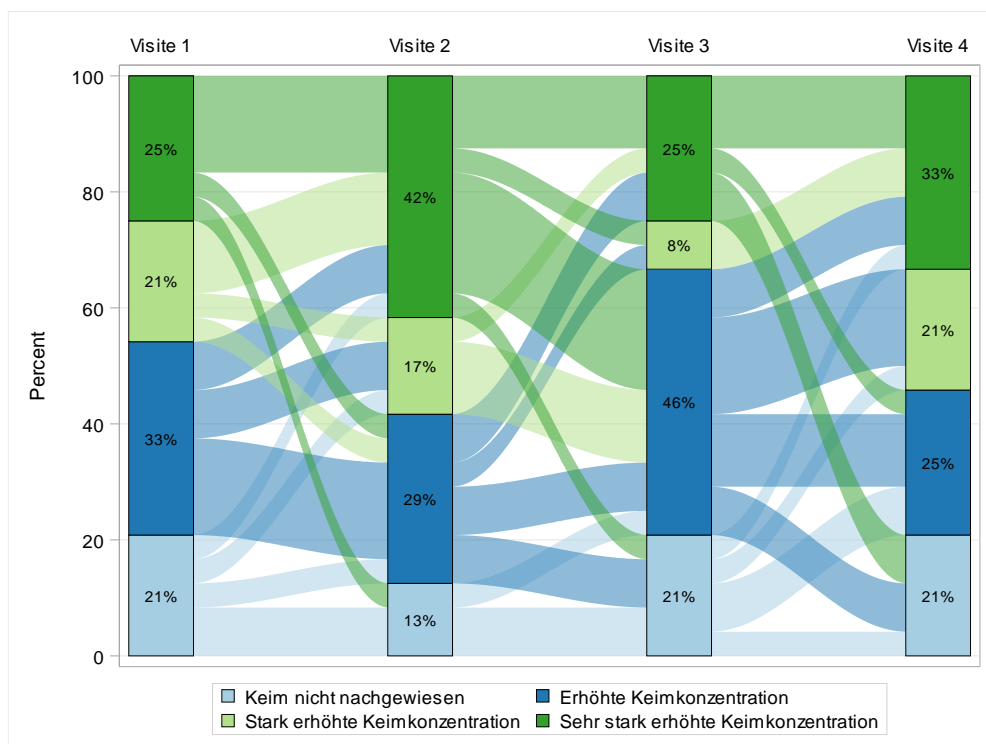


Abbildung 21: Sankey-Diagramm der Veränderungen der Konzentrationen von *Fusobacterium spp.* im OK im Verlauf von Visite 1 bis 4 in Prozent

Im UK dagegen zeigte sich eine deutlichere Tendenz. Im Vergleich von V2 zu V1 zeigte der Vorzeichentest eine Tendenz der Vermehrung mit $p=0,0768$. Bei V3 ist diese Tendenz wieder geringer mit $p=0,2101$. Erst im Vergleich von V4 mit V1 im UK war eine statistisch signifikante Steigerung der Konzentration von *F. spp.* mit $p=0,0414$ erkennbar (Abb. 22).

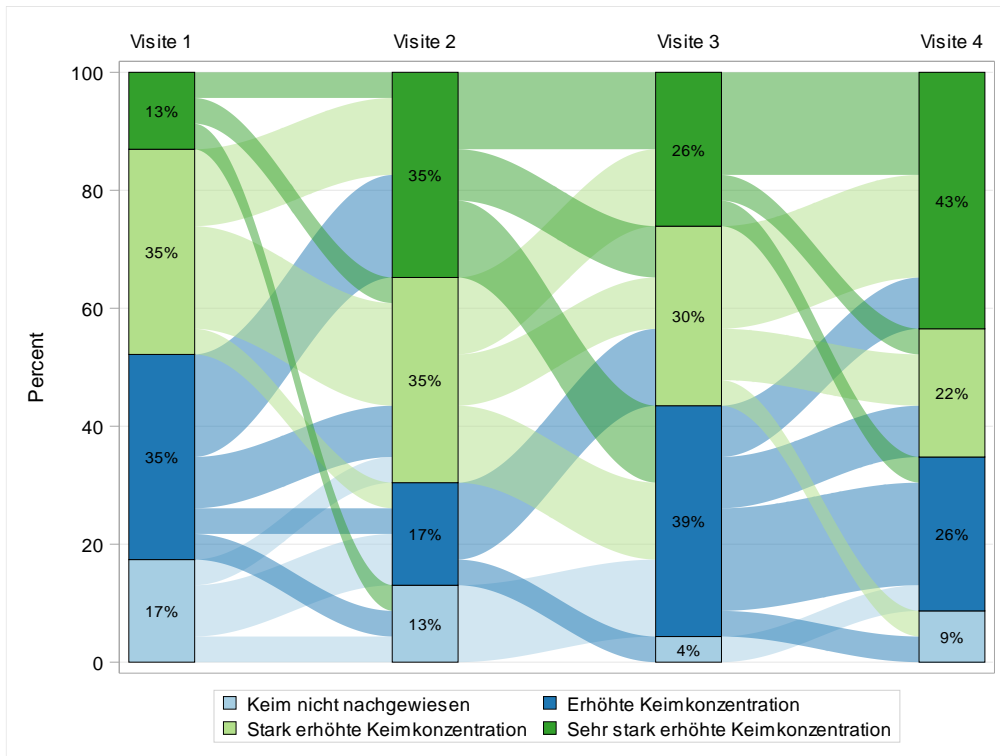


Abbildung 22: Sankey-Diagramm der Veränderungen der Konzentrationen von *Fusobacterium spp.* im UK im Verlauf von Visite 1 bis 4 in Prozent

Aufgrund der geringen Veränderungen der Markerkeimwerte wurde keine klinische Relevanz erkennbar und daher wurden hierzu auch keine weiteren Auswertungen durchgeführt.

4.4 Auswertung aMMP-8

Von allen 24 Patienten wurden bei jeder Visite Proben von OK und UK getrennt voneinander genommen und separat als Poolproben die aMMP-8-Konzentrationen analysiert.

4.4.1 Unterscheidung nach Visiten

Für einen Gesamtüberblick der aMMP-8-Daten wurden bei jedem Patienten die Mittelwerte aus den Ergebnissen für OK und UK gebildet. Um Unterschiede in der aMMP-8-Konzentration im Verlauf der Behandlung beurteilen zu können, wurden die statistischen Maßzahlen verglichen und Box-Plots der aMMP-8-Konzentrationen zu jeder Visite erstellt (Abb. 23).

Vor Beginn der Aligner-Behandlung (Invisalign® Teen) (V1) betrug der Mittelwert 4,2 ng/ml (Standardabweichung 5,6 ng/ml). Bei der zweiten Visite (V2) lag der Mittelwert minimal niedriger bei 3,5 ng/ml (Standardabweichung 4,7 ng/ml). Ab der dritten Visite (V3) stieg der Mittelwert deutlich an auf 6,9 ng/ml. Auch die Standardabweichung erhöhte sich auf 8,7 ng/ml. Danach blieb der Mittelwert nahezu konstant und lag bei V4 (6 Monate nach Erhalten der Aligner) bei 6,8 ng/ml (Standardabweichung 5,5 ng/ml).

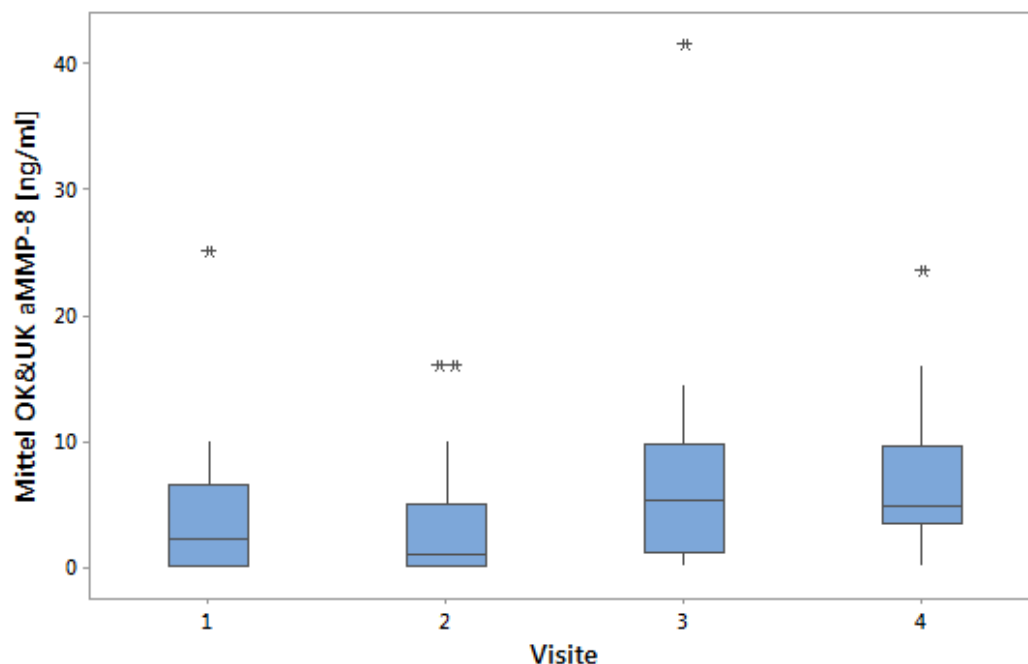


Abbildung 23: Boxplots aller aMMP-8-Daten (Mittelwert von OK und UK) unterschieden nach den Visiten 1 bis 4

Die Spannweiten von 25 ng/ml bei V1, 16 ng/ml bei V2, 41,5 ng/ml bei V3 und 23,5 ng/ml zeigen, dass bei allen vier Visiten große Streuungen vorlagen und auch einzelne Ausreißer auftraten.

Der Vorzeichenrangtest bestätigt, dass eine deutliche Zunahme der aMMP-8-Werte im Behandlungsverlauf von Visite 1 bis 4 zu beobachten war. In den vier Wochen bis Visite 2 ist noch keine Steigerung zu erkennen ($V2_V1: p=0,5577$). Der Unterschied zur dritten Visite liegt auch noch im Rahmen zufälliger Schwankungen, es ist aber eine leichte Tendenz erkennbar ($V3_V1: p=0,2055$). Erst zur vierten Visite (6 Monate nach Erhalten der ersten Aligner) ist die Zunahme der aMMP-8-Konzentration im Vergleich zur ersten Visite deutlich ($V1_V4: p=0,0161$).

4.4.2 Unterscheidung zwischen OK und UK

Bei Visite 1 waren die Mittelwerte für aMMP-8 im OK mit 4 ng/ml und im UK mit 4,3 ng/ml sehr ähnlich. Zur Visite 2 blieb der OK-Mittelwert relativ konstant mit 4,3 ng/ml. Im UK sank der Wert auf 2,6 ng/ml. Zur Visite 3 stiegen jedoch die Werte deutlich an, auf 7,1 ng/ml im OK und 6,7 ng/ml im UK. Bei Visite 4 waren sie immer noch relativ konstant bei 7,4 ng/ml im OK und 6,3 ng/ml im UK.

Die Standardabweichungen waren im OK sowie im UK relativ hoch mit Werten zwischen 5,8 ng/ml bis 10,8 ng/ml. Nur die Werte des UK zur zweiten Visite waren mit 3,1 ng/ml auffällig niedriger.

Mit einem Vorzeichenrangtest wurde untersucht, ob ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den aMMP-8-Konzentrationen der Visite 1 (vor Behandlungsbeginn) und den Visiten 2, 3 und 4 bestand. Im OK zeigte sich im Vergleich zwischen V1 und V3 mit $p=0,0804$ eine Tendenz zur Zunahme der aMMP-8-Werte während der Aligner-Behandlung, die im Vergleich zwischen V1 und V4 mit $p=0,0336$ noch deutlicher ausgeprägt war. Im UK wurde nur im Vergleich zwischen V1 und V4 mit $p=0,0763$ ebenfalls eine gewisse Zunahmetendenz erkennbar.

