

Aus der Uniklinik für Radioonkologie mit Poliklinik Tübingen
Abteilung Radioonkologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Bamberg
Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung
Leiter: Professor Dr. H. P. Rodemann

**Zellbiologische Untersuchungen zur Wirksamkeit von bioaktivem
infrarotem Laserlicht auf menschliche Gingiva-Fibroblasten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
Tübingen

vorgelegt

von

Darko Slovska
aus Zagreb/Kroatien

2006

Dekan:
1. Berichterstatter
2. Berichterstatter

Professor Dr. C. D. Claussen
Professor Dr. H. P. Rodemann
Professor Dr. J. Geis-Gerstorfer

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	4
1.1 Hintergrund	4
1.2 Zytokine	5
1.2.1 Interleukin-1 (IL-1)	5
1.2.2 Interleukin-6 (IL-6)	7
1.2.3 Tumor-Necrosis-Faktor- α (TNF- α).....	7
1.3 Wirkung von Laserstrahlung auf Gewebe.....	8
1.4 Das Fibroblastenzellsystem.....	10
1.5 Ziel der Studie	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Zellmaterial	13
2.2 Kulturbedingungen.....	13
2.3 ZellkulturgefäÙe	13
2.4 Medien, Puffer und Lösungen.....	14
2.4.1 Kulturmedium.....	14
2.4.2 Puffer	14
2.4.3 Trypsin-Lösung.....	15
2.4.4 Fixative	15
2.4.5 Färbelösungen.....	15
2.5 Subkultivierung von Massenkulturen	15
2.5.1 Passagieren konfluenter Zellkulturen	16
2.5.2 Mediumwechsel.....	17
2.5.3 Kryokonservierung von Zellen	17
2.5.4 Auftauen tiefgefrorener Zellen	18
2.6 Koloniebildungstest	19
2.6.1 Aussaat eines Koloniebildungstests.....	19
2.7 Bestrahlung	21
2.7.1 Physikalische und technische Parameter des Elektromagnetfeldes	21
2.7.2 Expositionsdauer.....	21
2.7.3 Vorbereitung der Zellen zur Bestrahlung	22
2.7.4 Durchführung der Bestrahlung	23
2.7.5 Ermittlung der Strahlungsinaktivierungskurve	23
2.7.6 Statistische Berechnung.....	23
2.8 Behandlung mit Zytokinen.....	24
2.8.1 Einmalige Behandlung im Koloniebildungstest	24
2.8.2 Einmalige Behandlung in Massenkultur.....	24
2.8.3 Behandlung in Massenkultur und Koloniebildungstest	24
2.9 Chemikalien	25
2.10 Geräte.....	25
2.11 Sonstiges Material.....	26
3 Ergebnisse	27
3.1 Bestrahlung von Gingiva-Fibroblasten mit infrarotem Laserlicht	27
3.1.1 Dosisfindung.....	27
3.1.2 Bestrahlung mit niedrigen Dosen	28
3.2 Behandlung von Gingiva-Fibroblasten mit Zytokinen	29
3.2.1 Einmalige Behandlung im Koloniebildungstest	29
3.2.2 Einmalige Behandlung in der Massenkultur.....	32
3.2.3 Behandlung in Massenkultur und im Koloniebildungstest.....	35
3.2.4 Kombinierte Behandlung von Gingiva-Fibroblasten.....	38
4 Diskussion	40
5 Zusammenfassung	44
6 Literatur	45

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Die marginale Parodontitis gilt als Hauptursache für Zahnverluste im Erwachsenenalter. Als entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates entsteht sie auf der Grundlage von Plaqueanlagerungen, einem Faktor, der als *conditio sine qua non* zu betrachten ist. Die Akkumulation von Plaque bedeutet jedoch nicht zwangsläufig die Entstehung einer Parodontitis; vielmehr reicht das klinische Bild bei vergleichbarer Plaquemenge von völliger Gesundheit über geringe Entzündungszeichen der Gingiva bis hin zu einer schweren Parodontitis mit massivem Knochenabbau (Griffiths et al., 1988; Seymour et al., 1991). Eine etablierte Läsion der Gingiva kann ohne weitere Konsequenzen jahrelang bestehen bleiben oder aber auch in eine Parodontitis übergehen. Es ist jedoch nicht geklärt, welche Faktoren den entscheidenden Zusammenbruch der tieferen knöchernen Parodontalgewebe auslösen, der schließlich zur fortgeschrittenen parodontalen Läsion mit Knochendestruktion, tiefen Taschen und Zahnlockerung führt (Renggli, H.R., 1990).

Bei Gingivitis und Parodontitis handelt es sich um entzündliche Erkrankungen des Zahnhalteapparates. Werden die den Zähnen anhaftenden Bakterien der fakultativ pathogenen Standortflora der Mundhöhle nicht entfernt, so reifen sie im Verlauf von etwa sieben Tagen zunächst supragingival zu einer etablierten Plaque heran, die mit zunehmender Anheftungsdauer zur Entstehung einer Gingivitis führt. Mit fortschreitender Entzündung lockert sich das gingivale Gewebe durch Bakterientoxine und entzündliche Prozesse auf, so dass ein Fortschreiten der Plaque auch in subgingivale Bereiche möglich wird. Bakterien und Immunreaktion sind dann auch in der Lage, die Resorption des Alveolarknochens zu bewirken; man spricht nun von einer Parodontitis.

Zudem wird diskutiert, dass exzessive Belastungen bzw. Überbelastungen des Parodontium als Kofaktor die Progredienz von bakteriell bedingten Entzündungen des Zahnhalteapparates beschleunigen können. Als Folge dieser mechanischen Überbeanspruchung könnten möglicherweise auch Entzündungsprozesse in Gang gesetzt bzw. bereits bestehende akute bakterielle Inflammationen beschleunigt werden, so dass es letztendlich zum progredienten Attachmentverlust kommt. Interaktionen von bakteriellen Stoffwechselprodukten, wie z.B. Lipopolysacchariden führen zur Freisetzung von

Zytokinen, wie Interleukin-1 (Il-1) und Tumor-Necrosis-Faktor- α (TNF- α) aus Entzündungszellen. Diese binden an die Oberflächenrezeptoren der Fibroblasten, was zu einer Stimulation der Produktion von Il-1, Prostaglandin E₂ (PGE₂) und Matrixmetalloproteinasen (MMP) durch die Fibroblasten führt. Durch die MMPs wird die extrazelluläre Matrix der Gingiva und des Parodontalligaments abgebaut, was dann zum Verlust von parodontalem Gewebe (Attachment) führt.

1.2 Zytokine

Obwohl Wirkungen, die wir heute auf Zytokine zurückführen, schon sehr früh beschrieben wurden, ist der Begriff Zytokin, der seit 1974 existiert, erst sehr spät benannt worden. Alle Zytokine sind Polypeptide, die von verschiedenen Zelltypen gebildet werden. Sie haben unterschiedliche Zielzellen und zeigen zum Teil überlappende oder divergierende Wirkungen. Die Zytokine sind eine heterogene Gruppe, zu denen Stoffe wie Lympholine, Wachstumsfaktoren, Interleukine oder Monokine zählen.

1.2.1 Interleukin-1 (Il-1)

Die Interleukine Il-1 α und Il-1 β werden als 31 kDa-Vorläuferproteine synthetisiert und als 17 kDa-Proteine sezerniert. Die Gene der α - und β -Form zeigen nur 26 % Homologie in der Aminosäuresequenz, aber sie teilen 7 hochkonservative Exons und sind auf dem Chromosom 2 der Maus lokalisiert (Bochner et al. 1987). Interleukin-1 ist bekannt als wichtiger Mediator bei der Koagulation bei Verletzungen und bei der Fibrose. Il-1 stimuliert Fibroblasten in Kultur und Chondrozyten zur Prostaglandin- und latenten Kollagenase-Synthese. Mit Ausnahme weniger Zellen wird Il-1 im gesunden Körperzustand nicht produziert. Als Reaktion auf Infektionen, mikrobielle Toxine und Komplementreaktionen kommt es allerdings in vielen verschiedenen Zelltypen zu einem dramatischen Anstieg der Il-1-Expression (Ishizaka, K., 1992).

Während für Il-1 α noch keine Ergebnisse im Zusammenhang mit einer Erkrankung der Mundschleimhaut vorliegen, scheint Il-1 β bei der Immunreaktion während einer Parodontitis eine besondere Rolle zu spielen. Es ist ein überaus potentes, multifunktionales Zytokin, das als zentraler Regulator inflammatorischer und

immunologischer Prozesse angesehen wird. Es entfaltet seine biologische Aktivität bereits in einem Konzentrationsbereich von 10^{-12} M bis 10^{-15} M, und beinahe jeder Zelltyp vermag Il-1 β zu produzieren, aber auch auf Änderungen der Il-1 β -Konzentration zu reagieren.

Das Interesse an Il-1 β hinsichtlich seiner Rolle im Knochenmetabolismus ist gewachsen seitdem seine Übereinstimmung mit dem Osteoklasten-Aktivierenden-Faktor bekannt wurde (Dewhirst et al., 1985) und damit auch feststand, dass Il-1 β der potenteste osteoklastenaktivierende Faktor des menschlichen Organismus ist (Stashenko et al., 1987). Der Nachweis von erhöhten lokalen Il-1 β -Konzentrationen im Bereich einer Parodontitis gelang sowohl in parodontalen Gewebeproben erkrankter Patienten (Hönig et al., 1989; Stashenko et al., 1991) als auch in der Sulkusflüssigkeit betroffener Zähne (Lee et al., 1995; Preiss & Meyle, 1994; Wilton et al., 1993). Ebenso ließen sich erhöhte Konzentrationen von Il-1 β in der Sulkusflüssigkeit an Stellen mit subgingivaler Präsenz der parodontopathogenen Keime *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Eikenella corrodens* beobachten (Reinhardt et al., 1993). Darüber hinaus konnte ein Absinken lokaler Il-1 β -Spiegel nach erfolgter Parodontalbehandlung nachgewiesen werden (Masada et al., 1990). Der Nachweis einer positiven Korrelation zwischen lokaler Il-1 β -Konzentration und zukünftigem Knochenabbau (Cavanaugh et al., 1998; Lee et al., 1995; Stashenko et al., 1991) spricht für einen direkten Zusammenhang zwischen Il-1 β und dem knöchernen Attachmentverlust bei der marginalen Parodontitis. Im Zusammenhang mit der Pathogenese der Parodontitis muss die starke knochenresorbierende Wirkung des Il-1 β in den Vordergrund gestellt werden (Alexander & Damoulis, 1994). Il-1 β induziert auch die Produktion von Prostaglandin-E₂-Kollagenase. Prostaglandine hemmen unter anderem die Knochenkollagenbildung und fördern die Knochenresorption. Durch diese Störung kann das bestehende Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau zu Gunsten der destruktiven Vorgänge verschoben werden. Bei Zugabe von Il-1 β zu Knochenzellkulturen kommt es zu dramatischen, resorbierenden Prozessen und zum Schwund der Knochenmatrix (Heasman et al., 1993). Agarwal, K. (1998) konnten zeigen, dass Il-1 β auch Effekte auf die parodontalen Ligamentzellen (PLZ) hat, die für die Verbindung zwischen Zahn und Alveolarknochen sorgen. Im gesunden Körperzustand sind die PLZ am Knochenaufbau beteiligt und sind unempfindlich gegenüber bakteriellen Produkten. Bei Anwesenheit von Il-1 β kommt es jedoch zum Stillstand der knochenaufbauenden Tätigkeit der PLZ und zur plötzlichen Sensitivität gegenüber bakteriellen Produkten.

Somit kann festgestellt werden: je mehr Interleukin-1 β von Zellen des eigenen Immunsystems produziert und sezerniert wird, desto rascher und tief greifender verläuft die Progredienz einer Parodontitiserkrankung.

1.2.2 Interleukin-6 (Il-6)

Interleukin-6 wird von T-Zellen, Fibroblasten, Tumorzellen und Monozyten produziert (Tosato et al., 1988). Das Vorläuferprotein ist ein 212 Aminosäuremolekül, das als 21 kDa Glykoprotein mit 184 Aminosäuren sezerniert wird. Das Gen enthält 4 oder mehr Exons (Zilberstein et al., 1986). Es wirkt als B-Zell Differenzierungs- und als hepatozytenstimulierender Faktor. Als wachstumsinhibitorisches Zytokin limitiert Il-6 die Zellproliferationsinduktion von TNF- α .

1.2.3 Tumor-Necrosis-Faktor- α (TNF- α)

Der Tumor-Necrosis-Faktor- α (TNF- α) ist ein proinflammatorisches Zytokin, das hauptsächlich von Makrophagen/Monozyten nach Endoxinausschüttung synthetisiert wird. Es ist ein Multimer aus 17 kDa Untereinheiten, das als inaktives Propeptid synthetisiert wird. TNF- α ist für eine Anzahl von Tumoren ein zytotoxisches Zytokin (Carswell et al., 1975). Es induziert weiterhin eine Breite von biologischen Effekten, z.B. die Modulation der Endothelzellen (Camussi et al., 1987) und der Granulozytenfunktion (Gamble et al., 1985), die Differenzierung myeloischer Zelllinien (Trincheri et al., 1986), das Wachstum von B-Lymphozythen (Jelinek et al., 1987), die Induktion der Kollagensynthese von Mesenchymalzellen und die metabolische Aktivierung von Makrophagen und Osteoblasten.

Der schwache mitogene Effekt von TNF- α auf Fibroblasten resultiert aus der Stimulierung der Il-6-Produktion der Fibroblasten. TNF- α interagiert synergistisch mit Il-1 bei der Prostaglandinproduktion der Lungenfibroblasten (Kohase et al., 1986). Die Prostaglandine, besonders E2, die als Antwort auf die Il-1 und TNF- α Stimulation produziert werden, fungieren als „second messenger“, um die Fibroblastenproliferation zu inhibieren.

1.3 Wirkung von Laserstrahlung auf Gewebe

Sofort nach der Entwicklung des ersten Lasers im Jahre 1960 begann die medizinische Forschung mit dieser neuen Strahlungsquelle. Der Fortschritt war anfangs besonders in der Augenheilkunde rasant. Inzwischen hat die Lasertechnik in nahezu alle medizinische Fachgebiete Einzug gehalten.

In den ersten Jahren nach der Erfindung wurde der Laser hauptsächlich als Laserskalpell in der Chirurgie eingesetzt. Hinzu kam die Anwendung in der Augenheilkunde zur Verhinderung der Netzhautablösung. Durch die Entwicklung neuer Lasertypen wurden später neuartige biologische Effekte entdeckt. Darauf aufbauend wurden medizinische Methoden entwickelt, so dass man heute folgende Verfahren in der Lasermedizin einsetzt:

- Koagulieren zur Gewebsvernichtung (thermische Wirkung),
- Verschweißen von Schichten und Gefäßen (thermische Wirkung),
- Schneiden mit dem Laser (thermische Wirkung),
- Abtragen von Gewebe (Photoablation),
- Zerreißen von Strukturen (Photodisruption),
- Bestrahlen von Gewebe (photochemische Wirkung),
- Biostimulation (photochemische Wirkung).

