

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung, Parodontologie, Endodontologie,
Präventive Zahnmedizin und Kinderzahnheilkunde
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. Clemens Walter)
des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
(Geschäftsführender Direktor: Univ.- Prof. Dr. K.-F. Krey)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Assoziationen des Speichelmetaboloms mit Parodontitis und dem Zahnverlust nach einer fünfjährigen Follow-Up Zeit

**Ergebnisse der Bevölkerungsstudie
Study of Health in Pomerania
(SHIP-2 und SHIP-3)**

Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktorin der Zahnmedizin
(Dr. med. dent.)
der
Universitätsmedizin
der
Universität Greifswald
2022

vorgelegt von:
Leonie Andörfer
geb. am: 03.12.1992
in Berlin

Die vorliegende Dissertation basiert auf der folgenden Publikation:

Leonie Andörfer, Birte Holtfreter, Stefan Weiss, Rutger Matthes, Vinay Pitchika, Carsten Oliver Schmidt, Stefanie Samietz, Gabi Kastenmüller, Matthias Nauck, Uwe Völker, Henry Völzke, Laszlo N. Csonka, Karsten Suhre, Maik Pietzner und Thomas Kocher (2021): Salivary metabolites associated with a 5-year tooth loss identified in a population-based setting. *BMC Medicine*. 2021 Jul 14; 19(1):161. doi.org/10.1186/s12916-021-02035-z

Dekan:	Herr Prof. Dr. med. Karlhans Endlich
1. Gutachter/in:	Herr Prof. Dr. Thomas Kocher
2. Gutachter/in:	Herr Prof. Dr. Henrik Dommisch
Ort, Raum:	Greifswald, Hörsaal ZZMK
Tag der Disputation:	12. April 2023

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis.....	1
II.	Einleitung.....	3
2.1.	Parodontitis.....	3
2.2.	Speichel.....	8
2.3.	Metabolomik.....	10
2.3.1.	‘Salivaomics’ – Metabolomik des Speichels.....	11
2.4.	Literaturüberblick.....	12
2.5.	Ziele.....	21
2.6.	Hypothesen.....	21
III.	Material & Methoden.....	22
3.1.	SHIP.....	22
3.1.1.	Datenerhebung der SHIP Untersuchung.....	24
3.2.	In-vitro Test.....	25
IV.	Ergebnisse.....	27
4.1.	Ergebnisse beruhend auf der Querschnittsanalyse.....	27
4.1.1.	Neu entdeckte Metabolite.....	29
4.1.2.	Replikationen.....	30
4.2.	Ergebnisse beruhend auf der Längsschnittanalyse.....	33
4.3.	Weiterführende Untersuchungen.....	34
4.3.1.	Metabolisches Netzwerk.....	34
4.3.2.	Genomweite Assoziationsstudien.....	35
4.3.3.	Auswirkung des Rauchverhaltens auf das Vorkommen von 2-Pyrr.....	35
4.3.4.	Wirkung von 2-Pyrr auf die Toleranz von <i>E. coli</i> gegenüber erhöhten NaCl-Konzentrationen.....	36
V.	Diskussion.....	39
5.1.	Diskussion über den Ursprung potentieller Biomarker mit signifikanten Assoziationen zu Parodontitis.....	39
5.1.1.	Polyaminregulation.....	39
5.1.2.	Oxidativer Stress.....	40
5.1.3.	Bakterieller Stoffwechsel.....	41
5.2.	Stärken & Schwächen.....	44
5.3.	Zusammenfassung.....	44

VI.	Literaturverzeichnis.....	46
VII.	Tabellenverzeichnis.....	51
VIII.	Abbildungsverzeichnis.....	52
IX.	Anhang.....	53
	9.1. Publikation.....	53

I. Abkürzungsverzeichnis

<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
<i>C. rectus</i>	<i>Camphylobacter rectus</i>
CAL	klinischer Attachmentverlust
CAL3+mm%	Prozentsatz der Flächen mit CAL ≥ 3 mm
CAL4+mm%	Prozentsatz der Flächen mit CAL ≥ 4 mm
DF-S	Anzahl kariöser und gefüllter Zahnoberflächen
DF-S%	Prozentsatz kariöser und gefüllter Zahnoberflächen
CumPPD4+	kumulativer PPD von Taschen mit PPD ≥ 4 mm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FB	Furkationsbeteiligung
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
KA	röntgenologischer Knochenabbau
KB	Koloniebildung
KBE	koloniebildende Einheiten
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
Mean CAL	Mittelwert des CAL an allen Seiten
Mean PPD	Mittelwert des PPD an allen Seiten
MS	Massenspektrometrie
MT count	Anzahl fehlender Zähne
NaCl	Natriumchlorid
NMR	Kernresonanzspektroskopie
OD620	optische Dichte bei 620nm
<i>P. micra</i>	<i>Parvimonas micra</i>
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
PPD	parodontale Taschentiefe
PPD3+mm%	Prozentsatz der Flächen mit PPD ≥ 3 mm
PPD4+mm%	Prozentsatz der Flächen mit PPD ≥ 4 mm
Prosthesis/MT	Zahnersatz in Kombination mit Zahnverlust
ROS	reaktive Oxygenspezies/reaktive Sauerstoffspezies
SHIP	Study of Health in Pomerania
ST	Sondierungstiefe

UPLC-MS/MS

Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
und Tandem-Massenspektrometrie

T. forsythia

Tanerella forsythia

T. denticola

Treponema denticola

2-Pyrr

2-Pyrrolidinessigsäure

II. Einleitung

Um das Verständnis für die vorliegende Arbeit gewährleisten zu können, werden zu Beginn die Grundlagen der parodontalen Gesundheit und die analytische Erfassung von Stoffwechselwegen behandelt. Dabei werden nur spezifische Aspekte der jeweils umfangreichen Thematiken besprochen, die entweder direkt oder indirekt Gegenstand des Forschungsprojektes sind.

2.1. Parodontitis

Der Begriff des Parodontiums umfasst alle anatomischen Strukturen, die zur Verankerung des Zahns beitragen. Dazu gehören Gingiva, Alveolarknochen, Desmodont und Wurzelzement. Parodontitis ist eine entzündliche Erkrankung, die den Zahnhalteapparat durch Taschenbildung, Gingivarezessionen sowie alveolären Knochenabbau zerstört und letztendlich zu Lockerungen der Zähne und Zahnverlust führen kann. Sie beruht auf einer wirtsimmunologischen Abwehrreaktion die zumeist durch subgingivale Plaque hervorgerufen wird (1). Schätzungen zufolge sind bis zu 22% der erwachsenen Bevölkerung in Industrieländern von einer Parodontitis betroffen (2) und insgesamt ist die Parodontitis auf Platz sechs der häufigsten Erkrankungen der Welt (3).

Entstehung des Biofilms

Auch wenn die Parodontitis ein multifaktorielles Geschehen ist, das durch viele Faktoren beeinflusst wird, spielt die Plaque eine entscheidende Rolle. Primär entsteht sie durch die Haftung von Mikroorganismen aus dem Speichel an die mit Speichelglykoproteinen beschichtete Zahnoberfläche. Die Vielfalt der angehefteten Mikroorganismen steigt mit der Zeit an und sie gruppieren sich zu Mikrokolonien. Eingebettet in ihrer Extrazellulärmatrix formiert sich die dentale Plaque zum hochorganisierten Biofilm. Bis zu diesem Zeitpunkt hat sich vorrangig eine grampositive Bakterienflora etabliert, doch durch die Vermehrung der Plaque kommt es zum mikrobiellen Shift hin zu gramnegativen Anaerobiern. Das Milieu wird zunehmend anaerober, bis man von einer herangereiften pathogenen Plaque spricht.

Parodontopathogene Keime

Die Zusammensetzung der subgingivalen Flora ist eine individuelle Angelegenheit, die sich je nach Patient*in, intraoraler Region oder Zeitpunkt (4) verändern kann. Trotz der verschiedenen Variationen zählen folgende Bakterien zu den parodontopathogenen Keimen: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*), *Treponema denticola* (*T. denticola*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), *Camphylobacter rectus* (*C. rectus*) und *Parvimonas micra* (*P. micra*)(5-8). Die Theorie von Socransky und Kolleg*innen (9) fasst die parodontopathogenen Keime aufgrund ihres zeitlichen Auftretens als Komplexe zusammen. Abbildung 1 veranschaulicht die Komplexe und deren beteiligte Spezies in einem Pyramidendiagramm. Die Bakterien des roten Komplexes, zu denen *P. gingivalis*, *T. denticola* und *T. forsythia* gehören, gelten als stark pathogen, da sie in Verbindung mit erhöhten Taschentiefen, Blutung bei Sondierung und fortgeschrittener parodontaler Destruktion stehen (9-11). *P. gingivalis* ist ein wichtiger Schlüsselkeim, der auf der äußeren Membran Oberflächenadhäsine und Fimbrien trägt, mit denen er durch Bindung an Epithelzellen, Fibroblasten und extrazellulärer Matrix in Kontakt mit dem Wirtsorganismus treten kann (12). Mit Hilfe weiterer zahlreicher Virulenzfaktoren wie Lipopolysacchariden, spezifischen Proteasen, Chemotaxisinhibitoren oder Invasinen schafft es das Bakterium, sich in der subgingivalen Plaque zu behaupten und das Immunsystem des Wirts zu modulieren (13). *P. gingivalis* gilt als Leitkeim für eine fortgeschrittene parodontale Läsion.

Der orangefarbene Komplex umfasst neben den Bakterien *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *P. micra* und *C. rectus*, die mit parodontalen Taschen und Zahnlockerungen assoziiert werden konnten (14, 15), noch weitaus mehr Keime. Die Bakterien dieses Komplexes sind mit denen des roten eng verbunden. Daher ist es nicht verwunderlich, dass *P. intermedia*, *C. rectus* und *P. micra* mit fortgeschrittenen Parodontitisstadien assoziiert werden (16). Insgesamt werden die Bakterien des orangefarbenen Komplexes als Brückenkeime betrachtet, die zwischen Frühkolonisierern - dem Basisteil der Pyramide - und den stark pathogenen Spätkolonisierern vermitteln.

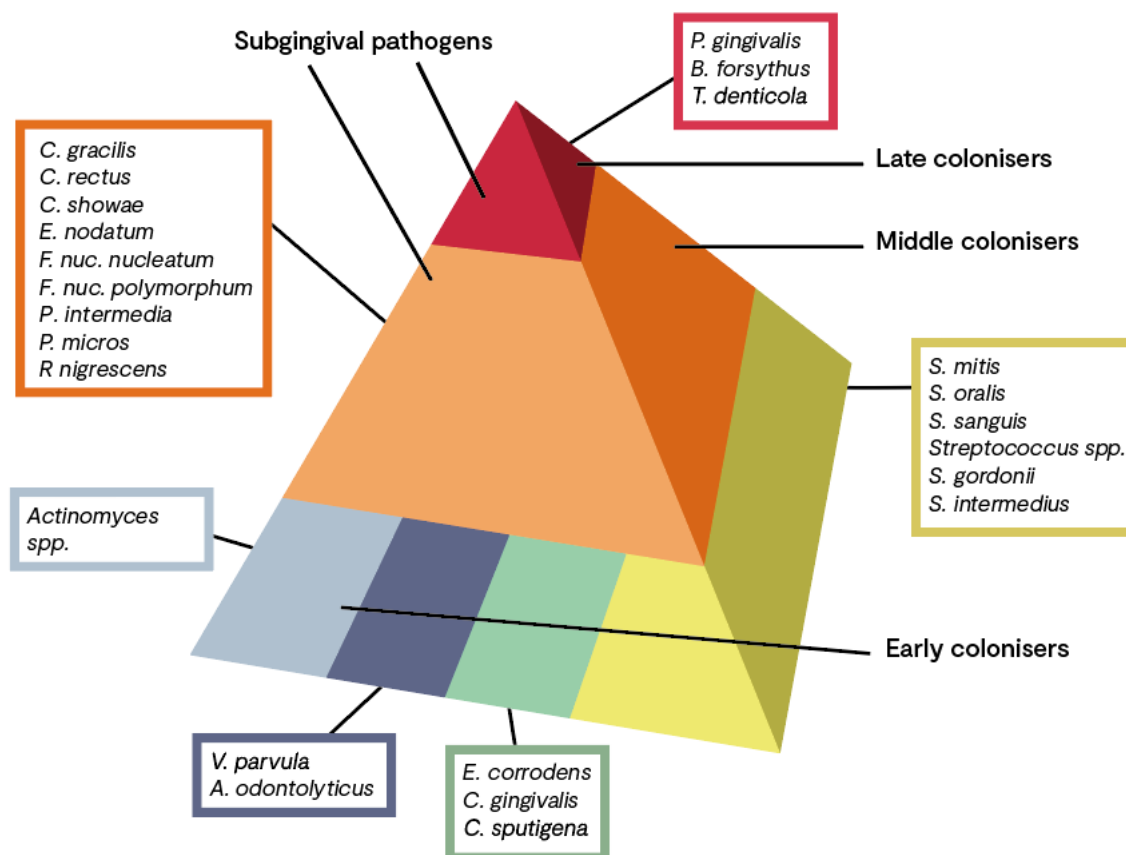


Abbildung 1: Modifiziertes Pyramidendiagramm zur Darstellung mikrobiologischer Komplexe und der Beziehungen bestimmter Spezies untereinander (Socransky und Haffajee, 2002; Socransky et al., 1984/1998 (9))

Klassifikation & Diagnostik

Seit 2018 steht eine neue Systematik für die Klassifikation parodontaler und periimplantärer Erkrankungen zur Verfügung. Die vorherige Einteilung in „chronische“ und „aggressive“ Parodontitis von 1999 (17) beruhte vorwiegend auf klinischen Befunden und ließ ätiologische sowie pathohistologische Hintergründe außer Acht. In der überarbeiteten Version wird nun in drei Formen differenziert: nekrotisierende Parodontitis, Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen und Parodontitis als alleinige Kategorie (18).

Zur Charakterisierung der Parodontitis wird das Staging und Grading angewandt (19, 20). Hauptziel des Stagings ist es, den Schweregrad und das Ausmaß der geschädigten Gewebe einzuordnen (Stadium I-IV). Die dafür benötigten diagnostischen Maßnahmen umfassen den klinischen Attachmentverlust (CAL), den

röntgenologisch sichtbaren Knochenabbau (KA) und die Anzahl der durch Parodontitis verloren gegangenen Zähne. Die zweite Dimension des Stagings dient der Komplexitätsbestimmung, durch welche der Umfang des Managements klar wird, den es benötigt, um die Zähne langfristig zu erhalten. Tabelle 1 verbildlicht die Stadieneinteilung der Parodontitis.

Tabelle 1: Stadieneinteilung der Parodontitis nach neuer Klassifizierung des „World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions“ 2018 nach Papapanou et al. (19) und Jepsen (20)

Parodontitis-Stadium STAGING		Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV
Schweregrad	interdentaler CAL an Stellen mit höchstem Verlust	1-2 mm	3-4 mm	≥ 5 mm	≥ 5 mm
	KA	< 15%	15-33%	33-100%	
	Zahnverlust aufgrund von Parodontitis	kein Zahnverlust		≤ 4 Zähne	≥ 5 Zähne
Komplexität	lokal ST	ST ≤ 4 mm KA vorwiegend horizontal	ST 4-5 mm KA vorwiegend horizontal	zusätzlich zu Stadium II: ST ≥ 6 mm, KA vertik. ≥ 3 mm, moderate Kammdefekte FB Grad II oder III	zusätzlich zu Stadium III: - komplexe Rehabilitation erforderlich - sekundäres okklusales Trauma (Zahnbeweglichkeit ≥ Grad 2) - Zahnwanderung - ausgeprägter Kammdefekt - Bisshöhenverlust - <20 Restzähne - <10 okkludierenden Paare
Ausmaß und Verteilung	wird zur genaueren Beschreibung des Staging verwendet	Für jedes Stadium Ausmaß als lokalisiert (< 30% der Zähne betroffen), generalisiert oder Molaren-Inzisiven-Muster beschreiben			
CAL: klinischer Attachmentverlust; KA: röntgenologischer Knochenabbau; ST: Sondierungstiefe; FB: Furkationsbeteiligung					

Das Grading ergänzt die Beurteilung der Parodontitis, indem das Risiko für die Krankheitsprogression und das Ansprechen auf die Standardtherapie abgeschätzt wird. Je nach vorliegendem Grad A-C wird die Therapieintensität bestimmt. Als primäre Kriterien werden entweder longitudinale Daten auf Basis röntgenologischer Befunde verwendet oder die Relation des Knochenabbaus zum Lebensalter berechnet. Das Vorhandensein der Risikofaktoren Rauchen und Diabetes kann den Grad der Parodontitis modifizieren. Tabelle 2 bildet die Einteilung der Parodontitis in Grad A, B und C sowie die Berücksichtigung weitere Risiko-Aspekte ab.