Zusätzlich wurde untersucht, ob im Verlauf der Behandlung ein Unterschied zwischen OK und UK festzustellen ist. Dafür wurde die Differenz der durchschnittlichen aMMP-8 Werte zwischen OK und UK berechnet und mit einem Vorzeichenrangtest auf Signifikanz untersucht. Es zeigten sich mit $p=0,8293$ bei

Visite 1, $p=0,3811$ bei Visite 2, $p=0,8826$ bei Visite 3 und $p=0,1143$ bei Visite 4, an keinem der Untersuchungstermine Hinweise auf Unterschiede der aMMP-8-Werte zwischen OK und UK (Abb. 24).

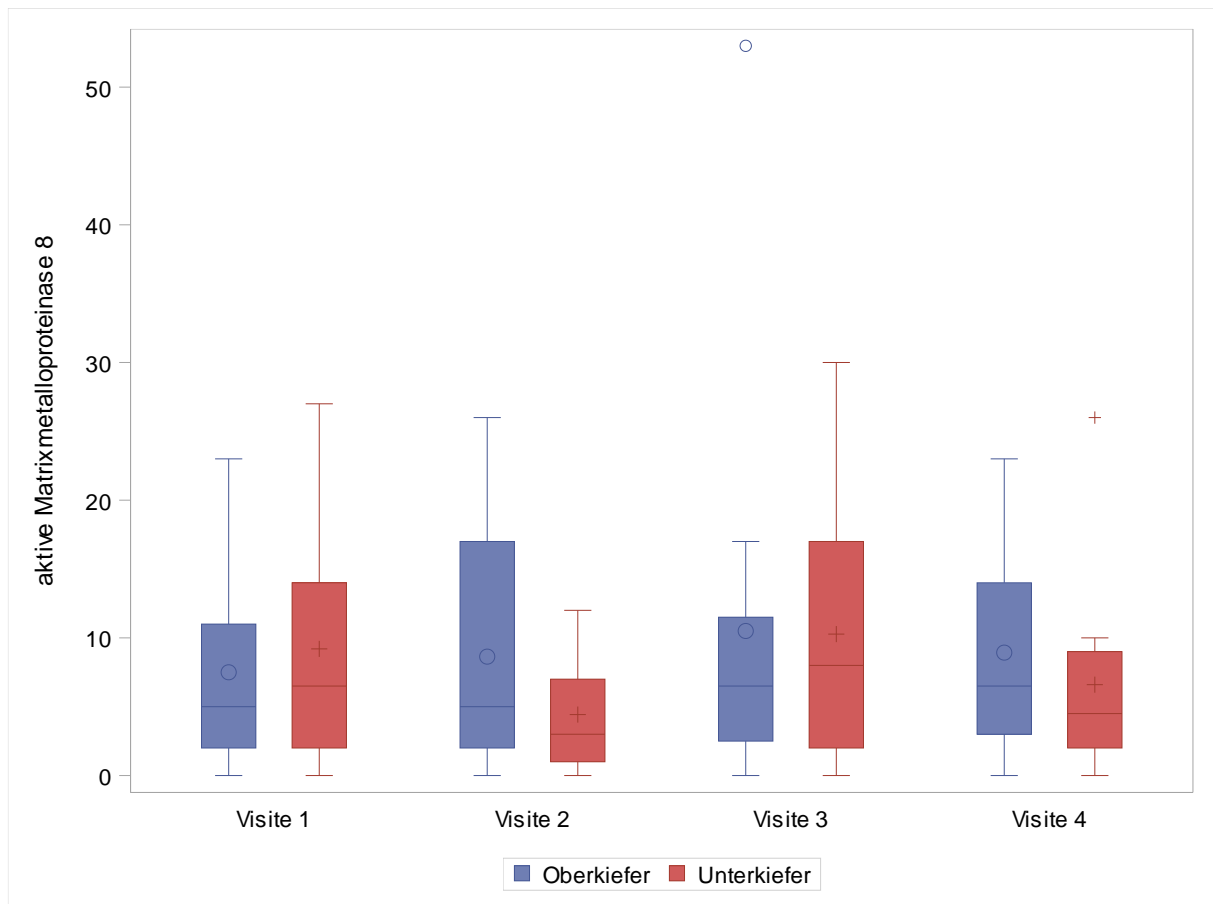


Abbildung 24: Boxplot der aMMP-8-Konzentrationen [ng/ml] unterteilt nach OK und UK sowie nach Visiten 1 bis 4, die zusätzliche Markierung innerhalb der "Box" stellt das arithmetische Mittel dar

4.4.3 Unterscheidung nach Geschlecht

Als nächstes wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen den gemessenen aMMP-8-Werten und dem Geschlecht der Patienten untersucht. Hierzu wurden die Mittelwerte aus OK und UK gebildet und die Maßzahlen für jede Visite nach Geschlecht verglichen (Tab. 3).

Visite	Geschlecht	n	Mittelw.	StdAbw	Min.	Unteres Quartil	Median	Oberes Quartil	Max.
V1	männlich	15	3,8	6,6	0,0	0,0	1,5	5,5	25,0
	weiblich	9	4,7	3,8	0,0	2,0	4,0	6,5	10,0
V2	männlich	15	3,7	4,6	0,0	0,0	2,0	5,5	16,0
	weiblich	9	3,1	5,1	0,0	0,5	1,0	3,5	16,0
V3	männlich	15	8,3	10,6	0,0	1,5	5,5	13,5	41,5
	weiblich	9	4,5	3,5	0,0	1,0	5,0	6,5	10,5
V4	männlich	15	6,5	5,5	0,0	3,5	4,5	8,5	23,5
	weiblich	9	7,3	5,7	0,1	3,5	5,0	13,5	16,5

Tabelle 3: Übersicht der aMMP-8-Konzentrationen in ng/ml im Vergleich nach Geschlecht bei Visiten 1 bis 4

Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test zeigt mit $p=0,2008$ bei Visite 1, $p=0,7780$ bei Visite 2, $p=0,5087$ bei Visite 3 und $p=0,7806$ bei Visite 4 keine Hinweise auf Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Patienten in Bezug auf die aMMP-8-Konzentrationen.

4.5 Zusammenhang von aMMP-8 und IL-1-Polymorphismus

Zur Untersuchung eines möglichen Zusammenhanges zwischen den Genotypen des IL-1-Polymorphismus und den aMMP-8-Konzentrationen wurden zu jedem Zeitpunkt der Mittelwert der aMMP-8-Konzentrationen von OK und UK gebildet und die Häufigkeiten in Bezug auf die Genotypen 1 bis 4 analysiert. Da es keine Hinweise auf Unterschiede zwischen OK und UK sowie zwischen den Geschlechtern gab, wurden diese Merkmale hier nicht weiter berücksichtigt.

Vor Behandlungsbeginn (V1) betrug der Mittelwert der aMMP-8-Konzentrationen 4,0 ng/ml bei Patienten mit Genotyp 1, 2,1 ng/ml bei Genotyp 2, 3,0 ng/ml bei Genotyp 3 und 6,7 ng/ml bei Genotyp 4. Der Median betrug bei den Genotypen 1 und 4 jeweils 3,5 ng/ml und bei den Patienten mit Genotyp 2 und 3 jeweils 0 ng/ml (Abb. 25).

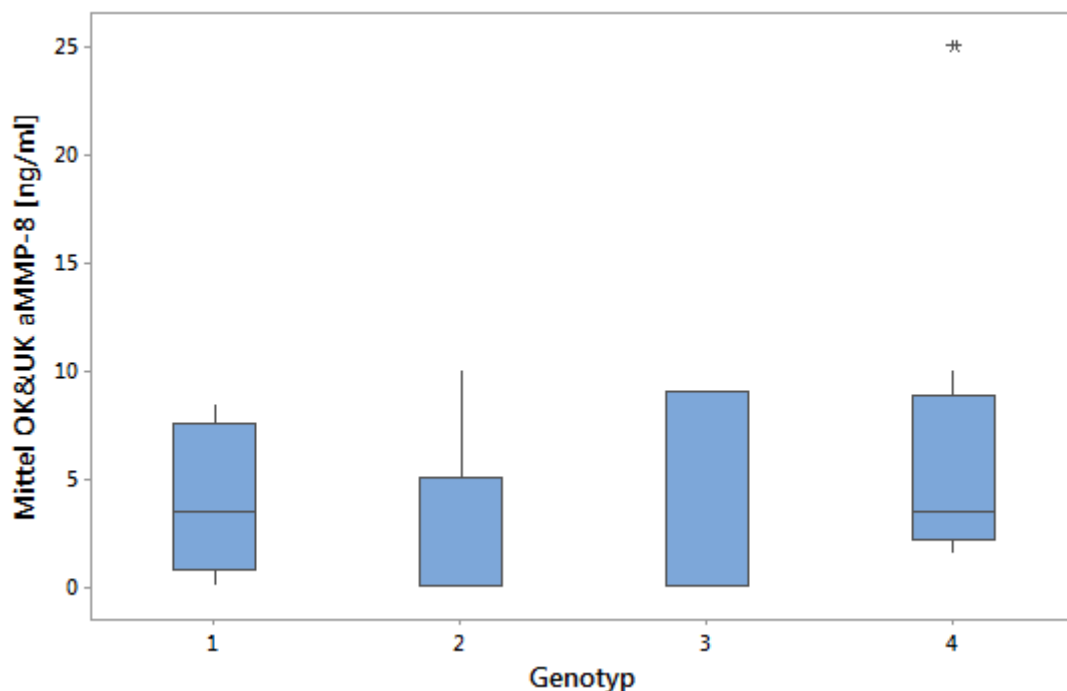


Abbildung 25: Boxplot der aMMP-8-Werte (Mittelwert von OK und UK) unterschieden nach den Genotypen 1 bis 4 bei Visite 1

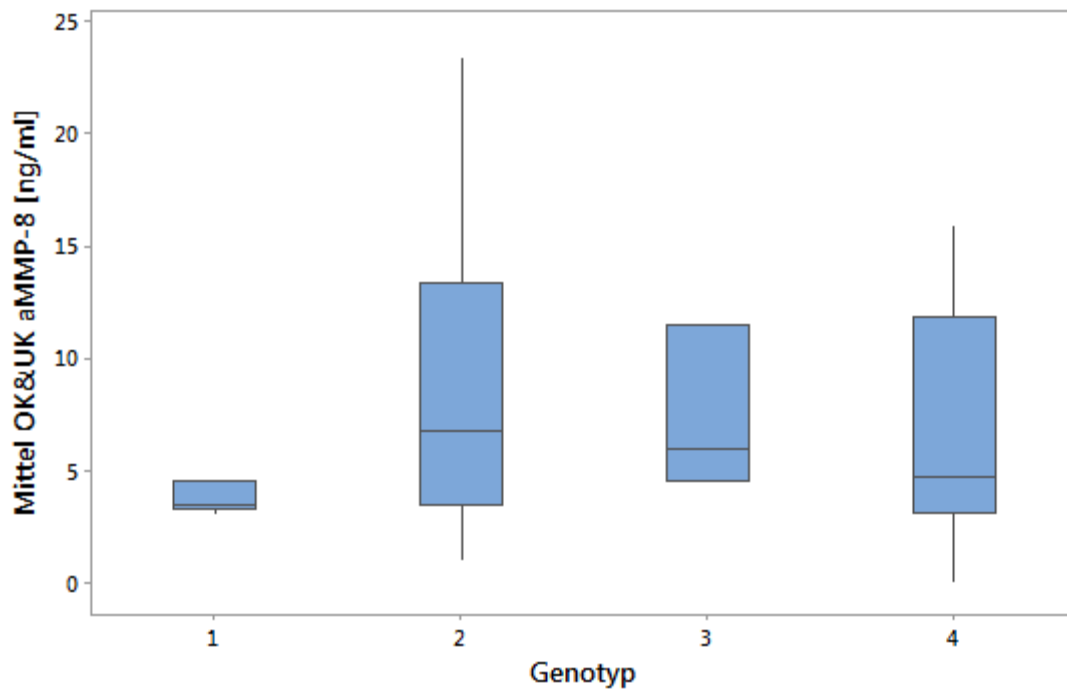


Abbildung 26: Boxplot der aMMP-8-Werte (Mittelwert von OK und UK) unterschieden nach den Genotypen 1 bis 4 bei Visite 4

Da mit dem Vorzeichenrangtest zwischen V1 (vor Behandlungsbeginn) und V4 (letzter Untersuchungstermin nach 6 Monaten) Hinweise auf Vermehrung von aMMP-8 festgestellt wurden (Kap. 4.4.1), wurden auch die aMMP-8-Konzentrationen während der Aligner-Behandlung (Invisalign® Teen) differenziert nach Genotypen zum Zeitpunkt von V4 analysiert (Abb. 26).