Heutzutage werden Laser in der Medizin mit Wellenlängen im ultravioletten Bereich (ab 200 nm), im Sichtbaren (400 bis 700 nm) und im Infraroten (bis 10000 nm) eingesetzt. Laserstrahlung vom nahen ultravioletten bis zum infraroten Bereich (3 µm) kann durch Glasfasern geleitet werden. Damit kann die Strahlung auch in Blutgefäße, den Magen und andere Körperhöhlen eingeführt werden. Dies geschieht oft in Verbindung mit Endoskopen und Operationsmikroskopen, so dass eine gezielt Behandlung auch im Körperinnern möglich ist.

Inzwischen gibt es vereinzelt Hinweise auf die biologische Wirksamkeit von niederenergetischem infrarotem Laserlicht (Lasertherapy, 1996). Insbesondere im Bereich der Wundheilung scheint Laserlicht über eine mögliche Induktion von Zellproliferationsprozessen bei Fibroblasten und Keratinozyten der Haut eine therapeutische Wirkung zu besitzen (Grossman et al., 1996, Mester A., 1996). Mehrere Arbeiten in den letzten Jahren konnten den positiven Einfluss von niederenergetischem Laserlichts auf die Proliferation von Fibroblasten nachweisen. So konnten Almeida-Lopes et al. (2001) bei der Bestrahlung mit Laserlicht verschiedener Wellenlängen (670-786 nm) eine verbesserte in-vitro Proliferation von Gingiva-

Fibroblasten gegenüber den unbestrahlten Kontrollen zeigen. Andere Arbeitsgruppen (Bednarska et al., 1998; Webb et al., 1998; Schindl et al., 2003) fanden ebenfalls eine erhöhte Proliferation verschiedener Zellen durch Bestrahlung mit niederenergetischem Laserlicht (660 bzw 670 nm).

Dagegen zeigten andere Arbeiten (Pogrel et al., 1997; Webb et al., 2003; Marques et al. 2004) keine signifikanten Unterschiede im Wachstum von humanen Fibroblasten nach Bestrahlung mit einem Ga-Al-As Laser (830 bis 904 nm). Auch Hallmann et al. fanden bei der Bestrahlung von humanen Fibroblasten mit einem He-Ne Laser weder einen stimulierenden noch inhibitorischen Effekt.

Yu et al. (1994) konnten zeigen, dass die Wirkung von niederenergetischem Laserlicht von der Dosis abhängt. Sie fanden bei der Bestrahlung von Fibroblasten mit $2,16 \text{ J/cm}^2$ eine deutliche Stimulation des Zellwachstums, während bei $3,24 \text{ J/cm}^2$ keine gesteigerte Proliferation zu beobachten war.

Mehrere Arbeitsgruppen untersuchten auch die Wirkung niederenergetischer Laserstrahlung auf die Synthese von Kollagen und Prokollagen in humanen Fibroblasten. Dabei fanden Abergel et al. (1987) eine deutliche Erhöhung der Kollagenexpression sowohl in-vitro in Fibroblastenkulturen als auch in-vivo in Tiermodellen durch Bestrahlung mit einem He-Ne Laser. Auch Yamamoto et al. (1996) konnten durch Laserbestrahlung eine um 50 % erhöhte Prokollagen-Synthese in humanen Fibroblasten unter serumfreien Bedingungen nachweisen. Dagegen beobachteten Pereira et al. (2002) zwar einen deutlichen Anstieg im Fibroblastenwachstum, aber keinen Effekt bei der Synthese von Prokollagen.

Das in der Literatur beschriebene Prinzip Laserlicht in der Zahnpflege einzusetzen, beruht im Wesentlichen auf den zuvor beschriebenen positiven Befunden. Bei Entzündungsprozessen im Zahnfleisch soll dieses spezifische, niederenergetische infrarote Laserlicht zu einer deutlich beschleunigten Ausheilung führen. Als biologische Grundlage wird die Aktivierung von Zellproliferationsprozessen postuliert, die zur Regeneration der Gingiva führen soll. Allerdings fehlt diesen Hinweisen generell detaillierte, wissenschaftliche zell- und molekularbiologische Untersuchungen, um die Wirkmechanismen anhand reproduzierbarer Ergebnisse erklären zu können. Für solche Untersuchungen bieten vor allem Fibroblasten der menschlichen Gingiva ein ideales Testsystem.

1.4 Das Fibroblastenzellsystem

Zell- und molekularbiologische Analysen konnten zeigen, dass das Fibroblastensystem des Menschen ein differenzierendes Stammzellensystem darstellt, das aus mitotisch aktiven Vorläuferfibroblasten (MFI, II und III) und postmitotischen, nicht mehr teilungsfähigen Funktionszellen, den Fibrozyten PMFIV, V und VI besteht (Bayreuther et al., 1988; Rodemann et al., 1984, 1995, 1996). Die mitotisch aktiven Vorläuferfibroblasten stellen den Regenerationspool des Fibroblasten-/Fibrozytenzellensystems dar. Vorläuferfibroblasten haben eine gewebespezifische Gesamtzellteilungskapazität von ca. 15 ZTG (Niere) bis ca. 70 ZTG (Lunge). Menschliche Gingiva-Fibroblasten haben ähnlich wie Hautfibroblasten eine Zellteilungskapazität von ca. 40-50 ZTG. Durch symmetrisches Teilungsverhalten können sich die mitotischen Vorläuferfibroblasten regenerieren oder durch asymmetrische Teilungen über Differenzierungsteilungsschritte die postmitotischen, nicht mehr teilungsfähigen Funktionsfibrozyten bilden. Die postmitotischen Funktionsfibrozyten haben eine speziesspezifische, genetisch determinierte, begrenzte Lebensspanne (Bayreuther et al., 1988; Rodemann et al., 1984, 1995, 1996). Nach Auslaufen dieser Lebensspanne sterben die Funktionsfibrozyten durch das Einsetzen von so genannten Apoptoseprogrammen ab. Um die Gewebhomeostase der Bindegewebe verschiedener Organe aufrechtzuerhalten, muss jeder abgestorbene Funktionsfibrozyt durch eine Aktivierung des Vorläuferpools der mitotischen Fibroblasten über die Induktion von Differenzierungsteilungen regeneriert werden.

Durch detaillierte *in vivo*-/*in vitro*-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass im Bindegewebe der Haut, der Niere, der Lunge und der Muskulatur ein konstantes Verhältnis von mitotischen Vorläuferfibroblasten zu postmitotischen Fibrozyten von 2:1 besteht und somit eine ständige Regenerationskapazität für den Funktionspool der Fibrozyten durch die Vorläuferfibroblasten gegeben ist. Die Regeneration der Vorläuferfibroblasten und die konstante Nachlieferung und Differenzierung der Funktionsfibrozyten erfolgt über die geregelte Abfolge von symmetrischen bzw. asymmetrischen Zellteilungen (Bayreuther et al., 1988; Rodemann et al., 1984, 1995, 1996)

Die Modulation oder eine Veränderung dieses ausgewogenen Verhältnisses von Vorläuferfibroblasten zu Funktionsfibrozyten kann signifikante Veränderungen der zellbiologischen Funktion der Bindegewebszellen nach sich ziehen. Beispielsweise kann

durch eine Induktion einer frühzeitigen Differenzierung der Vorläuferfibroblasten in Funktionsfibrozyten eine "Ausdünnung" des Regenerationspools erreicht werden, wodurch das Bindegewebe einem vorzeitigen Alterungsprozess unterliegen würde (Rodemann et al., 1995, 1996).

Veränderungen des Proliferations- und Teilungsverhaltens dieser Zellen - z.B. im Zuge der postulierten Aktivierung durch infrarotes Laserlicht - könnten einerseits zu einer Erhöhung des Regenerationspools führen und damit beispielsweise Wundheilungsprozesse im Falle einer Gingivitis kurz- bis mittelfristig positiv beeinflussen. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass durch eine Aktivierung der Proliferationsrate der Vorläuferzellen der Regenerationspool langfristig durch eine gleichzeitig erhöhte Differenzierungsrate reduziert wird und damit die Funktionsfähigkeit des Systems nachhaltig gestört wird. Darüber hinaus besteht dadurch die Möglichkeit, dass insgesamt durch eine Veränderung des gewebespezifischen Verhältnisses von Vorläufer- zu Funktionszellen die zelluläre Homeostase und damit die Interaktion verschiedener in der Gingiva vertretener Zellpopulationen beeinträchtigt wird.

1.5 Ziel der Studie

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, die Wirksamkeit niederenergetischen infraroten Laserlichtes auf das Proliferations- und Regenerationsverhalten von humanen Gingiva-Fibroblasten zu analysieren.

In einer ersten experimentellen Serie sollte hierbei eine Dosisfindungsstudie hinsichtlich der zu applizierenden Intensität (1-5 mW bei 630 nm) mit Hilfe klonaler Testsysteme durchgeführt werden.

In Rahmen dieser Untersuchungen sollten auf statistischer Basis Aussagen darüber ermöglicht werden, inwiefern das vorgeschlagene infrarote Laserlicht tatsächlich eine Beeinflussung von Gingivazellen im Sinne einer Aktivierung von Zellproliferationsprozessen induziert.

In einem zweiten Ansatz sollte überprüft werden, wie Zytokine und hier insbesondere die Interleukine, alleine und in Kombination mit der Bestrahlung auf die Gingiva-Fibroblasten wirken. Diese Experimente sind insbesondere unter dem Aspekt zu sehen, dass eine potentiell denkbare "Ausverdünnung" des Regenerationspools der Gingiva-Vorläuferfibroblasten durch die Zytokine verstärkt werden und somit potentiell negative Langzeitfolgen der Zytokine auf die Gingiva durch Laserbestrahlung vermieden werden könnte.

Für die Findung der optimalen Zytokin-Konzentrationen wurden 0,1, 1, 10 und 25 ng/ml eingesetzt. Die optimale beste Hemmungs-Konzentration der Zytokine wurde unter alleiniger Behandlung und in Kombination mit Laserlicht in die Experimente eingebracht. Werden hierbei Daten erhoben, die auf eine kombinatorische Wirkung und Nutzung in der Mundpflege hinweisen, sind diese Ergebnisse Gegenstand eines auszuarbeitenden Patent.

2 Material und Methoden

2.1 Zellmaterial

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden an adhärent wachsenden in vitro Zellkulturen von normalen menschlichen Zellen durchgeführt. Als Testzellen werden 3-5 verschiedene normale menschliche Gingiva-Fibroblasten-Zellstämme, die in Zusammenarbeit mit der Zahnklinik des Universitätsklinikums in der Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung aus Spendermaterial etabliert wurden, herangezogen.

2.2 Kulturbedingungen

Die Zellkultur wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle bei der Kultur verwendeten Materialien und Lösungen wurden entweder steril vom Hersteller geliefert oder im Labor autoklaviert bzw. steril filtriert. Die Zellkulturen wurden im Brutschrank (Heraeus 6000) unter kontrolliert gleich bleibenden Bedingungen bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ inkubiert.

2.3 Zellkulturgefäße

Große Gewebeskulturschalen (75 cm ²), 250 ml	Falcon Becton Dickinson
Kleine Gewebeskulturschalen (25 cm ²), 50 ml	Falcon Becton Dickinson
Petrischalen, 5 cm	Falcon Becton Dickinson
6-Well-Makroplatten	Falcon Becton Dickinson

2.4 Medien, Puffer und Lösungen

2.4.1 Kulturmedium

Als Kultivierungsmedium für die Gingivafibroblasten wurde Dulbecco's Modification von Eagle's Medium in Pulverform (DMEM 12,04 g/l) verwendet. Dem Medium wurde zur Pufferung Bikarbonat NaHCO_3 (3,33 g/l) beigelegt. Das Medium wurde auf ein pH-Wert von 7,2 eingestellt. Zur Vermeidung bakterieller Kontaminationen wurde dem Medium Penicillin (320 mg/l) und Streptomycin (100 mg/l) zugesetzt. Als Serumkomponente wurde für alle Versuche einer Zelllinie Fötales Kälberserum (FCS) derselben Charge verwendet, um so eine Gleichbehandlung der Zellen und eine Vergleichbarkeit der Experimente zu gewährleisten.

Je nach Verwendungszweck der Zellen wurden dem Medium unterschiedliche Mengen an Serum zugegeben.

Massenkultivierungsmedium: DMEM + 10 % FCS

Klonierungsmedium: DMEM + 20 % FCS

2.4.2 Puffer

Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich die Angaben auf 1 Liter Lösung in H_2O .

PBS⁻:
8,0 g NaCl
0,2 g KCl
0,2 g KH_2PO_4
1,1 g Na_2HPO_4

Sörensen A: 9,078 g KH_2PO_2

Sörensen B: 11,0876 g Na_2HPO_4

Sörensen Puffer: 380 ml Sörensen A
612 ml Sörensen B
pH 7,0

Bei normalen Fibroblastenstämmen wurden jeweils $0,7 \times 10^6$ in 10 ml Medium als Erhaltungskultur in 75 cm² (250 ml) große Kulturflaschen ausgesät. Die Zellen wurden alle sieben Tage passagiert.

2.5.1 Passagieren konfluenter Zellkulturen

Aussaat der Zellen erfolgte mit einer konstanten Ausgangszelldichte (N_0) von 700.000 Zellen pro 75 cm² große Kulturflasche. An jedem 7. Tag nach Aussaat erreicht die Kultur aufgrund der Zellvermehrung eine bestimmte Endzelldichte (N) (unter Kontrollbedingungen ca. 2 Mio. Zellen pro 75 cm²), die aufgrund spezifischer Kontaktregulationsmechanismen kein weiteres Wachstum erlaubt. Um ein weiteres Wachstum zu ermöglichen, muss die Kultur dann passagiert und mit verdünnter Zelldichte neu ausgesät werden.

Zunächst wurde der dicht bewachsene Zellrasen der Gewebekulturflasche zweimal mit vorgewärmtem PBS⁻ (37 °C) gewaschen, um Medium- und Serumreste gründlich zu entfernen. Zum Lösen vom Flaschenboden wurden 2 ml der vorgewärmten Trypsin-Lösung zu den Zellen gegeben. Da 37° C die optimale Temperatur zur Wirkung von Trypsin ist, wurden die Kulturflaschen für wenige Minuten in den Brutschrank gestellt. Eine zu lange Inkubation der Zellen in Trypsinlösung kann die Lebensfähigkeit der Zellen irreversibel schädigen, daher wurde die proteolytische Ablösung unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Sobald sich alle Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten, wurden mindestens 4 ml Kultivierungsmedium zugegeben. Die Zugabe von Zellkulturmedium bewirkt die Inaktivierung von Trypsin und beendet die proteolytische Reaktion. Anschließend wurden noch lose an der Kulturflasche haftende Zellen mit Hilfe einer 10 ml Glaspipette abgespült und die Zellsuspension mehrmals gut durchpipettiert, um Zellverklumpungen zu vermeiden und eine homogene Zellverteilung zu erzielen. Um die Zellzahl mittels Häemocytometer (Fuchs-Rosenthal) zu bestimmen, wurde mit einer sterilen Pasteurpipette etwas Zellsuspension entnommen. Hieraus ließ sich die Zellzahl pro ml Zellsuspension und daraus die Gesamtzellzahl errechnen. Anschließend wurden die Zellen in definierter Zahl wieder in neue Kulturgefäße ausgesät.

