

METHYLMERCAPTAN UND SCHWEFELWASSERSTOFFPRODUKTE STIMULIEREN PROENTZÜNDLICHE ZYTOKINE IN PATIENTEN MIT NEKROTISCHEM PULPAGEWEBE UND WURZELBEHANDELTEN ZÄHNEN.

ELISABETH JACOBI-GRESSER¹, SABINE SCHÜTT², KATRIN HUESKER², VOLKER VON BAEHR²

¹Praxis für orale Chirurgie und Implantologie, Mainz, Deutschland;

²Abteilung für Immunologie, Institut für Medizinische Diagnostik, Berlin, Deutschland

Eingegangen am 29. September 2014 - Akzeptiert am 8. Januar 2015

Bacterial infections of the residual dentin or infected pulp tissue are responsible for most cases of endodontic treatment failures. Persisting microorganisms in necrotic pulp tissue produce sulphur components such as methyl mercaptan and hydrogen sulfide as well as thioether derivatives. Although there is emerging evidence that these sulphur compounds stimulate immune cells and induce the inflammation cascade, the immunological mechanisms of local and systemic inflammation have not been described. In this retrospective study we evaluated the ex vivo immune response of peripheral blood mononuclear cells to sulphur compounds in 53 patients with clinical or radiologic endodontic treatment failure, 20 patients with clinical discomfort or radiological findings without previous endodontic treatment and a control group of 31 patients who had received successful endodontic treatment at least five years before. Patients with endodontic abnormalities showed significantly higher ex vivo-sulphur compounds stimulated interferon-gamma (IFN- γ) and interleukin-10 (IL-10) levels as compared to the control group. The association between ex vivo-stimulated cytokines and endodontically derived sulphur compounds was further substantiated by the fact that the number of IFN- γ and/or IL-10-positive patients declined significantly 3-8 months after retreatment of the root canal or tooth extraction. Further, serum tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) levels were higher in patients than in controls, and at the same time, the TNFA -308 G/A polymorphism was associated with endodontic treatment failure in our study population. We conclude that a cellular immune response to sulphur compounds contributes to the inflammation process observed in relation to endodontic treatment failures.

Aktuellen Studien zufolge sind moderne Wurzelbehandlungen in bis zu 90 % der Fälle erfolgreich. In Fällen wiederkehrender Entzündungen können Revisionen durch spezialisierte Endodontologen Erfolgsraten von etwa 80 % erreichen, was signifikant über den Erfolgsraten von Zahnärzten ohne entsprechende Spezialisierung liegt (1). Trotz dieser Erfolge leiden selbst heute noch 12 % der Patienten auch nach Leitlinien getreuer endodontischer

Behandlung an leichten bis moderaten Beschwerden (2). Die Erfolgsrate der Nachbehandlung zunächst übersehener und unbehandelter Kanäle beträgt etwa 80 % (3, 4). Eine vor kurzem veröffentlichte Meta-Analyse der zwischen 1922 und 2002 veröffentlichten Literatur zeigt eine durchschnittliche Erfolgsrate von 75 % für nachbehandelte Wurzelkanäle mit apikaler Parodontitis (5).

Schlüsselwörter: Pulpitis, Methylmercaptan, Hydrogensulfid, Thioether, Interferon- γ , Interleukin-10, Tumornecrose-Faktor alpha

Korrespondenz:

Dr. med. Volker von Baehr
Abteilung für Immunologie,
Institut für Medizinische Diagnostik,
Nicolaistr. 22
12247 Berlin, Deutschland
Telefon: +49-30-77001220
Fax: +49-30-77001236

v.baehr@imd-berlin.de

E. JACOBI-GRESSER ET AL.

Den Aussagen der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK) und der Deutschen Gesellschaft für Zahnerhaltung (DGZ) zufolge zeigen die bis dato verfügbaren, allerdings wenig umfangreichen, Studienergebnisse eine vollständige Erholung innerhalb von 3 bis 4 Jahren in 90 % der Fälle. Gleichzeitig könnte die Häufigkeit der postendodontischen apikalen Parodontitis aufgrund von unzureichender radiologischer Bildgebung unterschätzt worden sein (6).

Es ist allgemein bekannt, dass die meisten Fälle von Therapieversagen auf anhaltende bakterielle Infektionen im Dentin oder Pulpagewebe zurückzuführen sind (7). Da eine vollständige Beseitigung von bakteriellen Infektionen mit den derzeit zur Verfügung stehenden Techniken nicht möglich ist, erzeugen die im nekrotischen Pulpagewebe vorhandenen Mikroorganismen eine große Bandbreite von Stoffwechselprodukten. Schwefelverbindungen wie zum Beispiel Methylmercaptan und Schwefelwasserstoff sowie Thioether-Derivate wie Dimethylsulfid und Diethylsulfid sind Stoffwechselprodukte, die in der Regel von anaeroben Bakterien durch Entschwefelung cysteinreicher, Glutathion, L-Methionin und L-Methionyl enthaltender Peptide abgegeben werden. Die Haupterzeuger von Schwefelwasserstoffprodukten sind *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola* und *Veillonella alcalescens*. Methylmercaptan wird vor allem von *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas intermedia* und *Fusobacterium nucleatum* erzeugt (8).

Schwefelreduzierende Bakterien sind ätiologisch an destruktiven parodontalen Erkrankungen beteiligt und fördern das Fortschreiten der Erkrankung (9). Schwefelverbindungen sind in der Gingivalflüssigkeit der Zahntaschen nachweisbar (8). Diese Schwefelverbindungen können toxisch wirken und greifen primär das zentrale Nervensystem an. Schwefelwasserstoff kann den Aufbau und das Wachstum von Nervenzellen dramatisch verändern, wie für Purkinje-Zellen gezeigt (10). In der Mundhöhle schädigt Schwefelwasserstoff die Epithelzellen und erhöht die Schleimhautpermeabilität (11). Methylmercaptan hemmt die Kollagensynthese in humanen Fibroblasten und unterbindet dadurch die Zellwanderung zum parodontalen Ligament. Dies kann zur Pathogenese von Zahnfleischerkrankungen beitragen (12).

Schwefelverbindungen können außerdem aktivierend oder modulierend auf Immunzellen wirken und damit die Gewebeerstörung durch entzündliche Prozesse fördern. Methylmercaptan steigert nachweislich die Produktion

von Interleukin 1 (IL-1) in mononukleären Zellen. Gleichermaßen steigt die durch Lipopolysaccharide (LPS) stimulierte Produktion von Interleukin 6 (IL-6) in Gegenwart von Methylmercaptan weiter an (13). Darüber hinaus kann Methylmercaptan in Kombination mit IL-1 oder LPS die Sekretion von PGE2 und cAMP deutlich erhöhen. PGE2 und cAMP sind für die Synthese von Matrix-Metalloproteinasen und anderen Prokollagenasen in gingivalen Fibroblasten und polymorphkernigen Leukozyten erforderlich (14). Damit kann Methylmercaptan über eine gesteigerte Kollagenaseproduktion die Gewebeerstörung bei Parodontalerkrankungen fördern. Methylmercaptan verstärkt außerdem die Aktivität von Aspartatprotease-Cathepsin B in gingival infiltrierten Leukozyten und erhöht damit die Rate des Kollagenabbaus (14).