Beim Genotyp 1 blieb der Median der aMMP-8-Konzentration unverändert bei 3,5 ng/ml. Auch der Mittelwert blieb fast unverändert. Interessanterweise sank die Standardabweichung sogar von 3,5 ng/ml auf 0,7 ng/ml (Tab. 4).

Auch die Ergebnisse von Genotyp 4 zeigen, dass zwar schon bei V1 im Vergleich zu den anderen Genotypen ein relativ hoher Mittelwert vorlag, dieser sich aber bis V4 praktisch nicht verändert hat. Der Median stieg von 3,5 ng/ml nur auf 4,8 ng/ml an.

Anders war der Verlauf bei Patienten mit Genotyp 2 und 3. Hier stiegen die Medianwerte von jeweils 0 ng/ml bei Visite 1 auf 6,8 ng/ml (Genotyp 2) bzw. 6,0 ng/ml (Genotyp 3) bis Visite 4. Die gleiche Tendenz zeigt auch ein Vergleich der Mittelwerte.

aMMP-8 in ng/ml		Genotyp 1	Genotyp 2	Genotyp 3	Genotyp 4
Visite 1	Median	3,5	0,0	0,0	3,5
	Mittelwert	4,0	2,1	3,0	6,7
	StdAbw	3,5	3,9	5,2	7,9
Visite 4	Median	3,5	6,8	6,0	4,8
	Mittelwert	3,8	8,8	7,3	6,6
	StdAbw	0,7	7,3	3,7	5,5

Tabelle 4: Übersicht der aMMP-8-Konzentrationen im Vergleich von V1 und V4 für die Genotypen 1 bis 4

4.6 Bewertung der tatsächlichen Entzündungsneigung

Da für den klinischen Alltag die eigentliche Bewertung einer Entzündungsneigung während der Behandlung mit Alignern (Invisalign® Teen) besonders interessant ist, wurden die Ergebnisse der aMMP-8-Werte noch einmal in Bezug auf eine tatsächliche Entzündung untersucht. aMMP-8-Werte unter 8 ng/ml wurden als „niedriger Bereich, gesund, nicht entzündet“ definiert, Werte ≥ 8 ng/ml als „entzündliches Geschehen im Entnahmebereich“. Dabei wurden Werte zwischen 8 und 20 ng/ml als „geringgradig entzündet“ und Werte ≥ 20 ng/ml als „akutes Entzündungsgeschehen“ definiert [81]. Es wurden die Häufigkeiten für jede Visite analysiert. Dabei wurden aufgrund der relativ kleinen Stichprobe von 24 Patienten die Ergebnisse nicht in Prozent angegeben, sondern die Anzahl.

Bei Visite 1 hatten insgesamt lediglich fünf Patienten einen aMMP-8-Wert ≥ 8 ng/ml. Dabei war jeder Genotyp vertreten. Von dieser Gruppe hatte nur ein einziger Patient (Genotyp 4) einen Wert von ≥ 20 ng/ml. Bei diesem Patienten sanken die aMMP-8-Werte zu Visite 2 allerdings deutlich ab und blieben bis V4 auch weiterhin unter dem Grenzwert von 20 ng/ml (Abb. 27).

Zur Visite 2 sanken wie oben beschrieben die aMMP-8-Werte etwas ab, was sich auch in dem tatsächlichen Entzündungsgeschehen widerspiegelt. Bei 4 Patienten wurden Werte von ≥ 8 ng/ml, aber weniger als 20 ng/ml gemessen. Davon hatte ein Patient Genotyp 1 und drei Genotyp 2.

Bei Visite 3 stieg die Anzahl der Patienten mit Werten ≥ 8 ng/ml auf 7 Patienten. Die Genotypen waren hier wieder alle vertreten (Genotyp 1: 2; Genotyp 2: 1; Genotyp 3: 1; Genotyp 4: 3). Der Patient mit Genotyp 2 lag allerdings auch über 20 ng/ml und hatte somit ein „akutes Entzündungsgeschehen“.

Bei Visite 4 lagen alle Patienten mit Genotyp 1 deutlich unter dem Grenzwert von 8 ng/ml. Von den restlichen Genotypen hatten 7 einen Wert ≥ 8 ng/ml. Besonders in der Gruppe mit Genotyp 2 stieg die Anzahl auf 4 Patienten (Genotyp 3: 1; Genotyp 4: 2). Der Patient mit Genotyp 2, der schon bei Visite 3 über 20 ng/ml lag, hatte auch bei V4 noch Werte über 20 ng/ml.

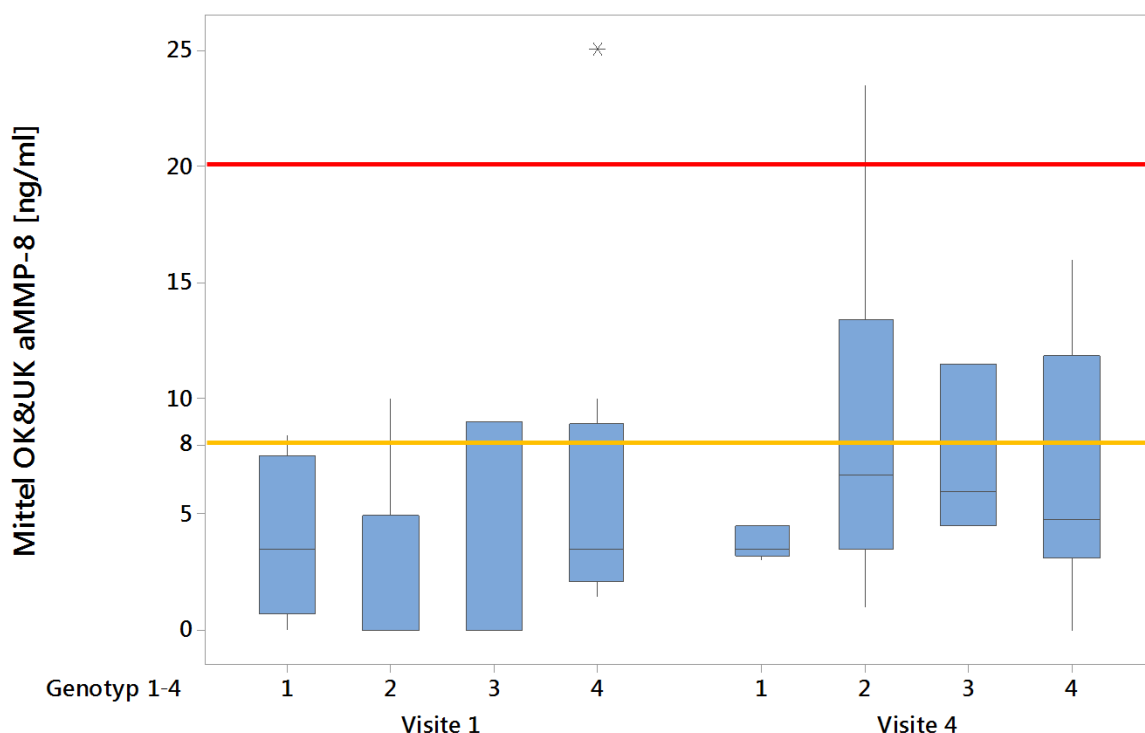


Abbildung 27: Boxplot der aMMP-8-Werte (Mittelwert von OK und UK) unterschieden nach den Genotypen 1 bis 4 bei den Visiten 1 und 4 mit Markierungen der Grenzwerte von 8 ng/ml (gelb) und 20 ng/ml (rot)

5 Diskussion

5.1 Methodendiskussion

5.1.1 Patienten

Es wurden 24 jugendliche Patienten begleitend zu ihrer kieferorthopädischen Behandlung mit Alignern (Invisalign® Teen) untersucht. Auch wenn diese Kollektivgröße relativ klein erscheint, ist sie mit anderen Aligner-Studien, die sich mit parodontalen Veränderungen während der Behandlung mit Alignern (Invisalign®) beschäftigt haben, gut vergleichbar, da auch dort Patientenzahlen zwischen 10 und 50 Invisalign®-Patienten untersucht wurden [6, 14, 16, 17, 22, 23, 26, 89]. Das Alter der Patienten zu Behandlungsbeginn (11,2 bis 17Jahre) entsprach genau der Zielsetzung, ein junges Kollektiv zu untersuchen. Durch die klaren Ausschlusskriterien von Allgemeinerkrankungen, Syndromen und Schwangerschaft wurde sichergestellt, dass bekannte Faktoren, die parodontale Erkrankungen beeinflussen können [20, 82] in dieser Untersuchungsgruppe nicht vorhanden waren, so dass nur gesunde und parodontal nicht vorbehandelte Patienten in die Studie mit eingeschlossen wurden. Alle vier Genotypen des IL-1-Polymorphismus waren im Patientenkollektiv vertreten und kamen jeweils mindestens dreimal vor. Es war kein Unterschied in der Verteilung der Genotypen in Bezug auf die Geschlechter erkennbar.

5.1.2 Studienablauf

Die Patienten wurden zu vier Zeitpunkten untersucht und Proben genommen. Die erste Visite wurde vor Therapiebeginn durchgeführt. Das Untersuchungsergebnis stellt somit den Zustand vor Behandlungsbeginn dar. Im Anschluss an die Probenahme und eine professionelle Zahnreinigung bekamen die Patienten ihre ersten Aligner-Paare. In einigen bisherigen Studien wurde der parodontale Zustand vor der Behandlung nicht miteinbezogen, sondern die ersten Untersuchungen fanden erst nach mindestens 6 Monaten der Behandlung statt, wodurch kein Vergleich zu einem „neutralen“ Zustand möglich war. Diese Studien hatten sich vorrangig auf den Vergleich von Alignern (Invisalign®) mit festsitzenden Apparaturen während der Behandlungen konzentriert [16, 17, 23].

Die zweite Visite fand nach 4 Wochen statt. In diesen 4 Wochen hatten die Patienten die Möglichkeit, sich mit zwei Aligner-Paaren (jeweils zwei Wochen Tragezeit ohne Attachments) erst einmal an die Behandlung zu gewöhnen. So konnte untersucht werden, ob schon nach einer so kurzen Zeit erste Veränderungen sichtbar werden. Auch Levrini et al. untersuchten in zwei Studien die Veränderungen des parodontalen Zustandes ihrer Aligner-Patienten (Invisalign®) im ersten Monat der Behandlung [26, 89]. Nach der zweiten Visite wurden im Anschluss wieder eine professionelle Zahnreinigung durchgeführt und dann die Attachments geklebt.

Nach weiteren 6 Wochen (10 Wochen nach Erhalten der ersten Aligner) wurde die dritte Visite durchgeführt. Im Nachhinein zeigte sich, dass diese Visite die einzige war, die im Median vom Terminplan abwich, d.h. nicht nach 10 sondern erst nach 11 Wochen durchgeführt wurde. Durch diese leichte Verschiebung des Untersuchungszeitpunktes ist jedoch die Vergleichbarkeit mit anderen Studien sogar noch besser gegeben. So untersuchten Abbate et al. [14] und Tuncay et al. [6] ihre jugendlichen Patienten erst wieder etwa 3 Monate nach Behandlungsbeginn und Levrini et al. wiederholten ebenfalls ihre Untersuchungen nach 3 Monaten und schlossen damit ihre Studien ab [26, 89]. Im Anschluss an die dritte Visite bekamen die Patienten wieder eine professionelle Zahnreinigung.