24 h nach Aussaat und dann jeden dritten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.5.2 Mediumwechsel

Ein regelmäßiger Mediumwechsel bei Monolayerkulturen ist erforderlich, da Bestandteile des Mediums und dessen Zusätze von den Zellen verbraucht oder bei 37 °C im Laufe der Zeit inaktiviert werden. Die Häufigkeit eines Mediumwechsels ist abhängig vom Metabolismus und von der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen und daher von Zelllinie zu Zelllinie unterschiedlich. Ein im Medium enthaltener Phenolrot-Indikator zeigt durch einen Farbwechsel die Notwendigkeit eines Mediumwechsels an. Bei Massenkulturen wurde 24 h bis 48 h nach Aussaat ein Mediumwechsel durchgeführt; wenn nötig nach 4 -5 Tagen ein weiterer.

2.5.3 Kryokonservierung von Zellen

Da sich das Proliferationsverhalten und das Differenzierungsmuster der Zellen (v.a. normaler Fibroblasten) mit zunehmender Kulturdauer verändert, wurden für die vorliegenden Experimente innerhalb derselben Zelllinie nur Zellen ähnlicher Passagezahl (+/- 7 Passagen) verwendet. Um immer wieder auf Zellpopulationen der gleichen Passage zurückgreifen zu können, wurden die Zellen tiefgefroren. Dazu wurden die Zellen zunächst mehrmals subkultiviert, um eine ausreichend hohe Zellzahl zu erhalten und anschließend bei -196 °C in flüssigem Stickstoff konserviert.

Die Zellen wurden wie folgt aufbereitet:

- Abtrypsinieren der konfluenten Zellen
- Zellzahlbestimmung
- Abzentrifugieren der Zellsuspension bei 1200 rpm/min für 2 min
- Pellet in Medium (20 % FCS) und 10 % DMSO aufnehmen und mehrmals resuspendieren
- Aliquots von 1 Mio. Zellen in vorgekühlte Kryoröhrchen steril pipettieren
- Unverzüglich einfrieren, da DMSO bei einer Temperatur größer 4°C als Zellgift wirkt

Um die Zellen möglichst schonend einzufrieren (optimale Kühlungsrate: -1 °C/min), wurden die Kryoröhrchen in speziellen Gestellen zunächst für zwei Stunden in der Gasphase über dem flüssigen Stickstoff aufbewahrt und dann sukzessive in vorgebene Positionen gebracht, bis sich die Röhrchen ganz im flüssigen Stickstoff befanden.

2.5.4 Auftauen tiefgefrorener Zellen

Um kryokonservierte Zellen aufzutauen, wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstoff-Behälter entnommen und direkt ins 37 °C warme Wasserbad überführt. Die Zellen wurden hierbei nur kurz angetaut, dann in sterilem Medium (20 % FCS) mehrmals resuspendiert, bis alle Eisklumpchen verschwunden und die Zellen homogen verteilt waren. Anschließend erfolgte die Aussaat der Zellen in Gewebekulturflaschen; nach etwa 3 h wurde mikroskopisch die Angeheute der Zellen ermittelt und ein Mediumwechsel durchgeführt, um das im Einfriermedium enthaltene Zellgift DMSO zu entfernen. Es wurde nun normales Kultivierungsmedium (10 % FCS) zugegeben. Vor Verwendung der aufgetauten Zellen in einem Experiment wurden sie mindestens zweimal passagiert.

2.5.5 Bestimmung der Populationsverdopplungen

Mit jeder Passagierung der Zellen wurde die kumulative Anzahl der Populationsverdopplung (CPD) rechnerisch bestimmt. Die zwischen zwei Transfers entstandenen Zellzuwachsrate wurden nach folgender Formel in Populationsverdopplungen (PD) umgerechnet:

$$PD = \frac{\ln N - \ln N_0}{\ln 2}$$

N gibt die Zahl der geernteten Zellen, N_0 die Zahl der ausgesäten Zellen an.

Die Populationsverdopplungen wurden fortlaufend aufaddiert und so die Kumulative Populationsverdopplung (CPD) ermittelt. Um eine Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der einzelnen Versuche zu gewährleisten, wurden alle Experimente mit Zellen durchgeführt, deren CPD sich auf annähernd gleichem, festgelegtem Niveau befand. Es wurden deshalb für jeden Zellstamm mehrere Subkulturen der gleichen Passage in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Fibroblasten wurden nur in den Passagen P8-P12 bei einer CPD zwischen 13 und 18 für Versuche verwendet.

Die Erhaltungskulturen aller Zellen wurden regelmäßig mittels DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-2-HCL) und Fluoreszenzmikroskopie auf Kontamination getestet.

2.6 Koloniebildungstest

Ein Klon stellt definitionsgemäß eine Population von Zellen dar, die aus einer Einzelzelle durch mitotische Teilung hervorgegangen sind. Die Fähigkeit von Zellen, Kolonien zu bilden, bezeichnet man als Klonierungseffizienz. Der Koloniebildungstest ist ein Testverfahren zur Ermittlung der Klonierungseffizienz von Zellen einer bestimmten Zelllinie und ist geeignet, um Substanzen oder Behandlungsmethoden auf deren Toxizität oder wachstumshemmende Wirkung zu untersuchen.

2.6.1 Aussaat eines Koloniebildungstests

Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- Zellen einer konfluenten Massenkultur wurden abtrysiniert und die Zellzahl bestimmt
- Aussaat der Zellen in einer bestimmten Dichte abhängig vom Versuchsaufbau:
 - 300 bzw. 500 Zellen pro Well (insgesamt 3 Wells pro Bedingung) für Versuche mit alleiniger Interleukinbehandlung
 - 400 Zellen pro 50 cm² Schale für Bestrahlungsversuche
- Da einer homogenen Verteilung der Zellen wesentliche Bedeutung zukommt, wurde zwischen den Pipettiervorgängen die Zellsuspension aufsuspendiert und bei der Aussaat auf eine kreisförmige Pipettenführung geachtet
- Nach der Zellaussaat wurden die Platten/Schalen in Form einer 8 vorsichtig geschwenkt, um eine homogene Verteilung der Zellen zu erreichen
- Bis zur Weiterverwendung inkubierten die Zellen im CO₂-Brutschrank

An den ersten Tagen nach Behandlungsbeginn wurde keine Manipulation an den 6-Well-Platten vorgenommen, auch keine mikroskopische Beobachtung der Klonkulturen. Je nach Zelllinie inkubierten die Zellen unterschiedlich lange im Brutschrank.

Ab dem 5. Tag nach Versuchsbeginn wurden die Koloniegröße und die Zellmorphologie mikroskopisch kontrolliert, da die Ausbildung der Konfluenz zwischen den Einzelkolonien die Auswertung des Experiments beeinträchtigt, andererseits aber eine gewisse Koloniegröße erreicht werden sollte.

Nach ausreichender Inkubationszeit wurde die Fixierung der Zellen mit Formaldehyd,

sowie die Zellfärbungen durchgeführt.

2.6.2 Fixierung der Zellen

Um Zellen eines Koloniebildungstests zu fixieren, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal gut mit PBS⁻ gewaschen, um Mediumreste zu entfernen.

Anschließend inkubierten die Zellen für 10 min in 3,7 %-iger Formaldehydlösung; dann wurde die Fixierlösung abgekippt und für 10 min 70 %-iger Alkohol zugegeben. Danach wurden die Platten unter Leitungswasser gespült und zum Trocknen in den Wärmeschrank (37° C) gestellt.

2.6.3 Färbung der Zellen

Zur Darstellung des Cytoplasmas wurden die Zellpopulationen mit einer vorher angesetzten 0.05 %-igen Coomassie-Lösung wie folgt gefärbt: für 30 - 40 sec. wurden 2 ml der Coomassie-Färbelösung auf jedes Well oder jede Kulturschale gegeben. Danach wurden die Platten mit Wasser mehrmals abgespült und im Wärmeschrank getrocknet.

Danach wurde eine zweite Färbung mit einer Giemsa-Lösung durchgerührt. Diese Färbung diente der Zellkerndarstellung. Die Zellen wurden 30 min mit der Lösung gefärbt, dann gespült und getrocknet. Anschließend konnten die Kolonien unter dem Mikroskop ausgezählt werden.

2.6.4 Bestimmung der Klonierungseffizienz

In die Auswertung aufgenommen wurden nur klonale Zellpopulationen einer Mindestzellgröße von 50 Zellen. Aus der ermittelten Kolonienanzahl von Wells gleicher Behandlungsbedingung erfolgte die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes, sowie der zugehörigen Standardabweichung. Der Mittelwert der unbehandelten Kontrollzellen wurde als 100 %, die anderen Werte als relative Klonierungseffizienz angegeben. Die Signifikanzprüfung erfolgte mit Hilfe der einfachen Varianzanalyse ($p < 0.05$).

Bei der Auswertung der Koloniebildungstests wurde zudem auf morphologische Veränderungen der Zellen im Sinne eines veränderten Differenzierungsmusters unter der jeweiligen Behandlungsmodalität geachtet.

2.7 Bestrahlung

2.7.1 Physikalische und technische Parameter des Elektromagnetfeldes

Die Laserbestrahlungsapparatur (infrarotes Laserlicht 630 nm, 1-5 mW) wurde durch die Firma BRAUN AG entsprechend der erforderlichen physikalischen und technischen Parameter erstellt und der Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung zur Verfügung gestellt. Wellenlängen: 635 nm bzw. 670 nm; Dosen: 0, 10, 27, 74, 200 mJ/cm² und 0, 1, 5, 10, und 27 mJ/cm².

2.7.2 Expositionsdauer

Um die verschiedenen Zellkulturen (Kontrolle- und Bestrahlungskulturen) unter gleichartigen Abschirmbedingungen gegenüber dem normal vorhandenen Sonnenlicht zu halten, wurden die Kontroll- sowie die Expositionskulturen in speziell dafür vorgesehenen Räumen, die eine Abschirmung gegenüber dem Sonnenlicht bei Entnahme aus dem Brutschrank garantieren, gehalten. Die zu exponierenden Kulturen wurden unter dafür vorgesehenen Abschirmbedingungen in dem Laserbrutschrank mit dem entsprechenden Laserlicht behandelt. Die Kontrollkulturen wurden ebenfalls im Laserbrutschrank für die Expositionszeiträume gehalten, allerdings wurden sie so abgedeckt, dass sie keine Laserstrahlung abbekamen.. Die zu untersuchenden Zellpopulationen wurden einmal täglich einer 2,5 minütigen Exposition mit verschiedenen Dosen von dem zu applizierenden Laserlicht unterzogen. Diese maximale Expositionsdauer der Gingivafibroblasten soll die Benutzungszeit eines möglichen mit Laserquelle ausgerüsteten Zahnpfleegerätes und die daraus resultierende Bestrahlung der Gingiva simulieren.

2.7.3 Vorbereitung der Zellen zur Bestrahlung

Konfluente Zellkulturen wurden abtrypsiniert, die Zellzahl bestimmt und die Zellen in 2 ml Klonierungsmedium ausgesät. Als Kulturgefäße dienten 50 cm² Schalen. In jede Schale wurden 400 Zellen eingesät. Um ein gleichmäßiges Anwachsen der Zellen zu ermöglichen, wurden die Schalen zunächst in einen normalen Brutschrank gestellt. Nach 24 h wurden die Schalen dann zwecks Bestrahlung folgendermaßen in den Laserbrutschrank umgesetzt (siehe Abb. 1):

Reihe A: Kontrollreihe mit 8 Schalen

Reihe B: 200 mJ/cm² mit 8 Schalen

Reihe C: 74 mJ/cm² mit 8 Schalen

Reihe D: 27 mJ/cm² mit 8 Schalen

Reihe E: 10 mJ/cm² mit 8 Schalen

Reihe G: Kontrollreihe mit 8 Schalen

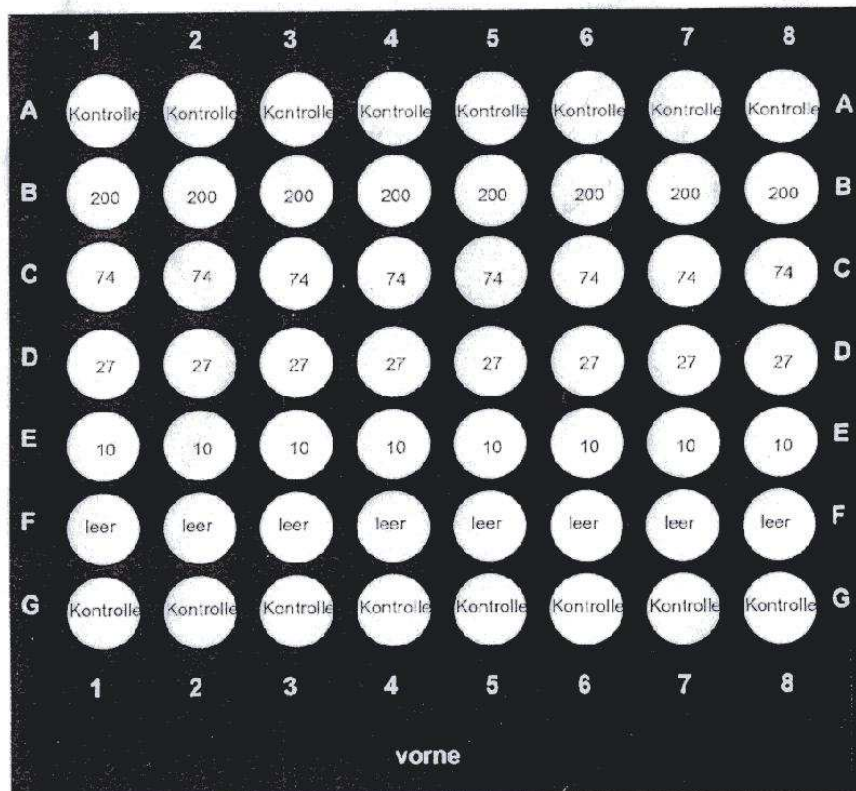


Abb. 1: Anordnung der Proben im Träger bei der Bestrahlung im Laserbrutschrank

2.7.4 Durchführung der Bestrahlung

Die Bestrahlung der Klonkulturen erfolgte nach dem Umsetzen in den Laserbrutschrank in Form einer 11-tägigen Dosisapplikation. Während der Bestrahlung inkubierten die Zellen in 20 %-igem Medium. In jedem Bestrahlungsdurchgang konnten bis zu 48 Schalen gleichzeitig bestrahlt werden, wobei die erste und letzte Reihe (Kontrollreihen) durch Abdeckung vor den Laserstrahlen geschützt wurden. Dadurch wurden nur die Reihen B bis E bestrahlt, d.h. 32 Schalen. Dazu wurden die Platten in 8 x 6 Reihen angeordnet und mit dem Träger in den Laserschrank eingebracht (siehe Abb1).

Um die Zellen gleichmäßig, aber mit verschiedenen Laserdosen zu bestrahlen, wurde die Laserbestrahlung über einen Computer gesteuert.

Die Zellen wurden von unten bestrahlt. Nach der Bestrahlung verweilten die Zellen bis zur nächster Bestrahlung im Laserbrutschrank.

Um Vergleiche mit den unbestrahlten Zellen anstellen zu können, wurden die Kontrollen bis auf die eigentliche Bestrahlung gleich behandelt, d.h. die Schalen wurden auch für den gleichen Zeitraum im Laserbrutschrank deponiert.