Der Großteil der Daten zu Schwefelverbindungen bei der Gewebeerstörung stammt aus Studien zu Parodontalerkrankungen. Welche Rolle Methylmercaptan und Thioether in nekrotischem Pulpagewebe und bei chronischer Pulpitis spielen, ist hingegen weitgehend unbekannt, wenn auch mehrere Studien zeigen, dass anaerobe Bakterien im Wurzelkanal die häufigste Ursache für das Versagen endodontischer Behandlungen sind. Lin und Kollegen wiesen färbare Bakterien in den Wurzelkanälen von 69 % der Patienten nach, bei denen eine Wurzelbehandlung zuvor versagt hatte. Darüber hinaus korreliert die Schwere der periradikulären Entzündung mit dem Vorhandensein von Bakterien im Wurzelkanal (15). Devitale Zähne sind weniger widerstandsfähig gegen das Eindringen von Bakterien in die Dentintubuli als vitale Zähne (16). Die am häufigsten aus primär und sekundär infizierten Wurzelkanälen isolierten anaeroben Bakterien sind schwefelreduzierende Bakterien ähnlich denen, die bei Parodontalerkrankungen zu finden sind. Zu ihnen zählen zum Beispiel *Porphyromonas gingivalis* und *Fusobacterium nucleatum*, die Hauptproduzenten von Methylmercaptan, Dimethylsulfid und Diethylsulfid (17). Trotz dieser Belege kann eine apikale Parodontitis klinischen Berichten zufolge selbst bei radiologisch einwandfreiem endodontischen Behandlungsergebnis und unabhängig von mikrobiologischen Restbelastungen auftreten.

Diese Beobachtung legt den Einfluss von Wirtsfaktoren nahe, wie beispielsweise eine genetisch erhöhte Entzündungsneigung oder individuelle Unterschiede bei der Immunantwort auf Bakterien, persistierende bakterielle Antigene oder Schwefelverbindungen.

Ziel dieser retrospektiven Studie war 1. den Zusammenhang zwischen dem Mercaptan-Thioether-Test, einem Ex-vivo-Stimulationsansatz, und klinischen und radiologischen Ergebnissen zu untersuchen sowie 2. Risikofaktoren für das Versagen endodontischer Therapien zu identifizieren. Die ausgewerteten Daten stammen von einer Gruppe aus Patienten, bei denen eine Wurzelbehandlung nach klinischen oder radiologischen Kriterien fehlgeschlagen war, sowie von einer Kontrollgruppe aus Probanden, bei denen eine mindestens fünf Jahre zuvor durchgeführte endodontische Behandlung erfolgreich gewesen war, d.h. ehemalige Patienten mit ausreichend gefüllten Kanälen ohne radiologische Auffälligkeiten oder klinische Symptome.

MATERIAL UND METHODEN

Studienpopulation

104 Patienten mit nur einem ein- oder mehrwurzeligen devitalen Zahn im Ober- oder Unterkiefer wurden zwischen März 2010 und Oktober 2012 in einer auf Endodontie spezialisierten Zahnarztpraxis untersucht. Patienten mit Parodontitis oder mehreren betroffenen Zähnen wurden ausgeschlossen. Die durchgeführten Zahnbehandlungen und Labordiagnosen erfolgten ausschließlich im Rahmen der medizinischen Routinebehandlung. Für die retrospektive Auswertung der Daten wurden die Patienten in eine Patientengruppe (n=73) und eine Kontrollgruppe (n=31) aufgeteilt, jeweils basierend auf dem Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von klinischen Symptomen bzw. radiologischen Befunden. 20 von 73 Patienten zeigten klinische Beschwerden oder radiologische Befunde ohne vorhergehende endodontische Behandlungsmaßnahmen. Bei 53 von 73 Patienten war zuvor eine endodontische Behandlung erfolgt, die sich nach radiologischer Bildgebung als unzureichend erwies (inhomogene Füllung, ganz oder teilweise ungefüllter Wurzelkanal), oder sie hatten eine apikale Parodontitis entwickelt. Die Bewertung der klinischen Symptome basierte auf der Perkussionsempfindlichkeit und der Empfindlichkeit gegenüber okklusaler Belastung, lokalen Schmerzen oder Anzeichen einer Zahnfleischentzündung wie z. B. Rötungen oder Schwellungen der Schleimhaut. Die Anamnesedaten wurden in Bezug auf Schmerzempfinden bei der ersten Konsultation oder zum Zeitpunkt der endodontischen Behandlung erfasst. Es wurden auch verfügbare Bilddaten berücksichtigt (Zahn-Röntgenbilder, Panorama-Röntgenbilder, 3D-Kegelstrahltaufnahmen).

Bei der Kontrollgruppe aus 31 symptomfreien Patienten

war mindestens fünf Jahre zuvor (>5-24 Jahre) eine endodontische Behandlung an einem Zahn erfolgreich durchgeführt worden. In der radiologischen Bildgebung zeigten die behandelten Zähne ausreichend gefüllte Wurzelkanäle und einen intakten Parodontalspalt.

Gemäß der Deklaration von Helsinki haben alle Patienten schriftlich ihre Einwilligung zur wissenschaftlichen Auswertung ihrer Daten erteilt. Eine Genehmigung durch das lokale IRB war nicht erforderlich, da alle diagnostischen Tests und Behandlungsprotokolle Teil der medizinischen Routineversorgung waren.

Zahnbehandlung und Labordiagnostik

Von den 73 Patienten erfolgte bei jeweils 45 bzw. 28 Patienten eine Behandlung der vorhandenen Wurzelkanalfüllung bzw. eine Zahnextraktion. Zahnextraktionen wurden bei schwerwiegenden endodontischen bzw. parodontalen Läsionen oder unzureichender Entfernung von Füllungsmaterial durchgeführt bzw. wenn eine Zahnrestauration nicht möglich war.

Die routinemäßigen Labortests wurden für die gesamte Studienpopulation ausgeführt und umfassten folgende Analysen: Genotypisierung der Gene IL1A, IL1B, IL1RN und TNFA, Mercaptan-Thioether-Tests, und die Bestimmung der TNF- α , IP-10- und MBL-Konzentrationen im Serum. Mit Ausnahme der Genotypisierung wurden alle diagnostischen Tests bei der ersten Vorstellung der Patienten beim Zahnarzt sowie 3 bis 8 Monate nach der ersten Behandlung bei der Entnahme von Folgeproben durchgeführt.