Die vierte und letzte Visite war 6 Monate nach Erhalten der ersten Aligner. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, um einen möglichst etablierten parodontalen Zustand während der Behandlung beurteilen zu können. Die meisten Studien, die sich mit dem parodontalen Zustand während einer Behandlung mit Alignern (Invisalign®) bis jetzt beschäftigt haben, haben auch nach 6 Monaten eine Untersuchung durchgeführt [6, 14, 22] oder aber erst nach mindestens 6 Monaten begonnen [16, 17, 23].

Dadurch, dass nach jeder Visite eine professionelle Zahnreinigung durchgeführt wurde, konnte jeder Abschnitt zwischen den Visiten individuell beurteilt werden und Effekte der Aligner-Behandlung (Invisalign® Teen) so weniger von individueller Zahnhygiene überlagert werden. Außerdem wurde dadurch verhindert, dass im Verlauf der Studie professionelle Zahnreinigungen beim Hauszahnarzt zwischen den Untersuchungsterminen durchgeführt wurden. Dies wurde auch bei jeder Visite durch Erfragung kontrolliert. Abbate et al. [14] beurteilten diese Vorgehensweise bei Alstadt und Zachrisson in ihrer 1979 veröffentlichten Studie [90] eher als Nachteil, da dies

den Effekt der patienteneigenen Hygienesdisziplin reduzieren würde. Alstadt und Zachrisson unterstützten damit aber andererseits vorrangig Patienten, die selber nicht in der Lage waren, eine ausreichende Mundhygiene durchzuführen. Abbate et al. sowie auch Levrini et al. führten bei allen Patienten lediglich einen Monat vor Studienbeginn einmalig eine professionelle Zahnreinigung durch [14, 26, 89].

Auch wenn der zeitliche Rahmen dieser Studie als umfangreich und genau betrachtet werden kann, wäre es auch interessant zu untersuchen, wie sich die Situation in der gesamten Behandlungszeit der Aligner-Therapie (Invisalign® Teen) von etwa 1,5 Jahren und auch in der Zeit nach Behandlungsende entwickelt.

5.1.3 Untersuchungsmethoden

Zur Untersuchung der parodontalen Markerkeime sowie der aMMP-8-Konzentrationen wurde Sulkusflüssigkeit („gingival crevicular fluid“ = GCF) aus dem Sulkus mit Papierspitzen (Markerkeime) und Papierstreifen (aMMP-8) gesammelt. Die Sulkusflüssigkeit eignet sich besonders für die Untersuchung von Biomarkern parodontaler Erkrankungen, da sie als Flüssigkeit direkt am parodontalen Gewebe liegt und Substanzen vom Wirt sowie aus Mikroorganismen aus der Plaque beinhaltet [91]. Es ist eine etablierte und nicht-invasive Methode, um den parodontalen Zustand zu beurteilen [25, 80].

Für die Untersuchung parodontaler Markerkeime gibt es zwei verschiedene Hauptmethoden, um die Bakterien aus Zahnfleischtaschen zu gewinnen: entweder durch die hier angewendete Adsorption auf Papierspitzen oder alternativ durch Abtragen von Plaque mit Küretten [69]. Beide Tests ergeben unterschiedliche Ergebnisse, da mit Küretten die gesamte Plaque entnommen wird, mit Papierspitzen aber vorwiegend die gewebezerstörenden pathogenen Bakterien aus den äußeren Schichten des Biofilms aufgenommen werden [69, 92]. Da in der vorliegenden Studie besonders die parodontalpathogenen Keime untersucht wurden, ist die Entnahme mit sterilen Papierspitzen als sinnvoller zu betrachten.

Die Laboranalyse der Markerkeime mit Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) und anschließender Hybridisierung ist eine gängige und sehr sensitive Methode, die nicht nur alle 11 Parodontitis assoziierten Keime gleichzeitig bestimmen kann, sondern auch eine quantitative Aussage ergibt [69, 71].

Alternativen wie z.B. das Anlegen von mikrobiologischen Kulturen haben höhere Detektionsgrenzen der Bakterien, sind teurer und dauern deutlich länger [69].

Die aMMP-8-Konzentration kann entweder in der Sulkusflüssigkeit durch Entnahme mit sterilen Papierstreifen oder im Speichel gemessen werden. Die Entnahme von Speichelproben ist zwar einfacher und schneller, dafür kann aber nicht der genaue Ort der Entzündungsaktivität bestimmt werden. Die Diagnostik aus der Sulkusflüssigkeit ist dagegen sensitiver und es kann zwischen OK und UK unterschieden werden [24, 28].

Die Analyse mit Enzymimmunoassay (enzyme-linked immunosorbent assay = ELISA) ist ein Standardverfahren mit einer sehr niedrigen Detektionsgrenze von 1 ng/ml. Sie ist kostengünstig, muss aber in einem externen Labor durchgeführt werden [24, 28, 69]. Mittlerweile gibt es auch ein „Chair-side“-Testverfahren, das vor Ort durchgeführt werden kann, dessen Detektionsgrenze aber bei 25 ng/ml liegt [93].

Repräsentativ für das gesamte Gebiss wurden die Proben an den sogenannten Ramfjord-Zähnen entnommen. Diese Zähne haben sich für die Beurteilung des Verlaufes parodontaler Veränderungen in longitudinalen Studien als aussagkräftig bewährt [94]. Die Proben wurden als Poolproben zusammengefasst und ermöglichen somit eine repräsentative Übersicht unterteilt nach OK und UK [81]. In bisherigen Studien zur Untersuchung von parodontalen Markerkeimen während Aligner-Behandlungen (Invisalign®- bzw Invisalign® Teen) mit GCF-Proben wurden nur an zwei Zähnen Proben genommen [14, 26, 89]. Umso mehr Probenstellen pro Patient verwendet werden, desto repräsentativer ist aber das Ergebnis [69].

Zur Bestimmung der Genotypen des IL-1-Polymorphismus wurde bei jedem Patienten ein Wangenabstrich durchgeführt. Alternativ können auch Blut- oder Speichelproben verwendet werden [95]. Auf Grund der einfachen Durchführbarkeit und unkomplizierten Versandes wurde der Abstrich gewählt. Auch hier wurde als Analysemethode eine PCR mit anschließender Hybridisierung angewendet [85]. Das PCR-Verfahren gilt dabei als Standardverfahren; in der Literatur wurde im Anschluss häufig anstatt einer Hybridisierung auch eine Gelelektrophorese angewendet [84, 86, 95].

5.2 Ergebnisdiskussion

5.2.1 Markerkeime

Das Auftreten der 11 Parodontitis-assoziierten Markerkeime wurde zu allen vier Visiten im Verlauf der Aligner-Behandlung (Invisalign® Teen) untersucht. Dabei wurden alle 11 Markerkeime einzeln betrachtet und es wurde nach OK und UK unterschieden.

5.2.1.1 *A. actinomycetemcomitans und roter Komplex*

Es stellte sich heraus, dass *A. actinomycetemcomitans* sowie der gesamte rote Komplex, bestehend aus *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola*, fast gar nicht auftraten. Nur bei wenigen Patienten wurden diese Keime vereinzelt festgestellt, waren aber im Verlauf der Behandlung auch nicht dauerhaft vorhanden. Dabei waren weder eine Häufung zu Behandlungsbeginn oder während der Folgetermine noch ein Unterscheid zwischen OK und UK erkennbar.

A. actinomycetemcomitans und die Bakterien des roten Komplexes gelten als sehr stark pathogen und führen zu intensiver Gewebedestruktion [77-79]. Sie treten v.a. bei fortgeschrittenen parodontalen Erkrankungen (chronischer Parodontitis), sowie bei früher aggressiver Parodontitis auf [96]. Die vorliegenden Ergebnisse geben keinen Hinweis darauf, dass diese Markerkeime während der ersten sechs Monate einer Aligner-Behandlung (Invisalign® Teen) auftreten. Sie können zwar unabhängig von der kieferorthopädischen Behandlung bei Jugendlichen durchaus vorkommen, die Ergebnisse weisen aber darauf hin, dass sie nicht mit einer Aligner-Behandlung (Invisalign® Teen) assoziierbar sind.

Dieses Ergebnis bestätigt bisherige Studien. Abbate et al. untersuchten in ihrer 2015 veröffentlichten Studie mit jeweils 25 jugendlichen Aligner (Invisalign®)- und Bracket-Patienten alle Patienten auf die Markerkeime *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* und *T. forsythia* aus dem roten Komplex sowie *P. intermedia* aus dem orangenen Komplex. GCF-Proben wurden vor Behandlungsbeginn sowie nach 3, 6 und 12 Monaten an zwei Zähnen im OK (16 und 21) durchgeführt. Auch dort zeigte sich, dass bei keinem einzigen der jugendlichen Aligner- bzw. Bracket-Patienten, auch nach 12 Monaten, diese Keime auftraten [14]. Levrini et al. veröffentlichten im

selben Jahr eine Studie mit insg. 77 Patienten (Aligner (Invisalign®), Brackets und Kontrollgruppe), in der sie die Patienten auf dieselben vier Markerkeime vor Behandlungsbeginn, nach einem Monat und nach 3 Monaten untersuchten. Sie entnahmen ebenfalls die Proben an den Zähnen 16 und 21. Auch bei ihnen war kein einziger Test bei den 32 Aligner-Patienten positiv. Nur bei einem Patienten mit festsitzender Apparatur war nach einem Monat und nach 3 Monaten die Probe auf *A. actinomycetemcomitans* positiv [26]. 2013 verglichen Karkhanechi et al. mit einem „Chair-side“-Test Plaqueproben, die mit Küretten bei erwachsenen Aligner (Invisalign®)- und Bracket-Patienten entnommen wurden [22]. Dieser so genannte BANA-Test (N-Benzoyl-DL-arginin-naphthylamid) erkennt Bakterien, die ein Trypsin-ähnliches Enzym aufweisen wie *T. forsythia*, *T. denticola* und *P. gingivalis* (roter Komplex). Dabei kann der Test nicht zwischen den drei Markerkeimen unterscheiden und keine Konzentrationen angeben sowie keine anderen Mikroorganismen nachweisen [69]. Es stellte sich heraus, dass vor Behandlungsbeginn und nach 6 Wochen keine Unterschiede zwischen den zwei Gruppen erkennbar waren. Nach 6 und 12 Monaten waren die Werte bei den Patienten mit festsitzenden Apparaturen deutlich höher als bei den Aligner-Patienten (Invisalign®), der Unterschied erreichte aber keine statistische Signifikanz [22].

5.2.1.2 Grüner Komplex

Aus dem grünen Komplex wurden die Markerkeime *Eikenella corrodens* und *Capnocytophaga spp.* untersucht. Sie traten zwar deutlich häufiger und in höherer Konzentration als die Keime des roten Komplexes auf, da aber Zu- und Abnahmen insgesamt im Verlauf von Visite 1 bis 4 sehr ausgeglichen waren, konnte keine Tendenz festgestellt werden. Damit ist trotz des vermehrten Auftretens auch kein Zusammenhang mit der Behandlung mit Aligner (Invisalign® Teen) erkennbar.

Die Bakterien des grünen Komplexes sind zwar nur schwach pathogen, da sie aber als Frühkolonisierer die Grundlage für weitere Besiedlungen durch stärker pathogene Bakterien schaffen, sollten sie trotzdem beachtet werden [76, 77]. Bei der Literaturrecherche wurde jedoch keine Veröffentlichung gefunden, in der der grüne Komplex im Zusammenhang mit einer Aligner-Behandlung (Invisalign®) untersucht wurde. Ein Grund dafür mag auch sein, dass über das allgemeine Vorhandensein der Keime hinaus keine Veränderungstendenz beobachtet werden konnte.

5.2.1.3 Oranger und orange-assoziierter Komplex

Der orange Komplex, bestehend aus *P. intermedia*, *P. micra* und *Fusobacterium spp.*, und der orange-assozierte Komplex, bestehend aus *E. nodatum* sowie *C. rectus*, werden in der Literatur nicht immer eindeutig unterschieden, sondern häufig zusammengefasst [72].