2.7.5 Ermittlung der Strahlungsinaktivierungskurve

Die Auswertung der bestrahlten Koloniebildungstests unterschied sich nicht von der Auswertung "normaler" Koloniebildungstests. Die Anzahl an Kolonien einer Zellgröße von mindestens 50 Zellen wurde bestimmt, der Mittelwert und die Standardabweichung für jede Bestrahlungsdosis angegeben.

2.7.6 Statistische Berechnung

Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurden mittels einfacher Varianz-Analyse "Anova" auf statistische Signifikanz untersucht (Box et al., 1972).

2.8 Behandlung mit Zytokinen

Die Behandlung der Fibroblasten erfolgte mit den vier Zytokinen:

Interleukin-1 alfa (IL-1 α),
Interleukin-1 beta (IL-1 β),
Interleukin-6 (IL-6) und
Tumor Necrosis Factor-alfa (TNF- α).

Dabei wurden die Zytokine in den Konzentrationen 0,1, 1, 5 und 10 ng/ml eingesetzt und die Zellen nach drei unterschiedlichen Schemata behandelt.

2.8.1 Einmalige Behandlung im Koloniebildungstest

Aus einer Massenkultur wurden Koloniebildungstests in 6-Well-Platten ausgesät (siehe 2.6.1). Eine Behandlung der Klonkulturen mit den verschiedenen Interleukinen erfolgte 24 h nach der Aussaat im Rahmen eines kompletten Mediumwechsels.

2.8.2 Einmalige Behandlung in Massenkultur

Zunächst wurden jeweils 300.000 Zellen pro Bedingung in eine Petrischale ausgesät. Nach 48 h wurde die Kultur mit verschiedenen Konzentrationen des entsprechenden Zytokins behandelt, nach weiteren 24 h die Schalen trypsiniert und die behandelten Zellen in 6-Well-Platten ausgesät.

2.8.3 Behandlung in Massenkultur und Koloniebildungstest

Die Zellen wurden zunächst wie in 2.8.2 in Massenkultur für 24 h behandelt und anschließend bei der Aussaat in den Koloniebildungstest ein zweites Mal mit der gleichen Konzentration des entsprechenden Zytokins.

2.9 Chemikalien

Calciumdichlorid	Merck
Coomassie Brilliant Blau	Merck
Essigsäure	Roth
Ethanol	Merck
Formaldehyd	Merck
Giemsa	Merck
Kaliumchlorid	Serva
Kaliumdihydrogenphosphat	Serva
Kaliumlauge	Serva
Natriumchlorid	Serva
Natriumdihydrogenphosphat	Serva
Natriumhydrogencarbonat	Serva
Natriumlauge	Sigma
Paraformaldehyd	Merck
Penicillin	Biochrom
Streptomycin	Biochrom
Trypsin	Biochrom

2.10 Geräte

CO ₂ - Inkubator	Hereaus
Fluoreszenzmikroskop	Leitz
Freezer (- 86 °C)	Forma Scientific
Gefrierschrank(- 20°)	Bosch
Kühlschrank	Siemens
Lichtmikroskop	Leitz
Pipetten	Eppendorf
Rüttler	Böhler
Sterilarbeitsbox	BDK
Sterilisator	Hereaus
Waage	Sartorius
Wärmeschrank	Hereaus

Wasserbad
Zentrifugen

Julabo
Eppendorf

2.11 Sonstiges Material

Deckgläschen
Glaspipetten
Kryoröhrchen
Pasteurpipetten
Sterilfilter

Langenbrinc
Fortuna
Nunc
Fortuna
Millipore

3 Ergebnisse

3.1 Bestrahlung von Gingiva-Fibroblasten mit infrarotem Laserlicht

3.1.1 Dosisfindung

In einer ersten experimentellen Serie wurde eine Dosisfindungsstudie hinsichtlich der zu applizierenden Intensität (1-5 mW bei 630 nm) mittels klonaler Testsysteme durchgeführt. Zur Bestimmung der optimalen Laserdosis wurden zunächst menschliche Gingiva-Fibroblasten eines Spenders in früher Passage (P8–P13) in den Koloniebildungstest ausgesät (400 Zellen/Well) und 24 h nach der Aussaat über einen Zeitraum von 11 Tagen einer täglichen Exposition der entsprechenden Laserdosis (10, 27, 74 oder 200 mJ/cm²) unterzogen. Dieser Test wurde 6-mal wiederholt. Die Daten wurden zu Diagrammen zusammengefasst, aus denen das Zell-überleben in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis wiedergegeben wird (siehe Abb. 2).

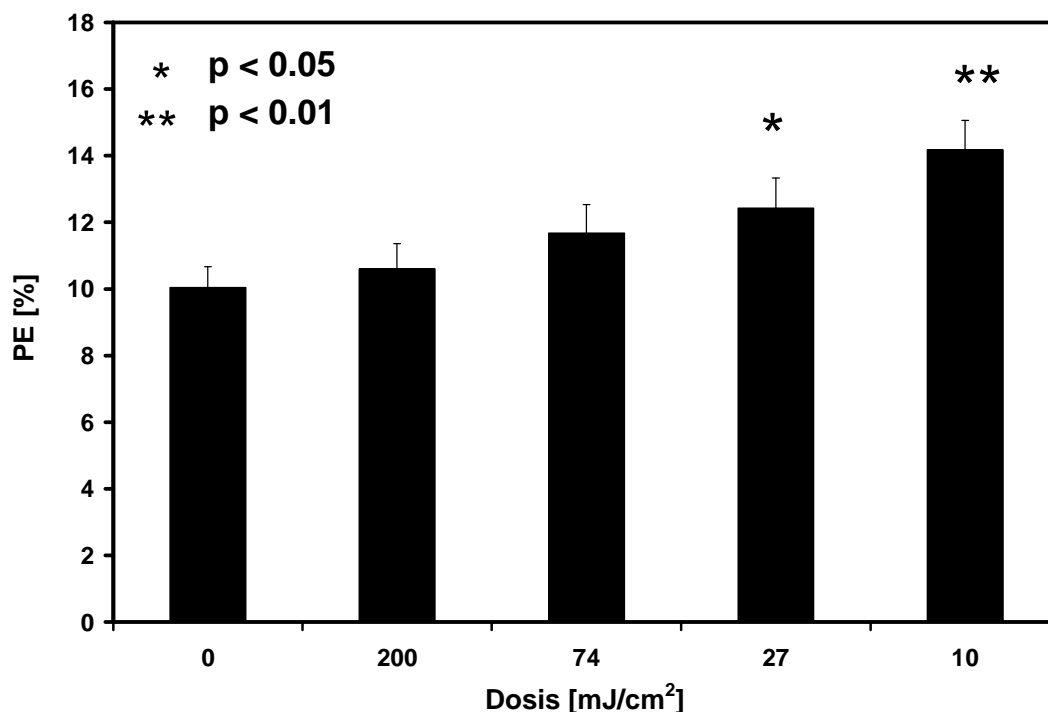


Abb. 2: Klonierungseffizienz der Gingiva-Fibroblasten in Abhängigkeit von der Laserdosis; Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus 6 unabhängigen Experimente mit jeweils 8 Parallelansätzen (n=48).

Vergleicht man die Klonierungseffizienz der Gingiva-Fibroblasten bei den verschiedenen Dosen mit der unbestrahlten Kontrolle, so sieht man in allen Fällen ein besseres Überleben nach der Bestrahlung. Dieses ist bei einer Dosis von 10 mJ/cm² am signifikantesten, was also bedeutet, dass die Gingiva-Fibroblasten durch die Bestrahlung mit dieser Dosis am stärksten aktiviert werden.

3.1.2 Bestrahlung mit niedrigen Dosen

Nachdem die optimale Laserdosis von 10 mJ/cm² gefunden worden war, wurde die Laserapparatur so verändert, dass man die Zellen jetzt auch mit kleineren Laserdosen von 1 und 5 mJ/cm² bestrahlen konnte, um zu sehen, ob mit noch kleinerer Strahlenintensität auch eine noch höhere Klonierungseffizienz erfolgt. Die Aussaat und die Bestrahlungsdauer der Gingiva-Fibroblasten erfolgte wie zuvor in 3.1.1 beschrieben. Dieser Test wurde 3-mal wiederholt. In Abbildung 3 sind die Überlebensraten der Fibroblasten bei den unterschiedlichen Laserdosen dargestellt. Überraschenderweise ist kein weiterer Anstieg der Klonierungseffizienz der Gingiva-Fibroblasten mit niedrigeren Dosen zu erkennen, sondern ein vergleichbares Überleben wie auch bei der Kontrolle.

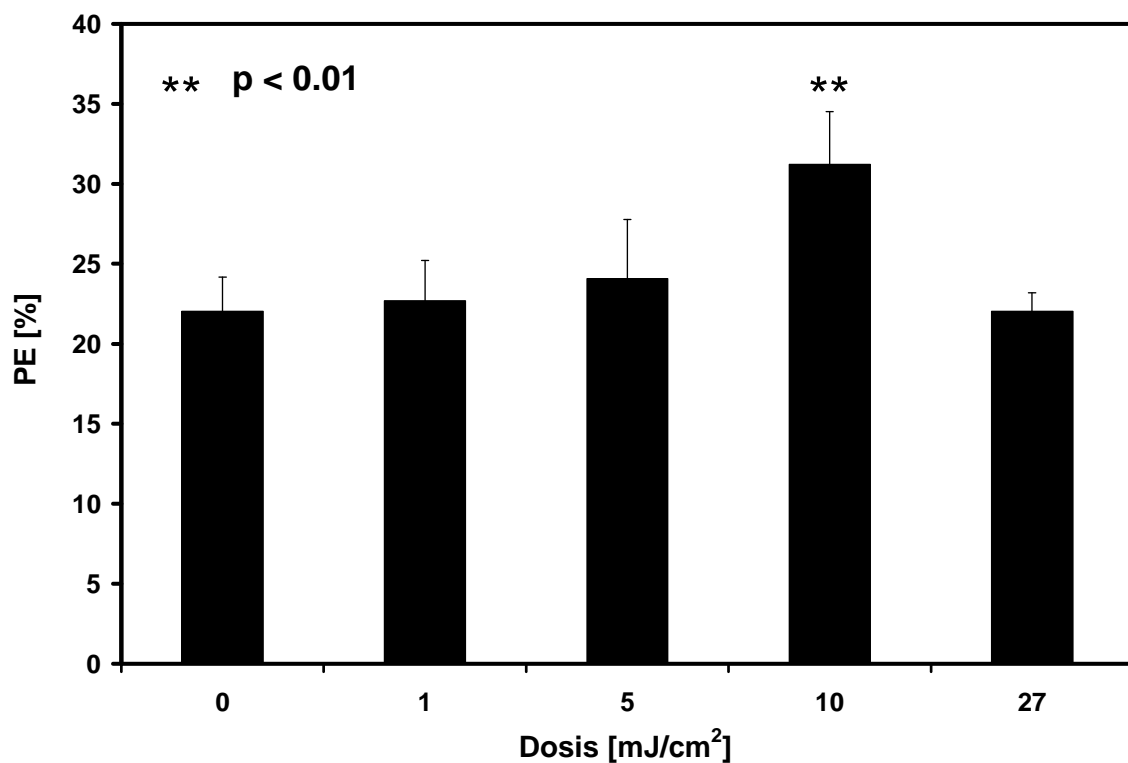


Abb. 3: Klonierungseffizienz der Gingiva-Fibroblasten in Abhängigkeit von der Laserdosis; Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimente mit jeweils 8 Parallelansätzen (n=24).

Dieses Ergebnis bedeutet also, dass die Gingiva-Fibroblasten bei einer Dosis von 10 mJ/cm² am besten aktiviert werden und somit diese Dosis für die kombinierte Behandlung verwendet wird.

3.2 Behandlung von Gingiva-Fibroblasten mit Zytokinen

Im Rahmen dieser Teilstudie sollte der Einfluss von Zytokinen, insbesondere von Interleukinen alleine und in Kombination mit der Laser-Bestrahlung auf Gingiva-Fibroblasten überprüft werden.

Da eine Parodontitis immer einen Entzündungsprozess zur Grundlage hat und die durch die Plaque aktivierten Zellen des Immunsystems Entzündungsmediatoren produzieren wie zum Beispiel Zytokine wurde diese Studie mit den vier Zytokinen

- Interleukin-1 α ,
- Interleukin-1 β ,
- Interleukin-6 und
- Tumor-Necrosis-Faktor- α

durchgeführt.

Für die Behandlung mit den verschiedenen Zytokinen mussten zunächst die optimalen Bedingungen wie Behandlungsschema und Konzentration ausgetestet werden. Damit sollte das Zytokin mit dem größten Effekt auf die Gingiva-Fibroblasten gefunden werden. Dieses Zytokin wurde dann für die kombinierte Behandlung mit dem Laserlicht in der optimalen Konzentration verwendet.

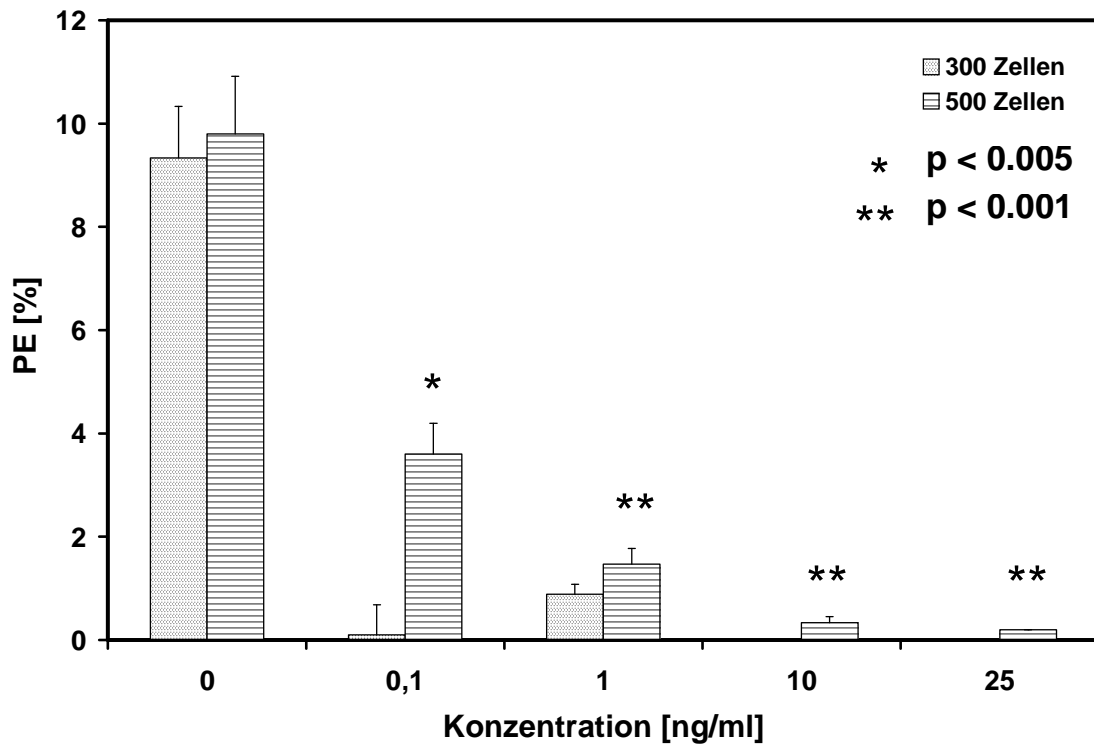
3.2.1 Einmalige Behandlung im Koloniebildungstest