Revision

Nach Erstellung einer Zugangskavität mithilfe von Kofferdam und mikroskopischer Bildgebung (Kaps Typ SOM 32, Asslar) erfolgten die Sondierung und Vorbereitung des koronalen Drittels des Kanals sowie die Sondierung des Gleitpfads und Vorbereitung von Kanälen bis zur apikalen Konstriktion mit mindestens ISO 30. Die endometrische Längenbestimmung wurde mithilfe eines elektronischen Apex-Finders kontrolliert (ROOT-ZX, J. Morita Corporation, Tokio, Japan). Das Spülungsprotokoll bestand aus 5 % Natriumhypochlorit, EDTA-Lösung und Chlorhexidin. Die Spülung erfolgte mit einem Ultraschallverfahren (30 THz). Die Aufbereitung und Reinigung des Wurzelkanals wurde durch Aufbringen von Ca(OH)₂ und einer bakterienundurchlässigen Versiegelung mit Zement oder Komposit abgeschlossen. Nach 1 bis 2 Wochen wurde eine Obturation durch vertikale Kondensation der

E. JACOBI-GRESSER ET AL.

Guttaperchastifte (Roeko-Coltene/Whaledent, Schweiz) und Versiegelung mit AH plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Im Falle von immunologischen Sensibilisierungen wurden die Standardmaterialien durch individuell tolerierte Materialien ersetzt, beispielsweise Epiphany (Pentron Clinical Technologies, Wallingford USA) und MTA (Dentsply DeTrey, Konstanz, Deutschland). Es wurde eine bakterienundurchlässige Kompositfüllung aufgebracht, um eine erneute mikrobielle Kontamination zu verhindern. Das Behandlungsergebnis wurde durch Röntgen der Zähne oder 3D-Kegelstrahl-aufnahmen kontrolliert.

Extraktion

Alle Zahnextraktionen wurden unter Lokalanästhesie durchgeführt. Um das Risiko einer Kontamination zu minimieren, wurden die Alveolen vorsichtig mit einer chirurgischen Kugelfräse ausgefräst und mit einer sterilen Natriumchloridlösung gespült. Dies sollte eine unkontaminierte Knochenregeneration ermöglichen. Die Extraktionsstellen wurden nicht durch eine Augmentation stabilisiert.

Genotypisierung

Für die genetischen Analysen wurde genomische DNA mithilfe des QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aus 2 ml EDTA-Vollblut extrahiert. Die Genotypisierung der Polymorphismen rs1800587 (IL1A), rs1143634 (IL1B) und rs419598 (IL1RN) erfolgte mittels Multiplex-PCR und anschließende reverse Hybridisierung gemäß dem Protokoll des Herstellers (GenoType IL-1; VER 1.0, HAIN Lifescience, Nehren, Deutschland). Die Genotypisierung von rs1800629 (TNFA) erfolgte mittels Real-Time-PCR und einer Schmelzkurvenanalyse am Light Cycler 1.5 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland), wie an anderer Stelle veröffentlicht (18).

Serumanalysen

Serumproben wurden mittels Zentrifugation von koagulierte Vollblut gewonnen und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Die Serumspiegel wurden durch im Handel erhältliche ELISA ermittelt: TNF- α Immulite (DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland), IP-10 (MERCCK/Millipore, Darmstadt, Deutschland) und MBL (Antibody-Shop, Gentofte, Dänemark). Die Analysen wurden gemäß den Anweisungen der Hersteller durchgeführt. Der MBL-Test weist ausschließlich funktionale MBL-Oligomere nach und detektiert keine inaktiven MBL-Monomere.

Mercaptan-Thioether-Test

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) wurden mit Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Schweden) Dichtegradientenzentrifugation aus 10 ml heparinisiertem venösem Vollblut isoliert. Die PBMCs wurden in RPMI 1640 (Biochrom KH, Berlin, Deutschland) resuspendiert, ergänzt mit 2 mM L-Glutamin (Sigma) und 10 % hitzeinaktiviertem autologem Serum. Die PBMCs wurden in einer Konzentration von 1×10^6 / ml in 24 fach-Mikrotiterplatten mit ebenem Boden (Nunclon, Wiesbaden, Deutschland) ausgesät und mit jeweils 500 ng/ml Methanethiol (CH₃SH, Methylmercaptan, Sigma, Deutschland) und Dimethylsulfid (CH₃SCH₃, Dimethylthioether, Sigma, Deutschland) stimuliert. Zum Vergleich der basalen Zytokinkonzentrationen dienten ohne Schwefelverbindungen kultivierte PBMCs zur Kontrolle. Die Zellen wurden für 24 Stunden in einem befeuchteten Inkubator mit 5 % CO₂ bei 37°C kultiviert. Nach Zentrifugation wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und das sekretierte IFN- γ und Interleukin 10 mithilfe des Human Cytokine Panel I (MPXHCYTO-60K; Merck, Darmstadt, Deutschland) nach den Anweisungen des Herstellers bestimmt, unter Nutzung der Software Luminex[®] 200™ mit xPonent[®] (Luminex, Austin, USA). Die Endergebnisse für IFN- γ und IL-10 wurden durch Subtraktion der unstimulierten Basalwerte von den mit Schwefelverbindungen stimulierten Werten ermittelt. Zusätzlich wurde mittels Trypanblau-Färbung bestätigt, dass die angewendeten Konzentrationen der Schwefelverbindungen im Verlauf der 24 stündigen Stimulation nicht zytotoxisch wirkten.

Statistik

Die anamnestischen und klinischen Parameter sowie die Genotyp-Häufigkeiten zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe wurden mittels Chi-Quadrat-Test verglichen. Das Alter der Patienten, die Testergebnisse des Mercaptan-Thioether-Tests und die Zytokinkonzentrationen wurden mittels Mann Whitney U-Test analysiert. Der Vergleich der positiven und negativen Ergebnisse des Mercaptan-Thioether-Tests erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test. Ein positives Ergebnis wurde definiert als IFN- γ $> 0,3$ IU/ml oder IL-10 > 10 pg/ml (nach Subtraktion der Basalwerte). p-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die Ergebnisse der primären und der Folgetests wurden mit einem Mc-Nemar-Test verglichen. Die statistischen Analysen wurden mithilfe von IBM SSP Statistics, Version 19 durchgeführt.

ERGEBNISSE

Mercaptan und Thioether stimulieren ex vivo die Ausschüttung von IFN- γ und IL-10 bei Patienten mit endodontischen Läsionen.

Um mögliche Unterschiede der Immunantwort auf Schwefelverbindungen in der Patienten- und der Kontrollgruppe zu beurteilen, wurde die Zytokin-Freisetzung in isolierten PBMCs nach einer 24 stündigen Stimulation mit und ohne Schwefelverbindungen analysiert. Während Interferon-gamma (IFN γ) als Marker für auf TH1-basierte Immunantworten diente, wurde Interleukin 10 (IL-10) zur Ermittlung der TH2-Antworten genutzt. Die PBMCs der Patientengruppe produzierten im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich höhere Konzentrationen an IFN- γ und IL-10 nach Stimulation mit Schwefelverbindungen (IFN γ 1,53 IU/ml vs. 0,1 IU/ml, $p < 0,0001$; IL-10: 46,09 pg/ml vs. 27,41 pg/ml; $p < 0,0001$; Abb. 1). Eine detaillierte Auswer-

tung der Daten zeigte, dass von den 73 Patienten 9 erhöhte IFN- γ -Konzentrationen, 19 erhöhte IL-10-Konzentrationen und 11 sowohl erhöhte IFN- γ - als auch IL-10-Konzentrationen aufwiesen. 34 Patienten zeigten weder erhöhte IFN- γ - noch IL-10-Konzentrationen. Im Gegensatz dazu wies in der Kontrollgruppe nur ein einziger Proband erhöhte IL-10-Konzentrationen auf. IFN- γ war sogar bei keinem Probanden der Kontrollgruppe erhöht. Das Ergebnis des Mercaptan-Thioether-Tests wurde daraufhin bei IFN- $\gamma > 0,3$ IU/ml bzw. IL-10 < 10 pg/ml als „positiv“ definiert. Aufgrund dieser Definition wurden 39/73 Patienten (53,4 %) als positiv eingestuft, im Vergleich zu 1/31 der Kontrollgruppe (3,2 %). Der Unterschied erwies sich nach dem Mann-Whitney U-Test als statistisch signifikant ($p < 0,001$).