E. nodatum konnte in der gesamten Studie kein einziges Mal nachgewiesen werden.

C. rectus, *P. intermedia* und *P. micra* traten zwar vermehrt auf, es waren aber zu keinem Zeitpunkt deutliche Zu- oder Abnahmen im Verlauf der Aligner-Behandlung (Invisalign® Teen) erkennbar.

Lediglich bei *Fusobacterium spp.*, das bei allen Patienten mit zum Teil hohen Werten gefunden wurde, war trotz sehr großer Streuung der Daten und Veränderungen im Verlauf der Visiten bei den einzelnen Patienten eine gewisse Tendenz der Vermehrung, insbesondere bei den Proben im UK, im Behandlungsverlauf festzustellen. *Fusobacterium spp.* gilt als Indikator für die Mundhygiene und kann auch bei gesunden Patienten nachgewiesen werden [76]. Insgesamt betrachtet war aber bei *Fusobacterium spp.* kein signifikanter Konzentrationsanstieg während der Aligner-Behandlung (Invisalign® Teen) statistisch belegbar.

Auch hier wurden keine bisherigen Studien gefunden, die sich mit den Keimen des orangenen bzw. orange-assozierten Komplexes während Behandlungen mit Alignern (Invisalign® bzw. Invisalign® Teen) beschäftigt haben.

Studien, die Veränderungen parodontaler Markerkeime während kieferorthopädischen Behandlungen mit festsitzenden Apparaturen untersucht haben, stellten fest, dass nach Insertion der Apparaturen sich das subgingivale Ökosystem deutlich verändert und Anstiege von *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *Fusobacterium spp.* und besonders *P. intermedia* zu verzeichnen waren [97-100]. Gründe dafür schienen nach subgingival reichende Bänder und eine vermehrte Plaqueanlagerung zu sein [98, 99]. Auch wenn die Werte im Verlauf der Behandlung teilweise wieder absanken und kein erhöhtes Risiko auf destruktive parodontale Erkrankungen bestand, betonten die Autoren die Wichtigkeit einer intensiven Mundhygieneinstruktion, -remotivation und -kontrolle während kieferorthopädischer

Behandlungen [97-100]. Auch die Verwendung orthodontischer Bänder sollte bei Patienten mit parodontalen Vorerkrankungen kritisch betrachtet werden [101].

Da bei der Behandlung mit Alignern (Invisalign® bzw. Invisalign® Teen) während der gesamten Zeit die Mundhygiene uneingeschränkt möglich ist [16, 22, 23, 37, 47, 48] und die Patienten nachgewiesen geringere Plaqueanlagerungen aufweisen als Patienten mit festsitzenden Apparaturen [14, 16, 17, 22, 23, 26], ist zu vermuten, dass eine solche Veränderung der subgingivalen Bakterienkonzentrationen bei Aligner-Patienten (Invisalign® Teen) erst gar nicht auftritt. Dies bestätigt auch die Erkenntnis, dass das allgemeine Risiko einer parodontalen Erkrankung geringer sein sollte als bei festsitzenden Apparaturen [14, 23]. Trotzdem sollte auch bei Aligner-Patienten (Invisalign® Teen) eine regelmäßige Mundhygieneinstruktion und professionelle Zahnreinigung durchgeführt werden.

5.2.2 aMMP-8

Die Messung der aMMP-8-Konzentrationen aus der Sulkusflüssigkeit ist eine gängige Methode, um ein parodontales Entzündungsgeschehen frühzeitig zu diagnostizieren und einzuschätzen, bevor bleibende Schäden entstehen können [24, 25, 27, 28]. Daher wurden in der vorliegenden Studie die Konzentrationen vor Behandlungsbeginn und während der ersten 6 Monate der Aligner-Behandlung (Invisalign® Teen) analysiert. Bisher wurde dieses Verfahren bei Aligner-Behandlungen (Invisalign®- oder Invisalign® Teen) noch nicht angewendet.

Es zeigte sich, dass aMMP-8 aufgrund seiner Genauigkeit und geringen Streuung im Gegensatz zu den parodontalen Markerkeimen einen sinnvollen Parameter zur Beobachtung entzündlicher Veränderungen während einer Aligner-Behandlung (Invisalign® Teen) darstellt. Auch wenn eine sehr genaue Analyse der aMMP-8-Konzentrationen nur im Labor möglich ist, bietet sich diese vor allem auch objektive Methode besonders für Studien an, in denen der Verlauf von entzündlichen Prozessen dokumentiert werden soll [24, 28].

Unterschiede in den aMMP-8-Konzentrationen zwischen OK und UK sowie den Geschlechtern konnten innerhalb des Untersuchungszeitraumes nicht festgestellt werden.

Insgesamt wurde ein signifikanter Anstieg der aMMP-8-Konzentrationen während der Aligner-Behandlung (Invisalign® Teen) festgestellt. In den ersten vier Wochen nach Erhalten der ersten Aligner blieben die aMMP-8-Konzentrationen im Vergleich zu den Werten vor Behandlungsbeginn relativ konstant und sanken sogar minimal. Zur Visite 3 stiegen dann die Konzentrationen deutlich an. Bis Visite 4 blieben die Werte relativ konstant, der Unterschied zu Visite 1 wurde aber erst hier signifikant. Dies könnte durch die geringere Standardabweichung erklärt werden. Auch wenn eine deutliche Steigerung der Werte über die Zeit erkennbar war, blieben die Mittelwerte die gesamte Zeit unter dem Schwellenwert von 8 ng/ml, der den Übergang von gesundem zu entzündlichem Geschehen definiert [81]. Ein entzündliches Geschehen im Entnahmbereich konnte nur bei ein paar Patienten festgestellt werden, dabei hatten fast alle Patienten nur eine geringgradige Entzündung. Nur zwei Patienten hatten zeitweilig ein akutes Entzündungsgeschehen (≥ 20 ng/ml). Daraus kann geschlossen werden, dass zwar die Entzündungsneigung während einer Behandlung mit Alignern (Invisalign® Teen) an sich etwas ansteigt, aber nicht unbedingt zu einer parodontalen Entzündung führt.

Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von Tuncay et al., die gingivale Entzündungen bei Jugendlichen während der gesamten Behandlungszeit mit Alignern (Invisalign® Teen) mit Gingiva-Blutungsindex untersuchten und maximal eine leichte Papillenblutung feststellten [6]. Abbate et al. sowie Karkhanechi et al. stellten sogar eine leichte Abnahme der gingivalen Blutungsneigung im Verlauf der Behandlung fest [14, 22].

Die einzigen bisherigen Veröffentlichungen zu Untersuchungen von aMMP-8-Konzentrationen während kieferorthopädischer Behandlungen haben sich mit festsitzenden Apparaturen beschäftigt. In einigen Studien wurde ein deutlicher Anstieg der Konzentrationen initial nach Aktivierung der Apparaturen vermerkt [102, 103], in anderen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden [104-106]. Alle Studien untersuchten aber nur die Anfangsphase der kieferorthopädischen Behandlungen bis maximal einen Monat nach Behandlungsbeginn, teilweise sogar nur die ersten Stunden, da sie vor allem die Wirkung kieferorthopädischer Kräfte auf die aMMP-8-Konzentrationen in der Sulkusflüssigkeit interessierte. Die Entwicklung anderer Faktoren über einen längeren Zeitraum wurde dabei nicht untersucht.

5.2.3 Zusammenhang zwischen Entzündungsneigung und IL-1-Polymorphismus

Da sich die Messung der aMMP-8-Konzentrationen als aussagekräftige Methode zur Untersuchung der Entzündungsneigung erwiesen hat, wurde des Weiteren analysiert, ob ein Zusammenhang zwischen den aMMP-8-Konzentrationen und den Genotypen des IL-1-Polymorphismus der Patienten besteht. Verschiedene Studien haben bereits gezeigt, dass durch Polymorphismen in den Genen des Interleukin-1 Patienten unterschiedlich stark auf entzündliches Geschehen reagieren [30, 32, 84].

Aus den verschiedenen Allel-Kombinationen der Polymorphismen des IL-1A, IL1-B und IL-1RN ergeben sich vier verschiedene Genotypen, durch die die Patienten zur Risikobeurteilung auf parodontale Erkrankungen in 4 entsprechende Gruppen unterteilt werden können [87]. Daher wurde für jeden Patienten das individuelle Risiko anhand des Genotyps bestimmt. Da bei der Auswertung der aMMP-8-Konzentrationen keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern sowie zwischen OK und UK festgestellt werden konnten, wurde hier dementsprechend auch nicht unterteilt und es wurden die Mittelwerte aus OK und UK gebildet, um die durchschnittliche Entzündungsneigung pro Patient zu beurteilen. Im Verlauf der Behandlung war im Vergleich zur Ausgangssituation nach sechs Monaten (Visite 4) eine signifikante Erhöhung der aMMP-8-Werte sichtbar, daher wurden insbesondere die Daten der Visiten 1 und 4 miteinander verglichen.

Es ist aber zu beachten, dass durch die Teilung des Patientenkollektives in vier Gruppen dementsprechend nur wenige Patienten jeweils einen Genotyp repräsentieren. So war z.B. der Genotyp 3 nur durch drei Patienten vertreten. Daher kann der Zusammenhang zwischen Genotyp und aMMP-8-Konzentrationen auch nur qualitativ, ohne Angabe von statistischen p-Werten betrachtet werden. Und obwohl die aMMP-8-Konzentrationen insgesamt sehr gering waren und nur vereinzelt für entzündliche Bereiche typische Werte gemessen wurden, konnten trotzdem Unterschiede in den Genotypen festgestellt werden.

Es zeigte sich, dass zu Behandlungsbeginn alle Patienten relativ niedrige aMMP-8-Werte aufwiesen. Bei den fünf Patienten, die eine leichte Entzündung aufwiesen, waren alle vier Genotypen vertreten.

Bei den Patienten mit Genotyp 1 veränderten sich die aMMP-8-Konzentrationen im Verlauf der Aligner-Behandlung (Invisalign® Teen) bis Visite 4 im Mittel fast gar nicht.

Ein Patient hatte zur Visite 2 und zwei Patienten zu Visite 3 eine geringgradige Entzündung (≥ 8 ng/ml). Interessant ist, dass die Streuung stark abnahm und alle Patienten mit Genotyp 1 bei Visite 4 deutlich unter der Entzündungsschwelle von 8 ng/ml lagen. Dies entspricht der Definition von Genotyp 1, dass durch eine normal ausgeprägte Produktion von IL-1 und IL-1RN kein erhöhtes Parodontitisrisiko besteht und die Patienten normal auf entzündliche Veränderungen reagieren [87].

Patienten mit Genotyp 4 haben zwar eine normale Produktion an IL-1, aber eine verminderte genetische Entzündungshemmung durch eine erniedrigte Produktion des IL-1-Rezeptorantagonisten [87]. Die aMMP-8-Konzentrationen waren bei diesen Patienten bei Visite 1 im Vergleich zu den anderen Genotypen schon relativ hoch und bei einem Patienten wurde ein akutes entzündliches Geschehen (≥ 20 ng/ml) gemessen. Auch nach 6 Monaten Behandlungszeit blieben die Werte relativ konstant und waren nur im Median leicht angestiegen. Während bei Visite 2 bei keinem der acht Patienten mit Genotyp 4 ein Entzündungsgeschehen diagnostiziert werden konnte, lagen drei Patienten bei Visite 3 und zwei bei Visite 4 über dem Schwellenwert von 8 ng/ml.