Tabelle 2: Einteilung der Parodontitis in Grad A, B und C unter Berücksichtigung weiterer Risiko-Aspekte nach neuer Klassifizierung des „World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions“ 2018 nach Papapanou et al. (19) und Jepsen (20)

Parodontitis GRADING			GRAD A: langsame Progressionsrate	GRAD B: moderate Progressionsrate	GRAD C: rasche Progressionsrate
Primäre Kriterien	direkte Evidenz für Progression	longitudinale Daten KA mit Angabe des CAL	Kein Verlust	< 2 mm über 5 Jahre	≥ 2 mm über 5 Jahre
	indirekte Evidenz für Progression	KA (%)/Alter	< 0,25	0,25-1,00	> 1,00
		Phänotyp	erheblicher Biofilm	Zerstörung proportional zum Biofilm	- Zerstörung unproportional zum Biofilm - Episoden rapider Zerstörung - früher Erkrankungsbeginn (Molaren-Inzisiven-Muster oder behandlungs- resistente Erkrankung)
Modifikatoren	Risikofaktoren	Rauchen	Nichtraucher	Raucher, <10 Zig./Tag	Racuher ≥10 Zig./Tag
		Diabetes	kein Diabetiker, normoglykämisch	HbA1c<7,0 % bei Patienten mit Diabetes	HbA1c < 7,0 % bei Patienten mit Diabetes
CAL: klinischer Attachmentverlust; KA: röntgenologischer Knochenabbau; HbA1c = glykolisiertes Hämoglobin; Zig.: Zigaretten					

2.2. Speichel

Speichel spielt eine zentrale Rolle für die Mundgesundheit. Er remineralisiert den Zahnschmelz, schützt die Mundschleimhaut, fördert die Wundheilung (21), wehrt Erreger ab (22) und erhält den pH-Wert der Mundhöhle aufrecht (23). Nebst all diesen protektiven Eigenschaften hat Speichel auch direkt nachvollziehbare Funktionen, die das Kauen, Schmecken, Schlucken, Vorverdauen und Sprechen ermöglichen (24). Der Speichel wird initial durch die großen paarig angelegten Speicheldrüsen Glandula parotidea, Glandula submandibularis und Glandula sublingualis sowie eine Vielzahl an kleineren Speicheldrüsen (Glandulae labiales, Glandulae buccales, Glandulae palatinae, Glandulae molare und Glandulae linguales) gebildet. Die drei großen Speicheldrüsen produzieren dabei ca. 90% des Speichels und die restlichen 10% stammen von den kleineren Drüsen. Der DrüsenSpeichel ist eine zusammengesetzte Flüssigkeit die zu >99% aus Wasser besteht. Die restlichen <1% umfassen Proteine, zu welchen Muzine, Immunglobuline und Proteine mit enzymatischen Fähigkeiten zählen, aber auch kleinmolekulare Bestandteile wie zum Beispiel Elektrolyte. Histologisch betrachtet bestehen die Speicheldrüsen aus epithelialen Zellen die seröse, muköse oder seromuköse Endstücke und ein Gangsystem bilden. In den Endstücken werden die im Speichel enthaltenen Proteine und Muzine produziert, während im Speichelgang die Regulation des Wassergehalts und der Elektrolytenkonzentration abläuft. Die Elektrolyte werden aktiv in den DrüsenSpeichel sezerniert und im Gangsystem partiell wieder resorbiert. Die Zusammensetzung des Speichels kann höher, gleich oder niedriger als der Konzentrationsspiegel des Blutplasmas sein. Speichel und Blutplasma ähneln sich in ihrer chemischen Beschaffenheit, weil viele Plasmasubstanzen durch Lipidmembranen und passive Transportsysteme in den Speichel diffundieren (25, 26). Die Medizin nutzt Speichel daher in verschiedensten Bereichen für diagnostische Zwecke anstelle von Plasma (27-31). Viele der Speichelbestandteile eignen sich als Biomarker für pathologische Zustände und liefern damit einen Überblick über den Gesundheitszustand von Patient*innen. Um die im Speichel enthaltenen potentiellen Biomarker einordnen zu können ist es wichtig alle möglichen Ursprünge der einzelnen Stoffe zu kennen. Erst mit der Mündung der Speichelausführungsgänge in die Mundhöhle entsteht der so genannte Gesamtspeichel von welchem meist die Rede ist, wenn von Speichel gesprochen wird. Im Vergleich zum Gesamtspeichel, enthält der von den Speicheldrüsen sezernierte DrüsenSpeichel noch keine Spuren von Sulkusflüssigkeit,

Zellabschilferungen, Bakterien, bakteriellen Stoffwechselprodukten, Nasen- und Bronchiensekret oder Nahrungsbestandteilen. Die in der Sulkusflüssigkeit enthaltenen Stoffe können beispielsweise aus dem Blutgefäßplexus der marginalen Gingiva stammen oder Molekularmarker aus umliegenden Bereichen sein, die das Exudat ansammelt, während es durch das entzündete Parodontalgewebe Richtung Sulkus fließt (32).

Im Gegensatz zu anderen Körperflüssigkeiten lassen sich Speichelproben einfach, schnell, kostengünstig und nicht-invasiv gewinnen, womit sie die Speicheldiagnostik ein routinemäßiger Bestandteil von zahnärztlichen wie ärztlichen Check-Ups werden könnte.

2.3. Metabolomik

Die Metabolomik befasst sich mit der Erforschung des Metaboloms, welches die Gesamtheit der niedermolekularen Metabolite in einer Zelle, einem Gewebe oder einer biologischen Flüssigkeit bezeichnet. Im Rahmen der metabolischen Analyse des jeweiligen biologischen Systems werden die Wechselwirkungen der enthaltenen Metabolite, deren Identifizierung und deren Qualifizierung untersucht.

Die Analysemethoden basieren im Wesentlichen auf den Standardtechniken der Kernresonanzspektroskopie (NMR) und der Massenspektrometrie (MS), bedürfen jedoch zusätzlicher Techniken, um auch die kleinsten Moleküle zu erfassen. Daher wird insbesondere in der MS die Kombination mit chromatographischen Methoden angestrebt (Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS), Gaschromatographie-Massenspektrometrie, Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie) (33). Dank dieser Entwicklungen im Feld der Massenspektrometrie ist es heute möglich, Tausende von Metaboliten gleichzeitig aus nur minimalen Mengen von Proben zu messen (34).

Die Metabolomik liefert direkte Signaturen biochemischer Aktivitäten und lässt sich daher leichter mit Phänotypen in Verbindung bringen, weshalb Metabolitenprofile als neuer Ansatz in der klinischen Diagnostik Anwendung finden (35). Die Entdeckung zahlreicher potentieller Biomarker für diverse Krankheiten ist aufgrund dieses neuen Instruments der Biomedizin geleistet worden und auch in Sachen Früherkennung von Krankheiten, Vorhersage von Therapien und Prognosen, Überwachung von Behandlungen und Erkennung von Rückfällen findet sich ein immenser Nutzen in der Metabolomik (36).

2.3.1. ‚Salivaomics‘ – Metabolomik des Speichels

Speichel ist eine nützliche und gleichermaßen einfach zu gewinnende biologische Flüssigkeit, die Informationen über die orale und auch systemische Gesundheit enthält (37). Je nach Zusammensetzung der Speichelbestandteile, wie beispielsweise Enzyme, Hormone, Antikörper oder Zytokine, ist es möglich, auf verschiedene physiologische und pathologische Zustände zu schließen (38). In Bezug auf die Zahnmedizin konnten bereits einige Speichelmetabolite mit verschiedenen oralen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden, darunter zu meist Parodontitis (Tabelle 3) und Mundhöhlenkarzinome (39-44). Die Speichelmetabolomik ist jedoch ein vergleichsweise neuer, wenn auch aufstrebender Forschungszweig, der im Hinblick auf seinen Nutzen für die Medizin weiter erforscht werden muss, um Anwendung im Praxisalltag zu finden.

2.3. Literaturübersicht

Metabolomstudien sind ein sich rasch entwickelnder Bereich der modernen Biologie und erfreuen sich großen Zuspruchs in der Wissenschaft. Daher gab es auch im Bereich der Speichelmetabolomik beziehungsweise der Metabolomuntersuchungen diverser anderer oraler Bioflüssigkeiten in den letzten Jahren einen großen Zuwachs an wissenschaftlichen Analysen.

In der folgenden Literaturübersicht werden alle relevanten oralen Metabolomstudien mit Assoziationen zu Parodontitis der letzten zwölf Jahre aufgelistet und ihre Ergebnisse zusammengefasst. In den Studien aus Tabelle 3 werden zumeist Proben von Speichel und Sulkusflüssigkeit betrachtet, jedoch auch vereinzelt Plaque-, Zahnstein- und Gewebeproben sowie Zungenabstriche.

Diese Übersicht fokussiert sich zwar vorrangig auf Analysen des Metaboloms, hat aber auch Berührungspunkte zu anderen wachsenden Omics-Technologien. Teilweise werden Arbeiten ausgewertet, die sich des bisher noch unüblichen Multi-Omics Ansatzes bedienen und nebst des Metaboloms auch das Proteom, Genom und/oder Lipidom untersuchen (45, 46). Nichtsdestotrotz offenbaren alle erfassten Metabolite, Enzyme, Stoffgruppen, etc. ein relativ einheitliches Bild an Assoziationen.

In den meisten Fällen weisen die Ergebnisse auf einen verstärkten Bakterienstoffwechsel (47-61) und Gewebszerstörung hin und den damit einhergehenden Protein- und Aminosäureabbau (46, 48, 51, 54-64), Zellproliferation (45, 49) und Energiegewinnung (45, 62, 64). Auch sind die Metabolite oft Anzeichen für erhöhten oxidativen Stress (45, 49, 51-53, 58, 60, 62, 64-67), der häufig mit der Produktion von reaktiven Oxygenspezies (ROS) (51) oder mit Entzündungen einhergeht (45, 48, 51, 53, 60, 61).

Einige Stoffwechselprodukte können nicht vollständig zurückverfolgt und verstanden werden. Die Verfahren zur Ermittlung neuer Metabolite bringen stetig neue Stoffe hervor, die teilweise wenig oder gar nicht erforscht sind. An dieser Stelle bedarf es schlichtweg weiterer Untersuchungen und Analysen.

Unter besonderer Berücksichtigung steht die Studie von Liebsch und Kolleg*innen (51), da unsere Arbeit teilweise einen direkten Vergleich zu deren Ergebnissen vornimmt. Beide Studien betrachten das Speichelprofil in Bezug auf diverse orale Gesundheitsparameter. In Liebsch et al. (51) wurden überwiegend Assoziationen von Metaboliten zu parodontalen Variablen beobachtet, die eindeutig auf Gewebsdestruktion, Wirtsabwehrmechanismen und Bakterienstoffwechsel

zurückzuführen sind. Zu den hervorstechendsten Metaboliten gehörte Phenylacetat sowie verschiedene Phenolsäuremetabolite.

Tabelle 3: Orale Metabolom-Studien mit Assoziationen zu Parodontitis

Studie	Autor*in	Jahr	Studien-population	Probe	Metabolite/ Stoffwechselwege	Assoziation
Metabolomic Evaluation of Chronic Periodontal Disease in Older Adults (47)	Rodrigues et al.	2021	N: 120 (60 Parodontitis, 60 gesund) Alter: ≥65	Sulkusflüssigkeit	5-Aminovalerat ↑ Serin ↑	Bakterienstoffwechsel
Saliva and Plasma Reflect Metabolism Altered by Diabetes and Periodontitis (48)	Sakanaka et al.	2021	N: 61 (31 Diabetes, 30 gesund)	Speichel Plasma	Threonsäure ↑ Cadaverin ↑ Citramalsäure ↑ Hydrocinnamat ↑ Oleat ↑ Malat ↑ Adenosin ↑ Cytidin ↓ Phosphat ↓ 4-Hydroxyphenethylalkohol ↓	Aminosäureabbau Bakterienstoffwechsel Entzündung Bakterienstoffwechsel
Microbial and metabolomic analysis of gingival crevicular fluid in general chronic periodontitis patients: lessons for a predictive, preventive, and personalized medical approach (49)	Pei et al.	2020	N: 58 (30 Parodontitis, 28 gesund)	Sulkusflüssigkeit	Uracil ↑ Carglumsäure ↑ N-Acetyl-β-D-Mannosamin 1 ↑ Fruktose 1 ↑ Citramalsäure ↑ 5β-Dihydrocortisol ↑ 4-Hydroxyphenylelessigsäure ↑ Thymidin 3 ↓ O-Phosphoserin 1 ↓	Zellproliferation Oxidativer Stress Bakterienstoffwechsel Bakterienstoffwechsel Pyrimidinstoffwechsel

Fortführung der Tabelle 3

Alterations and Correlations in Microbial Community and Metabolome Characteristics in Generalized Aggressive Periodontitis (50)	Shi et al.	2020	N: 34 (24 Parodontitis, 10 gesund)	Sulkusflüssigkeit	Glukose ↑ Uridin ↑ Alanin ↑ Isoleucin ↑ Maltotriose ↑ Putrescin ↑ 5-Aminovalerat ↑ Valin ↑ Oxoprolin ↑ Leucin ↑	Galaktosestoffwechsel Pyrimidinstoffwechsel Bakterieller Ursprung Bakterieller Ursprung Bakterienstoffwechsel Bakterieller Ursprung
<i>Porphyromonas gingivalis</i> triggers inflammatory responses in periodontal ligament cells by succinate-succinate dehydrogenase-HIF-1α axis (45)	Su et al.	2020	Zellkulturen von Patient*innen ohne Parodontitis Alter: 10-18	Parodontal-ligamentzellen (befallen mit <i>P. gingivalis</i>)	Glutamin ↓ Glutathion ↓ 4-Aminophenol ↓ Citraconsäure ↑ Zitronensäure ↑ 2-Hydroxybernsteinsäure ↑ Grundumsatz ↓ Maximalumsatz ↓ Reservekapazität ↓ Citrat Synthase ↑ Isocitrat Dehydrogenase 1 & 2 ↑ Succinat Dehydrogenase a & b ↑ Fumarat Hydratase ↓ 6-Phosphofrukto-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase 3 ↑ Hexokinase2 ↑ Lactatdehydrogenase ↑ Succinat ↑ Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ↑ Hypoxie-Induzierbarer-Faktor 1α (HIF-1α) ↑ Prolyl-Hydroxylase 2 ↓ Transkriptionsfaktor Nuclear factor erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) ↓ Interleukin-6 ↑ Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1 ↑	<div> Citratzyklus Argininstoffwechsel Prolinstoffwechsel Glyoxylat Stoffwechsel Dicarboxylat Stoffwechsel </div> <div> Energieproduktion verlagert sich von mitochondrialer oxidative Phosphorylierung zu Glykolyse </div> <div> Glykolyse Citratzyklus </div> <div> Energieproduktion durch Glykolyse </div> <div> Citratzyklus Oxidativer Stress Zellproliferation Steuerung von HIF Antioxidantien Entzündung Entzündung </div>

Fortführung der Tabelle 3

Proteomics, lipidomics, metabolomics and 16S DNA sequencing of dental plaque from patients with diabetes and periodontal disease (46)	Overmyer et al.	2020	N: 97 (39 Diabetes 37 Diabetes & Parodontitis, 11 Parodontitis 10 gesund)	supragingivale Plaque	5-Aminovalerat ↑ Alanin ↑ Tryptophan ↑ Prolin ↑ Xylose ↑ Glykolsäure ↓	Aminosäureabbau Proteinabbau Proteinabbau Proteinabbau
Salivary 8-hydroxyguanosine levels in smokers and non-smokers with chronic periodontitis (65)	Varghese et al.	2020	N: 40	Speichel	8-Hydroxyguanosin ↑	Oxidativer Stress
The Saliva Metabolome in Association to Oral Health Status (51)	Liebsch et al.	2019	N: 909 Alter: 20-79	Speichel	Phenylacetat ↑ Phenyllactat ↑ 3-(4-Hydroxyphenyl)-Propionat ↑ 3-Phenylpropionat ↑ Isovalerat ↑ Isocaproat ↑ 5-Aminovalerat ↑ Pipicolat ↑ N-delta-Acetylornithin ↑ N6-Acetyllysin ↑ Urea ↓ Phosphat ↓ ω-6 Fettsäure (Dihomolinolenat) ↑ Adenin ↓ 5-Oxoprolin ↑	Aminosäureabbau Aminosäureabbau Aminosäureabbau Aminosäureabbau Aminosäureabbau Aminosäureabbau/Fäulnis Aminosäureabbau Aminosäureabbau Gewebsuntergang/Proteinab. Bakterienstoffwechsel Bakterienstoffwechsel Entzündung Purinabbau/ROS Gewinnung Oxidativer Stress
Metabolomic Status of The Oral Cavity in Chronic Periodontitis (52)	Gawron et al.	2019	N: 45 (35 Parodontitis, 15 gesund) Alter: 37-68 in Gruppe der Erkrankten, 23-62 in Gruppe der Gesunden	Zungenabstrich Mundspülflüssigkeit	Isopropanol ↑ Glycerol ↓ Laktat ↑ Aceton ↓ Methanol ↓ Antioxidatives Taurin ↑	Bakterienstoffwechsel Bakterienstoffwechsel Bakterienstoffwechsel Bakterienstoffwechsel Bakterienstoffwechsel Wundheilung Oxidativer Stress