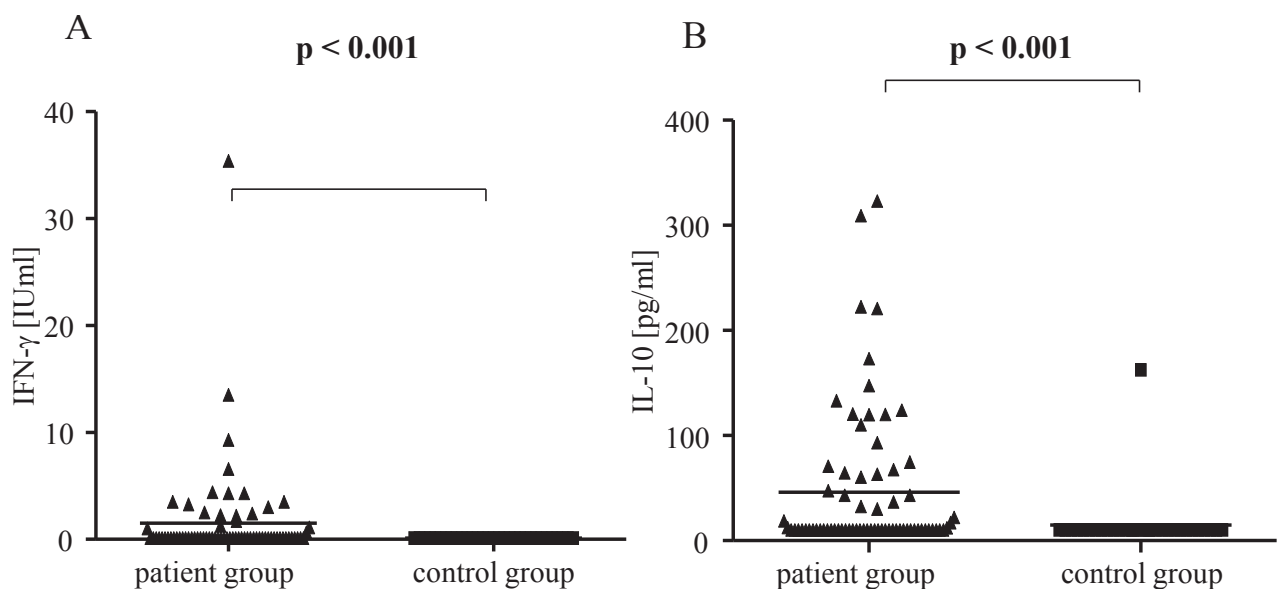


Fig. 1. Konzentration an ex-vivo stimuliertem IFN- γ (A) und IL-10 (B) in Patienten (n=73) und Kontrollprobanden (n=31). Die Werte entsprechen der Differenz aus Basal- und stimulierten Konzentrationen. Patienten zeigen für beide Zytokine signifikant höhere Werte (Mann-Whitney U-Test).

E. JACOBI-GRESSER ET AL.

Das Ergebnis des Mercaptan-Thioether-Tests ist unabhängig vom Alter, Geschlecht, Tabakkonsum und Vorerkrankungen.

Im nächsten Schritt wurden mögliche Einflussfaktoren geprüft, die die Korrelation zwischen dem endodontischen Therapieversagen und dem positiven Ergebnis des Mercaptan-Thioether-Tests überlagern könnten. Die logisti-

sche Regressionsanalyse zeigt jedoch, dass die Assoziation unabhängig von Alter, Geschlecht und Tabakkonsum besteht (Tabelle I). Auch Bluthochdruck, Pollen- und anderen Allergien, Autoimmunerkrankungen, Krebserkrankungen sowie der persönlichen Mundpflege, Bruxismus und Alkoholkonsum beeinflussten nicht das Ergebnis des Mercaptan-Thioether-Tests (Tabelle I).

	patient group (n = 73)		control group (n = 31)		p-value
	n	%	n	%	
Average age (years)	50.6		53.0		0.221*
Range (years)	22-76		33-73		
Gender (F/M)	57/16		25/6		1.000
Smokers	13	17.8	3	9.7	0.382
General medical conditions					
hypertension	16	21.9	7	22.6	1.000
Sensitizations	38	52.8	12	38.7	0.205
Allergic rhinitis	16	21.9	9	29.0	0.459
autoimmune diseases	14	19.7	4	12.9	0.574
cancer history	8	11.3	2	6.5	0.719
Daily oral hygiene					
good	72	98.6	31	100	1.000
poor	1	1.4	0	0	
Bruxism					
yes	25	34.2	9	29.0	0.654
no	48	65.8	22	71.0	
Alcohol					
yes	5	6.8	2	6.5	1.000
no	68	93.2	29	93.5	

Table I: Alter, Geschlecht, Rauchverhalten und Vorerkrankungen der Patienten (n=73) und Kontrollprobanden (n=31).

Der TNF- α -Polymorphismus G-308A erhöht das Risiko für ein Versagen der Wurzelbehandlung.

IL-1, Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1RN) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) stellen Schlüsselzytokine der angeborenen Immunantwort dar. Um die potenziellen Auswirkungen funktionaler Polymorphismen in diesen Zytokin-Genen auf das Ergebnis der endodontischen Therapie zu analysieren, wurden die Polymorphismen IL1A rs1800587 (-889 C/T), IL1B rs1143634 (+3954 C/T), IL1RN rs419598 (+2018 T/C) und TNFA rs1800629 (-308 G/A) bei den Patienten und den Probanden der Kontrollgruppe genotypisiert (Tabelle II). Für die Interpretati-

on der Daten wurde das Vorhandensein von mindestens einem selteneren Allel als „Risiko-Genotyp“ für den entsprechenden Polymorphismus definiert. Der Vergleich der TNFA-Genotypen in den verschiedenen Gruppen ergab einen signifikanten Anstieg der Prävalenz des TNFA-Risiko-Genotyps in der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (43,8 % vs. 16,1 %, $p = 0,007$). Die Risiko-Genotypen IL1A 889 C/T-, IL1B +2953 C/T und IL1RA +2018 T/C zeigten dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen (Tabelle II).

Genotype	patient group n=73 n (%)	control group n=31 n (%)	p-value
IL1A -889 C/T			
CC	42 (57.5)	19 (61.3)	0.829
CT or TT	31 (42.5)	12 (38.7)	
IL1B +3953 CT			
CC	45 (61.6)	20 (64.5)	0.828
CT or TT	28 (38.4)	11 (35.5)	
IL1RA +2018 T/C			
TT	37 (50.7)	19 (61.3)	0.392
CT or CC	36 (49.3)	12 (38.7)	
TNFA -308 G/A			
GG	41 (56.2)	26 (83.9)	0.007
GA or AA	32 (43.8)	5 (16.1)	

Table II. Allelhäufigkeit von IL1A rs1800587 (-889 C/T), IL1B rs1143634 (+3954 C/T), IL1RN rs419598 (+2018 T/C) und TNFA rs1800629 (-308 G/A). Allein TNFA rs1800629 (-308 G/A) zeigt eine signifikante Assoziation (Chi square test, $p=0.007$).