Ein anderes Ergebnis zeigte sich bei den Patienten mit Genotyp 2 und 3. Sie hatten zu Behandlungsbeginn die niedrigsten aMMP-8-Konzentrationen mit einem Median von 0 ng/ml. Beide Genotypen zeigten im Verlauf der Aligner-Behandlung (Invisalign® Teen) bis zur vierten Visite den stärksten Anstieg der aMMP-8-Konzentrationen. Beide Genotypen sind charakterisiert durch eine erhöhte Produktion von Interleukin-1. Dadurch haben Patienten mit Genotyp 2 eine stärkere Entzündungsreaktion. Patienten mit Genotyp 3 haben sogar ein sehr stark erhöhtes Entzündungsrisiko, da zusätzlich noch die Produktion des IL-1-Rezeptorantagonisten verringert ist [87]. In der vorliegenden Studie hatten zur zweiten Visite drei Patienten mit Genotyp 2 ein leichtes Entzündungsgeschehen. Bei einem Patienten wurde ab Visite 3 eine akute Entzündung diagnostiziert, die auch noch drei Monate später bei Visite 4 vorhanden war. Zur Visite 4 hatten noch 3 weitere Patienten mit Genotyp 2 eine geringgradige Entzündung. Auch wenn Patienten mit Genotyp 3 ein genetisch sehr stark erhöhtes Entzündungsrisiko haben, hatte von den Aligner-Patienten (Invisalign® Teen) mit diesem Genotyp nur ein Patient zu Visite 3 kurzzeitig ein geringgradiges Entzündungsgeschehen und ein anderer zur Visite 4.

Trotz der durch die Unterteilung entstandenen sehr kleinen Gruppen lässt sich vermuten, dass durch die Bestimmung der Genotypen der Patienten eine gewisse Vorhersage über das Entzündungsrisiko und -verhalten während einer Aligner-Behandlung (Invisalign® Teen) und vielleicht auch bei anderen kieferorthopädischen Behandlungen getroffen werden kann. Es wäre interessant zu sehen, ob bei einer Unterteilung nach Genotypen bei Patienten mit festsitzenden Apparaturen noch deutlichere Unterschiede in Bezug auf parodontale Veränderungen zu erkennen sind. Eine derartige Untersuchung ist bisher nicht bekannt. Iwasaki et al. stellten jedoch bereits fest, dass IL-1-Polymorphismen durch die unterschiedlich starke Ausprägung von IL-1 und IL-1RN Einfluss auf die Geschwindigkeit von kieferorthopädischen Zahnbewegungen haben und somit diese je nach Genotyp unterschiedlich ausfallen [107].

Durch eine Genotyp-Bestimmung vor Behandlungsbeginn eröffnet sich somit eine viel genauere Einschätzung der einzelnen Patienten bezüglich ihrer genetischen Prädisposition. So könnten eventuell Patienten mit erhöhtem Risiko schon vor Behandlungsbeginn individuell motiviert werden, regelmäßige Kontrollen und Mundhygieneunterstützungen in Form von Zahnreinigungen in Anspruch zu nehmen. Trotzdem sollte aber bei allen Patienten weiterhin eine Kontrolle der Mundhygiene und der parodontalen Gesundheit beibehalten werden, da diese ein Zusammenspiel von vielen Faktoren und das genetische Risiko nur ein Faktor von vielen ist [29, 30]. Des Weiteren eröffnet sich mit der Bestimmung von Genotypen alleine oder auch in Kombination mit der Untersuchung der aMMP-8-Konzentrationen eine weitere interessante Untersuchungsmethode, um in zukünftigen Studien noch genauer die Patientenkollektive und Ihre Reaktionen auf kieferorthopädische Behandlungen untersuchen zu können.

6 Zusammenfassung

Die Studie umfasste insgesamt 24 Patienten im Alter von 11 bis 17 Jahren, die mit Alignern (Invisalign® Teen) behandelt wurden. Vor Behandlungsbeginn, nach 4 und 10 Wochen sowie nach 6 Monaten wurden Proben der gingivalen Sulkusflüssigkeit entnommen und auf die 11 Parodontitis-assoziierten Markerkeime untersucht sowie die Konzentration der aktiven Matrixmetalloproteinase-8 (aMMP-8) gemessen.

Im Einklang mit bisherigen Studien wurde festgestellt, dass *A. actinomycetemcomitans* und die Keime des roten Komplexes sehr selten auftraten und somit nicht mit einer Aligner-Behandlung (Invisalign® Teen) assoziiert werden können. Die Entwicklung von Bakterien des orangenen, orange-assoziierten und grünen Komplexes war bisher im Zusammenhang mit Aligner-Behandlungen (Invisalign®- und Invisalign® Teen) noch nicht untersucht worden. Der schwach pathogene grüne Komplex, der als Frühkolonisierer die Basis für mögliche später auftretende, stärker pathogene Keime schafft, zeigte in dieser Studie keine Tendenz der Zu- oder Abnahme mit Alignern (Invisalign® Teen). Anders als bei Studien mit festsitzenden Apparaturen, bei denen ein deutlicher Anstieg nach Insertion festgestellt worden war, konnte auch beim orangenen und orange-assoziierten Komplex kein statistisch signifikanter Anstieg der Bakterienkonzentration festgestellt werden. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass Aligner herausgenommen werden können und somit die Mundhygiene uneingeschränkt möglich ist. Dadurch konnte eine vermehrte Plaqueablagerung, die zur Ansiedlung parodontalpathogener Bakterien führt, vermieden werden. Zusammengefasst ergaben die Analysen keine erhöhte Anzahl von parodontalpathogenen Markerkeimen in den ersten sechs Monaten der Aligner-Behandlung (Invisalign® Teen) und bestätigten somit, dass kein erhöhtes Risiko für parodontale Erkrankungen besteht.

Als wesentlich sensitiver erwies sich die Messung der aMMP-8-Konzentrationen aus der Sulkusflüssigkeit. Obwohl dies eine gängige, objektive Methode ist, um parodontale Entzündungsgeschehen frühzeitig, d.h. noch bevor bleibende Schäden entstehen können, zu diagnostizieren, wurde sie bisher noch nicht auf Aligner (Invisalign®- oder Invisalign® Teen) angewandt. In dieser Untersuchung konnte ein deutlicher Anstieg innerhalb der ersten 10 Wochen festgestellt werden, der bis zur vierten Visite nach 6 Monaten signifikant wurde. Dabei blieben die Mittelwerte aber insgesamt unter dem Schwellenwert von 8 ng/ml, der den Übergang zu einem

entzündlichen Geschehen definiert. Lediglich zwei Patienten hatten zeitweilig ein akutes Entzündungsgeschehen (aMMP-8-Konzentration ≥ 20 ng/ml), so dass daraus geschlossen werden kann, dass zwar die Entzündungsneigung während einer Aligner-Behandlung (Invisalign® Teen) steigt, dies aber nicht ursächlich zu einer parodontalen Entzündung führt.

Unterschiede in der Entzündungsneigung zwischen OK und UK sowie zwischen männlichen und weiblichen Patienten konnten anhand der Messung der aMMP-8-Konzentration nicht festgestellt werden.

Andererseits wurden bei der Unterteilung des Patientenkollektivs in 4 Genotypen anhand verschiedener Allel-Kombinationen der Polymorphismen des IL-1A, IL-1B und IL-1RN deutliche Unterschiede festgestellt. Alle Patienten mit Genotyp 1 (normale Produktion von IL-1 und IL-1RN) lagen nach 6 Monaten Behandlung mit Alignern (Invisalign® Teen) deutlich unter der Entzündungsschwelle von 8 ng/ml. Patienten mit Genotyp 4 (verminderte genetische Entzündungshemmung durch erniedrigte Produktion von IL-1RN) wiesen bereits vor Behandlungsbeginn relativ hohe aMMP-8-Konzentrationen auf, die aber im weiteren Verlauf relativ konstant blieben bzw. nur im Median minimal anstiegen. Dagegen hatten Patienten vom Genotyp 2 (stärkere Entzündungsreaktion durch erhöhte IL-1-Produktion) und Genotyp 3 (sehr stark erhöhtes Entzündungsrisiko durch erhöhte IL-1- und erniedrigte IL-1RN-Produktion) zwar vor Behandlungsbeginn von allen Gruppen im Mittel die niedrigsten aMMP-8-Konzentrationen, diese stiegen jedoch bis zur Visite 4 nach 6 Monaten Behandlungszeit am stärksten an, was auch dem erhöhten Entzündungsrisiko entspricht.

Aus diesen Ergebnissen erschließt sich die Möglichkeit, bereits vor Behandlungsbeginn die einzelnen Patienten viel genauer einschätzen zu können und eventuell Patienten mit erhöhtem genetischen Entzündungsrisiko individuell unterstützen zu können. Des Weiteren eröffnet sich mit der Bestimmung von Genotypen alleine oder auch in Kombination mit der Messung der aMMP-8-Konzentrationen eine aussagekräftige Methode, um in zukünftigen Studien noch differenzierter die Patientenkollektive und ihre Reaktionen auf kieferorthopädische Behandlungen untersuchen zu können.

7 Literaturverzeichnis

1. Meier B, Wiemer KB, Miethke RR. Invisalign--patient profiling. Analysis of a prospective survey. *J Orofac Orthop.* 2003;64(5):352-8.
2. Cooper-Kazaz R, Ivgi I, Canetti L, Bachar E, Tsur B, Chaushu S, et al. The impact of personality on adult patients' adjustability to orthodontic appliances. *The Angle orthodontist.* 2013;83(1):76-82.
3. Shalish M, Cooper-Kazaz R, Ivgi I, Canetti L, Tsur B, Bachar E, et al. Adult patients' adjustability to orthodontic appliances. Part I: a comparison between Labial, Lingual, and Invisalign. *Eur J Orthod.* 2012;34(6):724-30.
4. Schott TC, Göz G. Young Patients' Attitudes toward Removable Appliance Wear Times, Wear-time Instructions and Electronic Wear-time Measurements – Results of a Questionnaire Study. *Journal of Orofacial Orthopedics / Fortschritte der Kieferorthopädie.* 2010;71(2):108-16.
5. Melkos AB. Advances in digital technology and orthodontics: a reference to the Invisalign method. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research.* 2005;11(5):Pi39-42.
6. Tuncay O, Bowman S, Amy B, Nicozisis J. Aligner treatment in the teenage patient. *J Clin Orthod.* 2013;47(2):115-9.
7. Walton DK, Fields HW, Johnston WM, Rosenstiel SF, Firestone AR, Christensen JC. Orthodontic appliance preferences of children and adolescents. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics.* 2010;138(6):698. e1-
. e12.
8. Brachwitz J. MR. Die Entwicklungsgeschichte von Align Technology Kieferorthopädisches Sonderheft Invisalign: Quintessenz; 2001 [Available from: <https://qos.quintessenz.de/index.php?doc=html&abstractID=13180>].
9. Wong BH. Invisalign A to Z. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2002;121(5):540-1.

10. Erbe C, Schmitt V, Krieger E, Wehrbein H. Invisalign®-Behandlung im Frontzahnbereich 2013 [updated 19.4.2018. Available from: <https://www.zm-online.de/archiv/2013/17/zahnmedizin/invisalignr-behandlung-im-frontzahnbereich/>].
11. Drechsler T. Möglichkeiten und Grenzen der kieferorthopädischen Erwachsenenbehandlung mit wenig sichtbaren Therapiemitteln. Quintessenz. 2017;68 (2017), Nr. 5:515-23.
12. Christensen GJ. Orthodontics and the general practitioner. The Journal of the American Dental Association.133(3):369-71.
13. Align Technology 2018 [Available from: <http://www.aligntech.com/>].
14. Abbate GM, Caria MP, Montanari P, Mannu C, Orru G, Caprioglio A, et al. Periodontal health in teenagers treated with removable aligners and fixed orthodontic appliances. J Orofac Orthop. 2015;76(3):240-50.
15. Schaefer I, Braumann B. Halitosis, oral health and quality of life during treatment with Invisalign((R)) and the effect of a low-dose chlorhexidine solution. J Orofac Orthop. 2010;71(6):430-41.
16. Miethke RR, Vogt S. A comparison of the periodontal health of patients during treatment with the Invisalign system and with fixed orthodontic appliances. J Orofac Orthop. 2005;66(3):219-29.
17. Azaripour A, Weusmann J, Mahmoodi B, Peppas D, Gerhold-Ay A, Van Noorden CJ, et al. Braces versus Invisalign(R): gingival parameters and patients' satisfaction during treatment: a cross-sectional study. BMC Oral Health. 2015;15:69.
18. KZBV B. Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V)–Kurzfassung. 1. Auflage, August. 2016.
19. Brauckhoff G, Kocher T, Holtfreter B, Bernhardt O, Splieth C, Biffar R, et al. Gesundheitsberichterstattung des Bundes Heft 47. Robert Koch-Institut, Berlin. 2009.
20. Kasaj A, Willershausen B. Parodontalerkrankungen bei Kindern und JugendlichenPeriodontal diseases in children and adolescents. Monatsschrift Kinderheilkunde. 2013;161(6):518-23.