Zunächst wurden die Gingiva-Fibroblasten mit unterschiedlicher Zellzahl (300 bzw. 500 Zellen/Well), um einen Einfluss der Zelldichte auszuschließen, für den Koloniebildungstest in 6-Well-Platten ausgesät. Eine Behandlung der Klonkulturen mit

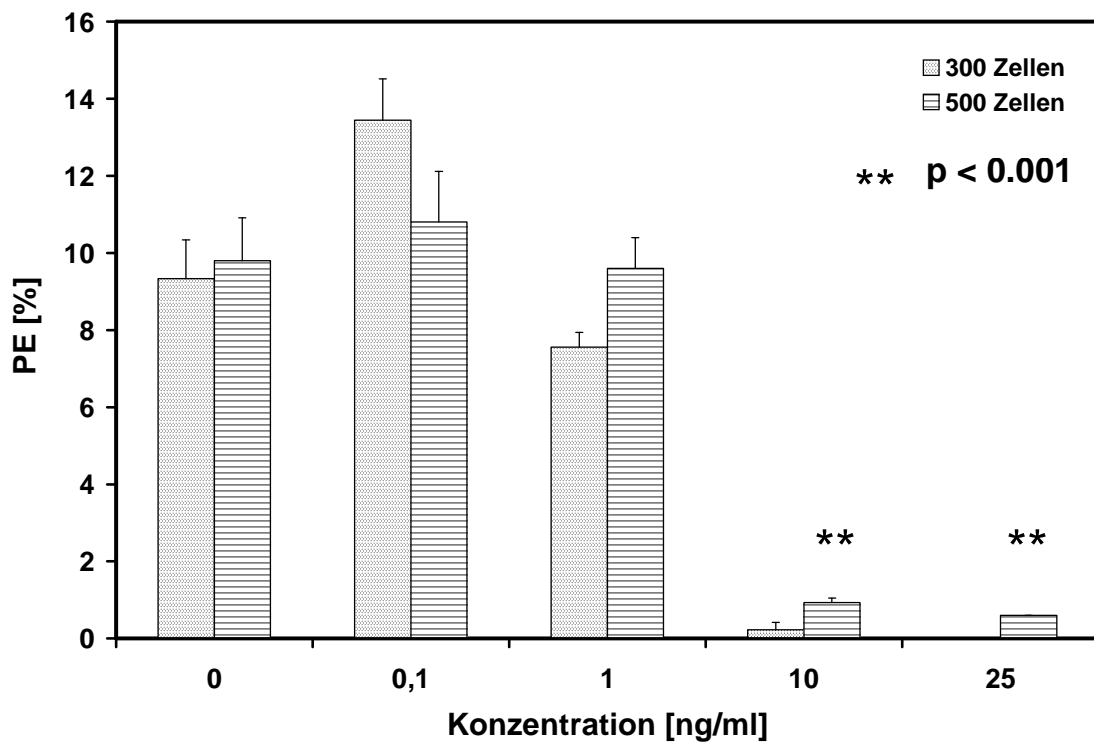
den Zytokinen (0,1, 1, 10 und 25 ng/ml) erfolgte 24 h nach der Aussaat im Rahmen eines kompletten Mediumwechsels.

In Abb. 4 sind die Überlebensraten der Gingiva-Fibroblasten nach der Behandlung mit den verschiedenen Zytokinen dargestellt.

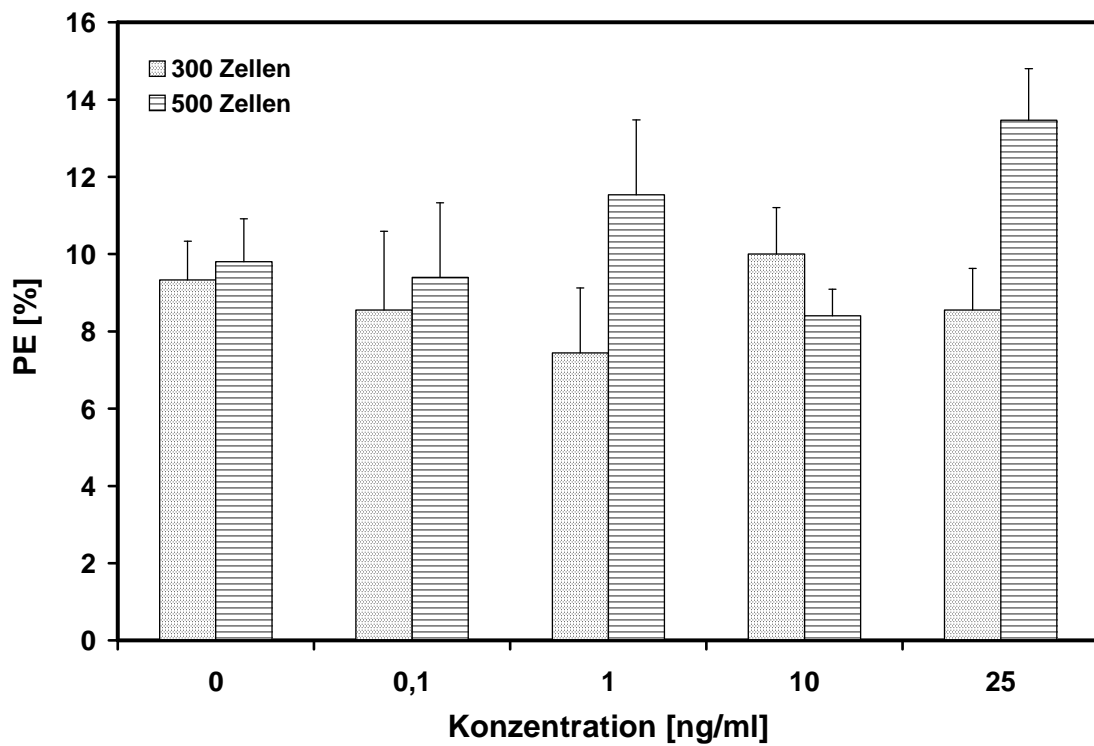
Interleukin-1 α :



Interleukin-1 β :



Interleukin-6:



Tumor-Necrosis-Faktor- α :

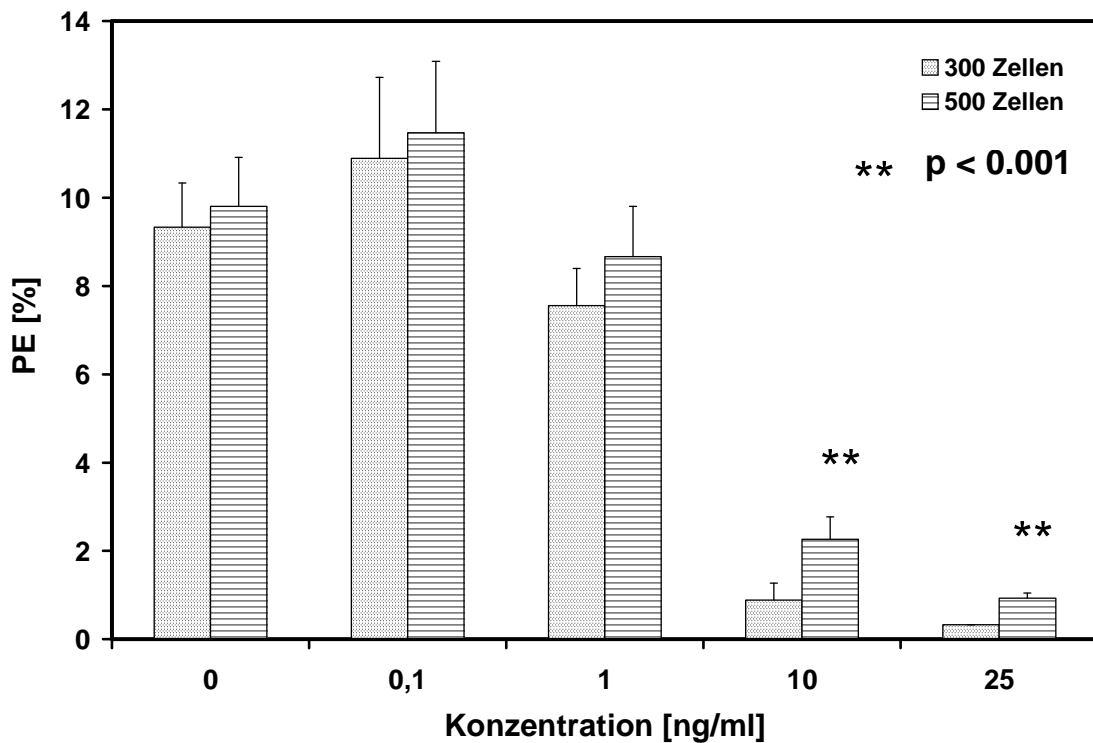


Abb. 4: Klonierungseffizienz der Gingiva-Fibroblasten in Abhängigkeit von der Zytokin-Konzentration; Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Experimente mit jeweils 3 Parallelansätzen (n=12).

Bei allen Zytokinen außer bei Interleukin-6 ist eine starke Wirkung auf das Überleben der Fibroblasten zu erkennen. Im Gegensatz dazu ist bei Interleukin-6 bei allen Konzentrationen kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle feststellbar.

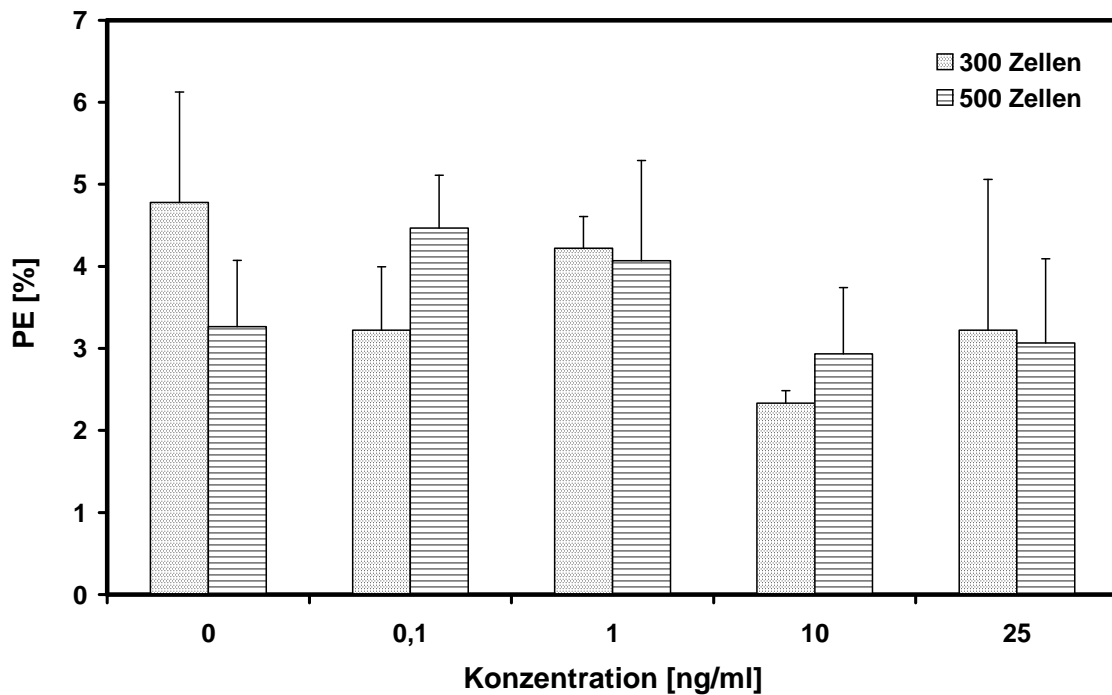
Während Interleukin-1 α bei allen Konzentrationen einen signifikanten Effekt auf die Fibroblasten zeigt, ist dieser bei Interleukin-1 β und TNF- α nur bei den höheren Konzentrationen vorhanden.

3.2.2 Einmalige Behandlung in der Massenkultur

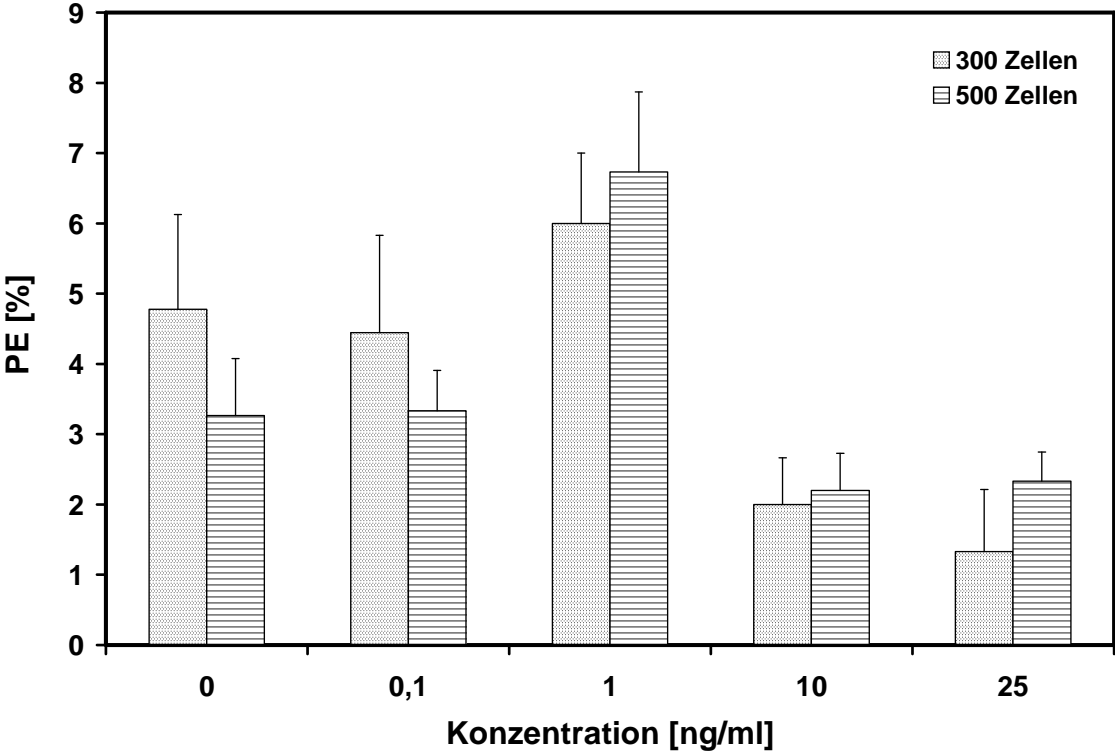
Zunächst wurden jeweils 300.000 Zellen pro Bedingung in eine Petrischale ausgesät. Nach 48 h wurde die konfluente Massenkultur mit verschiedenen Konzentrationen des entsprechenden Zytokins behandelt. Nach 24 h wurden die behandelten Gingiva-Fibroblasten trypsiniert und in den Koloniebildungstest ausgesät.