Ein Versagen der Wurzelbehandlung geht mit erhöhten TNF- α -Serumspiegeln einher.

Zum Nachweis systemischer Entzündung wurde TNF- α in Serum analysiert. Tatsächlich wies die Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte TNF- α -Serumspiegel auf (14,51 pg/ml vs. 11,90 pg/ml, $p < 0,05$, Abb. 2). Das Mannose-bindende Lektin (MBL), das an der Immunabwehr der Schleimhäute beteiligt ist, und das Inter-

feron-induzierbare Protein-10 (IP-10), ein Chemokin, das die Migration aktivierter T-Zellen fördert, zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollgruppe. Es war lediglich eine Tendenz zu höheren IP-10-Werten bei den Patienten zu beobachten (MBL: 1438 pg/ml vs. 1541 pg/ml; IP-10: 733,3 pg/ml vs. 661,7 pg/ml; Mann-Whitney U-Test).

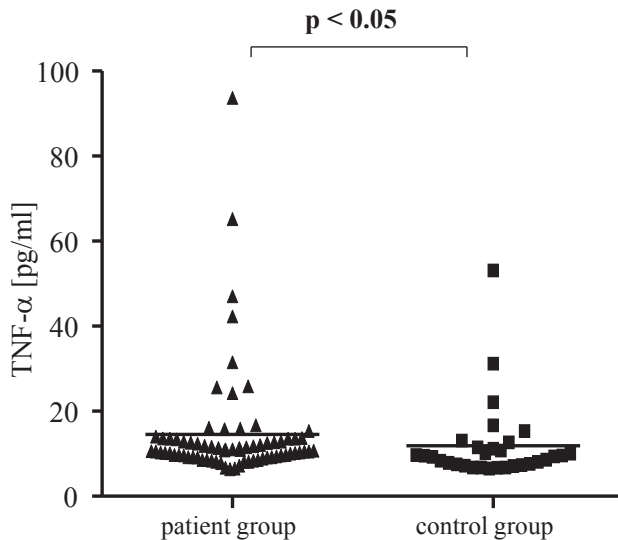


Fig. 2: TNF- α Serumspiegel in Patienten und Kontrollprobanden. Jeder Punkt steht für ein Individuum.

Auffällige Ergebnisse des Mercaptan-Thioether-Tests normalisierten sich nach Revision oder Extraktion.

Wir prüften die Hypothese, dass ein Entfernen der Quelle der Schwefelverbindungen die Zytokinproduktion im Mercaptan-Thioether-Test reduziert. Daher wurde der Test 3 bis 8 Monate nach der Zahnextraktion oder der erneuten Behandlung des Wurzelkanals zu zwei Zeitpunkten wiederholt. 69 der anfänglich 73 Patienten standen für Folgetests zur Verfügung (Extraktionsgruppe: 27/69 Patienten; Revisionsgruppe: 42/69 Patienten). Patienten, die zu einem der Zeitpunkte ein negatives Ergebnis hatten (IFN- $\gamma < 0,3$ IU/ml und IL-10 < 10 pg/ml), wurden als negativ eingestuft. Wie in den Tabellen III und IV gezeigt, reduzierten sowohl die Revision als auch die Extraktion signifikant die Häufigkeit positiver Mercaptan-Thioether-Testergebnisse. In der Extraktionsgruppe wurden vor der Behandlung 16/27 Patienten (59,3 %) als positiv eingestuft, während nach der Extraktion nur 4/27 (14,8 %) als positiv eingestuft wurden ($p = 0,004$; Tabelle III). Die detaillierte Auswertung ergab, dass sich von 16 Patienten, die vor der Behandlung positiv waren, 14 nach der Extraktion als negativ erwiesen. Zwei Patienten blieben positiv, von denen sich bei einem

(ID 45) die IFN- γ -Sekretion von 9,3 auf 0,1 pg/ml normalisierte, wobei dieser jedoch IL-10-positiv blieb. Der andere weiterhin positive Patient (ID 67) blieb IFN- γ -negativ, steigerte jedoch die IL-10-Sekretion. Zwei der Patienten wurden bei den anfänglichen Tests als negativ eingestuft, waren bei den Folgetests jedoch IL-10-positiv (ID 57 und ID 68). Kein IFN- γ -negativer Patient wurde IFN- γ -positiv. In der Revisionsgruppe wurden 22/42 Patienten (52,4 %) vor der Behandlung im Stimulationstest mit Schwefelverbindungen auf mindestens ein Zytokin positiv getestet, während beim Folgetest nach der Behandlung 10/42 als positiv eingestuft wurden (23,8 %, $p = 0,023$; Tabelle IV). Die detaillierte Auswertung ergab, dass 17 der anfänglich 22 positiv getesteten Patienten nun als negativ einzustufen waren. Bei fünf Patienten blieben die Testergebnisse positiv (IDs 3, 9, 15, 29, 42) und fünf anfänglich negative Patienten waren im Folgetest positiv (IDs 13, 24, 26, 34, 36). Von diesen fünf zeigten vier jedoch nur eine geringfügige Erhöhung des IL-10-Werts (bis zu 14,4 pg/ml). Nur bei einem anfänglich negativen Fall trat eine starke Induktion der Zytokinsekretion auf (ID 26: IFN- γ 12,3 IU/ml, IL-10 negativ).

Table III: Stimulation test outcome before and after treatment, extraction group

patient ID	time point 1			time point 2		
	IFN- γ	IL-10	result	IFN- γ	IL-10	result
61	35.4	74.7	positive	<0.1	<10	negative
45	9.3	<10	positive	<0.1	54	positive
53	4.4	<10	positive	<0.1	<10	negative
69	4.3	124.2	positive	<0.1	<10	negative
46	3.5	22.3	positive	<0.1	<10	negative
52	3	<10	positive	<0.1	<10	negative
65	2.2	12.4	positive	<0.1	<10	negative
48	1	<10	positive	<0.1	<10	negative
43	<0.1	<10	negative	<0.1	<10	negative
44	<0.1	<10	negative	<0.1	<10	negative
47	<0.1	173.3	positive	<0.1	<10	negative
49	<0.1	<10	negative	<0.1	<10	negative
50	<0.1	309	positive	<0.1	<10	negative
51	<0.1	18.8	positive	<0.1	<10	negative
54	<0.1	120.5	positive	<0.1	<10	negative
55	<0.1	<10	negative	<0.1	<10	negative
56	<0.1	43	positive	<0.1	<10	negative
57	<0.1	<10	negative	<0.1	99	positive
58	<0.1	32.6	positive	<0.1	<10	negative
59	<0.1	<10	negative	<0.1	<10	negative
60	<0.1	<10	negative	<0.1	<10	negative
62	<0.1	120.3	positive	<0.1	<10	negative
63	<0.1	<10	negative	<0.1	<10	negative
64	<0.1	<10	negative	<0.1	<10	negative
66	<0.1	<10	negative	<0.1	<10	negative
67	<0.1	60.6	positive	<0.1	240	positive
68	<0.1	<10	negative	<0.1	26.6	positive