21. Kahl-Nieke B. Optimaler Zeitpunkt für die Durchführung kieferorthopädischer Maßnahmen (unter besonderer Berücksichtigung der kieferorthopädischen Frühbehandlung). Überarbeitete Stellungnahme der DGKFO April 2010 [Available from: https://www.dgkfo-vorstand.de/fileadmin/redaktion/veroeffentlichungen/Stellungnahme_Behandlungsbeginn.pdf].
22. Karkhanechi M, Chow D, Sipkin J, Sherman D, Boylan RJ, Norman RG, et al. Periodontal status of adult patients treated with fixed buccal appliances and removable aligners over one year of active orthodontic therapy. *The Angle orthodontist*. 2013;83(1):146-51.
23. Miethke RR, Brauner K. A Comparison of the periodontal health of patients during treatment with the Invisalign system and with fixed lingual appliances. *J Orofac Orthop*. 2007;68(3):223-31.
24. Ehlers V, Netuschil L, Willershausen B, Arweiler N. Frühdiagnostik parodontaler Erkrankungen. Entzündungsaktivität zeitgemäß erkennen CME-Fortbildung. *Der Freie Zahnarzt* 2011; 01: 1-8 Springer Medizin.
25. Kinney JS, Ramseier CA, Giannobile WV. Oral fluid-based biomarkers of alveolar bone loss in periodontitis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1098(1):230-51.
26. Levrini L, Mangano A, Montanari P, Margherini S, Caprioglio A, Abbate GM. Periodontal health status in patients treated with the Invisalign((R)) system and fixed orthodontic appliances: A 3 months clinical and microbiological evaluation. *European journal of dentistry*. 2015;9(3):404-10.
27. Ehlers V, Kasaj A, Willershausen B. MMP-8-Messung als erweiterte Diagnostik in der modernen Parodontaltherapie. *ZWR-Das Deutsche Zahnärzteblatt*. 2008;117(07/08):370-4.
28. de Morais EF, Pinheiro JC, Leite RB, Santos PPA, Barboza CAG, Freitas RA. Matrix metalloproteinase-8 levels in periodontal disease patients: A systematic review. *Journal of periodontal research*. 2017.

29. da Silva MK, de Carvalho ACG, Alves EHP, da Silva FRP, Pessoa LDS, Vasconcelos DFP. Genetic Factors and the Risk of Periodontitis Development: Findings from a Systematic Review Composed of 13 Studies of Meta-Analysis with 71,531 Participants. *International journal of dentistry*. 2017;2017:1914073.
30. Lang NP, Tonetti MS, Suter J, Sorrell J, Duff GW, Kornman KS. Effect of interleukin-1 gene polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population. *Journal of periodontal research*. 2000;35(2):102-7.
31. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology* 2000. 1997;14(1):33-53.
32. Laine M, Farre M, Garcia-González M, Van Dijk L, Ham A, Winkel E, et al. Polymorphisms of the interleukin-1 gene family, oral microbial pathogens, and smoking in adult periodontitis. *Journal of dental research*. 2001;80(8):1695-9.
33. Kesling HD. The philosophy of the tooth positioning appliance. *American Journal of Orthodontics and Oral Surgery*. 1945;31(6):297-304.
34. Weir T. Clear aligners in orthodontic treatment. *Australian dental journal*. 2017;62 Suppl 1:58-62.
35. Gierie WV. Clear aligner therapy: An overview. *J Clin Orthod*. 2018;52(12):665-74.
36. Schupp W, Haubrich J. Möglichkeiten und Grenzen der Invisalign-Behandlung. *Quintessenz*. 2010;61(8):951-62.
37. Göz G. Stellungnahme der DGKFO zur Behandlung mit Alignern Stand Januar 2010 [Available from: https://www.dgkfo-vorstand.de/fileadmin/redaktion/veroeffentlichungen/Stellungnahme_Aligner.pdf].
38. Phan X, Ling PH. Clinical limitations of Invisalign. *Journal (Canadian Dental Association)*. 2007;73(3):263-6.
39. Technology A. The Invisalign system: © 2019 Align Technology, Inc; 2019 [Available from: <https://www.aligntech.com/solutions>].

40. Rossini G, Parrini S, Castroflorio T, Deregibus A, Debernardi CL. Efficacy of clear aligners in controlling orthodontic tooth movement: a systematic review. *The Angle orthodontist*. 2015;85(5):881-9.
41. Gu J, Tang JS, Skulski B, Fields HW, Jr., Beck FM, Firestone AR, et al. Evaluation of Invisalign treatment effectiveness and efficiency compared with conventional fixed appliances using the Peer Assessment Rating index. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2017;151(2):259-66.
42. White DW, Julien KC, Jacob H, Campbell PM, Buschang PH. Discomfort associated with Invisalign and traditional brackets: A randomized, prospective trial. *The Angle orthodontist*. 2017.
43. Fujiyama K, Honjo T, Suzuki M, Matsuoka S, Deguchi T. Analysis of pain level in cases treated with Invisalign aligner: comparison with fixed edgewise appliance therapy. *Prog Orthod*. 2014;15:64.
44. Miller KB, McGorray SP, Womack R, Quintero JC, Perelmuter M, Gibson J, et al. A comparison of treatment impacts between Invisalign aligner and fixed appliance therapy during the first week of treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2007;131(3):302.e1-9.
45. Nedwed V, Miethke RR. Motivation, acceptance and problems of invisalign patients. *J Orofac Orthop*. 2005;66(2):162-73.
46. Fonseca LM, Araujo TM, Santos AR, Faber J. Impact of metal and ceramic fixed orthodontic appliances on judgments of beauty and other face-related attributes. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2014;145(2):203-6.
47. Boyd RL, Waskalic V. Three-dimensional diagnosis and orthodontic treatment of complex malocclusions with the invisalign appliance. *Seminars in Orthodontics*. 2001;7(4):274-93.
48. Barlattani A, Jr., Mampieri G, Ottria L, Bollero P. Invisalign treatment in periodontal patient: case report. *Oral Implantol (Rome)*. 2009;2(4):35-9.
49. Scheurer PA, Firestone AR, Burgin WB. Perception of pain as a result of orthodontic treatment with fixed appliances. *Eur J Orthod*. 1996;18(4):349-57.

50. Kvam E, Gjerdet NR, Bondevik O. Traumatic ulcers and pain during orthodontic treatment. *Community dentistry and oral epidemiology*. 1987;15(2):104-7.
51. Serogl HG, Klages U, Zentner A. Pain and discomfort during orthodontic treatment: causative factors and effects on compliance. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1998;114(6):684-91.
52. Krukemeyer AM, Arruda AO, Inglehart MR. Pain and orthodontic treatment. *The Angle orthodontist*. 2009;79(6):1175-81.
53. Kuhlman DC, Lima TA, Duplat CB, Capelli JJ. Esthetic perception of orthodontic appliances by Brazilian children and adolescents. *Dental press journal of orthodontics*. 2016;21(5):58-66.
54. Harnick DJ. invisalign Correction of a teenager's Class 2 division 1 malocclusion. *the Journal*.1(01).
55. Chazalon J-F. INVISALIGN for adolescents: an alternative to multibracket attachments? Illustrated treatment of a clinical case, *J Dentofac Anom Orthod*. 2013;16:406-14.
56. Boyd RL, Miller R, Vlaskalic V. The Invisalign system in adult orthodontics: mild crowding and space closure cases. *Journal of Clinical Orthodontics*. 2000;34(4):203-12.
57. AlignTechnology. Invisalign für Ihren Teenager 2018 [Available from: <https://www.invisalign.de/de/what-is-invisalign/Pages/Teen-Braces.aspx>].
58. Abolfathi A, Chen JC, Li C, Tricca RE, Wu BM. Systems and methods for dental appliance compliance indication. Google Patents; 2009.
59. Tuncay OC, Bowman S, Nicozisis JL, Amy BD. Effectiveness of a compliance indicator for clear aligners. *J Clin Orthod*. 2009;43(4):263-8.
60. Schott TC, Goz G. Color fading of the blue compliance indicator encapsulated in removable clear Invisalign Teen(R) aligners. *The Angle orthodontist*. 2011;81(2):185-91.

61. Levrini L, Tettamanti L, Macchi A, Tagliabue A, Caprioglio A. Invisalign teen for thumb-sucking management. A case report. *European journal of paediatric dentistry : official journal of European Academy of Paediatric Dentistry*. 2012;13(2):155-8.
62. Brown DF, Moerenhout RG. The pain experience and psychological adjustment to orthodontic treatment of preadolescents, adolescents, and adults. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1991;100(4):349-56.
63. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of bacteriology*. 2001;183(12):3770-83.
64. Hellwig E, Klimek J, Attin T. Einführung in die Zahnerhaltung: Deutscher Ärzteverlag; 2009.
65. Heidemann D. Parodontologie: Elsevier GmbH Deutschland; 2005.
66. Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *Journal of periodontology*. 1965;36(3):177-87.
67. Loesche WJ. Bacterial mediators in periodontal disease. *Clinical infectious diseases*. 1993;16(Supplement_4):S203-S10.
68. Van Winkelhoff A, Loos B, Van Der Reijden W, Van Der Velden U. Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *Journal of clinical periodontology*. 2002;29(11):1023-8.
69. Loomer PM. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 2004;34(1):49-56.
70. Christersson LA, Zambon JJ, Genco RJ. Dental bacterial plaques. *Journal of clinical periodontology*. 1991;18(6):441-6.
71. Chipron GmbH. Bedienungsanleitung LCD-Array Kit BAC-Dent 2.4 DNA-basiertes Nachweissystem für 11 Parodontitis-assoziierte Markerkeime. GER2013.

72. Socransky S, Haffajee A, Cugini M, Smith C, Kent R. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology*. 1998;25(2):134-44.
73. Ezzo PJ, Cutler CW. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2003;32(1):24-35.
74. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 1994;5(1):78-111.
75. HainLifescienceGmbH. Parodontitsbakterien micro-IDent 2018 [Available from: <https://www.micro-ident.de/zahnaerzte/parodontitis/risikofaktor-bakterien/parodontitsbakterien/>].
76. Bioscientia. Ergebnisbögen Test auf 11 Parodontitis spez. Erreger. Bioscientia Institut für Medizinische Diagnostik GmbH.
77. Dombrowa S. 5 oder 11 Markerkeime? 2007 [Available from: <http://heicodent.ch/wp-content/uploads/micro-IDent-5-oder-11-Markerkeime.pdf>].
78. Henderson B, Wilson M, Sharp L, Ward JM. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of medical microbiology*. 2002;51(12):1013-20.
79. Gazi M, Cox S, Clark D, Eley B. Characterization of protease activities in *Capnocytophaga* spp., *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella* spp., *Treponema denticola* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Molecular Oral Microbiology*. 1997;12(4):240-8.
80. Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontology 2000*. 2003;31(1):77-104.
81. dentognosticsGmbHJena. Gebrauchsanleitung dentoELISA aMMP-8 Version 09. 2012.
82. Ehlers V KA, Prescher N, Willershausen B. MMP-8-Messung bei Patienten mit chronischer Parodontitis und Schwangerschaftsgingivitis 2008 [Available from: https://www.zahnheilkunde.de/beitragpdf/pdf_5721.pdf].