In Abb. 5 sind die Überlebensraten der Gingiva-Fibroblasten nach der Behandlung mit den verschiedenen Zytokinen und Zytokin-Konzentrationen in Massenkultur dargestellt. Überraschenderweise zeigt bei dieser Behandlungsmethode Interleukin-6 den stärksten Effekt auf die Fibroblasten, während bei Interleukin-1 α die Wirkung am schwächsten ist.

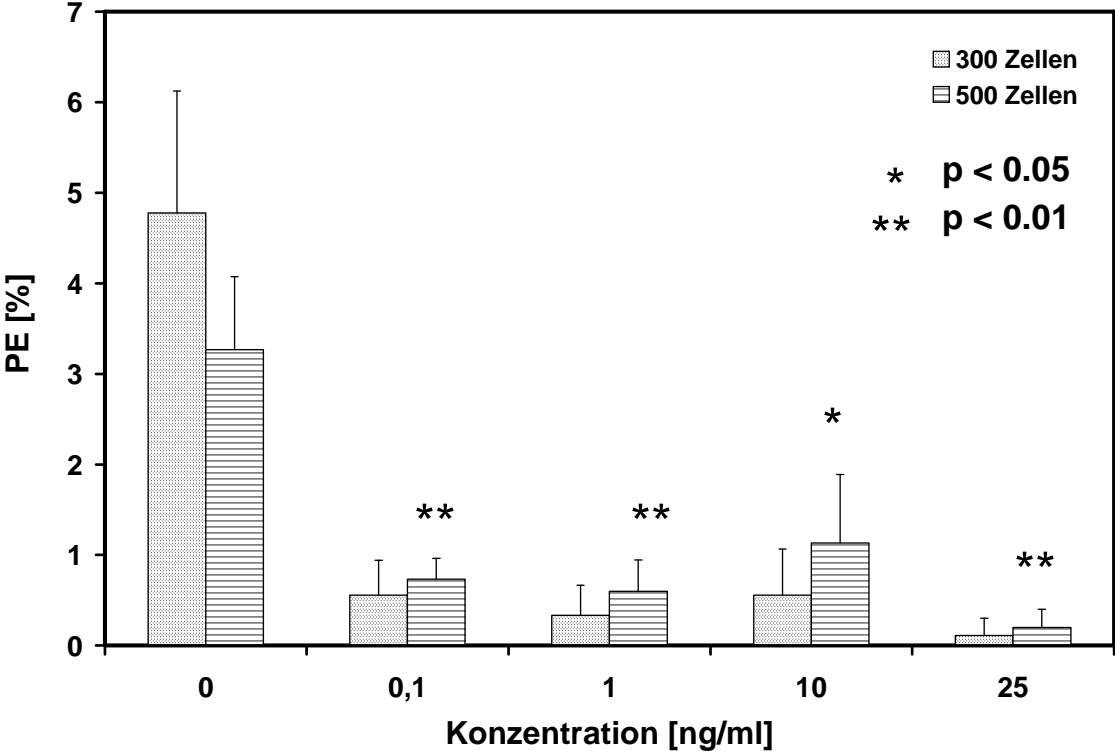
Interleukin-1 α :



Interleukin-1β:



Interleukin-6:



Tumor-Necrosis-Faktor- α :

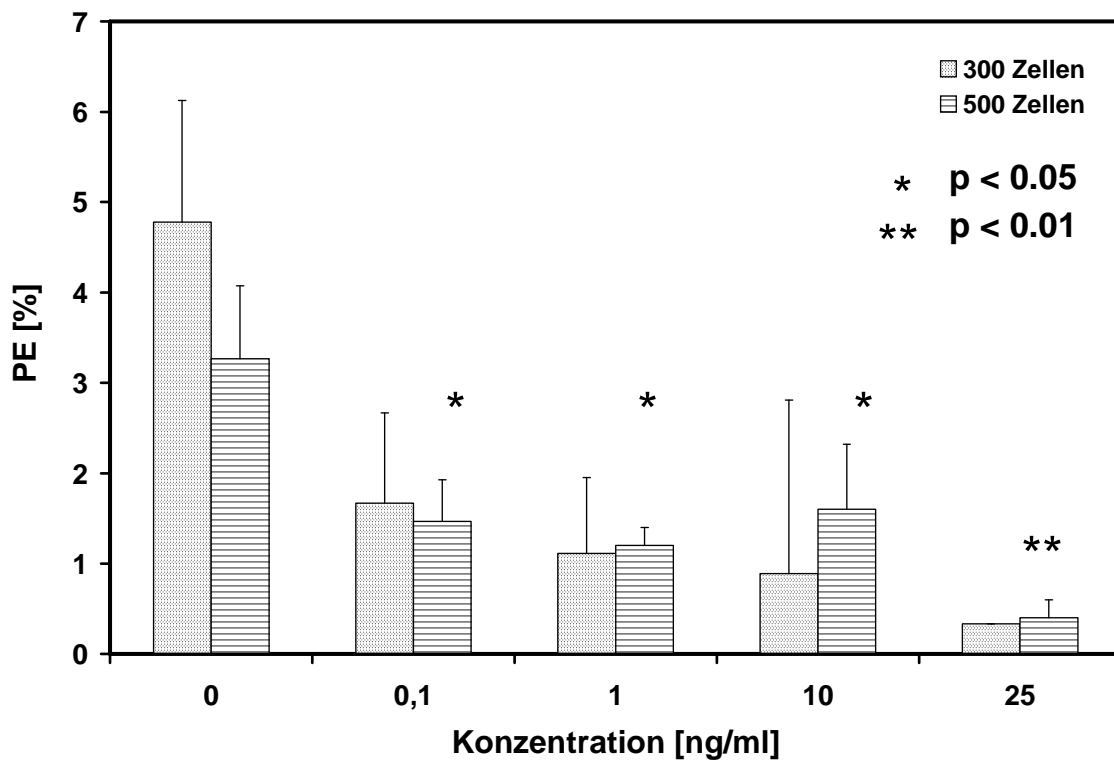


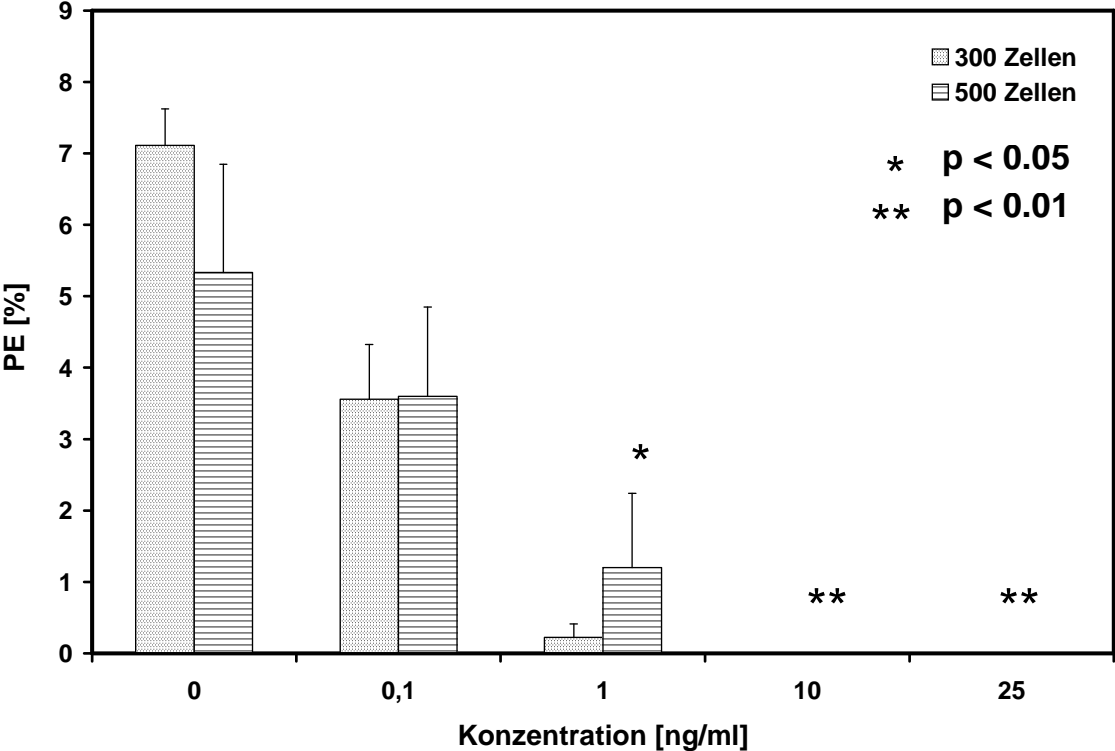
Abb. 5: Klonierungseffizienz der Gingiva-Fibroblasten in Abhängigkeit von der Zytokin-Konzentration; Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Experimente mit jeweils 3 Parallelansätzen (n=12).

Auch bei der Behandlung mit TNF- α zeigen die Fibroblasten bei allen Zytokin-Konzentrationen nur ein geringes Überleben im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dagegen ist bei Interleukin-1 β nach Behandlung der Fibroblasten mit 1 ng/ml sogar ein besseres Überleben im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten.

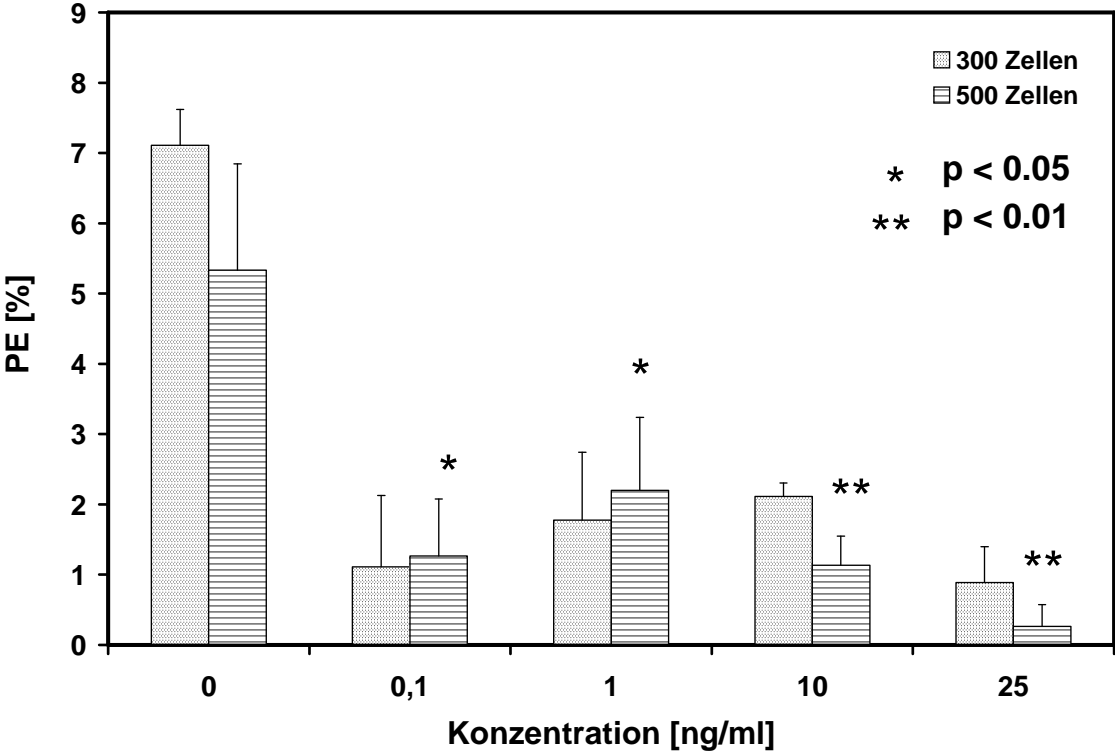
3.2.3 Behandlung in Massenkultur und im Koloniebildungstest

Die Aussaat und die Behandlung in Massenkultur der Fibroblasten erfolgte wie zuvor in 3.2.2 beschrieben. Allerdings wurden die Zellen bei diesem Experiment ein zweites Mal bei der Aussaat der Koloniebildungstests mit den Zytokinen in den entsprechenden Konzentrationen behandelt.

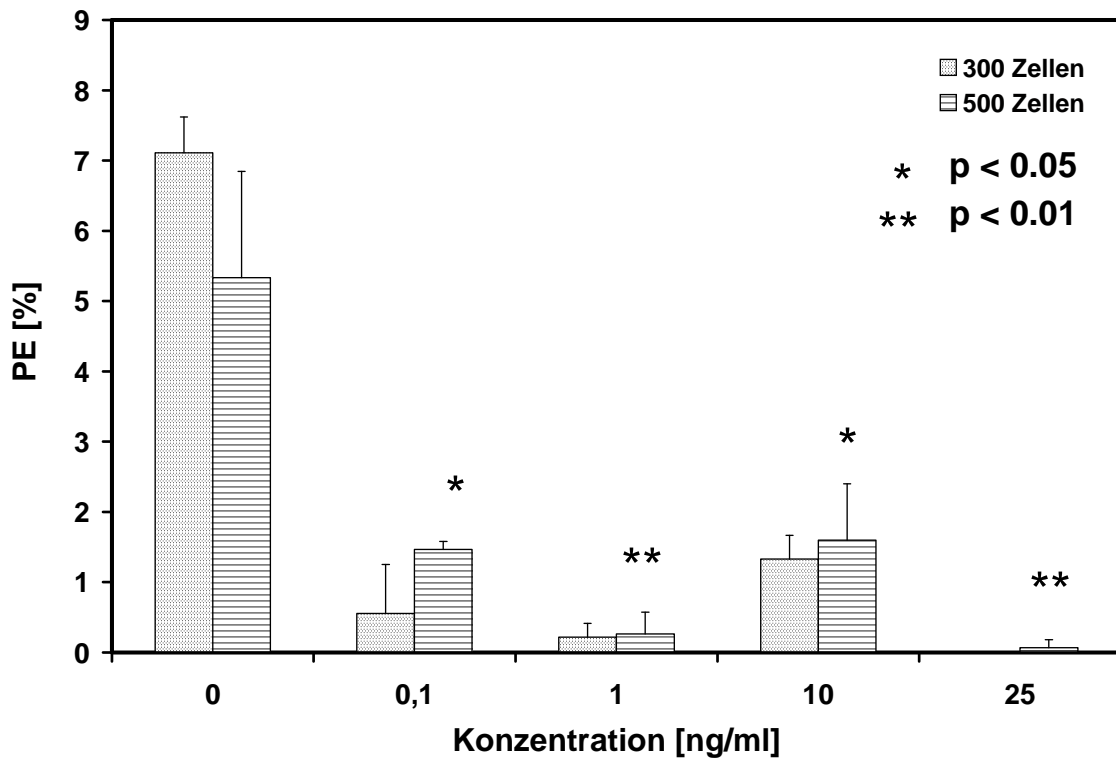
Interleukin-1α:



Interleukin-1β:



Interleukin-6:



Tumor-Necrosis-Faktor- α :