Table IV: Stimulation test outcome before and after treatment, revision group

patient ID	time point 1			time point 2		
	IFN- γ	IL-10	result	IFN- γ	IL-10	result
1	13.5	<10	positive	<0.1	<10	negative
15	6.6	43	positive	3.4	<10	positive
16	4.3	323	positive	<0.1	<10	negative
22	3.5	222.4	positive	<0.1	<10	negative
12	3.3	110	positive	<0.1	<10	negative
8	2.5	<10	positive	<0.1	<10	negative
5	2.4	<10	positive	<0.1	<10	negative
21	2.3	<10	positive	<0.1	<10	negative
7	1.7	36.7	positive	<0.1	<10	negative
3	1.1	<10	positive	<0.1	10.1	positive
9	0.7	147.4	positive	<0.1	87.3	positive
2	<0.1	17.2	positive	<0.1	<10	negative
4	<0.1	93.2	positive	<0.1	<10	negative
6	<0.1	<10	negative	<0.1	<10	negative
10	<0.1	63.3	positive	<0.1	<10	negative
11	<0.1	<10	negative	<0.1	<10	negative
13	<0.1	<10	negative	<0.1	14.4	positive
14	<0.1	<10	negative	<0.1	<10	negative
17	<0.1	<10	negative	<0.1	<10	negative
18	<0.1	47.4	positive	<0.1	<10	negative
19	<0.1	64.6	positive	<0.1	<10	negative
20	<0.1	<10	negative	<0.1	<10	negative
23	<0.1	<10	negative	<0.1	<10	negative
24	<0.1	<10	negative	<0.1	14.1	positive
25	<0.1	220.8	positive	<0.1	<10	negative
26	<0.1	<10	negative	12.3	<10	positive
27	<0.1	<10	negative	<0.1	<10	negative
28	<0.1	67.5	positive	<0.1	<10	negative
29	<0.1	30.1	positive	1	<10	positive
30	<0.1	<10	negative	<0.1	<10	negative
31	<0.1	<10	negative	<0.1	<10	negative
32	<0.1	<10	negative	<0.1	<10	negative
33	<0.1	<10	negative	<0.1	<10	negative
34	<0.1	<10	negative	<0.1	14.4	positive
35	<0.1	<10	negative	<0.1	<10	negative
36	<0.1	<10	negative	<0.1	11.5	positive
37	<0.1	12.3	positive	<0.1	<10	negative
38	<0.1	<10	negative	<0.1	<10	negative
39	<0.1	<10	negative	<0.1	<10	negative
40	<0.1	<10	negative	<0.1	<10	negative
41	<0.1	119.9	positive	<0.1	<10	negative
42	<0.1	70.9	positive	3.7	36.5	positive

In der Kontrollgruppe blieben die Ergebnisse des Mercaptan-Thioether-Tests unverändert.

Um die biologische Variabilität und die Inter-Assay-Reproduzierbarkeit zu prüfen, wurde der Mercaptan-Thioether-Test auch für 28 Probanden der Kontrollgruppe (28/31) wiederholt. Keiner dieser Probanden war in der Zwischenzeit nicht endodontisch behandelt wurden. Die Wiederholungstests erfolgten im gleichen Zeitfenster wie bei der Patientengruppe. 25 von 28 Probanden zeigten zu keinem Zeitpunkt ein positives Testergebnis. Dies spricht für eine hohe Inter-Assay-Stabilität. Der einzige in der Wiederholung positive Patient wurde sechs Monate später als wieder negativ getestet. Zwei anfänglich negative Patienten zeigten hingegen in der Folgeuntersuchung eine geringfügig erhöhte IL-10-Sekretion (13,1 pg/ml und 27,7 pg/ml).

DISKUSSION

Die vorliegende Studie zeigt, dass mit dem Versagen der endodontischen Therapie eine immunologische Sensibilisierung gegenüber Methylmercaptan und Thioethern assoziiert ist. Die Ex-vivo-Stimulation von Lymphozyten mit Schwefelverbindungen ergab eine signifikant erhöhte Zytokinausschüttung bei Patienten mit klinischen Beschwerden oder radiologischen Auffälligkeiten. Die Tatsache, dass die Analysen mit mononukleäre Zellen aus dem Blutkreislauf durchgeführt wurden, spricht für eine Typ-IV-Immunsensibilisierung gegenüber den eingesetzten Schwefelverbindungen. Da T-Lymphozyten sowohl IFN- γ als auch IL-10 produzieren, sind sie wahrscheinlich für den beobachteten Anstieg der Zytokinwerte verantwortlich. Doch auch andere Zellkomponenten der PBM-Cs stellen mögliche Quellen dar, beispielsweise natürliche Killerzellen, die nachweislich IFN- γ ausschütten (19), Monozyten und B-Lymphozyten, die nachweislich beide IL-10 produzieren (20). Diesen Zellen fehlen jedoch spezifische Antigen-Erkennungsstellen, sodass sie nur durch unspezifische Signale aktiviert werden. Eine unspezifische Aktivierung durch Methylmercaptan bzw. Dimethylsulfid ist jedoch aufgrund der durchgehend negativen Zytokinwerte in der Kontrollgruppe sehr unwahrscheinlich.

Die Beobachtung, dass Schwefelverbindungen die Produktion proentzündlicher Zytokine in Immunzellen stimulieren, ist in der Literatur gut belegt. Methylmercaptan aktiviert nachweislich IL-1 in humanen mononukleären Zellen (14) und steigert die LPS-induzierte Produktion von IL-6 (13). Darüber hinaus steigert Methylmercaptan in Kombination mit IL-1 oder LPS deutlich die Sekre-

tion von PGE2 und cAMP, und induziert dadurch lokale Entzündungsprozesse (14). Proentzündliche Zytokine wie IL-1, Interleukin-8 (21), TNF- α (22) und sogar der T-Zell-Mediator Interleukin-2 (23) sind in entzündetem Pulpagewebe von Patienten mit irreversibler Pulpitis erhöht. Es ist naheliegend zu spekulieren, dass die proentzündlichen Pathomechanismen bei devitalen Zähnen denen der irreversiblen Pulpitis ähneln.

Ein möglicher kausaler Zusammenhang zwischen einer Sensibilisierung gegenüber Methylmercaptan und der apikalen Entzündung wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Elimination von Methylmercaptan/Thioether durch Wurzelbehandlung oder Zahnextraktion zu einem signifikanten Rückgang der durch Schwefelverbindungen induzierten Zytokinproduktion führt. Dies korreliert mit der bekannten Tatsache, dass bei Entfernung eines stimulierenden Antigens die Zahl der entsprechenden antigenspezifischen T-Zell-Vorläufer im Blut zurückgeht. Die Beobachtung, dass in der Revisionsgruppe und in der Extraktionsgruppe einzelne zunächst negative Patienten in der Folgeuntersuchung positive Werte aufwiesen, könnte auf Regulierungsmechanismen zurückzuführen sein. Diese Patienten sind Schwefelverbindungen ausgesetzt und entwickeln möglicherweise, induziert durch regulatorische T-Lymphozyten, eine Immuntoleranz. Im Mercaptan-Thioether-Test dient IL-10 als Marker für regulatorische T-Zellen, während IFN- γ eine TH1-vermittelte Effektorzellantwort anzeigt, die mit lokalen und/oder systemischen Entzündungen im Zusammenhang steht. Da der Fokus dieser Studie auf der Sensibilisierung gegenüber Schwefelverbindungen liegt, wurde die Analyse auf diese Zytokine beschränkt. Ein späterer endodontischer Eingriff könnte eine latente Toleranzreaktion gegen Schwefelverbindungen reaktivieren. Es ist wichtig anzumerken, dass Gegenstand dieser Studie nicht war, den langfristigen Erfolg von Revision und Extraktion im Zusammenhang mit Immunreaktionen auf Schwefelverbindungen zu vergleichen.