83. Jacobs C, Walter C, Ziebart T, Grimm S, Meila D, Krieger E, et al. Induction of IL-6 and MMP-8 in human periodontal fibroblasts by static tensile strain. *Clinical oral investigations*. 2014;18(3):901-8.
84. Kornman KS, Crane A, Wang HY, Giovine FSd, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*. 1997;24(1):72-7.
85. HainLifescienceGmbH. GenoType L 1 VER 10 Arbeitsanleitung. 2015.
86. Parkhill JM, Hennig BJ, Chapple IL, Heasman PA, Taylor JJ. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with early-onset periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 2000;27(9):682-9.
87. Bioscientia. Laborbefundbogen Parodontitis-Risiko-Test/ GenoType IL-1 Bioscientia Institut für Medizinische Diagnostik GmbH.
88. Rosanbalm S. PharmaSUG 2015 - Paper DV07 Getting Sankey with Bar Charts Shane Rosanbalm, Rho, Inc., Chapel Hill, NC <https://github.com/RhoInc/sas-sankeybarchart>.
89. Levrini L, Abbate GM, Migliori F, Orru G, Sauro S, Caprioglio A. Assessment of the periodontal health status in patients undergoing orthodontic treatment with fixed or removable appliances. A microbiological and preliminary clinical study. 2013.
90. Alstad S, Zachrisson BU. Longitudinal study of periodontal condition associated with orthodontic treatment in adolescents. *American Journal of Orthodontics*. 1979;76(3):277-86.
91. Tsuchida S, Satoh M, Umemura H, Sogawa K, Kawashima Y, Kado S, et al. Proteomic analysis of gingival crevicular fluid for discovery of novel periodontal disease markers. *Proteomics*. 2012;12(13):2190-202.
92. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000*. 2002;28(1):12-55.
93. Borujeni SI, Mayer M, Eickholz P. Activated matrix metalloproteinase-8 in saliva as diagnostic test for periodontal disease? A case–control study. *Medical microbiology and immunology*. 2015;204(6):665-72.

94. Rams TE, Oler J, Listgarten MA, Slots J. Utility of Ramfjord index teeth to assess periodontal disease progression in longitudinal studies. *J Clin Periodontol.* 1993;20(2):147-50.
95. Laine ML, Farré MA, Crusius JBA, van Winkelhoff A-J, Peña AS. The mouthwash: a non-invasive sampling method to study cytokine gene polymorphisms. *Journal of periodontology.* 2000;71(8):1315-8.
96. Khiste SV, Ranganath V, Nichani AS, Rajani V. Critical analysis of biomarkers in the current periodontal practice. *J Indian Soc Periodontol.* 2011;15(2):104-10.
97. Ristic M, Svabic MV, Sasic M, Zelic O. Effects of fixed orthodontic appliances on subgingival microflora. *International Journal of Dental Hygiene.* 2008;6(2):129-36.
98. Naranjo AA, Trivino ML, Jaramillo A, Betancourth M, Botero JE. Changes in the subgingival microbiota and periodontal parameters before and 3 months after bracket placement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006;130(3):275.e17-22.
99. Diamanti-Kipiotti A, Gusberti FA, Lang NP. Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances. *Journal of Clinical Periodontology.* 1987;14(6):326-33.
100. Thornberg MJ, Riolo CS, Bayirli B, Riolo ML, Van Tubergen EA, Kulbersh R. Periodontal pathogen levels in adolescents before, during, and after fixed orthodontic appliance therapy. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics.* 135(1):95-8.
101. Erbe C, Hornikel S, Schmidtman I, Wehrbein H. Quantity and distribution of plaque in orthodontic patients treated with molar bands. *Journal of Orofacial Orthopedics / Fortschritte der Kieferorthopädie.* 2011;72(1):13-20.
102. Ingman T, Apajalahti S, Mantyla P, Savolainen P, Sorsa T. Matrix metalloproteinase-1 and -8 in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: a pilot study during 1 month of follow-up after fixed appliance activation. *Eur J Orthod.* 2005;27(2):202-7.
103. Apajalahti S, Sorsa T, Railavo S, Ingman T. The in vivo levels of matrix metalloproteinase-1 and -8 in gingival crevicular fluid during initial orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2003;82(12):1018-22.

104. Almeida RC, Capelli J, Jr., Teles RP. Levels of gingival crevicular fluid matrix metalloproteinases in periodontally compromised teeth under orthodontic forces. *The Angle orthodontist*. 2015;85(6):1009-14.
105. Canavarro C, Teles RP, Capelli Junior J. Matrix metalloproteinases -1, -2, -3, -7, -8, -12, and -13 in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: a longitudinal randomized split-mouth study. *Eur J Orthod*. 2013;35(5):652-8.
106. Bildt MM, Bloemen M, Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod*. 2009;31(5):529-35.
107. Iwasaki LR, Chandler JR, Marx DB, Pandey JP, Nickel JC. IL-1 gene polymorphisms, secretion in gingival crevicular fluid, and speed of human orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res*. 2009;12(2):129-40.

Anhang

Tabelle 5: Übersichtstabelle der Konzentrationen der 11 Parodontitis assoziierten Markerkeime unterteilt nach OK und UK sowie Visiten 1 bis 4

Die Konzentrationen wurden in 5 diskrete Stufen unterteilt. Die Stufe „geringe Keimkonzentration“ trat kein einziges Mal auf und wurde daher in der Tabelle nicht berücksichtigt. Die Häufigkeiten wurden jeweils in Anzahl N der Probanden und in Prozent angegeben.

			Keimkonzentration							
			Keim nicht nachgewiesen		Erhöhte Keimkonzentration		Stark erhöhte Keimkonzentration		Sehr stark erhöhte Keimkonzentration	
			N	%	N	%	N	%	N	%
Bakterium	Kiefer	Visite								
A. actinomycetemcomitans	OK	Visite 1	24	100
		Visite 2	24	100
		Visite 3	23	96	1	4
		Visite 4	23	96	1	4
	UK	Visite 1	23	96	.	.	1	4	.	.
		Visite 2	21	91	2	9
		Visite 3	23	96	1	4
		Visite 4	24	100
Porphyromonas gingivalis	OK	Visite 1	24	100
		Visite 2	23	96	1	4
		Visite 3	24	100
		Visite 4	24	100
	UK	Visite 1	23	96	1	4
		Visite 2	23	100
		Visite 3	24	100
		Visite 4	24	100
Tannarella forsythia	OK	Visite 1	24	100
		Visite 2	24	100
		Visite 3	24	100
		Visite 4	24	100
	UK	Visite 1	22	92	1	4	.	.	1	4
		Visite 2	23	100
		Visite 3	22	92	1	4	.	.	1	4
		Visite 4	24	100
Treponema denticola	OK	Visite 1	24	100
		Visite 2	24	100
		Visite 3	24	100
		Visite 4	24	100
	UK	Visite 1	23	96	.	.	1	4	.	.
		Visite 2	23	100
		Visite 3	24	100
		Visite 4	23	96	1	4
Prevotella intermedia	OK	Visite 1	24	100
		Visite 2	23	96	.	.	1	4	.	.
		Visite 3	22	92	2	8
		Visite 4	23	96	1	4
	UK	Visite 1	24	100
		Visite 2	22	96	1	4

			Keimkonzentration							
			Keim nicht nachgewiesen		Erhöhte Keimkonzentration		Stark erhöhte Keimkonzentration		Sehr stark erhöhte Keimkonzentration	
			N	%	N	%	N	%	N	%
Parvimonas micra	OK	Visite 3	20	83	2	8	.	.	2	8
		Visite 4	21	88	1	4	1	4	1	4
	OK	Visite 1	21	88	3	13
		Visite 2	20	83	3	13	.	.	1	4
		Visite 3	22	92	1	4	1	4	.	.
		Visite 4	17	71	6	25	1	4	.	.
	UK	Visite 1	21	88	2	8	1	4	.	.
		Visite 2	22	96	1	4
		Visite 3	21	88	2	8	1	4	.	.
		Visite 4	21	88	3	13
Fusobacterium spp.	OK	Visite 1	5	21	8	33	5	21	6	25
		Visite 2	3	13	7	29	4	17	10	42
		Visite 3	5	21	11	46	2	8	6	25
		Visite 4	5	21	6	25	5	21	8	33
	UK	Visite 1	4	17	8	33	9	38	3	13
		Visite 2	3	13	4	17	8	35	8	35
		Visite 3	1	4	9	38	7	29	7	29
		Visite 4	2	8	6	25	5	21	11	46
Campylobacter rectus	OK	Visite 1	14	58	6	25	4	17	.	.
		Visite 2	13	54	6	25	4	17	1	4
		Visite 3	15	63	6	25	2	8	1	4
		Visite 4	15	63	5	21	4	17	.	.
	UK	Visite 1	13	54	7	29	3	13	1	4
		Visite 2	14	61	6	26	1	4	2	9
		Visite 3	10	42	12	50	2	8	.	.
		Visite 4	12	50	6	25	5	21	1	4
Eubacterium nodatum	OK	Visite 1	24	100
		Visite 2	24	100
		Visite 3	24	100
		Visite 4	24	100
	UK	Visite 1	24	100
		Visite 2	23	100
		Visite 3	24	100
		Visite 4	24	100
Eikenella corrodens	OK	Visite 1	14	58	6	25	2	8	2	8
		Visite 2	11	46	11	46	2	8	.	.
		Visite 3	14	58	8	33	2	8	.	.
		Visite 4	14	58	9	38	1	4	.	.
	UK	Visite 1	14	58	10	42
		Visite 2	16	70	5	22	2	9	.	.
		Visite 3	13	54	9	38	2	8	.	.
		Visite 4	16	67	7	29	1	4	.	.
Capnocytophaga spp.	OK	Visite 1	9	38	5	21	2	8	8	33
		Visite 2	4	17	5	21	5	21	10	42
		Visite 3	6	25	6	25	8	33	4	17
		Visite 4	7	29	9	38	4	17	4	17
	UK	Visite 1	5	21	11	46	4	17	4	17
		Visite 2	7	30	4	17	6	26	6	26
		Visite 3	4	17	10	42	3	13	7	29
		Visite 4	5	21	11	46	4	17	4	17

Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Heinrich Wehrbein danke ich für die Ermöglichung dieser klinischen Studie sowie der Promotion und das große entgegengebrachte Vertrauen.

Besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Christina Erbe für die Möglichkeit, an einer so interessanten Studie mitarbeiten zu dürfen, für die spannende Themenstellung sowie die stetige Unterstützung und Betreuung.

..... danke ich für die Erstellung des 2. Gutachtens.

Dr. Thomas Drechsler und seinem Team danke ich für die herzliche Aufnahme in seiner Praxis, das Anwerben und Bereitstellen vieler Studienpatienten sowie die tatkräftige und verständnisvolle Unterstützung während der Studiendurchführung. Vielen Dank auch für die Zurverfügungstellung des Bildmaterials.

Des Weiteren danke ich Dr. Irene Schmidtmann vom Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) für ihre kompetente Beratung und Unterstützung bei der statistischen Datenanalyse.

Mein besonderer Dank gilt Philipp-Jan Hofman, ohne dessen herausragende und zeitintensive Mitarbeit die gesamte Studie nicht möglich gewesen wäre. Vielen Dank für die unermüdliche und unkomplizierte kollegiale Zusammenarbeit!

Mareike Sauer und Nicklas Mainka danke ich für die Unterstützung und Weiterführung der Studie.

Priscila Ferrari Peron danke ich für das Einarbeiten in die Untersuchungsmethoden und Probenahmen sowie die Koordination in der Klinik und Hilfe vor Ort.

Meinem Freund Simon danke ich für sein umfangreiches Verständnis während jeder Phase des Studiums und der Promotion sowie der liebevollen Rückendeckung.

Abschließend möchte ich meinen Eltern danken, die mir das Studium und die Promotion überhaupt ermöglicht haben. Vielen Dank für die unzähligen Gespräche, Motivationen und uneingeschränkte Unterstützung zu jedem Zeitpunkt. Ohne euch wäre das alles niemals möglich gewesen!