Fortführung der Tabelle 3

Malondialdehyde as a Marker of Oxidative Stress in Periodontitis Patients (66)	Cherian et al.	2019	N: 85 (30 Parodontitis, 25 Gingivitis, 30 gesund)	Speichel	Malonaldehyd (MDA) ↑	Oxidativer Stress
Salivary antioxidant enzymes and lipid peroxidation product malondialdehyde and sialic acid levels among smokers and non smokers with chronic periodontitis-A clinico-biochemical study (67)	Naresh et al.	2019	N: 90 (30 Nicht-raucher*innen & gesund, 30 Nicht-raucher*innen & Parodontitis, 30 Raucher*innen & Parodontitis) Alter: 20-60	Speichel	Malondialdehyd (MDA) ↑ Sialinsäure (SD) ↑ Superoxid Dismutase (SOD) ↓ Glutathion Peroxidase ↓	Oxidativer Stress: Lipid-Peroxidase Produkt/ Reaktionsprodukt freier Radikale das zu Gewebszerstörung führt Zellmembran-Stabilisierung/ Schutz vor freien Hydroxylradikalen Antioxdation/ Entfernung von Sauerstoffradikalen Antioxdation/ Entfernung von Sauerstoffradikalen
Metabolic changes during periodontitis therapy assessed by real-time ambient mass spectrometry (53)	Bregy et al.	2019	N: 24 (12 Parodontitis, 12 gesund) Alter: ≥18	Speichel	flüchtige Schwefelverb. (C ₁₂ H ₁₀ O ₆ S)↑ Pyridin ↑ 2-Hydroxyoctansäure (FA) ↑ Hydroxynonansäure (FA) ↑ Hydroxydodecapentaensäure (SCFA) ↑ Arecolin ↑	Fäulnis Stoffwechselerkrankungen, Mundgeruch Bakterienstoffwechsel Bakterienstoffwechsel Entzündung Hemmung Zellwachstum, Oxidativer Stress Exogener Ursprung: Kaugummi und Tabak

Fortführung der Tabelle 3

Analysis of metabolic profiles of generalized aggressive periodontitis (62)	Chen et al.	2018	N: 40 (20 Parodontitis, 20 gesund) Alter: 18-35 in Gruppe der Erkrankten, <35 in Gruppe der Gesunden	Serum Sulkusflüssigkeit	Glutathion Urea 2-Desoxyguanosin 2,5-Dihydroxybenzaldehyd Adipinsäure Allo-Inositol α-Tocopherol (Vit. E) Dehydroascorbinsäure (Vit. C) Glutathion Xanthin β-Alanin Thymidin Uridin Fructose-6-Phosphat Galactose Glucose-1-Phosphat Ribose-5-Phosphat Ribulose-5-Phosphat Ribose Noradrenalin Glycin-d5 Lysin Methionin Sarkosin 2-Oxobutansäure Phosphoglykolsäure	Oxiativer Stress Purinstoffwechsel Purinstoffwechsel Tyrosinstoffwechsel Oxidativer Stress Oxidativer Stress Oxidativer Stress Purinstoffwechsel Pyrimidinstoffwechsel Pyrimidinstoffwechsel Pyrimidinstoffwechsel Kohlenhydratstoffwechsel Kohlenhydratstoffwechsel Kohlenhydratstoffwechsel Kohlenhydratstoffwechsel Kohlenhydratstoffwechsel DNA/RNA Abbau Tyrosinstoffwechsel Aminosäurestoffwechsel Aminosäurestoffwechsel Aminosäurestoffwechsel Aminosäurestoffwechsel Aminosäurestoffwechsel Fettstoffwechsel
Using NMR in saliva to identify possible biomarkers of glioblastoma and chronic periodontitis (54)	García-Villaescusa et al.	2018	N: 130 (39 gesund, 59 Gingivitis/ frühe Parodontitis, 32 Parodontitis) Alter: 26-81	Speichel	Isocaproat ↑ Isovalerat ↑ Isoleucin ↑ Laktat ↓	Aminosäureabbau Aminosäureabbau Proteinabbau Bakterienstoffwechsel

Fortführung der Tabelle 3

Analysis of salivary phenotypes of generalized aggressive and chronic periodontitis through nuclear magnetic resonance-based metabolomics (55)	Romano et al.	2018	N: 100 (33 chronische Parodontitis, 28 aggressive Parodontitis, 39 gesund)	Speichel	Pyruvat ↓ N-Acetylgruppen ↓ Laktat ↓ Prolin ↑ Phenylalanin ↑ Tyrosin ↑	Bakterienstoffwechsel Bakterienstoffwechsel Proteinabbau Proteinabbau Proteinabbau
Saliva diagnostics - Current views and directions (63)	Kaczor-Urbanowicz et al.	2017	Review	Speichel	Veränderte Dipeptide Dihomolinolenat ↑	Gewebsuntergang Proteinabbau Fettsäurestoffwechsel
Distinct signatures of dental plaque metabolic byproducts dictated by periodontal inflammatory status (56)	Sakanaka et al.	2017	N: 50 (10 gesund, 28 moderate Parodontitis, 12 schwere Parodontitis)		3-Phenylpropionat ↑ Putrescin ↑ 5-Aminovalerat ↑	Bakterienstoffwechsel Fäulnis Aminosäureabbau
The dental calculus metabolome in modern and historic samples (57)	Velsko et al.	2017	N: 17 (5 Proben von Lebendigen, 12 Proben von Skeletten)	Zahnstein	Dihomo-Linolenate Carnitin Glycerolphosphorylcholin Aminosäuren Putrescin Nicotinat Nukleotide	ω-6 Fettsäurestoffwechsel Bakterienstoffwechsel Abbau von Biomembranen Proteinabbau Fäulnis Vitamine DNA/RNA Abbau
Prediction of Periodontal Inflammation via Metabolic Profiling of Saliva (58)	Kuboniwa et al.	2016	N: 19	Speichel	Ornithin ↑ 5-Oxoprolin ↑ Prolin ↑ Valin ↑ Histidin ↑ Cadaverin ↑ Spermidin ↑ Hydrocinnamat ↑	Harnstoffzyklus/Proteinabbau Oxidativer Stress Proteinabbau Proteinabbau Proteinabbau Aminosäureabbau Aminosäureabbau Bakterienstoffwechsel

Fortführung der Tabelle 3

Metabolomic analysis of gingival crevicular fluid using gas chromatography/Mass Spectrometry (59)	Ozeki et al.	2016	N: 30 (14 Parodontitis, 16 gesund)	Sulkusflüssigkeit	Putrescin ↑ Lysin ↑ Phenylalanin ↑ 5-Aminovalerat ↑ Milchsäure ↑	Bakterienstoffwechsel Proteinabbau Proteinabbau Bakterienstoffwechsel Bakterienstoffwechsel
Global Metabolomic Analysis of Human Saliva and Plasma from Healthy and Diabetic Subjects, with and without Periodontal Disease (60)	Barnes et al.	2014	N: 161 (80 Diabetes, 81 gesund)	Speichel Plasma	Purinabbau ↑ Dipeptide ↑ Aminosäure Metaboliten ↑ Kohlenhydrate ↑ DNA/RNA Abbau ↑ ω-6 Fettsäuren ↑ Fettsäuren ↑ Acetylcarnitin ↑ Carnitin ↑	Oxidativer Stress Proteinabbau Bakterienstoffwechsel Bakterienstoffwechsel Gewebezerstörung Entzündung Bakterienstoffwechsel Bakterienstoffwechsel Bakterienstoffwechsel
Metabolomics Reveals Elevated Macromolecular Degradation in Periodontal Disease (61)	Barnes et al.	2011	N: 68 (34 Parodontitis, 34 gesund)	Speichel	Dipeptide ↑ Aminosäuren ↑ Kohlenhydrate ↑ Lipide ↑ Fettsäuren (ω-3/ ω-6) ↑ Nukleotide ↑ Carnitin ↑	Proteinabbau Proteinabbau Zuckerabbau Abbau der Zellmembran Entzündung DNA/RNA Abbau Bakterienstoffwechsel
Acceleration of Purine Degradation by Periodontal Disease (64)	Barnes et al.	2009	N: 22	Sulkusflüssigkeit	Antioxidantien (Glutathion) ↓ Tri- und Disaccharide ↓ Aminosäuren ↑ Glycerolphosphorylcholin ↑ Polyamine ↑ Purinabbau ↑ Harnstoffzyklus ↑	Oxidativer Stress Zuckerstoffwechsel Proteinabbau Abbau der Zellmembran Aminosäureabbau Oxidativer Stress Proteinabbau

↑, erhöhte Metabolitenkonzentration; ↓, reduzierte Metabolitenkonzentration. Diese Angaben beziehen sich auf jene Proben, bei denen Studienteilnehmer*innen eine reduzierte bis krankhafte parodontale Gesundheit aufwiesen.

2.4. Ziele

Wir wollen mit dieser Studie das Speichelmetabolom von Proband*innen mit und ohne Parodontitis untersuchen, um potentielle Biomarker und Stoffwechselwege der Parodontalerkrankung aufzudecken oder zu validieren.

Das sogenannte ‚Metabolic Profiling‘ wird bereits umfassend für die Erstellung biochemischer Krankheitsprofile genutzt und treibt die Biomarkerforschung und Charakterisierung von Krankheiten maßgeblich voran (68). Auch in der Zahnmedizin bedient man sich zunehmend dem Metabolomics Ansatz, um ätiologische Fragen zu klären und potentielle Biomarker für parodontale Erkrankungen ausfindig zu machen (58). Bisher konnte sich das ‚Metabolic Profiling‘ jedoch nicht in der Praxis durchsetzen, da es sowohl an Studien mit größerer Anzahl an Proband*innen als auch an Replikationen und longitudinalen Studien fehlt. Daher erstellen wir in unserer Studie ein metabolisches Profil von gesunden und an Parodontitis erkrankten Proband*innen, indem wir in einer groß angelegten Replikationsstudie Korrelationsanalysen zwischen Speichelmetaboliten und parodontalen Parametern durchführen und den Zusammenhang zwischen den im Querschnitt gefundenen Speichelmetaboliten und dem Zahnverlust im Längsschnitt untersuchen. Bisher wurden keine Publikationen zwischen Speichelmetaboliten und Zahnverlust in Längsschnittstudien veröffentlicht.

2.5. Hypothesen

1. Speichelmetabolite, die in der SHIP-Trend-0 Kohorte signifikant mit Parametern reduzierter parodontaler Gesundheit assoziiert waren (siehe Liebsch et al. (51); SHIP-Trend-Daten), replizieren sich in den SHIP-2-Daten.
2. Spezifische Speichelmetabolite weisen in SHIP-2/3 signifikante Assoziationen mit dem Zahnverlust nach fünf Jahren auf.

III. Material & Methoden

Die angewandten Materialien und Methoden zu dieser Studie sind in dem Artikel von Andörfer und Kolleg*innen beschrieben (69). Aufgrund der umfassenden Datenlage von SHIP werden nur einzelne Aspekte im Anschluss gesondert erwähnt. Ebenso wird ein zusätzliches Experiment zu den Eigenschaften des Metaboliten 2-Pyrrolidinessigsäure (2-Pyrr) besprochen, da nur spärliche Hintergrundinformationen zu diesem Metaboliten vorlagen.

3.1. SHIP

Die „Studie Leben und Gesundheit in Vorpommern“, besser bekannt als Study of Health in Pomerania (SHIP), ist eine bevölkerungsbasierte Kohortenstudie des nordöstlichen Teils von Deutschland, welche die menschliche Gesundheit in ihrer Komplexität erfassen soll (70). Die Studienregion umfasst die Landkreise Vorpommern-Rügen und Vorpommern-Greifswald, mit Ausnahme der Inseln Rügen, Usedom sowie dem Fischland/Darß (Abbildung 2). Alle Teilnehmer*innen wurden zufällig unter Einbeziehung der Einwohnermeldeämter in einem zweistufigen Verfahren bestimmt. Zuerst wurden aus der beschriebenen Studienregion die drei Städte Stralsund, Greifswald und Anklam sowie 29 weitere umliegende Gemeinden (12 Ortschaften mit >1500 Einwohner*innen und 17 zufällig gewählte Ortschaften mit <1500 Einwohner*innen) ausgewählt. Im zweiten Schritt wurden, proportional zur Bevölkerungsgröße, aus jeder dieser Gemeinden Teilnehmer*innen nach dem Zufallsprinzip bestimmt und nach Alter und Geschlecht stratifiziert (71).

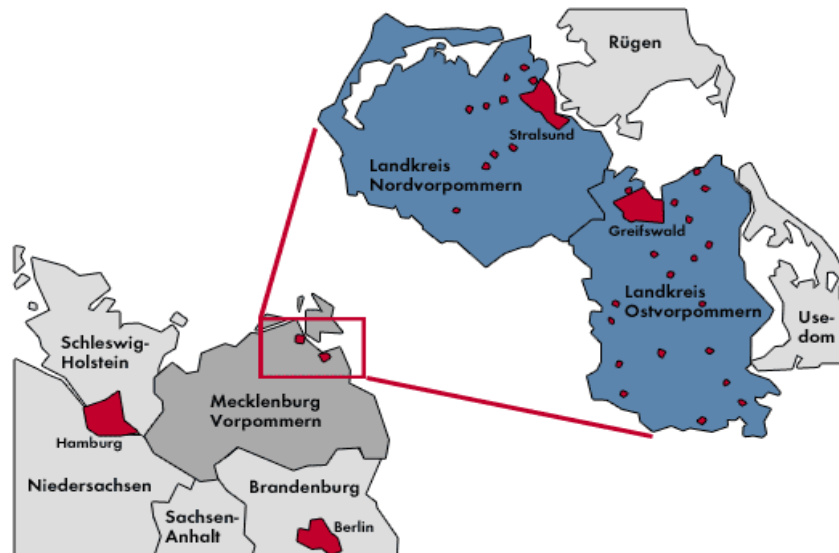


Abbildung 2: Einzugsgebiet der SHIP Proband*innen (Forschungsverband Community Medicine); Landkreis Nordvorpommern wurde umbenannt (und vergrößert) in Landkreis Vorpommern-Rügen; Landkreis Ostvorpommern wurde umbenannt in Landkreis Vorpommern-Greifswald.

Die Gesundheitsstudie SHIP ist ein bis in die Gegenwart anhaltendes Projekt, welches die Teilnehmer*innen in regelmäßigen Abständen zu Folgeuntersuchungen einlädt. Daraus ergeben sich sieben verschiedene Datensätze, basierend auf zwei Kohorten (Abbildung 3). Eine dritte Kohorte ist in der Entstehungsphase (Stand 2021). Alle Proband*innen gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Greifswald genehmigt und entsprach den Prinzipien der Deklaration von Helsinki. Für die vorliegende Arbeit verwendeten wir Daten aus SHIP-2 und SHIP-3. Bei der Querschnittsanalyse wurde ausschließlich mit SHIP-2 gearbeitet, wohingegen die longitudinale Untersuchung SHIP-3 Daten heranzieht.