Bei T-Zell-vermittelten Immunaktivierungen tritt die Hochregulation von IL-10 in der Regel zusammen mit der INF- γ -Produktion auf. Dennoch stimmt die Beobachtung, dass drei Probanden der Kontrollgruppe ohne Anzeichen klinischer Befunde als IL-10-positiv eingestuft wurden, mit Studien überein, die zeigen, dass isoliertes IL-10 auch ohne manifeste Entzündungs- oder allergische Reaktionen auftritt. Dies wurde für Allergene berichtet, insbesondere bei der Sensibilisierung auf Medikamente (24). Ausgehend von den bisher publizierten Daten kann nicht festgestellt werden, ob positive IL-10-Werte auf beginnende Immun-

prozesse hinweisen oder alternativ eine stabile Immun-toleranz anzeigen; dazu sind weitere Studien mit einem verstärkten klinischen Schwerpunkt notwendig. Ebenso werden weitere Studien erforderlich sein, um die klinische Bedeutung von isolierten positiven IL-10-Werten zu beleuchten.

Eine entgegengesetzte Situation zeigte sich bei dem Patienten der Revisionsgruppe, der bei den Folgetests eine starke Hochregulation von IFN- γ aufwies. Hier besteht eine wahrscheinliche Erklärung darin, dass die Revision in diesem Fall zu einer Freisetzung von Schwefelverbindungen aus dem Kanal geführt haben könnte. Alternativ könnte dieser Patient in Zeit zwischen Primär- und Folgeuntersuchung eine weitere, unabhängige endodontische Läsion entwickelt.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass ein immunologischer Labortest bei Patienten mit chronisch nekrotischem Pulpagewebe als diagnostisches Werkzeug dienen kann. Ebenso kann der Mercaptan-Thioether-Test im Rahmen der Nachsorge ein zusätzliches objektives Kriterium für den Erfolg der endodontischen Therapie ergeben. Wie aufgrund seiner belegten proentzündlichen Wirkung zu erwarten, zeigen die Daten für IFN- γ einen höheren prognostischen Wert. Die prognostische Bedeutung des IL-10 wird dennoch durch die größere Häufigkeit IL-10 positiver Testergebnisse in der Patientengruppe gestützt, sowie durch die Tatsache, dass Wurzelbehandlung und Extraktion in der Mehrheit der Fälle zu einem Rückgang von IL-10 führten. Die Daten zeigen, dass die hier vorgestellten neuen Labortests zusätzliche objektive Kriterien für die Prognose der endodontischen Therapie bieten können und damit klinische Untersuchungsergebnisse und die Bildgebung unterstützen.

Zusätzlich zu unseren Daten, die auf den TNF- α -Polymorphismus G-308A als prädisponierenden Faktor für das Versagen der endodontischen Therapie oder apikale Parodontitis hinweisen, haben frühere Studien einen Beitrag dieses Polymorphismus zu verschiedenen chronischen entzündlichen Erkrankungen aufgezeigt, beispielsweise Diabetes mellitus (25), entzündliche Darmerkrankungen (26), Atherosklerose und Schlaganfall (27) sowie Parodontitis (28) und Periimplantitis (29). Andere Studien weisen einen signifikanten Zusammenhang zwischen TNFA -308 G/A und lokalen Entzündungsprozessen nach, bei denen Osteoklasten und synoviale Fibroblasten durch RANKL-Expression aktiviert werden, was wiederum die Knochenresorption erhöht (30). Gleichzeitig fördert TNF- α die Zerstörung des parodontalen Gewebes, indem es Matrix-Metalloproteinasen induziert (31). Es erscheint plausibel, dass Patienten mit einer erhöhten Entzün-

dungsneigung auf Schwefelverbindungen als potenzielle immunogene Stimuli mit verstärkter lokaler Entzündung reagieren. Da TNFA -308 G/A jedoch auch in der Kontrollgruppe auftritt – wenn auch weniger häufig – kann dieser Polymorphismus nicht den einzigen relevanten Risikofaktor darstellen.

Erhöhte TNF- α -Serumspiegel der Patientengruppe unterstützen zusätzlich die klinische Bedeutung dieses Zytokins. Interessanterweise ist TNFA -308 G/A mit einer erhöhten TNF- α -Transkription assoziiert (32). In Anbetracht der relativ geringen Unterschiede zwischen den Serumkonzentrationen der Patienten- und Kontrollgruppe stellt TNF- α jedoch keinen aussagekräftigen diagnostischen Marker für die Identifizierung endodontischer Patienten dar. Auch MBL und IP-10 im Serum erwiesen sich als nicht geeignet für die Unterscheidung bei der endodontischen Diagnose, auch wenn IP-10 in der Patientengruppe tendenziell höher lag. Es ist wichtig anzumerken, dass der normale IP-10-Wert im Serum eine systemische Immunnaktivierung durch einen lokalen, von T-Zellen vermittelten Immunprozess nicht ausschließt. IP-10 ist bei systemischen, TH-1-vermittelten Infektionskrankheiten wie der chronisch-aktiven Hepatitis und der Doppelinfektion mit HIV und Tuberkulose signifikant erhöht (33), jedoch nicht bei anderen entzündlichen Erkrankungen wie akuten Magengeschwüren (34), atopischer Dermatitis oder Morbus Parkinson (35). Die Tatsache, dass TH-1-Lymphozyten bei diesen IP-10-negativen Krankheiten zu Organerkrankungen und systemischen Entzündungen beitragen, unterstreicht, dass der normale IP-10-Wert im Serum die Aktivierung von TH-1-Lymphozyten nicht ausschließt. Die diagnostische Sensitivität von IP-10 im Serum ist sehr wahrscheinlich nicht ausreichend für die zuverlässige Feststellung lokaler Entzündungsprozesse.

Zusammengefasst zeigt die vorliegende retrospektive Studie, dass bei Patienten mit klinischen oder radiologischen Zeichen einer fehlgeschlagenen Wurzelbehandlung vermehrt T-Zellen vorkommen, die spezifisch auf Schwefelverbindungen reagieren. Die Daten belegen ferner, dass eine endodontische Revision nach einem standardisierten Protokoll die Immunwerte wirksam normalisiert, vermutlich durch die Reduzierung von Schwefelverbindungen im Wurzelkanalsystem. Der Mercaptan-Thioether-Test, ein ex-vivo-Stimulationstest für Schwefelverbindungen, kann daher bewährte klinische und radiologische Diagnosemethoden ergänzen und als Werkzeug für die Überwachung des Erfolges endodontischer Therapien dienen. Ferner zeigen unsere Daten eine signifikante Assoziation zwischen TNFA -308 G/A und einem Versagen der endodontischen Therapie, womöglich bedingt durch eine Prädisposition

für Entzündungsprozesse.