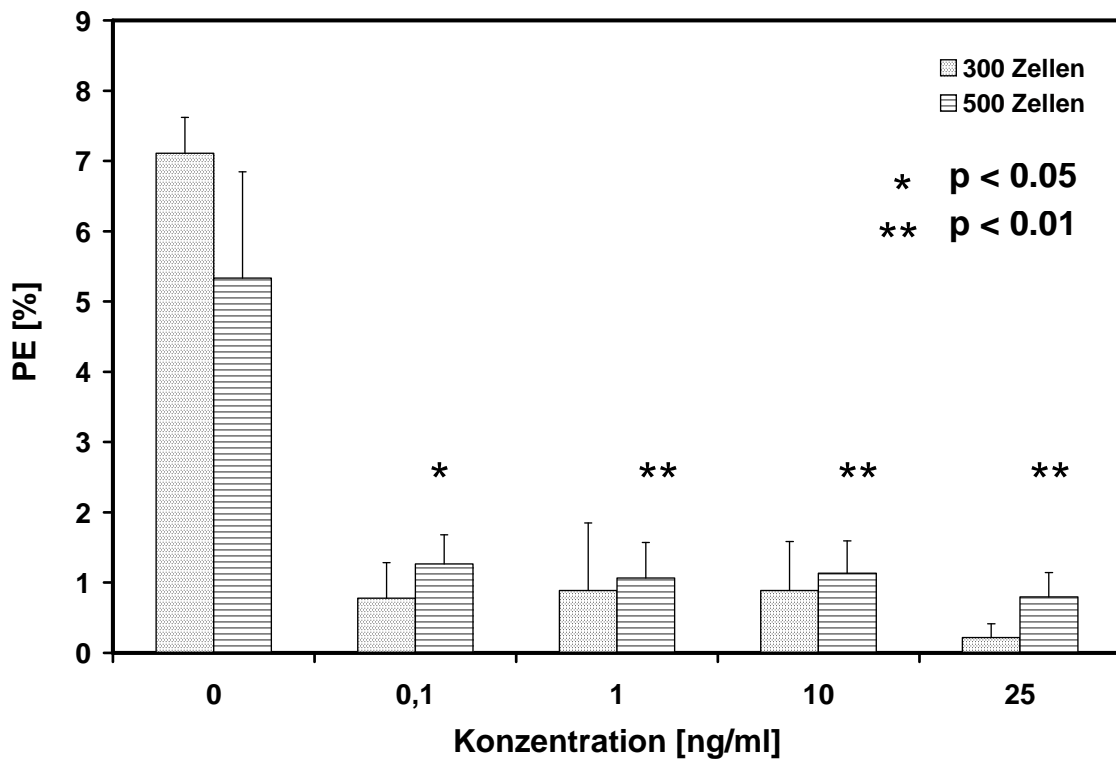


Abb. 6: Klonierungseffizienz der Gingiva-Fibroblasten in Abhängigkeit von der Zytokin-Konzentration; Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Experimente mit jeweils 3 Parallelansätzen (n=12).

In Abb. 6 sieht man, dass bei dieser Behandlungsmethode die Wirkung der Zytokine auf die Gingiva-Fibroblasten in allen Fällen am stärksten ist, so dass selbst bei der Behandlung mit den kleinen Zytokinen-Konzentrationen nur noch wenige Zellen überleben.

Eine Ausnahme ist hier Interleukin-1 α , bei dem die Überlebensrate bei einer Konzentration von 0,1 ng/ml am größten ist. Da dieses Zytokin auch bei dem vorherigen Experiment, der Behandlung in Massenkultur, die geringste Wirkung aufwies, wurde es für die kombinierte Behandlung verwendet.

3.2.4 Kombinierte Behandlung von Gingiva-Fibroblasten

Um den Effekt des Laserlichtes auf die mit Zytokinen behandelten Gingiva-Fibroblasten zu überprüfen, wurden die Zellen zunächst in Massenkultur wie in 3.2.2 beschrieben mit Interleukin 1- α (0,1 ng/ml) für 24 h behandelt, anschließend in den Koloniebildungstest ausgesät und 24 h nach der Aussaat über einen Zeitraum von 11 Tagen einer täglichen Exposition der entsprechenden Laserdosis (10, 27, 74 oder 200 mJ/cm²) unterzogen.

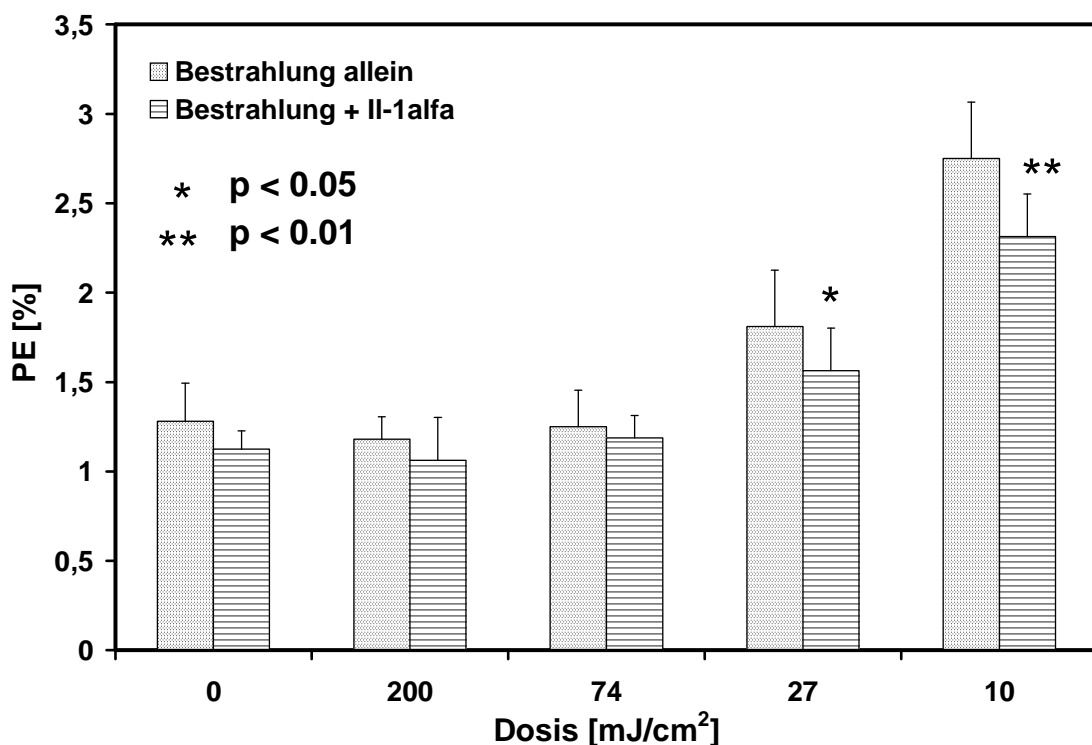


Abb. 7: Vergleich der Klonierungseffizienz der Gingiva-Fibroblasten nach alleiniger Laserbestrahlung und nach kombinierter Behandlung mit Interleukin-1 α und Bestrahlung; Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimente mit jeweils 4 Parallelansätzen (n=8).

In Abb. 7 sind die Überlebensraten der Gingiva-Fibroblasten nach alleiniger Laserbestrahlung und nach der kombinierten Behandlung mit Interleukin-1 α und Bestrahlung dargestellt.

Bei den höheren Dosen ist kein Unterschied zwischen den beiden Behandlungen zu erkennen. Dagegen ist bei einer Dosis 10 mJ/cm² ein minimal besseres Überleben nach alleiniger Bestrahlung im Gegensatz zur kombinierten Behandlung zu erkennen. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass das Laserlicht bei dieser Dosis eventuell die negative Wirkung der bei der Entzündung freigesetzten Zytokine abschwächen kann.

4 Diskussion

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde die Wirksamkeit von niederenergetischem infraroten Laserlichtes auf das Proliferations- und Regenerationsverhalten von humanen Gingiva-Fibroblasten untersucht. Frühere Studien konnten zeigen, dass die Bestrahlung mit niederenergetischem Laserlicht stimulierende Effekte auf Zellen haben kann, während bei höheren Dosen eine inhibitorische Wirkung beobachtet wurde (Basford, J.R., 1995, Conlan et al., 1996, Walsh, L.J., 1997).

Um diese These zu überprüfen, wurden die Gingiva-Fibroblasten mit unterschiedlichen Dosen (10-200 mJ/cm²) bestrahlt und das Überleben mit Hilfe des Koloniebildungstests ermittelt. Es zeigte sich, dass mit abnehmender Laserdosis, die Klonierungseffizienz der Fibroblasten anstieg und die Zellen bei 10 mJ/cm² am stärksten aktiviert werden.

Eine weitere Verringerung der applizierten Dosis (1 und 5 mJ/cm²) ergab keinen Effekt im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Dies bestätigt die allgemein in der Literatur akzeptierte These, dass es für die Wirkung niederenergetischer Laserstrahlung auf Zellen ein spezifisches Fenster gibt. Dieses Fenster ist abhängig von der Dosis und Wellenlänge des verwendeten Laserlichtes (Karu, T.I., 1990). So fanden Webb et al. bei der Bestrahlung verschiedener Fibroblasten-Zellstämme einmal eine signifikante Erhöhung des Zellwachstums nach Bestrahlung mit Laserlicht der Wellenlänge 660 nm (Webb et al., 1998), aber nach Bestrahlung der gleichen Zellstämme mit einem 880 nm-Laser eine deutliche Abnahme der Zellzahl nach 5 Tagen (Webb et al., 2003).

Auch andere Arbeitsgruppen konnten bei der Bestrahlung mit Laserlicht höherer Wellenlänge (> 800 nm) weder eine Stimulation der Zellproliferation (Pogrel et al., 1997) noch Unterschiede in der Proteinexpression von Prokollagen (Marques et al., 2004) im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle nachweisen. Pereira et al. fanden zwar nach Bestrahlung mit einem 904 nm-Laser eine um 3-5 fach höhere Zellzahl, allerdings nur bei einer Dosis von 3 J/cm² und nicht bei 5 J/cm². In beiden Fällen war aber kein Anstieg der Prokollagensynthese zu beobachten. Auch Kreisler et al. (2002, 2003) beobachteten bei verschiedenen Fibroblastentypen eine gesteigerte Proliferation bis zu 72 Stunden nach Bestrahlung mit Laserlicht von 809 nm Wellenlänge. Bei mehrmaliger Bestrahlung war der Unterschied zur unbestrahlten Kontrolle nach 24 Stunden am größten. Es ergab sich allerdings kein weiterer Anstieg der Fibroblastenproliferation an den darauffolgenden Tagen, trotz der zusätzlichen Bestrahlung. Deshalb vermuten die Autoren einen gewissen Sättigungseffekt bei mehrmaliger Laserbestrahlung.

Yu et al. (1994) konnten zeigen, dass die Wirkung von Laserlicht niedrigerer Wellenlänge (660 nm) ebenfalls von der Dosis abhängt. Bei der Bestrahlung von Fibroblasten mit $2,16 \text{ J/cm}^2$ war eine deutliche Stimulation des Zellwachstums zu beobachten, während bei $3,24 \text{ J/cm}^2$ keine gesteigerte Proliferation nachzuweisen war.

Im Gegensatz dazu fanden mehrere Arbeitsgruppen auch eine positive Wirkung von Laserlicht bei der Bestrahlung mit verschiedenen Dosen. So konnten Bednarska et al. (1998) bei Dosen von 2 und 12 J/cm^2 und Schindl et al. (2003) bei Dosen zwischen 2 und 8 J/cm^2 nach der Bestrahlung von humanen Zellen mit einem 670 nm-Laser eine signifikante Steigerung der Proliferation zeigen.

Diese Ergebnisse zeigen die Schwierigkeiten die optimale Dosis und Wellenlänge des Laserlichtes für die Behandlung von Patienten zu finden.

Bei einer Entzündungsreaktion, wie Gingivitis und Parodontitis werden nach Kontakt mit dem entzündlichen Reiz unter anderem Histamin und Serotonin von geschädigten Zellen freigesetzt und führen im lokalen Endstromgebiet zu einer Durchblutungsstörung, die letztlich in einer Verlangsamung des Blutstroms mit Wandständigkeit der im Blut befindlichen Leukozyten resultiert. Ebenfalls von Histamin beeinflusst, ermöglichen Zytokine als Mediatoren des Immunsystems, insbesondere Interleukin-1 und Tumor-Necrosis-Faktor- α , bereits nach wenigen Minuten durch die Ausbildung von Adhäsionsmolekülen an Gefäßwand und im Interzellularraum, die Anheftung und Diapedese von Leukozyten aus dem Blut in das Gewebe. Dort reifen sie unter dem Einfluss von Interferonen und gelangen durch Chemotaxis zum Herd der Entzündung, wo sie größere Mengen von Interleukin-1, Tumor-Necrosis-Faktor- α und Prostaglandin E_2 bilden und freisetzen. Immunglobuline werden durch Zytokine ebenfalls zum Entzündungsherd geführt, wo sie biologische Antigene markieren und somit die Phagozytose unterstützen (Böcking, A., 1994).

Wegen dieser besonderen Rolle der Zytokine bei Entzündungsreaktionen wurde in der vorliegenden Arbeit neben der alleinigen Laserbestrahlung ebenfalls untersucht, welchen Einfluss Zytokine und hier insbesondere die Interleukine, alleine und in Kombination mit der Bestrahlung auf die Gingiva-Fibroblasten in-vitro haben.

Für die Behandlung mit den verschiedenen Zytokinen mussten zunächst die optimalen Bedingungen wie Behandlungsschema und Konzentration (0,1, 1, 10 und 25 ng/ml) ausgetestet werden. Damit sollte das Zytokin mit dem größten Effekt auf die Gingiva-

Fibroblasten gefunden werden. Dieses Zytokin wurde dann für die kombinierte Behandlung mit dem Laserlicht in der optimalen Konzentration verwendet.

Es wurden folgende Behandlungsschemata ausgetestet:

- Einmalige Behandlung im Koloniebildungstest,
- Einmalige Behandlung in Massenkultur,
- Behandlung in Massenkultur und im Koloniebildungstest.

Bei der Behandlung im Koloniebildungstest war bei allen Zytokinen außer bei Interleukin-6 eine starke Wirkung auf das Überleben der Fibroblasten zu erkennen. Während Interleukin-1 α bei allen Konzentrationen einen signifikanten Effekt auf die Fibroblasten zeigte, war dieser bei Interleukin-1 β und TNF- α nur bei den höheren Konzentrationen vorhanden. Im Gegensatz dazu war bei Interleukin-6 bei allen Konzentrationen kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle feststellbar.

Überraschenderweise zeigte aber Interleukin-6 bei der einmaligen Behandlung in Massenkultur den stärksten Effekt auf die Fibroblasten, während bei Interleukin-1 α die Wirkung am schwächsten war. Auch bei der Behandlung mit TNF- α zeigten die Fibroblasten bei allen Zytokin-Konzentrationen nur ein geringes Überleben im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dagegen war bei Interleukin-1 β nach Behandlung der Fibroblasten mit 1 ng/ml sogar ein besseres Überleben im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten.

Bei der zweimaligen Behandlung in Massenkultur und im Koloniebildungstest war die Wirkung der Zytokine auf die Gingiva-Fibroblasten in allen Fällen am stärksten, so dass selbst bei der Behandlung mit kleinen Zytokin-Konzentrationen nur noch wenige Zellen überlebten. Eine Ausnahme war hier Interleukin-1 α , bei dem die Überlebensrate bei einer Konzentration von 0,1 ng/ml am größten war. Da dieses Zytokin auch bei der Behandlung in Massenkultur, die geringste Wirkung aufwies, wurde es für die kombinierte Behandlung mit dem niederenergetischen Laserlicht verwendet.