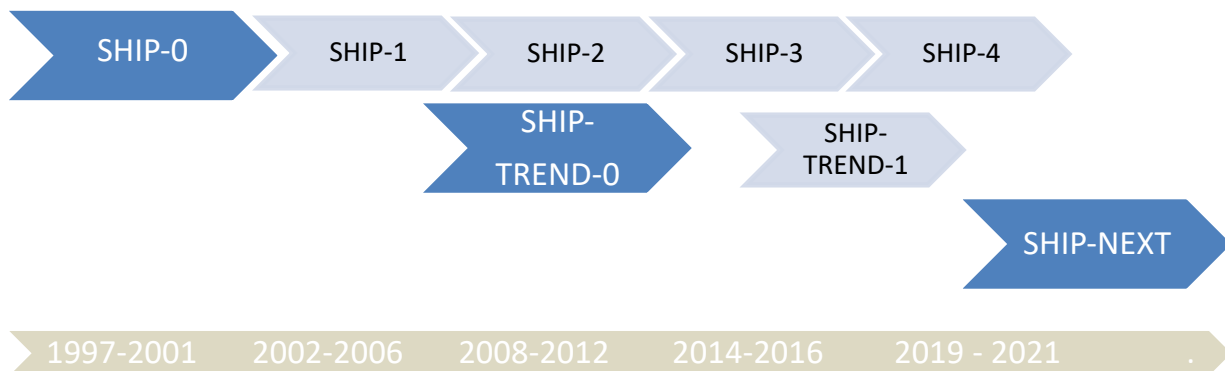


Abbildung 3: Fließschema der SHIP-Datensätze mit zeitlicher Einordnung, dunkelblau hinterlegt – Baseline Kohorten; hellblau hinterlegt – Datensätze der Folgeuntersuchungen

3.1.1. Datenerhebung der SHIP Untersuchungen

Das Untersuchungsprogramm umfasst vier Teile:

A. Computer-gestützte Befragung zur Gesundheit

Die Fragen liefern Informationen zur soziodemographischen und sozioökonomischen Situation der Teilnehmenden, bereits bekannte Erkrankungen, Medikationen und bestehende Risikofaktoren, wie beispielsweise dem gesundheitsbezogenen Verhalten, Arbeitsbedingungen und Erkrankungen innerhalb der Familie.

B. Mundgesundheitsuntersuchung

Hierbei wurden Zähne, Parodontium, Mundschleimhaut, cranio-mandibuläre Strukturen und Funktion sowie, wenn vorhanden, Zahnersatz dokumentiert. Zusätzlich wurden in einem Interview Fragen zur Mundhygiene und Mundgesundheit gestellt.

C. Allgemeinmedizinische Untersuchung

Dieser Part umfasst eine Somatometrie ausgewählter Körperteile; Blutdruck- und Herzfrequenzmessung; Durchführung und Auswertung eines Elektrodiagramms sowie Echokardiographie (nur bei Proband*innen im Alter von 45-79 Jahren); eine Sonographie von Karotis (nur bei Proband*innen im Alter von 45-79 Jahren),

Schilddrüse und Abdomen; ein Screening auf neurologische Symptome (nur bei Proband*innen im Alter von 60-79 Jahren); Untersuchung einer Blut- und Urinprobe; und ein Screening auf kognitive Beeinträchtigungen.

D. Gesundheits- und Risikofaktoren bezogener Fragebogen

Die Proband*innen füllten eigenständig Fragen zu Lebens- und Arbeitsbedingungen; zum sozialen Umfeld; subjektiv empfundenen sowie mentalen Gesundheitsstatus; und Veränderungen in ihrem Leben verursacht durch die deutsche Wiedervereinigung, aus.

Umfang der Mundgesundheitsuntersuchung

Alle oralen Untersuchungen wurden von ausgebildeten Zahnärzt*innen nach der Half oder Full-Mouth Methode, durchgeführt. Die Methodik zu den in Bezug auf die vorliegende Thematik besonders relevanten parodontalen Variablen Taschentiefe, Attachmentverlust, Plaque, Zahnstein und Zahnverlust, wurde in der Publikation von Andörfer und Kolleg*innen bereits eingehend erläutern (69). Für die vielfach analysierten Parameter der parodontalen Taschentiefe (PPD) und des CAL sollte jedoch noch erwähnt werden, dass deren Messung zum einen die Distanz zwischen marginaler Gingiva und Sulkusboden und zum anderen den Abstand der Schmelz-Zement-Grenze zum Sulkusboden darstellt. Durch deren unterschiedliche Ausgangsmesspunkte bei gleichbleibenden Endpunkten können so neben parodontalen Taschen auch Rezessionen und veränderte Attachmentniveaus sichtbar gemacht werden.

3.2. In-vitro Test

Zu dem Metabolit Pyrrolidinessigsäure (2-Pyrr) wurde nur wenig Literatur gefunden, aber unser Interesse an besagtem Stoff war infolge der Ergebnisse groß. Daher nahmen wir Kontakt zu national und international bekannten Metabolomforscher*innen auf, um mehr Informationen zu generieren. Der Austausch mit den Kolleg*innen bestätigte uns in der Annahme, dass 2-Pyrr eher mikrobiellen als menschlichen Ursprungs ist. Eventuell handelt es sich auch um ein Abbauprodukt oder eine biosynthetische Vorstufe eines anderen Sekundärprodukts. Dennoch blieb der Stoff weitestgehend neuartig.

Die zwitterionische Anordnung des Metaboliten ähnelt vielen Verbindungen, die von Bakterien zum Schutz vor osmotischem Stress verwendet werden. Dies brachte uns zu dem Ansatz, dass es sich bei 2-Pyrr um ein Osmoprotektivum handeln könnte. Die Struktur von 2-Pyrr ähnelt der von Osmoprotektoren und könnte eine wichtige Funktion des Stoffes darstellen. Daher haben wir die osmoprotektive Wirkung von 2-Pyrr auf das gramnegative Darmbakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) getestet. Im In-vitro-Test wird der Einfluss von 2-Pyrr auf die Wachstumsrate von *E. coli* in einem Medium mit erhöhter Natriumchlorid-Konzentration untersucht.

Prüfsubstanz:	(S)-2-(Pyrrolidin-2-yl)essigsäure, CAS: 56633-75-1, M 129,16 g/mol (Sigma-Aldrich/Merck, AMBH2D6F4369-250MG; Flammpunkt: 118,5; Siedepunkt 272,3°C bei 760 mmHg Hersteller: AmBeed, A174769-250mg, LOT A174769-003).
Testorganismus:	<i>E. coli</i> DSM 11250 (Genotyp: K1 2 (MG1655), ER2738 (NEB); Serotyp: O Rough H48).
Medium:	M9-Lösung (Minimal Medium Suspension, M9 Broth, Sigma-Aldrich/Merck, 63011), versetzt mit 1M MgSO ₄ und Glukose 20%, gemäß Zubereitungshinweise des Lieferanten).

Die Testlösungen wurden in M9-Medium ohne und mit zusätzlichen unterschiedlichen Natriumchlorid-Konzentrationen hergestellt, mit oder ohne 2-Pyrr versetzt und mit *E. coli* in einer Endkonzentration von 5 log₁₀ koloniebildenden Einheiten (KBE)/ml in Röhrchen beimpft, die für 24 Stunden bei 37°C im Schüttelinkubator bebrütet wurden. Die Bewertung erfolgte anhand der Trübungsmessung bei 620nm und der Dokumentation der Koloniebildung (KB) von 100µl Testlösung auf Columbia-Agar mit 5% Schafsblut (BBL™, BD, Heidelberg, Deutschland) nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C.

Beim ersten Testlauf wurde der Vergleich zwischen reinem M9-Medium und mit 0,65M Natriumchlorid (NaCl) angereichertem M9-Medium durchgeführt. Beim zweiten Testlauf wurde das M9-Medium mit NaCl-Konzentrationen von 0,15, 0,25, 0,35, 0,45, 0,55 und 0,65M untersucht.

IV. Ergebnisse

Die folgenden Ergebnisse basieren auf mehreren Untersuchungen. Der erste Teil bezieht sich auf die Querschnittsanalysen von SHIP-2 sowie deren Vergleich zu den in Liebsch et al. (51) veröffentlichten Ergebnissen, die sich mit der SHIP-Trend-Kohorte befassen. Im zweiten Teil wurden Längsschnittanalysen von SHIP-2 zu SHIP-3 ausgewertet. Um Zusammenhänge, Hintergründe und Ursprünge der Metaboliten besser zu verstehen, wurden außerdem unterschiedliche weiterführende Analysen durchgeführt. Alle Ergebnisse dazu sind in dem Artikel von Andörfer und Kolleg*innen im Juli 2021 veröffentlicht worden (69). Nachfolgend werden die wesentlichen Resultate zusammengefasst und ein zusätzliches In-vitro Experiment ausgewertet.

4.1. Ergebnisse beruhend auf der Querschnittsanalyse

Insgesamt wurden 559 Metabolite durch eine nicht zielgerichtete Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (UPLC-MS/MS) in unserer Teilstichprobe der SHIP-2 Kohorte identifiziert. Die Querschnittsanalyse dieser Population ergab 84 Metabolite, die mit mindestens einer der untersuchten dentalen Variablen signifikant assoziiert waren (p -Werts $<0,05$). Diese Substanzen umfassten 16 replizierte sowie 51 neue Metabolite (bezogen auf das Speichelmetabolom von SHIP-Trend). Die verbliebenen 17 Substanzen waren bereits bekannt, zeigten aber veränderte signifikante Assoziationen zu den dentalen Variablen auf, sodass sie weder der Kategorie ‚neu‘ noch ‚repliziert‘ zugezählt werden konnten (Abbildung 4).

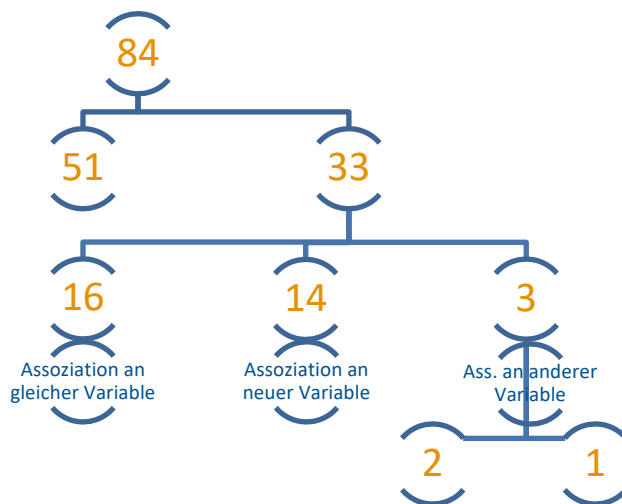


Abbildung 4: Fließschematische Darstellung zur Zuordnung der im Querschnitt festgestellten signifikanten Assoziationen. Erste Ebene = Gesamtheit aller Metabolite mit mindestens einer signifikanten Assoziation zu den Variablen MeanPPD, CumPPD4+, PPD3+mm%, PPD4+mm%, MeanCAL, CAL3+mm%, CAL4+mm%, MTcount, Plaque, Calculus, Prosthesis/MT, DF-S und DF-S%. Zweite Ebene = Aufteilung der Metabolite in neu vorhandene (links) und bereits bekannte (rechts). Dritte Ebene = Aufteilung bereits bekannter bzw. replizierter Metabolite, entsprechend ihrer Assoziation. Vierte Ebene = Verteilung bekannter, jedoch nicht replizierter Metabolite, deren signifikante Assoziation zu einer anderen Variablen als in SHIP-Trend bestand. Variable wurde nicht mit Parodontitis assoziiert (links), Variable wurde mit Parodontitis assoziiert (rechts).

Am auffälligsten an den Querschnittsanalysen war, dass überwiegend PPD und Plaque-Variablen, jedoch nur vereinzelt CAL-Variablen signifikant mit Speichelmetaboliten assoziiert waren. Die überwiegend positiven Assoziationen mit Sondierungstiefen deuteten darauf hin, dass der aktuell stattfindende Prozess der „akuten Entzündung“ oder das in den Taschen lebende Mikrobiom für entsprechend gesteigerte Metabolitenkonzentrationen verantwortlich ist und nicht der Attachmentverlust, der das „historische Gedächtnis“ der Parodontitis darstellt.

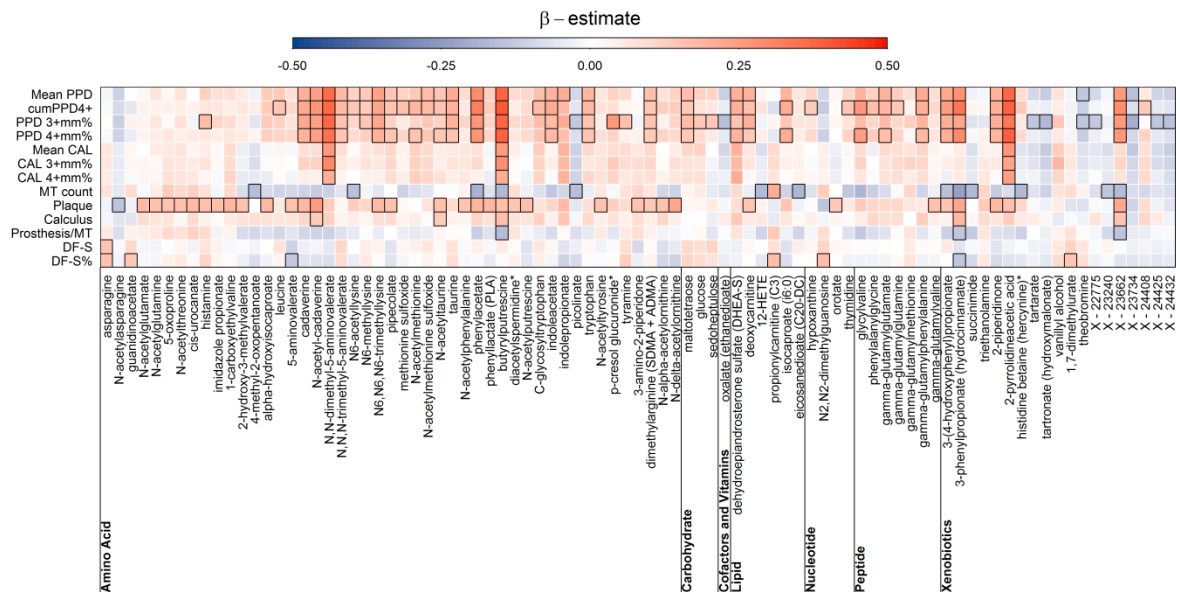


Abbildung 5: Heatmap der Speichelmetaboliten, die in den Querschnittsanalysen signifikant mit mindestens einem der untersuchten Merkmale assoziiert sind. Die roten und blauen Färbungen spiegeln positive und negative Assoziationen wider. Umrandete Felder kennzeichnen Assoziationen mit FDR-korrigierten p-Werten $<0,05$, was der gewählten Signifikanzschwelle entspricht. PPD, Sondierungstiefe der Tasche; PPD 3+mm% und 4+mm%, Prozentsatz der Stellen mit PPD ≥ 3 mm und ≥ 4 mm; cumPPD4+, kumulative PPD aus Taschen mit PPD ≥ 4 mm; CAL, klinisches Attachmentlevel; CAL 3+mm% und 4+mm%, Prozentsatz der Stellen mit CAL ≥ 3 mm und ≥ 4 mm; MT, fehlende Zähne; DF-S und DF-S%, Anzahl und Prozentsatz kariöser oder gefüllter Flächen.

4.1.1. Neu entdeckte Metabolite

Unter den 51 neu entdeckten Metaboliten zeigten Butyrylputrescin, 2-Pyrr, X-23662, N,N-Dimethyl-5-Aminovalerat und N-Acetyl-Cadaverin am häufigsten signifikante Verbindungen zu oralen Parametern (>5 Assoziationen). Die Reihenfolge der genannten Metabolite orientiert sich dabei an der Anzahl der Assoziationen, beginnend mit der höchsten. Butyrylputrescin, 2-Pyrr, X-23662, N,N-Dimethyl-5-Aminovalerat und N-Acetyl-Cadaverin wurden am überwiegendsten zu sämtlichen PPD zugehörigen Variablen (Mean PPD, cumPPD4+, PPD 3+mm%, PPD 4+mm%) assoziiert. Ähnlich oft wurden signifikante Verknüpfungen zu Plaque, Zahnstein, durchschnittlichem CAL, CAL 3+mm% und CAL 4+mm% erfasst. Die oralen Parameter für die Anzahl der fehlenden Zähne (MT count) und die Verknüpfung von herausnehmbarem Zahnersatz

mit fehlenden Zähnen (Prosthesis/MT) gehörten ebenfalls zu den signifikanten Assoziationen, aber wurden vergleichsweise wenig nachgewiesen.