Diese Studie stellt systemische und prognostische Immunparameter vor, die bei proentzündlichen endodontischen Pathomechanismen eine Rolle spielen. Der mechanistische Zusammenhang zwischen Schwefelverbindungen und systemischen Entzündungsprozessen sowie der diagnostische Wert unserer neuartigen Laborparameter wird in weiterführenden, zukünftigen Studien geprüft werden.

LITERATUR

- Weiger R, Geurtsen W, Heidemann D, Löst C, Petschelt A, Raab W, Schäfer E, Hicke R. Stellungnahme der DGZMK und der DGZ: Zur Prognose von Wurzelkanalbehandlungen. *Dtsch Zahnärztl Z* 2001; 56:206.
- Polycarpou N, Ng YL, Canavan D, Moles DR, Gulabivala K. Prevalence of persistent pain after endodontic treatment and factors affecting its occurrence in cases with complete radiographic healing. *Int Endod J* 2005; 38:169-78.
- Allen RK, Newton RW, Brown CE. A statistical analysis of surgical and non-surgical endodontic retreatment cases. *J Endod* 1989;15:261-266.
- Gorni FG, Gagliani MM. The outcome of endodontic retreatment: a 2-yr follow up. *J Endod* 2004; 30:1-4.
- Ng YL, Mann V, Rahbaran S, Lewsey J, Gulabivala K. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature - part 1. Effects of study characteristics on probability of success. *Int Endod J* 2007; 40:921-39.
- Huumonen S, Kvist T, Gröndahl K, Molander A. Diagnostic value of computed tomography in re-treatment of root fillings in maxillary molars. *Int Endod J* 2006; 39:827-833.
- Figdor D. Microbial aetiology of endodontic treatment failure & pathogenic properties of selected species. Dissertation Umea, Sweden: Umea University 2002.
- Persson S, Edlund MB, Claesson R, Carlsson J. The formation of hydrogen sulfide and methyl mercaptan by oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 1990; 5:195-201.
- Langendijk PS, Hanssen JT, Van der Hoeven JS. Sulfate-reducing bacteria in association with human periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000; 27:943-50.
- Hannah RS, Roth SH. Chronic exposure to low concentrations of hydrogen sulfide produces abnormal growth in developing cerebellar Purkinje cells. *Neurosci Lett* 1991; 122:225-8.
- Ng YL, Tonzetich J. Effect of hydrogen sulfide and methyl mercaptan on the permeability of oral mucosa. *J Dent Res* 1984; 63:994-7.
- Johnson PW, Yaegaki K, Tonzetich J. Effect of methyl mercaptan on synthesis and degradation of collagen. *J Periodontal Res* 1996; 31:323-9.
- Coil J, Tam E, Waterfield JD. Proinflammatory cytokine profiles in pulp fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide and methyl mercaptan. *J Endod* 2004; 30:88-91.
- Ratkay LG, Waterfield JD, Tonzetich J. Stimulation of enzyme and cytokine production by methyl mercaptan in human gingival fibroblast and monocyte cell cultures. *Arch Oral Biol* 1995; 40:337-44.
- Lin LM, Pascon EA, Skribner J, Gängler P, Langeland K. Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1991; 71:603-11.
- Nagaoka S, Miyazaki Y, Liu HJ, Iwamoto Y, Kitano M, Kawagoe M. Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth. *J Endod* 1995; 21:70-3.
- Jung IY, Choi BK, Kum KY, Roh BD, Lee SJ, Lee CY, Park DS. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. *J Endod* 2000; 26:599-604.
- Guis S, Balandraud N, Bouvenot J, Auger I, Toussirot E, Wendling D, Mattei JP, Nogueira L, Mugnier B, Legeron P, Landt O, Serre G, Roudier J, Roudier C. Influence of -308 A/G polymorphism in the tumor necrosis factor alpha gene on etanercept treatment in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 57:1426-30.
- Bonmort M, Ullrich E, Mignot G, Jacobs B, Chaput N, Zitvogel L. Interferon-gamma is produced by another player of innate immune responses: the interferon-producing killer dendritic cell (IKDC) *Biochimie* 2007; 89:872-7.
- Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:165-90.
- Silva AC, Faria MR, Fontes A, Campos MS, Cavalcanti BN. Interleukin-1 beta and interleukin-8 in healthy and inflamed dental pulps. *J Appl Oral Sci* 2009; 17:527-32.
- Pezelj-Ribaric S, Anic I, Brekalo I, Miletic I, Hasan M, Simunovic-Soskic M. Detection of tumor necrosis factor alpha in normal and inflamed human dental pulps. *Arch Med Res* 2002; 33:482-4.

23. Rauschenberger CR, Bailey JC, Cootauco CJ. Detection of human IL-2 in normal and inflamed dental pulps. *J Endod* 1997; 23:366-70.
24. Sachs B, Erdmann S, Malte Baron J et al. Determination of interleukin-5 secretion from drug-specific activated ex vivo peripheral blood mononuclear cells as a test system for the in vitro detection of drug sensitization. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:736-744.
25. Feng RN, Li Y, Sun CH. TNF 308 G/A polymorphism and type 1 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract* 2009; 85:4-7.
26. Bouma G, Xia B, Crusius JB, Bioque G, Koutroubakis I, VonBlomberg BM, Meuwissen SG, Peña AS. Distribution of four polymorphisms in the tumour necrosis factor (TNF) genes in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1996; 103:391-6.
27. Szabó GV, Acsády G. Tumornecrosis-Factor- α 308 GA Polymorphism in Atherosclerotic Patients. *Pathol Oncol Res* 2011; 17:853-7.
28. Erciyas K, Pehlivan S, Sever T, Igci M, Arslan A, Orbak R. Association between TNF-alpha, TGF-beta1, IL-10, IL-6 and IFN-gamma gene polymorphisms and generalized aggressive periodontitis. *Clin Invest Med* 2010; 33:85.
29. Jacobi-Gresser E, Huesker K, Schütt S. Genetic and immunological markers predict titanium implant failure: a retrospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2013; 42:537-43.
30. Boyce BF, Li P, Yao Z, Zhang Q, Badell IR, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Xing L. TNF-alpha and pathologic bone resorption. *Keio J Med* 2005; 54:127-31.
31. Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res* 1993; 28:500-10.
32. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:3195-9.
33. Djoba Siawaya JF, Ruhwald M, Eugen-Olsen J, Walzl G. Correlates for disease progression and prognosis during concurrent HIV/TB infection. *Int J Infect Dis* 2007; 11:289-99.
34. Jafarzadeh A, Nemati M, Rezayati MT, Khoramdel H, Nabizadeh M, Hassanshahi G, Abdollahi H. Lower circulating levels of chemokine CXCL10 in *Helicobacter pylori*-infected patients with peptic ulcer: Influence of the bacterial virulence factor CagA. *Iran J Microbiol* 2013; 5:28-35.
35. Scalzo P, de Miranda AS, Guerra Amaral DC, de Carvalho Vilela M, Cardoso F, Teixeira AL. Serum levels of chemokines in Parkinson's disease. *Neuroimmunomodulation* 2011; 18:240-4.