Bei dieser Behandlung war bei höheren Dosen kein Unterschied zwischen den beiden Behandlungen zu erkennen. Allerdings war bei einer Dosis von 10 mJ/cm² ein minimal besseres Überleben nach alleiniger Bestrahlung im Gegensatz zur kombinierten Behandlung zu erkennen. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass eventuell bei einer Dosis von 10 mJ/cm² weniger Interleukin-1 α freigesetzt wird und somit die negative Wirkung bei der Entzündungsreaktion abgeschwächt wird. Auch Shimizu et al. (1995) fanden eine inhibitorische Wirkung von niederenergetischem Laserlicht auf die Produktion von Prostaglandin E₂ und Interleukin-1 β in menschlichen parodontalen Ligamentfibroblasten.

Abschließend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Arbeit der positive Effekt von niederenergetischem Laserlicht auf das Klonierungsverhalten von Gingiva-Fibroblasten deutlich nachweisbar war. Diese Wirkung ist allerdings stark von der Dosis und Wellenlänge des verwendeten Laserlichtes abhängig.

Desweiteren konnte ein geringer Einfluss des Laserlichtes auf die mit Interleukin-1 α behandelten Fibroblasten bei Bestrahlung mit der optimalen Dosis gezeigt werden.

Bevor allerdings niederenergetisches Laserlicht zuverlässig bei der Behandlung von Entzündungsreaktionen des Zahnhalteapparates eingesetzt werden kann, müssen in Zukunft auch klinische Studien durchgeführt werden, um die in-vitro gezeigten Ergebnisse zu bestätigen.

5 Zusammenfassung

Niederenergetische Laserbestrahlung wird schon seit ca. Mitte der 70er Jahre in der Medizin und Zahnmedizin eingesetzt. Inzwischen gibt es vereinzelt Hinweise auf die biologische Wirksamkeit von niederenergetischem Laserlicht. Insbesondere bei Entzündungsprozessen im Zahnfleisch, bei deren Induktion Zytokine und insbesondere Interleukine eine entscheidene Rolle spielen, soll niederenergetisches infrarotes Laserlicht zu einer deutlich beschleunigten Ausheilung führen. Als biologische Grundlage wird die Aktivierung von Zellproliferationsprozessen postuliert, die zur Regeneration der Gingiva führen soll. Da diesen Hinweisen generell der detaillierte, wissenschaftliche zell- und molekularbiologische Unterbau fehlt, um die Wirkmechanismen anhand reproduzierbarer Ergebnisse erklären zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirksamkeit von niederenergetischem infraroten Laserlicht auf menschliche Gingiva-Fibroblasten, die zur Überprüfung dieses Postulates ein ideales Testsystem bieten, untersucht.

Die Fibroblasten wurden mit verschiedenen Dosen bestrahlt und das Überleben anhand des Koloniebildungstests analysiert. Dabei ergab sich eine signifikant bessere Klonierungseffizienz bei einer Dosis von 10 mJ/cm^2 im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Da bei geringeren Dosen kein besseres Überleben zu beobachten war, wird angenommen, dass es für die Wirkung von Laserlicht ein spezifisches Fenster gibt, das von der Dosis und Wellenlänge abhängt.

Außerdem wurde untersucht, ob niederenergetisches Laserlicht einen Einfluss auf die negative Wirkung von Zytokinen nimmt. Deshalb wurden die Gingiva-Fibroblasten sowohl mit verschiedenen Zytokinen alleine als auch in Kombination mit dem Laserlicht behandelt. Es ergab sich nur bei einer Dosis von 10 mJ/cm^2 ein etwas besseres Überleben im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle.

In der vorliegenden Arbeit konnte die positive Wirkung von niederenergetischem infrarotem Laserlicht auf Gingiva-Fibroblasten in-vitro deutlich gezeigt werden.

Allerdings sind weitere Untersuchungen nötig, um diese Ergebnisse auch in-vivo zu überprüfen.

6 Literatur

Abergel, R.P., Lyons, R.F., Castel, J.C., Dwyer, R.M., Uitto, J. (1987) Biostimulation of wound healing by lasers: experimental approaches in animal models and in fibroblast cultures. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* 13, 127-133.

Agarwal, S. (1998) Regulation of periodontal ligament cell functions by interleukin-1 beta., *Infect. Immun.* 66 (3), 932-937.

Alexander, M.B. & Damoulis, P.D. (1994) The Role of Cytokines in the Pathogenesis of Periodontal Disease. *Current Opinion in Periodontology* 39-53.

Almeida-Lopes, L., Rigau, J., Zingaro, R.A., Guidugli-Neto, J., Jaeger, M.M. (2001) Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence, *Lasers Surg. Med.* 29, 179-184.

Basford, J.R. (1995) Low intensity laser therapy: still not a established clinical tool, *Lasers Surg. Med* 16, 331-342.

Bayreuther, K., Rodemann, H.P. Hommel, R., Dittmann, K., Albiez, M., Francz, P.I. (1988) Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5112-5116.

Bednarska, K., Rozga, B., Kolodziejczyk, K., Szosland, D., Leyko, W., Bryszewska, M. (1998) Effect of low-power red light laser irradiation on the viability of human skin fibroblast, *Radiat. Environ. Biophys.* 37, 215-217.

Bochner, B.S., Landy, S.D., Plaut, M., Dinarello, C.A., Schleimer, R.P. (1987) Interleukin-1 production by human lung tissue: Identification and characterization., *J. Immunol.* 139, 2297-2302.

Böcking, A. (1994) Pathologie für Zahnmediziner Band 1: Scriptum der Allgemeinen Pathologie für Zahnmediziner (3. Auflage), Aachen, Verlag der Augustinus Buchhandlung.

Box, E.P., Hunter, Hunter (1978) Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley and Sons, 1978.

Camussi, G., Bussolino, F., Salvidio, G., Baglioni, C. (1987) Tumor necrosis factor/cachin stimulates peritoneal macrophages, polymorphonuclear neutrophils, and vascular endothelial cells to synthesize and release platelet-activating factor, *J. Exp. Med.* 166, 1390-1404.

Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L. (1975), An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 3666-3670.

Cavanaugh, P.F. Jr., Meredith, M.P., Buchanan, W., Doyle, M.J., Reddy, M.S. & Jeffcoat, M.K. (1998). Coordinate Production of PGE2 and IL-1 beta in the Gingival Crevicular Fluid of Adults with Periodontitis: its Relationship to Alveolar Bone Loss and Disruption by Twice Daily Treatment with Ketorolac Tromethamine Oral Rinse. *Journal of Periodontal Research*, 33, 75-82.

Conlan, M.J., Rapley, J.W., Cobb, C.M. (1996) Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation: A review, *J. Clin. Periodontol.* 23, 492-496.

Dewhirst, F.E., Stashenko, P.P., Mole, J.E. & Tsurumachi, T. (1985). Purification and Partial Sequence of Human Osteoclast- Activating Factor: Identity with Interleukin 1 β . *Journal of Immunology*, 135, 2562-2568.

Gamble, J.R., Harlan, J.M., Kelbanoff, S.J., Vadas, M.A. (1985) Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 82, 8667-8671.

Griffith, G.S., Wilton, J.M.A., Curtis, M.A., Maiden, M.F.J., Gillett, I.R., Wilson, D.T., Sterne, J.A.C., Johnson, N.W. (1988). Detection of High-Risk Groups and

Individuals for Periodontal Diseases. Clinical Assessment of the Periodontium.
Journal of Clinical Periodontology, 15, 403-410.

Grossman, N., Goren R., Reuveni H., Lubart R. (1996) Lasertherapy 8, 21-25.

Hallman, H.O., Basford, J.R., O'Brien, J.F., Cummins, L.A. (1988) Does low-energy helium-neon laser irradiation alter "in vitro" replication of human fibroblasts? Lasers Surg. Med. 8, 125-129.

Heasman, P.A., et al., Changes in crevicular fluid levels of interleukin-1 beta, leukotriene B 4, prostaglandin E 2, tromabaxane B2 and tumor-necrosis-factor alpha in experimental gingivitis in humans, J Periodont. Res 1993, 28, 543-546.

Hönig, J., Rordorf-Adam, C., Siegmund, C., Wiedemann, W. & Erard, F. (1989). Increased Interleukin-1 beta (IL-1 β) Concentration in Gingival Tissue from Periodontitis Patients. Journal of Periodontal Research, 24, 362-367.

Ishizaka, K., Interleukins: Molecular biology and immunology. Basel/ New York 1992.

Jelinek, D.F., Lipsky, P.E., (1987) Enhancement of human B cell proliferation and differentiation by tumor necrosis-factor- α and interleukin-1, J. Immunol. 139, 2970-2976.

Karu, T.I. (1990) Yearly review: effects of visible radiation on cultured cells, J. Photochem. Photobiol. 52, 1089-1098.

Kohase, M., Henriksen-DeStefano, D., May, L.T. (1986) Induction of beta 2-interferon by tumor necrosis factor: a homeostatic mechanism in the control of cell proliferation, Cell 45, 659-666.

Kreisler, M., Christoffers, A.B., Al-Haj, H., Willershausen, B., d'Hoedt, B. (2002) Low Level 809-nm Diode Laser-Induced In Vitro Stimulation of the Proliferation of Human Gingival Fibroblasts, Lasers Sug. Med. 30, 365-369.

Kreisler, M., Christoffers, A.B., Willershausen, B., d'Hoedt, B. (2003) Effect of Low-Level GaAlAs Laser Irradiation on the Proliferation Rate of Human periodontal Ligament Fibroblasts: An In Vitro Study 30, 353-358.

Lasertherapy Vol. 8, (1996) Proceedings of the 1st Congress on Lasertherapy.

Lee, H.-J., Kang, I.-K., Chung, C.-P. & Choi, S.-M. (1995). The Subgingival Microflora and Gingival Crevicular Fluid Cytokines in Refractory Periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 22, 885-890.

Marques, M.M., Pereira, A.N., Fujihara, N.A., Nogueira, F.N., Eduardo, C.P. (2004) Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts, *Lasers Surg. Med.* 34, 260-265.

Masada, M.P., Persson, R., Kenney, J.S., Lee, S.W., Page, R.C. & Allison, A.C. (1990). Measurement of Interleukin-1 α and -1 β in Gingival Crevicular Fluid: Implications for the Pathogenesis of Periodontal Disease. *Journal of Periodontal Research*, 25, 156-163.

Mester, A. (1996) *Lasertherapy* 8, 52-56

Pereira, A.N., Eduardo, C.de P., Matson, E., Marques, M.M. (2002) Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts, *Lasers Surg. Med.* 31, 263-267.

Pogrel, M.A., Chen, J.W., Zhang, K. (1997) Effects of low-energy gallium-aluminum-arsenide laser irradiation on cultured fibroblasts and keratinocytes, *Lasers Surg. Med.* 20, 426-432.

Preiss, D.S. & Meyle, J. (1994). Interleukin-1 β Concentration of Gingival Crevicular Fluid. *Journal of Periodontology*, 65, 423-428.

Reinhardt, R.A, Masada, M.P., Kaldahl, W.B., DuBois, L.M., Kornman, K.S., Choi, J., Kalkwarf, K.L. & Allison, A.C. (1993) Gingival Fluid Il-1 and Il-6 Levels in

Refractory Periodontitis, *Journal of Clinical Periodontology*, 20, 225-231.

Renggli, H.R. (1990). Ätiologie marginaler Parodontopathien. In Ketterl, W. (Hrsg.): *Praxis der Zahnheilkunde 4 – Parodontologie* (2. Auflage), München; Wien; Baltimore; Urban & Schwarzenberg, 33-64.

Rodemann, H.P., Bayreuther, K. (1984) Abnormal collagen metabolism in cultured skin fibroblasts from patients with Duchenne muscular dystrophy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5130-5134

Rodemann, H.P. Bamberg, M. (1995) Cellular basis of radiation-induced fibrosis, *Radiother. Oncol.* 35, 83-90.

Rodemann, H.P., Binder, A., Burger, A., Güven, N., Löffler, H., Bamberg, M. (1996) The underlying cellular mechanism of fibrosis, *Kidn. Int.* 49, 32-36.

Schindl, A., Merwald, H., Schindl, L., Kaun, C., Wojta, J. (2003) Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation, *Br. J. Dermatol.* 148, 334-336.

Seymour, G.J. (1991). Importance of the Host Response in the Periodontium. *Journal of Clinical Periodontology* 18, 421-426.

Stashenko, P., Dewhirst, F.E., Peros, W.J., Kent, R.L. & Ago, J.M. (1987). Synergistic Interactions between Interleukin 1, Tumor Necrosis Factor, and Lymphotoxin in Bone Resorption. *Journal of Immunology*, 138, 1464-1468.

Stashenko, P., Fujiyoshi, P., Obernesser, M.S., Probst, L., Haffajee, A.D. & Socransky, S.S. (1991) Levels of Interleukin-1 β in Tissue from Sites of Active Periodontal Disease, *Journal of Clinical Periodontology*, 18, 548-554.

Shimizu, N., Yamaguchi, M., Goseki, T., Shibata, Y., Takiguchi, H., Iawasawa, T., Abiko, Y. (1995) Inhibition of prostaglandin E₂ and interleukin-1 β by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells, *Journal of Dental Research* 74, 1382-1388.

Tosato, G., Seamon, K.B., Goldman, N.D. (1988) Monocyte-derived human B-cell growth factor identified as interferon- β (BSF-2, Il-6), *Science* 239, 502-504.

Trinchieri, G., Kobayashi, M., Rosen, M. (1986) Tumor necrosis factor and lymphotoxin induce differentiation of human myeloid cell lines in synergy with immune interferon, *J. Exp. Med.* 164, 1206-1225.

Walsh, L.J. (1997) The current status of low level laser therapy in dentistry, Part 1, soft tissue applications, *Austr. Dent. J.* 42, 247-254.

Webb, C., Dyson, M. (2003) The effect of 880 nm low level laser energy on human fibroblast cell numbers: a possible role in hypertrophic wound healing, *J. Photochem. Photobiol. B.* 70, 39-44.

Webb, C., Dyson, M., Lewis, W.H. (1998) Stimulatory effect of 660 nm low level laser energy on hypertrophic scar-derived fibroblasts: possible mechanisms for increase in cell counts, *Lasers Surg, Med.* 22, 294-301.

Wilton, J.M., Bampton, J.L., Hurst, T.J., Caves, J. & Powell, J.R. (1993) Interleukin-1 beta and IgG Subclass Concentrations in Gingival Crevicular Fluid from Patients with Adult Periodontitis, *Archives of Oral Biology*, 38, 55-60.

Yamamoto, Y., Kono, T., Totani, H., Kasai, S., Mito, M. (1996) Effect of low-power laser irradiation on procollagen synthesis in human fibroblasts, *J. Clin. Laser. Med. Surg.* 14, 129-132.

Yu, W., Naim, J.O., Lanzafame, R.J. (1994) The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts, *Photochem. Photobiol.* 59, 167-170.

Zilberstein, A., Ruggieri, R., Korn, J.H., Revel, M. (1986) Structure and expression of

cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulation cytokines, EMBO J. 5, 2529-2537.