4.1.2. Replikationen

Der Vergleich mit den Ergebnissen aus Liebsch et al. (51) ergab für 16 Metabolite übereinstimmende Assoziationen. Die Resultate der hervorstechendsten Metabolite 3-Phenylpropionat, Phenylacetat und 3-(4-Hydroxyphenyl)Propionat konnten repliziert werden. Bei einzelner Betrachtung aller Variablen, die der parodontalen Taschentiefenmessung zugehörig sind sowie der Anzahl der fehlenden Zähne (MT count) und der Plaquewerte, kommt dies besonders gut zur Geltung.

Tabelle 4: Metabolite mit mindestens einer signifikanten Assoziation in SHIP-Trend oder SHIP-2

Metabolit	DFS%		DFS		Prosthesis/MT		Calculus		Plaque		MT count		CAL4+mm%		CAL3+mm%		MeanCAL		PPD4+mm%		PPD3+mm%		cumPPD4+		MeanPPD	
	ST	S2	ST	S2	ST	S2	ST	S2	ST	S2	ST	S2	ST	S2	ST	S2	ST	S2	ST	S2	ST	S2	ST	S2	ST	S2
Asparagin	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
N-Acetylasparagin	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Guanidinoacetat	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
N-Acetylglutamat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
N-Acetylglutamin	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
5-Oxoprolin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
N-Acetylthreonin	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Urocanat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Histamin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Imidazol Propionat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
1-Carboxyethylvalin	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
2-Hydroxy-3-Methylvalerat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4-Methyl-2-Oxopentanoat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Alpha-Hydroxyisocaproat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Leucin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
5-Aminovalerat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cadaverin	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
N-Acetyl-Cadaverin	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
N,N-Dimethyl-5-Aminovalerat	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
N,N,N-Trimethyl-5-Aminovalerat	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
N6-Acetyllysin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
N6-Methyllysin	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
N6,N6,N6-Trimethyllysin	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Pipecolat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Methionin Sulfoxid	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
N-Acetylmethionin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
N-Acetylmethionin Sulfoxid	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
N-Acetyltaurin	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Taurin	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
N-Acetylphenylalanin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Phenylacetat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Phenyllactat (PLA)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Diacetylspermidin	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
N-Acetylputrescin	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
C-Glycosyltryptophan	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Indoleacetat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Indolepropionat	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Picolinat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Tryptophan	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
N-Acetyltyrosin	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
p-Cresol Glucuronid	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Tyramin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
3-Amino-2-Piperidon	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Dimethylarginin	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
N-Alpha-Acetylmethionin	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
N-Delta-Acetylmethionin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Maltotetraose	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Glucose	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Sedoheptulose	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Oxalat (Ethanedioat)	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Dehydroepiandrosteron Sulfat	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Deoxycarnitin	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
12-HETE	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Propionylcarnitin (C3)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Isocaproat (i6:0)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Eicosanedioat (C20-DC)	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Hypoxanthin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
N2,N2-Dimethylguanosin	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Orotat	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Thymidin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Glycylvalin	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Phenylalanylglutamin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Gamma-Glutamylglutamat	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Gamma-Glutamylglutamin	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Gamma-Glutamylmethionin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Gamma-Glutamylphenylalanin	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Gamma-Glutamylvalin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
3-(4-Hydroxyphenyl)Propionat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
3-Phenylpropionat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Tabelle 4 wird auf der nächsten Seite fortgeführt

Fortführung der Tabelle 4

Metabolit	DFS%	DFS	Prosthesis/	Calculus	Plaque	MT count	CAL4+mm%	CAL3+mm%	MeanCAL	PPD4+mm%	PPD3+mm%	cumPPD4+	MeanPPD	
Succinimid	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Triethanolamin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
2-Piperidinon	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
2-Pyrrolidinessigsäure	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Histidin Betain (Hercynin)	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Tartarat	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Tartronat (Hydroxymalonat)	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Anillyl Alkohol	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
1,7-Dimethylurat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Theobromin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
X - 22775	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
X - 23240	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
X - 23662	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
X - 23734	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
X - 24408	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Butyrylputrescin	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
X - 24425	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
X - 24432	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Aspartat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Creatin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Glutathion, oxidiert (GSSG)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Threonin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
3-Methyl-2-Oxovalerat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Isoleucin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Isovalerat (i5:0)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Valin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Lysin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
3-(4-Hydroxyphenyl)Lactat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Phenylalanin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Tyrosin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4-Hydroxyphenylpyruvat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Arginin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Citrullin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Prolin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Trans-4-Hydroxyprolin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Urea	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
1,5-Anhydroglucitol (1,5-AG)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Lactat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Nicotinat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Phosphat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Malat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Succinat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Carnitin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Butyrylcarnitin (C4)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Acetylcarnitin (C2)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
2-Hydroxyglutarat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Azelat (C9-DC)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Docosadioat	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
10-Hydroxydeicansäure	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4-Hydroxybutyrat (GHB)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Mevalonat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Glycerophosphorylcholin (GPC)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Dihomo-Linolenat	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/
Inosin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Adenin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Adenosin 5'-Monophosphat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Guanosin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
2'-Deoxycytidin 5'-Monophosphat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cytidin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Uracil	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Glycylisoleucin	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Glycylleucin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Isoleucylglycin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Leucylglycin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Prolylglycin	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cis, Cis-Muconsäure	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS
Lauryl Sulfat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
2,3-Dihydroxyisovalerat	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Levulinat (4-Oxovalerat)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Vanillin	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS	/	NS

Rot markiert, signifikant positiv assoziiert; blau markiert, signifikant negativ assoziiert; schwarz hervorgehobener Rahmen, Replikation.

NS, nicht signifikant; / = nicht festgestellt; PPD, Sondierungstiefe der Tasche; PPD 3+mm% und 4+mm%, Prozentsatz der Stellen mit PPD ≥ 3 mm und ≥ 4 mm; cumPPD4+, kumulative PPD aus Taschen mit PPD ≥ 4 mm; CAL, klinisches Attachmentlevel; CAL 3+mm% und 4+mm%, Prozentsatz der Stellen mit CAL ≥ 3 mm und ≥ 4 mm; MT, fehlende Zähne; DF-S und DF-S%, Anzahl und Prozentsatz kariöser oder gefüllter Flächen

4.2. Ergebnisse beruhend auf der Längsschnittsanalyse

Für die longitudinalen Analysen wurden 34 vorausgewählte Metabolite verwendet. Neun der 34 Metabolite waren signifikant mit dem Zahnverlust nach fünf Jahren assoziiert. Am stärksten war die Variable Zahnverlust jedoch abhängig von den Metaboliten N,N-Dimethyl-5-Aminovalerat, dicht gefolgt von Butyrylputrescin, N-Acetyltaurin und 2-Pyrr (Tabelle 5).

Tabelle 5: Inzidenzratenverhältnisse (IRR; mit 95% Konfidenzintervall) aller Speichelmetabolite die als Expositionsvariablen in der Längsschnittanalyse untersucht wurden (n=34).

Metabolit	IRR (95% KI)
Pipecolat	1,06 (0,94; 1,21)
N6,N6,N6-Trimethyllysin	1,21 (1,06; 1,38)
Cadaverin	1,10 (0,96; 1,25)
3-Phenylpropionat (Hydrocinnamat)	1,15 (1,01; 1,31)
N-Acetylmethionin	1,06 (0,93; 1,22)
Maltotetraose	1,17 (1,03; 1,34)
Glycylvalin	1,21 (0,99; 1,49)
Theobromin	0,98 (0,85; 1,11)
Taurin	1,11 (0,97; 1,27)
Isocaproat	0,99 (0,82; 1,20)
Indoleacetat	1,13 (0,99; 1,29)
Dehydroepiandrosteron Sulfat	1,08 (0,88; 1,34)
Propionylcarnitin	0,97 (0,84; 1,11)
Gamma-Glutamylphenylalanin	1,18 (0,99; 1,40)
Gamma-Glutamylglutamat	1,20 (1,02; 1,40)
Deoxycarnitin	1,06 (0,93; 1,21)
N6-acetyllysine	1,12 (0,97; 1,29)
Dimethylarginin	1,19 (1,04; 1,36)
3-(4-Hydroxyphenyl)Propionat	1,15 (1,01; 1,31)
2-Piperidinon	1,13 (0,99; 1,29)
N-Acetyl-Cadaverin	1,21 (1,07; 1,38)
N-Acetylmethionin Sulfoxid	1,08 (0,93; 1,25)
N-Acetyltaurin	1,26 (1,10; 1,44)
X - 23662	1,21 (1,06; 1,38)
X - 23734	1,02 (0,87; 1,20)
Asparagin	1,09 (0,96; 1,25)
Butyrylputrescin	1,27 (1,10; 1,46)
Tryptophan	1,15 (1,01; 1,31)
N,N,N-Trimethyl-5-Aminovalerat	1,17 (1,02; 1,34)
Phenylacetat	1,25 (1,10; 1,43)
Leucin	1,06 (0,94; 1,20)
N,N-Dimethyl-5-Aminovalerat	1,28 (1,10; 1,49)
N6-Methyllysin	1,17 (1,02; 1,35)
2-Pyrrolidinessigsäure	1,26 (1,10; 1,44)

Grün markiert, Speichelmetabolite mit signifikanter Assoziation zu Zahnverlust nach fünf Jahren.
KI, Konfidenzintervall

4.3. Weiterführende Untersuchungen

Zu den zusätzlich durchgeführten Analysen zählen: die Erstellung des metabolischen Netzwerks über ein Gaußsches grafisches Modell, die Analysen zur Untersuchung von Zusammenhängen zwischen Phänotypen und signifikanten Speichemetaboliten aus der Längsschnittuntersuchung, die genomweiten Analysen der Speichelmetabolite 2-Pyrr und Butyrylputrescin, die Betrachtung der Verteilung von 2-Pyrr bei unterschiedlichem Rauchverhalten und die Betrachtung der Wirkung von 2-Pyrr auf ein gramnegatives Bakterium in einem Medium mit erhöhter Natriumchlorid-Konzentration.

4.3.1. Metabolisches Netzwerk

Das Netzwerk brachte Verknüpfungsmuster zwischen 2-Pyrr, 3-Phenylpropionat, Phenylacetat und 3-(4-Hydroxyphenyl)Propionat hervor, aber auch Verbindungen des unbekannten Metaboliten X-23662 zu N-Acetylcadaverin und Cadaverin. Cadaverin ist ein bakterielles Abbauprodukt, das bereits mit Parodontitis assoziiert wurde (48, 58). Die Stoffe N6-N6-N6-Trimethyllysin und Dimethylarginin scheinen ebenfalls in Korrelation zueinanderzustehen.

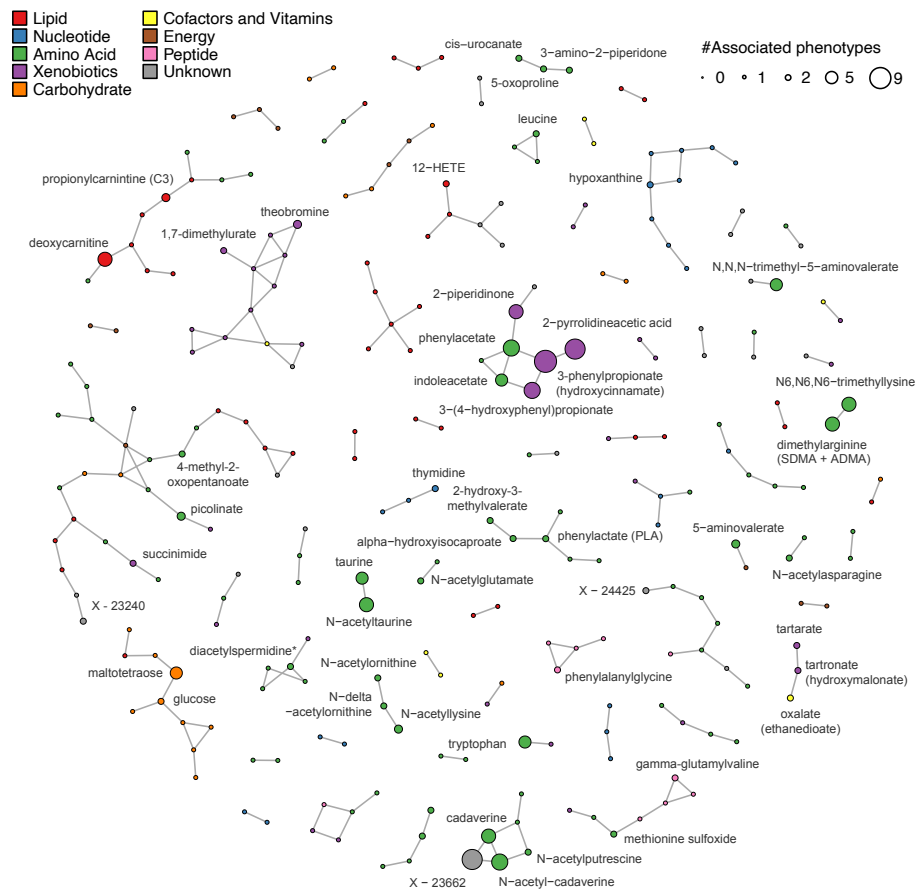


Abbildung 6: Partielles Korrelationsnetzwerk von Metaboliten, die signifikante Wechselwirkungen mit anderen Metaboliten aufweisen. Metabolite werden als Knoten und signifikante Interaktionen als Linien dargestellt. Nur Metabolite mit mindestens einer Assoziation zu einem Phänotyp in der Querschnittsanalyse wurden annotiert. Die Größe eines Knotens entspricht der Anzahl der assoziierten Phänotypen in den Querschnittsanalysen. Die Farbmarkierungen klassifizieren die Metabolite in verschiedene Substanzgruppen.

4.3.2. Genomweite Assoziationsstudien

Bei der Untersuchung von Butyrylputrescin und 2-Pyrr konnten keine signifikanten genetischen Assoziationen erfasst werden.

4.3.3. Auswirkung des Rauchverhaltens auf das Vorkommen von 2-Pyrr

Proband*innen, die gegenwärtig rauchen, verzeichnen deutlich höhere 2-Pyrr Werte als diejenigen, die noch nie oder früher geraucht haben. Dennoch wurde der Stoff in

allen drei Gruppen gefunden und Rauchen erweist sich als begünstigender, nicht aber ursächlicher Faktor für das Aufkommen von 2-Pyrr.

4.3.4. Wirkung von 2-Pyrr auf die Toleranz von *E. coli* gegenüber erhöhten NaCl-Konzentrationen

Im ersten Testlauf blieben die Lösungen mit 0,65M NaCl klar und die Lösungen ohne 0,65M NaCl wurden trüb, unabhängig davon, ob 2-Pyrr dazugegeben wurde oder nicht (Tabelle 4, Abbildung 5). Auf dem Agar wurde dabei eine deutlich reduzierte Anzahl von Kolonien festgestellt. Der zweite Testlauf wurde mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen durchgeführt. Bei Testlösungen mit Natriumchlorid-Konzentrationen von 0,15M bis 0,45M waren die Werte der optischen Dichte bei 620nm (OD620) höher, wenn 2-Pyrr zugesetzt wurde. Bei den 0,55M und 0,65M NaCl Testlösungen gab es keine Unterschiede der OD620-Werte, wenn 2-Pyrr dazugegeben wurde. Auf den Agarplatten wurden bis zu einer Konzentration von 0,35M NaCl keine Abweichungen durch Zugabe von 2-Pyrr festgestellt. Bei einer Natriumchlorid-Konzentration von 0,45M wurden leichte und bei einer Natriumchlorid-Konzentration von 0,55M deutliche Unterschiede festgestellt (Tabelle 4). Es wurden unterschiedliche Proliferationsraten von *E. coli* in Bezug auf die Zugabe von 2-Pyrr, für Zellkonzentrationen bis zu einem OD620-Wert von 0,1 nachgewiesen. Bei niedrigeren Zellkonzentrationen waren diese Unterschiede anhand der auf Agar gewachsenen koloniebildenden Einheiten (KBE) nachweisbar. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass 1mM 2-Pyrr das Wachstum von *E. coli* in Gegenwart steigender Konzentrationen von NaCl im Medium unterstützt (Tabelle 4). Das Experiment stützt also die Vermutung, dass 2-Pyrr ein Osmoprotektivum sein könnte.

Tabelle 6: Trübungsmessung und Dokumentation der Koloniebildung entsprechender Testlösungen auf Agarplatten

Testlauf	M9 Medium mit NaCl (in verschiedenen Molaritäten) mit oder ohne 2-Pyrr	N	OD ₆₂₀ Durchschnittswert	Visuelle Kontrollen der Testlösungen	Visuelle Kontrollen der Koloniebildung auf Agarplatten
1	M9	6	0.35	trüb	dichte KB Schicht
	M9 + 2-Pyrr	4	0.35	trüb	dichte KB Schicht
	0.65M NaCl	6	0.04	klar	KBE Schicht
	0.65M NaCl + 2-Pyrr	6	0.04	klar	dichte KB Schicht, partiell KBE
2	0.15 NaCl	2	0.28	trüb	dichte KB Schicht
	0.15 NaCl + 2-Pyrr	2	0.37	trüb	dichte KB Schicht
	0.25 NaCl	2	0.14	trüb	dichte KB Schicht
	0.25 NaCl + 2-Pyrr	2	0.39	trüb	dichte KB Schicht
	0.35 NaCl	2	0.04	klar	dichte KB Schicht
	0.35 NaCl + 2-Pyrr	2	0.21	trüb	dichte KB Schicht
	0.45 NaCl	2	0.04	klar	dichte KB Schicht, partiell KBE
	0.45 NaCl + 2-Pyrr	2	0.08	leicht trüb	dichte KB Schicht
	0.55 NaCl	2	0.04	klar	vereinzelte KBE
	0.55 NaCl + 2-Pyrr	2	0.04	klar	dichte KB Schicht, partiell KBE
	0.65 NaCl	2	0.04	klar	vereinzelte KBE
	0.65 NaCl + 2-Pyrr	2	0.04	klar	dichte KB Schicht, partiell KBE

NaCl, Natriumchlorid; 2-Pyrr, 2-Pyrrolidinessigsäure; OD₆₂₀, optische Dichte bei 620nm; N, Anzahl der Proben; KB, Koloniebildung; KBE, koloniebildende Einheit.

visuelle Kontrollen der KB:

- dichte KB Schicht, die gesamte Fläche war bewachsen; + partiell KBE, einige Bereiche zeigen unterscheidbare KBE
- KBE Schicht, KBE sind unterscheidbar und nehmen die gesamte Agaroberfläche ein
- vereinzelte KBE, KBE sind erkennbar und freie Agarflächen sichtbar

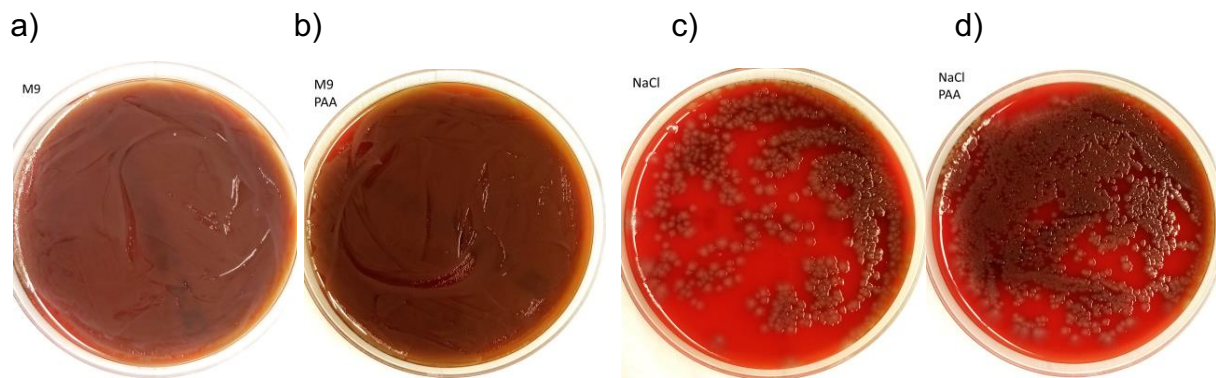


Abbildung 7: Ausplattierte Lösungen des ersten Testlaufs mit *E. coli* nach Inkubation für 24h bei 37°C auf Blutagar.

a) M9 Lösung ohne 2-Pyrr oder NaCl; b) M9-Lösung mit 2-Pyrr und ohne NaCl;
c) M9-Lösung ohne 2-Pyrr und mit 0,65M NaCl; d) M9-Medium mit 2-Pyrr und 0,65M NaCl

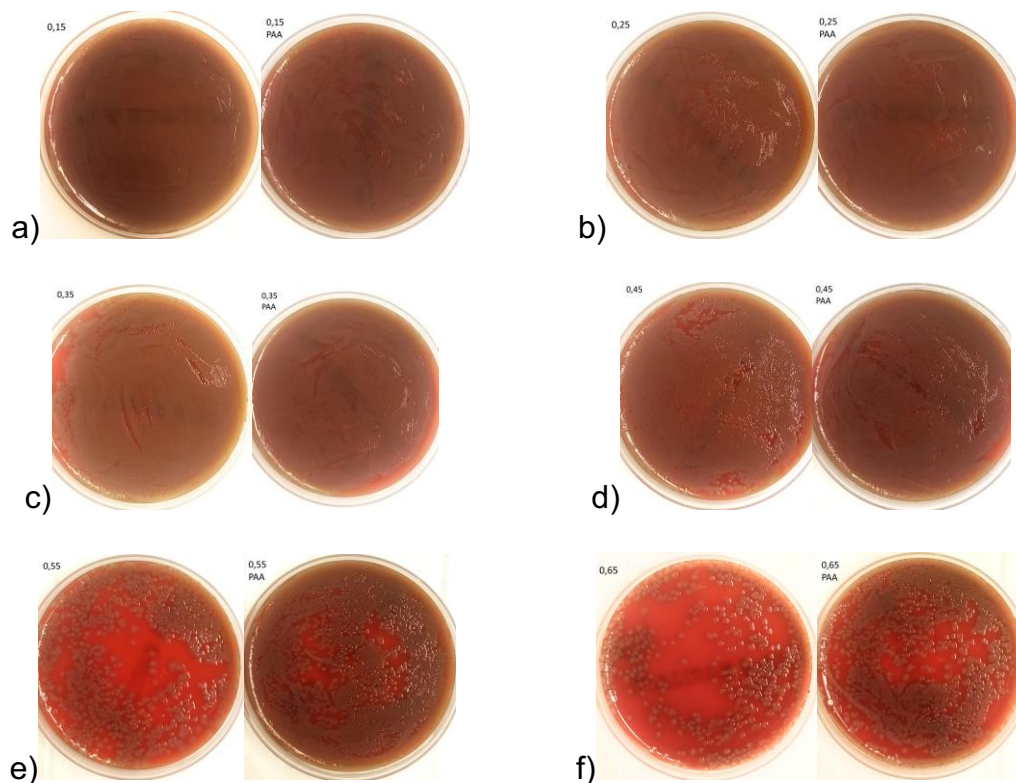


Abbildung 8: Ausplattierte Lösungen des zweiten Testlaufs mit *E. coli* nach Inkubation für 24h bei 37°C auf Blutagar. Linke Seite jeder Untergruppe jeweils ohne Zusatz von 2-Pyrr, rechte Seite mit Zusatz von 2-Pyrr.

a) M9-Lösung mit 0,15M NaCl; b) M9-Lösung mit 0,25M NaCl;
c) M9-Lösung mit 0,35M NaCl; d) M9-Lösung mit 0,45M NaCl;
e) M9-Lösung mit 0,55M NaCl; f) M9-Lösung mit 0,65M NaCl

V. Diskussion

In dieser Arbeit wurden zum einen querschnittliche Assoziationen zwischen Speichelmetaboliten und Parodontitisvariablen und zum anderen Assoziationen zwischen den im Querschnitt signifikanten Metaboliten und der Progression von Zahnverlust untersucht. Es sei an dieser Stelle betont, dass Zahnverlust jedoch kein spezifisches Ergebnis der Parodontitis ist. Zähne werden ebenfalls aufgrund von Karies und den daraus resultierenden Folgen, Traumata oder im Zusammenhang mit der zahnärztlichen Therapieplanung extrahiert (72). Dennoch ist das Endstadium einer Parodontitis eindeutig mit dem Verlust von Zähnen bis hin zur Zahnlosigkeit verbunden (Tabelle 1).

Die Metabolite mit signifikanten Korrelationen sind teilweise bereits bekannte und teilweise bisher unbekannte Speichelbiomarker. Um erfassen zu können in welchem Kontext die einzelnen Stoffwechselprodukte mit Parodontitis stehen, gilt es unter anderem ihre Herkunft zurückzuverfolgen. Durch die Betrachtung dieser Zusammenhänge können sich neue Erkenntnisse über den Pathomechanismus der Erkrankung ergeben und potentielle Biomarker für die Diagnostik von parodontal erkrankten Patient*innen gefunden werden.

5.1. Diskussion über den Ursprung potenzieller Biomarker mit signifikanten Assoziationen zu Parodontitis

5.1.1. Polyaminregulation

Butyrylputrescin und N-Acetylcadaverin, beides Polyaminderivate, gehörten in unserer Studie zu den am häufigsten assoziierten Metaboliten. N,N-Dimethyl-5-Aminovalerat war am deutlichsten mit dem Zahnverlust nach fünf Jahren assoziiert und 5-Aminovalerat ist ein Metabolit, der durch den Abbau von Cadaverin entsteht.

Polyamine sind mit vielfältigen Funktionen versehene Moleküle, die sich in eukaryotischen und prokaryotischen Zellen finden lassen. Sie spielen eine wichtige Rolle für die Zellproliferation, Genexpression und zelluläre Stressreaktion (73). Aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften sind sie in unzähligen Prozessen wiederzufinden, wie beispielsweise in der Wundheilung verschiedener Erkrankungen und in der Regulation entzündlicher Reaktionen (74). Die Wirkungsweisen sind divers und können in Abhängigkeit von der Konzentration auch gegensätzliche Effekte

erzeugen. Sowohl das Fehlen als auch eine extreme Ansammlung von Polyaminen führen beispielsweise zum Zelltod (75, 76). Es ist daher wenig überraschend, dass es etliche enge Regulationsmechanismen wie beispielsweise Acetylierungen gibt. Je nach metabolischem Bedarf können über Acetyltransferasen Polyaminkonzentrationen gesteuert werden (73). In aktiviertem Zustand reduzieren diese Enzyme die positive Ladung von Polyaminen und verhindern damit Wechselwirkungen mit anderen Molekülen (77, 78). Regulationsmechanismen können jedoch je nach Zelltyp variieren. Erhöhte intrazelluläre Polyaminwerte induzieren eine Acetylierung, was anschließend eine Exkretion begünstigt (74). Aus dem vermehrten Aufkommen an acetylierten Polyaminen lässt sich also ein vorheriger Überschuss an Polyaminen ablesen. Unter Berücksichtigung dieser Schlussfolgerung erklärt sich das vermehrte Auftreten von N-Acetylcadaverin mit zunehmendem Zahnverlust als Folge einer ausgeprägten Parodontitis. Frühere Studien zeigten bereits, dass die Entzündung des Zahnhalteapparates mit erhöhten Polyaminwerten von Cadaverin und Putrescin einhergeht (48, 56, 58, 64). Verschlimmert sich das Krankheitsbild durch Progression, steigt vermutlich auch die Polyaminkonzentration initial bis Regulationsmechanismen wie Acetylierungen eingreifen.

Die Metabolite Butyrylputrescin und N,N-Dimethyl-5-Aminovalerat, die dem Polyaminstoffwechsel zuzuschreiben sind, könnten Produkte von Regulationsmechanismen sein, die bisher noch nicht genauer beschrieben wurden. Insbesondere im Feld der Polyamine gibt es noch einige Wissenslücken zum Verständnis aller beteiligten Stoffwechselwege. Das zeigt auch unser metabolisches Netzwerk, in dem ein noch unbekannter Stoff mit starker Korrelation zu Cadaverin und N-Acetylcadaverin auftaucht.

Eindeutiger hingegen sind die Verbindungen der Polyaminderivate Butyrylputrescin, N,N-Dimethyl-5-Aminovalerat (79) und N-Acetylcadaverin zu den Polyaminen Putrescin und Cadaverin. Beide Polyamine wurden bereits mit Parodontitis in Verbindung gebracht (48, 56, 58, 59).

5.1.2. Oxidativer Stress

Die erhöhte N-Acetyltaurin Konzentration bei Proband*innen mit Parodontitis sprechen für eine gesteigerte Verstoffwechselung von Taurin und dessen vermehrte Nutzung als Antioxidant. Einer von vielen Abwehrmechanismen des Wirtes ist die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies. In hohen Konzentrationen führen ROS zu oxidativem

Stress und schädigen durch ihre hohe Reaktivität Mikroorganismen aber auch körpereigene Zellen. ROS tragen damit zur Pathogenese einiger chronischen degenerativen Erkrankungen (80) wie zum Beispiel Parodontitis bei (81-83). Den ROS gegenüber gestellt werden die Antioxidantien. Unter physiologischen Bedingungen schützen sie den Körper vor der toxischen Wirkung der ROS, indem sie Oxidantien entfernen, inaktivieren oder den bereits entstandenen Schaden reparieren (82, 84). Kommt es jedoch zu einem anhaltenden Ungleichgewicht zwischen freien Radikalen und antioxidativer Abwehr zugunsten der Radikale, führt dies zu einer erschöpften Kapazität von Antioxidantien. In Chapple et al. (85) wird die reduzierte lokale antioxidative Abwehr mit Parodontitis assoziiert und als Spiegel für die Aktivität von Sauerstoffradikalen während einer parodontalen Entzündung betrachtet.

Zu den Stoffen mit antioxidativen Eigenschaften zählt unter anderem auch das Taurin, welches schon mit erhöhten Werten bei Patient*innen mit Parodontitis festgestellt wurde (52, 59). Studien konnten bereits die abschwächende Wirkung von Taurin auf oxidativen Stress belegen, der grundlegende Mechanismus bleibt jedoch weitgehend ungeklärt (86, 87). Wir können also zusammenfassen, dass es viele Speichelmarker gibt, die auf erhöhten oxidativen Stress bei Parodontitiserkrankten schließen lassen. Dennoch ist diese Assoziation im Fall von N-Acetyltaurin noch nicht ausreichend belegt, wenngleich dies sehr wahrscheinlich ist.

5.1.3. Bakterieller Stoffwechsel

Die signifikanten Korrelationen von Phenylacetat, Dimethylarginin, N6,N6,N6-Trimethyllysine und 2-Pyrr mit dem Zahnverlust nach fünf Jahren sowie die Assoziationen von Phenylacetat, 3-Phenylpropionat und 3-(4-Hydroxyphenyl)Propionat zu parodontalen Parametern der Querschnittsanalyse sind allesamt Anzeichen eines erhöhten bakteriellen Stoffwechsels.

Die Erkrankung des Zahnhalteapparates geht mit der Besiedlung verschiedener Bakterienstämme einher. Mit fortschreitender Reife und Wachstum der Plaque ist eine Vermehrung der Mikroorganismen zu beobachten. Viele Bakterien sind oftmals auf Peptide angewiesen und haben als eine Art Überlebensstrategie die Fähigkeit entwickelt, proteolytische Enzyme zu produzieren (88, 89). Als Antwort auf die stetige Anwesenheit der Bakterien kommt es beim Wirt zu einer Entzündungsreaktion, die zum Abbau des Parodonts beiträgt (2).

Unsere Ergebnisse aus der Querschnittsanalyse zeigen, dass vor allem aromatische Aminosäuren verstoffwechselt werden. Die Abbauprodukte von Phenylalanin und Tyrosin: Phenylacetat, 3-Phenylpropionat, 3-(4-Hydroxyphenyl)Propionat sind bei parodontal erkrankten Patient*innen mit Parodontitis signifikant erhöht. Es wurde bereits berichtet, dass sich die Zerstörung von parodontalem Gewebe durch vermehrte Proteaseaktivität in gesteigerten Dipeptiden (60, 61) sowie freien Aminosäuren und Aminosäuremetaboliten (51, 64) äußert. Auch in Liebsch et al. (51) wurden insbesondere die Assoziationen zu aromatischen Aminosäuren nachgewiesen. Unsere Studie konnte diese Ergebnisse replizieren und zudem Phenylacetat mit longitudinalem Zahnverlust in Verbindung bringen. Damit könnte Phenylacetat möglicherweise als Biomarker im Rahmen der Parodontitisdiagnostik dienen. Auffällig ist, dass die meisten detektierten Substanzen auf Aminosäuren statt auf Peptide zurückzuführen sind. Jedoch ist der Ausgangsstoff eines Metaboliten nicht immer eindeutig bestimmbar. Es gibt eine Reihe paropathogener Keime, die sowohl aus Aminosäuren als auch aus Dipeptiden dieselben Endabbauprodukte produzieren (89). Der Bezug vieler Metabolite zum Stoffwechsel von Bakterien konnte auch in unseren longitudinalen Analysen beobachtet werden. Die signifikant positiven Assoziationen von Dimethylarginin und N6,N6,N6-Trimethyllysin mit dem Zahnverlust nach fünf Jahren deuten auf eine bakterielle Überlastung bei fortgeschrittener Parodontitis hin. Da es sich bei diesen Metaboliten um Arginin- und Lysin-derivate handelt, besteht eine mögliche Verbindung zu *P. gingivalis*. Dieser paropathogene Keim gehört zu den Spätbesiedlern, ist ein Hauptverursacher schwerer Parodontitisformen und ein Anzeichen für Progression (5, 90-92). Die Gingipaine Rgp und Kgp, beides Virulenzfaktoren von *P. gingivalis*, spalten Proteinsubstrate nach Arginin- und Lysinresten in Oligopeptide (93, 94). Die signifikante Korrelation zwischen Dimethylarginin und N6,N6,N6-Trimethyllysin, die aus unserem metabolischen Netzwerk hervorgeht, bekräftigt deren Verbindung zueinander bzw. ihren gemeinsamen Ursprung.

Ebenso ist unser vielfach untersuchter Stoff 2-Pyrr vermutlich bakteriellen Ursprungs. Die enge Beziehung zu verschiedenen Phenolsäuremetaboliten und seine denkbare Rolle als Kollagen stabilisierendes Element unterstützen diese Annahme (95). Der bakterieninduzierte parodontale Gewebeabbau führt unter anderem zur Zerstörung des Parodontalligaments, dessen Hauptbestandteil verschiedene Kollagentypen sind (96). 2-Pyrr scheint zusätzlich äußerst nützliche osmoprotektive Eigenschaften zu

besitzen, die für Mikroorganismen von Nutzen sind. Osmoprotektiva sind zwitterionische kleine Moleküle, die von Organismen durch Synthese oder Transport in hohen Konzentrationen angereichert werden und dadurch die schädlichen Auswirkungen von osmotischem Stress abmildern. Die Ergebnisse unseres In-vitro Experiments bestätigen, dass 2-Pyrr das bakterielle Wachstum unter hyperosmotischen Stressbedingungen unterstützt. Daher sollte der Metabolit zukünftig weiter untersucht werden, um seine Rolle in der Pathogenese der Parodontitis und Biomarkerqualität zu klären.

5.3. Stärken & Schwächen

Eine der wesentlichen Stärken unserer Analysen ist die große Stichprobengröße. Obwohl die Speichel-Metabolomik ein aufstrebendes Forschungsgebiet ist, fehlen den meisten Studien große bevölkerungsbezogene Daten. Zudem ermöglicht die Replikation der Querschnittsanalyse einen Vergleich mit den Ergebnissen aus Liebsch et al. (51), welche ebenfalls mit einer großen Stichprobe gearbeitet haben. Die ausgewählte Analyse potenzieller Biomarker in Bezug auf den Zahnverlust bei schwereren Parodontitisstadien unter Verwendung von Follow-Up Daten ist ebenfalls einmalig.

Dennoch sollten auch Einschränkungen beachtet werden. Für die Beurteilung des Krankheitsverlaufs der Parodontitis wurde nur der Zahnverlust herangezogen. Erhöhte Sondierungstiefen sind ein übliches Krankheitsmerkmal, daher eignen sich PPD-Werte prinzipiell gut für die longitudinale Untersuchung der parodontalen Gesundheit. Jedoch ist die Methodik zur Erhebung der Sondierungstiefen durch die Verwendung der PCP11-Sonde verfälscht und es wurden überwiegend 3mm tiefe Taschen befundet. Die Skalierung der Sonde führt dazu, dass 2mm Taschen tendenziell höher und 4mm Taschen tendenziell niedriger eingestuft werden. Taschentiefenwerte von 3mm werden mit der PCP11-Sonde daher etwa 12% häufiger gemessen als mit der PCPUNC15-Sonde (97). Da in SHIP-2 und SHIP-3 die PCP11-Sonde verwendet wurde, konnten keine signifikanten Assoziationen von PPD-Werten im Längsschnitt ausgemacht werden.

5.4. Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, das metabolische Speichelprofil in Zusammenhang mit Parodontitis zu untersuchen und potentielle Biomarker sowie Stoffwechselwege im Rahmen der Erkrankung zu erforschen. Speichelproben von 938 Proband*innen wurden in Abhängigkeit von dentalen Gesundheitsvariablen betrachtet und anschließend, auf Basis dieser Ergebnisse, mit dem Zahnverlust nach fünf Jahren assoziiert.

Die Querschnittsanalyse ergab mehrere signifikant assoziierte Speichelmetabolite, wovon Butyrylputrescin mit den meisten oralen Variablen verknüpft war. Außerdem konnten wir die Kernergebnisse einer unabhängigen Studie replizieren und das Potenzial von Phenylacetat, 3-Phenylpropionat und 3-(4-Hydroxyphenyl)Propionat

bekräftigen. In der Längsschnittanalyse war der Zahnverlust nach fünf Jahren am stärksten mit N,N-Dimethyl-5-Aminovalerat verbunden. Die Mehrzahl aller auffälligen Metabolite steht in Zusammenhang mit Zellvermehrung, bakteriellem Stoffwechsel und Gewebedestruktion. Fasst man die Analysen zusammen, sind 2-Pyrr und Butyrylputrescin die beständigsten Metabolite mit signifikanten Korrelationen. Daher erscheinen sie als besonders geeignet, das Ungleichgewicht der Mundflora widerzuspiegeln.

VI. Literaturverzeichnis

1. Qasim SSB, Al-Otaibi D, Al-Jasser R, Gul SS, Zafar MS. An Evidence-Based Update on the Molecular Mechanisms Underlying Periodontal Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11).
2. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet.* 2005;366(9499):1809-20.
3. Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res.* 2014;93(11):1045-53.
4. Moore WE, Holdeman LV, Cato EP, Good IJ, Smith EP, Ranney RR, et al. Variation in periodontal floras. *Infect Immun.* 1984;46(3):720-6.
5. Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol* 2000. 2005;38:72-122.
6. Loomer PM. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2004;34:49-56.
7. van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol.* 2002;29(11):1023-8.
8. Ezzo PJ, Cutler CW. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2003;32:24-35.
9. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25(2):134-44.
10. Haffajee AD, Socransky SS. Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontol* 2000. 2005;38:9-12.
11. Suda R, Kobayashi M, Nanba R, Iwamaru M, Hayashi Y, Lai CH, et al. Possible periodontal pathogens associated with clinical symptoms of periodontal disease in Japanese high school students. *J Periodontol.* 2004;75(8):1084-9.
12. Amano A. Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol.* 2003;74(1):90-6.
13. How KY, Song KP, Chan KG. *Porphyromonas gingivalis*: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Front Microbiol.* 2016;7:53.
14. Ali RW, Skaug N, Nilsen R, Bakken V. Microbial associations of 4 putative periodontal pathogens in Sudanese adult periodontitis patients determined by DNA probe analysis. *J Periodontol.* 1994;65(11):1053-7.
15. Grant DA, Grant DA, Flynn MJ, Slots J. Periodontal microbiota of mobile and non-mobile teeth. *J Periodontol.* 1995;66(5):386-90.
16. von Troil-Linden B, Torkko H, Alaluusua S, Jousimies-Somer H, Asikainen S. Salivary levels of suspected periodontal pathogens in relation to periodontal status and treatment. *J Dent Res.* 1995;74(11):1789-95.
17. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999;4(1):1-6.
18. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol.* 2018;89 Suppl 1:S1-S8.
19. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2018;89 Suppl 1:S173-S82.
20. Jepsen S, Caton JG, Albandar JM, Bissada NF, Bouchard P, Cortellini P, et al. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of

workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018;89 Suppl 1:S237-S48.

21. Jia J, Sun Y, Yang H, Wang X, Liu L, Zong L, et al. [Effect of human saliva on wound healing]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2012;26(5):563-6.
22. Shugars DC, Wahl SM. The role of the oral environment in HIV-1 transmission. *J Am Dent Assoc*. 1998;129(7):851-8.
23. de Almeida Pdel V, Gregio AM, Machado MA, de Lima AA, Azevedo LR. Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J Contemp Dent Pract*. 2008;9(3):72-80.
24. Morris-Wiman J, Sego R, Brinkley L, Dolce C. The effects of sialoadenectomy and exogenous EGF on taste bud morphology and maintenance. *Chem Senses*. 2000;25(1):9-19.
25. Buchalla W. Multitalent Speichel: Bekanntes und Neues zu Zusammensetzung und Funktion. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift (DZZ)*. 2012;67(7):438-46.
26. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva--a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(2):197-212.
27. Goncalves AC, Marson FAL, Mendonca RMH, Bertuzzo CS, Paschoal IA, Ribeiro JD, et al. Chloride and sodium ion concentrations in saliva and sweat as a method to diagnose cystic fibrosis. *J Pediatr (Rio J)*. 2019;95(4):443-50.
28. Zhang L, Farrell JJ, Zhou H, Elashoff D, Akin D, Park NH, et al. Salivary transcriptomic biomarkers for detection of resectable pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(3):949-57 e1-7.
29. Malathi L, Masthan KM, Balachander N, Babu NA, Rajesh E. Estimation of salivary amylase in diabetic patients and saliva as a diagnostic tool in early diabetic patients. *J Clin Diagn Res*. 2013;7(11):2634-6.
30. Kadashetti V, Baad R, Malik N, Shivakumar KM, Vibhute N, Belgaumi U, et al. Glucose Level Estimation in Diabetes Mellitus By Saliva: A Bloodless Revolution. *Rom J Intern Med*. 2015;53(3):248-52.
31. Xiao H, Zhang Y, Kim Y, Kim S, Kim JJ, Kim KM, et al. Differential Proteomic Analysis of Human Saliva using Tandem Mass Tags Quantification for Gastric Cancer Detection. *Sci Rep*. 2016;6:22165.
32. Giannobile WV, Beikler T, Kinney JS, Ramseier CA, Morelli T, Wong DT. Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions. *Periodontol 2000*. 2009;50:52-64.
33. Weckwerth W, Morgenthal K. Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation. *Drug Discov Today*. 2005;10(22):1551-8.
34. Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem*. 2006;78(3):779-87.
35. Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(4):263-9.
36. Nagana Gowda GA, Raftery D. Biomarker Discovery and Translation in Metabolomics. *Curr Metabolomics*. 2013;1(3):227-40.
37. Hyvarinen E, Savolainen M, Mikkonen JJW, Kullaa AM. Salivary Metabolomics for Diagnosis and Monitoring Diseases: Challenges and Possibilities. *Metabolites*. 2021;11(9).
38. Tasoulas J, Patsouris E, Giaginis C, Theocharis S. Salivaomics for oral diseases biomarkers detection. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016;16(3):285-95.
39. Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, Soga T, Tomita M. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics*. 2010;6(1):78-95.
40. Wei J, Xie G, Zhou Z, Shi P, Qiu Y, Zheng X, et al. Salivary metabolite signatures of oral cancer and leukoplakia. *Int J Cancer*. 2011;129(9):2207-17.
41. Wang Q, Gao P, Wang X, Duan Y. The early diagnosis and monitoring of squamous cell carcinoma via saliva metabolomics. *Sci Rep*. 2014;4:6802.
42. Lohavanichbutr P, Zhang Y, Wang P, Gu H, Nagana Gowda GA, Djukovic D, et al. Salivary metabolite profiling distinguishes patients with oral cavity squamous cell carcinoma from normal controls. *PLoS One*. 2018;13(9):e0204249.

43. Ishikawa S, Wong DTW, Sugimoto M, Gleber-Netto FO, Li F, Tu M, et al. Identification of salivary metabolites for oral squamous cell carcinoma and oral epithelial dysplasia screening from persistent suspicious oral mucosal lesions. *Clin Oral Investig*. 2019;23(9):3557-63.
44. Ishikawa S, Sugimoto M, Edamatsu K, Sugano A, Kitabatake K, Iino M. Discrimination of oral squamous cell carcinoma from oral lichen planus by salivary metabolomics. *Oral Dis*. 2020;26(1):35-42.
45. Su W, Shi J, Zhao Y, Yan F, Lei L, Li H. Porphyromonas gingivalis triggers inflammatory responses in periodontal ligament cells by succinate-succinate dehydrogenase-HIF-1 α axis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;522(1):184-90.
46. Overmyer KA, Rhoads TW, Merrill AE, Ye Z, Westphall MS, Acharya A, et al. Proteomics, Lipidomics, Metabolomics, and 16S DNA Sequencing of Dental Plaque From Patients With Diabetes and Periodontal Disease. *Mol Cell Proteomics*. 2021;20:100126.
47. Rodrigues WF, Miguel CB, Agostinho F, da Silva GV, Lazo-Chica JE, Naressi Scapin SM, et al. Metabolomic Evaluation of Chronic Periodontal Disease in Older Adults. *Mediators Inflamm*. 2021;2021:1796204.
48. Sakanaka A, Kuboniwa M, Katakami N, Furuno M, Nishizawa H, Omori K, et al. Saliva and Plasma Reflect Metabolism Altered by Diabetes and Periodontitis. *Front Mol Biosci*. 2021;8:742002.
49. Pei J, Li F, Xie Y, Liu J, Yu T, Feng X. Microbial and metabolomic analysis of gingival crevicular fluid in general chronic periodontitis patients: lessons for a predictive, preventive, and personalized medical approach. *EPMA J*. 2020;11(2):197-215.
50. Shi M, Wei Y, Nie Y, Wang C, Sun F, Jiang W, et al. Alterations and Correlations in Microbial Community and Metabolome Characteristics in Generalized Aggressive Periodontitis. *Front Microbiol*. 2020;11:573196.
51. Liebsch C, Pitchika V, Pink C, Samietz S, Kastenmuller G, Artati A, et al. The Saliva Metabolome in Association to Oral Health Status. *J Dent Res*. 2019;98(6):642-51.
52. Gawron K, Wojtowicz W, Lazarz-Bartyzel K, Lamasz A, Qasem B, Mydel P, et al. Metabolomic Status of The Oral Cavity in Chronic Periodontitis. *In Vivo*. 2019;33(4):1165-74.
53. Bregy L, Hirsiger C, Gartenmann S, Bruderer T, Zenobi R, Schmidlin PR. Metabolic changes during periodontitis therapy assessed by real-time ambient mass spectrometry. *Clin Mass Spectrom*. 2019;14 Pt A:54-62.
54. Garcia-Villaescusa A, Morales-Tatay JM, Monleon-Salvado D, Gonzalez-Darder JM, Bellot-Arcis C, Montiel-Company JM, et al. Using NMR in saliva to identify possible biomarkers of glioblastoma and chronic periodontitis. *PLoS One*. 2018;13(2):e0188710.
55. Romano F, Meoni G, Manavella V, Baima G, Tenori L, Cacciatore S, et al. Analysis of salivary phenotypes of generalized aggressive and chronic periodontitis through nuclear magnetic resonance-based metabolomics. *J Periodontol*. 2018;89(12):1452-60.
56. Sakanaka A, Kuboniwa M, Hashino E, Bamba T, Fukusaki E, Amano A. Distinct signatures of dental plaque metabolic byproducts dictated by periodontal inflammatory status. *Sci Rep*. 2017;7:42818.
57. Velsko IM, Overmyer KA, Speller C, Klaus L, Collins MJ, Loe L, et al. The dental calculus metabolome in modern and historic samples. *Metabolomics*. 2017;13(11):134.
58. Kuboniwa M, Sakanaka A, Hashino E, Bamba T, Fukusaki E, Amano A. Prediction of Periodontal Inflammation via Metabolic Profiling of Saliva. *J Dent Res*. 2016;95(12):1381-6.
59. Ozeki M, Nozaki T, Aoki J, Bamba T, Jensen KR, Murakami S, et al. Metabolomic Analysis of Gingival Crevicular Fluid Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Mass Spectrom (Tokyo)*. 2016;5(1):A0047.
60. Barnes VM, Kennedy AD, Panagakos F, Devizio W, Trivedi HM, Jonsson T, et al. Global metabolomic analysis of human saliva and plasma from healthy and diabetic subjects, with and without periodontal disease. *PLoS One*. 2014;9(8):e105181.
61. Barnes VM, Ciancio SG, Shibly O, Xu T, Devizio W, Trivedi HM, et al. Metabolomics reveals elevated macromolecular degradation in periodontal disease. *J Dent Res*. 2011;90(11):1293-7.
62. Chen HW, Zhou W, Liao Y, Hu SC, Chen TL, Song ZC. Analysis of metabolic profiles of generalized aggressive periodontitis. *J Periodontal Res*. 2018;53(5):894-901.

63. Kaczor-Urbanowicz KE, Martin Carreras-Presas C, Aro K, Tu M, Garcia-Godoy F, Wong DT. Saliva diagnostics - Current views and directions. *Exp Biol Med* (Maywood). 2017;242(5):459-72.
64. Barnes VM, Teles R, Trivedi HM, Devizio W, Xu T, Mitchell MW, et al. Acceleration of purine degradation by periodontal diseases. *J Dent Res*. 2009;88(9):851-5.
65. Varghese J, Bhat V, Chianeh YR, Kamath V, Al-Haj Husain N, Ozcan M. Salivary 8-hydroxyguanosine levels in smokers and non-smokers with chronic periodontitis. *Odontology*. 2020;108(4):569-77.
66. Cherian DA, Peter T, Narayanan A, Madhavan SS, Achammada S, Vynat GP. Malondialdehyde as a Marker of Oxidative Stress in Periodontitis Patients. *J Pharm Bioallied Sci*. 2019;11(Suppl 2):S297-S300.
67. Naresh CK, Rao SM, Shetty PR, Ranganath V, Patil AS, Anu AJ. Salivary antioxidant enzymes and lipid peroxidation product malondialdehyde and sialic acid levels among smokers and non-smokers with chronic periodontitis-A clinico-biochemical study. *J Family Med Prim Care*. 2019;8(9):2960-4.
68. Barros SP, Williams R, Offenbacher S, Morelli T. Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis. *Periodontol 2000*. 2016;70(1):53-64.
69. Andorfer L, Holtfreter B, Weiss S, Matthes R, Pitchika V, Schmidt CO, et al. Salivary metabolites associated with a 5-year tooth loss identified in a population-based setting. *BMC Med*. 2021;19(1):161.
70. Volzke H, Alte D, Schmidt CO, Radke D, Lorbeer R, Friedrich N, et al. Cohort profile: the study of health in Pomerania. *Int J Epidemiol*. 2011;40(2):294-307.
71. John U, Greiner B, Hensel E, Ludemann J, Piek M, Sauer S, et al. Study of Health In Pomerania (SHIP): a health examination survey in an east German region: objectives and design. *Soz Praventivmed*. 2001;46(3):186-94.
72. Glockmann E, Panzner K-D, Huhn P, Sigusch B, Glockmann K. Ursachen des Zahnverlustes in Deutschland – Dokumentation einer bundesweiten Erhebung (2007). Institute of German Dentists (IDZ). 2011.
73. Miller-Fleming L, Olin-Sandoval V, Campbell K, Ralser M. Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *J Mol Biol*. 2015;427(21):3389-406.
74. Moinard C, Cynober L, de Bandt JP. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin Nutr*. 2005;24(2):184-97.
75. Bettuzzi S, Davalli P, Astancolle S, Pinna C, Roncaglia R, Boraldi F, et al. Coordinate changes of polyamine metabolism regulatory proteins during the cell cycle of normal human dermal fibroblasts. *FEBS Lett*. 1999;446(1):18-22.
76. Casero RA, Jr., Pegg AE. Spermidine/spermine N1-acetyltransferase--the turning point in polyamine metabolism. *FASEB J*. 1993;7(8):653-61.
77. Jeevanandam M, Petersen SR. Clinical role of polyamine analysis: problem and promise. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2001;4(5):385-90.
78. Seiler N. Functions of polyamine acetylation. *Can J Physiol Pharmacol*. 1987;65(10):2024-35.
79. Fothergill JC, Guest JR. Catabolism of L-lysine by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol*. 1977;99(1):139-55.
80. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. 1994;344(8924):721-4.
81. Kimura S, Yonemura T, Kaya H. Increased oxidative product formation by peripheral blood polymorphonuclear leukocytes in human periodontal diseases. *J Periodontal Res*. 1993;28(3):197-203.
82. Chapple IL. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol*. 1997;24(5):287-96.
83. Shapira L, Borinski R, Sela MN, Soskolne A. Superoxide formation and chemiluminescence of peripheral polymorphonuclear leukocytes in rapidly progressive periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 1991;18(1):44-8.
84. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med*. 1991;91(3C):14S-22S.
85. Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000*. 2007;43:160-232.

86. Sree SL, Sethupathy S. Evaluation of the efficacy of taurine as an antioxidant in the management of patients with chronic periodontitis. *Dent Res J (Isfahan)*. 2014;11(2):228-33.
87. Nandhini AT, Thirunavukkarasu V, Ravichandran MK, Anuradha CV. Effect of taurine on biomarkers of oxidative stress in tissues of fructose-fed insulin-resistant rats. *Singapore Med J*. 2005;46(2):82-7.
88. Ohara-Nemoto Y, Rouf SM, Naito M, Yanase A, Tetsuo F, Ono T, et al. Identification and characterization of prokaryotic dipeptidyl-peptidase 5 from *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*. 2014;289(9):5436-48.
89. Takahashi N, Sato T. Dipeptide utilization by the periodontal pathogens *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol Immunol*. 2002;17(1):50-4.
90. Nelson KE, Fleischmann RD, DeBoy RT, Paulsen IT, Fouts DE, Eisen JA, et al. Complete genome sequence of the oral pathogenic Bacterium *porphyromonas gingivalis* strain W83. *J Bacteriol*. 2003;185(18):5591-601.
91. Colombo AP, Boches SK, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, et al. Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol*. 2009;80(9):1421-32.
92. Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Bartova J, Janatova T, et al. *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res*. 2014;2014:476068.
93. Kadowaki T, Nakayama K, Okamoto K, Abe N, Baba A, Shi Y, et al. *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence determinants in progression of periodontal diseases. *J Biochem*. 2000;128(2):153-9.
94. Travis J, Pike R, Imamura T, Potempa J. *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. *J Periodontal Res*. 1997;32(1 Pt 2):120-5.
95. Krane SM. The importance of proline residues in the structure, stability and susceptibility to proteolytic degradation of collagens. *Amino Acids*. 2008;35(4):703-10.
96. Kaku M, Yamauchi M. Mechano-regulation of collagen biosynthesis in periodontal ligament. *J Prosthodont Res*. 2014;58(4):193-207.
97. Holtfreter B, Alte D, Schwahn C, Desvarieux M, Kocher T. Effects of different manual periodontal probes on periodontal measurements. *J Clin Periodontol*. 2012;39(11):1032-41.

VII. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung der Parodontitis nach neuer Klassifizierung	6
Tabelle 2: Gradeinteilung der Parodontitis nach neuer Klassifizierung	7
Tabelle 3: Orale Metabolom-Studien mit Assoziationen zu Parodontitis	14-20
Tabelle 4: Metabolite mit mindestens einer signifikanten Assoziation in SHIP-Trend oder SHIP-2	33-34
Tabelle 5: Inzidenzratenverhältnisse aller Speichelmetabolite der Längsschnittanalyse	35
Tabelle 6: Trübungsmessung und Dokumentation der Koloniebildung entsprechender Testlösungen auf Agarplatten	39

VIII. **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Modifiziertes Pyramidendigramm zur Darstellung mikrobiologischer Komplexe und der Beziehungen bestimmter Spezies untereinander (Socransky und Haffajee, 2002; Socransky et al., 1984/1998)	5
Abbildung 2: Einzugsgebiet der SHIP Proband*innen (Forschungsverband Community Medicine)	24
Abbildung 3: Fließschema der SHIP-Datensätze mit zeitlicher Einordnung	25
Abbildung 4: Fließschematische Darstellung zur Zuordnung der im Querschnitt festgestellten signifikanten Assoziationen	30
Abbildung 5: ‚Heatmap‘ der Speichelmetabolite mit mindestens einer signifikanten Assoziation aus dem Querschnitt	31
Abbildung 6: Partielles Korrelationsnetzwerk von Metaboliten mit signifikanter Verbindung zu anderen Metaboliten	37
Abbildung 7: Ausplattierte Lösungen des ersten Testlaufs mit <i>E. coli</i> nach Inkubation für 24h bei 37°C auf Blutagar	40
Abbildung 8: Ausplattierte Lösungen des zweiten Testlaufs mit <i>E. coli</i> nach Inkubation für 24h bei 37°C auf Blutagar	40

IX. Anhang

9.1. Publikation

Andörfer et al. *BMC Medicine* (2021) 19:161
<https://doi.org/10.1186/s12916-021-02035-z>

BMC Medicine

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Salivary metabolites associated with a 5- year tooth loss identified in a population- based setting



Leonie Andörfer¹, Birte Holtfreter¹, Stefan Weiss^{2,3}, Rutger Matthes¹, Vinay Pitchika¹, Carsten Oliver Schmidt⁴, Stefanie Samietz⁵, Gabi Kastenmüller⁶, Matthias Nauck^{3,7}, Uwe Völker^{2,3}, Henry Völzke^{3,4}, Laszlo N. Csonka⁸, Karsten Suhre^{6,9}, Maik Pietzner^{7,10†} and Thomas Kocher^{1†*}

Abstract

Background: Periodontitis is among the most common chronic diseases worldwide, and it is one of the main reasons for tooth loss. Comprehensive profiling of the metabolite content of the saliva can enable the identification of novel pathways associated with periodontitis and highlight non-invasive markers to facilitate time and cost-effective screening efforts for the presence of periodontitis and the prediction of tooth loss.

Methods: We first investigated cross-sectional associations of 13 oral health variables with saliva levels of 562 metabolites, measured by untargeted mass spectrometry among a sub-sample ($n = 938$) of the Study of Health in Pomerania (SHIP-2) using linear regression models adjusting for common confounders. We look forward any candidate metabolite associated with at least two oral variables, to test for an association with a 5-year tooth loss over and above baseline oral health status using negative binomial regression models.

Results: We identified 84 saliva metabolites that were associated with at least one oral variable cross-sectionally, for a subset of which we observed robust replication in an independent study. Out of 34 metabolites associated with more than two oral variables, baseline saliva levels of nine metabolites were positively associated with a 5-year tooth loss. Across all analyses, the metabolites 2-pyrrolidineacetic acid and butyrylputrescine were the most consistent candidate metabolites, likely reflecting oral dysbiosis. Other candidate metabolites likely reflected tissue destruction and cell proliferation.

Conclusions: Untargeted metabolic profiling of saliva replicated metabolic signatures of periodontal status and revealed novel metabolites associated with periodontitis and future tooth loss.

Keywords: Metabolomics, Periodontitis, Progression, Tooth loss, 2-Pyrrolidineacetic acid, Butyrylputrescine, Cohort study

* Correspondence: kocher@uni-greifswald.de

†Maik Pietzner and Thomas Kocher jointly supervised this work. ¹Department of Restorative Dentistry, Periodontology, Endodontology, and Preventive and Pediatric Dentistry, University Medicine Greifswald, Fleischmannstr. 42, 17475 Greifswald, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2021 Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Background

Periodontitis is the sixth-most prevalent health condition, affecting 743 million people worldwide [1], and is associated with severe comorbidities, such as cardiovascular disease, diabetes mellitus, rheumatoid arthritis, and metabolic syndrome [2–6], as well as impairments in the quality of life. Periodontitis is a silent disease without grave symptoms, and the associated socioeconomic burden is substantial [7]. Despite this burden, periodontitis remains understudied and there is a clear call for action by health authorities [8, 9]. Non-invasive techniques such as the molecular characterization of saliva samples can help to identify early disease markers and provide insights into underlying pathological pathways.

Periodontitis is a multifactorial inflammatory disease driven by a dysbiotic microbiome, eliciting host defense mechanisms through interactions of pathogen-associated molecular patterns. The oral cavity can be colonized by over 700 different microbial species [10] and at least 400 species can be found in the subgingival microbiome [11]. Following continuous stimulation of inflammation mediators by subgingival periodontal pathogens, chemotactic recruitment of immune system cells increases. The destruction of periodontal tissues is a consequence of the dysregulated immune response [12, 13].

Up to now, reliable biomarkers for periodontitis do not exist; therefore, developing a robust, consistent, and distinct screening tool to detect periodontitis or to improve the management of periodontitis is of high priority. The saliva is an easily sampled body fluid that has been used to map metabolic events and to survey changes in biological processes in periodontitis [14]. Metabolome profiling by mass spectrometry approaches enables a deep characterization of processes driving the progression of a microbial dysbiosis and possibly adverse host responses [15]. Previous studies already highlighted distinct pathways associated with severe cases of periodontitis [16–20], and we have shown in a large cross-sectional, population-based study that phenylacetate was consistently associated with various periodontitis variables [16]. However, previous studies were limited in their cross-sectional design to disentangle whether the highlighted pathways were cause or consequence of the disease.

In the middle-aged and older persons, periodontitis increases the risk for tooth loss [21, 22]. Persons with periodontitis are three times more likely to lose teeth compared to periodontally healthy persons [23] and, vice versa, persons with future tooth loss display a higher level of periodontal destruction at baseline [21]. In the German adult population, periodontitis is responsible for about 30 to 40% of dental extractions [24]. We chose tooth loss as the primary endpoint for our longitudinal analysis as it presents the most severe outcome for

patients and wanted to know if biologically grounded associations of periodontitis with metabolites translate into significant associations between metabolites and tooth loss over and above current clinical measures.

Here, we systematically characterize the molecular fingerprint of current and future oral health status among 938 participants of the population-based Study of Health in Pomerania (SHIP-2) using non-targeted metabolomic analysis covering more than 500 metabolites. We show numerous associations between oral phenotypes and saliva metabolites and replicate previous findings [16–20]. We considerably extend current evidence by identifying a set of metabolites, which were statistically significantly associated with a 5-year tooth loss over and above oral health status at baseline. Among these metabolites, butyrylputrescine and 2-pyrrolidineacetic acid (2-pyrr), putatively of microbial origin, might be promising candidates to be evaluated in future studies.

Methods

Study design

The Study of Health in Pomerania (SHIP) is a population-based cohort study in the north-eastern part of Germany [25]. Using a two-stage cluster sampling procedure [26], 7006 Caucasian subjects were randomly drawn, proportional to community population size, and stratified by age and gender. Of 6265 eligible subjects, 4308 participated between 1997 and 2001 (SHIP-0, response 68.8%). Follow-up examinations were conducted after 5 (SHIP-1), 11 (SHIP-2), and 16 years (SHIP-3) [27].

For the present study, we used data from SHIP-2 and SHIP-3. In total, 2333 subjects aged 30 to 93 years participated in SHIP-2. Among these subjects, we selected 1000 participants, who had dental follow-up data in SHIP-3, for metabolic profiling of saliva samples using the Metabolon HD4 platform (Metabolon Inc., Durham, USA). Out of those, we excluded 22 participants whose saliva measurements did not pass the quality control and another 40 participants due to missing values in variables considered as confounders in the statistical analysis. The final data set for statistical analysis included up to 938 individuals (depending on the oral health variable).

Oral examination

Examinations were conducted in a dental chair with light and without saliva ejector or air jet. Using the half-mouth method (i.e., alternating on the left or right side), periodontal probing depth (PPD) and clinical attachment level (CAL) were assessed on four sites (mesiobuccal, midbuccal, distobuccal, and midpalatal/midlingual) of all teeth excluding the third molars using a periodontal probe (PCP-11, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). The

presence of supragingival plaque and supragingival calculus was recorded on the same four sites at the first incisor, canine, and first molar. If a tooth was missing, the next distally located tooth was considered. The number of teeth was registered excluding wisdom teeth. A dental interview completed the measures.

Coronal cavities were diagnosed visually or using a periodontal probe (PCP-11, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) [28]. Carious defects, fillings, secondary caries, and missing teeth were registered by surface (occlusal, mesial, distal, vestibular, and oral) with the exception of wisdom teeth using the half-mouth method (alternating on the left or right side). The number (DF-S) and the percentage of decayed or filled surfaces (DF-S%) were based on a maximum of 14 permanent teeth (excluding third molars), resulting in 64 surfaces being assessed in total. Information on the presence of removable prostheses in the upper or lower jaw was retrieved from the dental interview.

Five calibrated and licensed dentists performed the dental examinations. Calibration exercises were conducted every 6–12 months. In SHIP-2, intra-class correlations of 0.76–0.88 per examiner and an inter-class correlation of 0.74 for CAL were achieved. For PPD, the intra-class correlation was 0.70–0.78 per examiner and the inter-class correlation was 0.70. In SHIP-3, intra-class correlations of 0.92–0.97 per examiner and an inter-class correlation of 0.98 for CAL were achieved. For PPD, the intra-class correlation was 0.69–0.92 per examiner and the inter-class correlation was 0.91. For caries assessments in SHIP-2, intra-rater kappas were 0.83–1.00, while pairwise inter-rater kappas were 0.72–1.00.

For cross-sectional analyses, the following oral examination variables were derived: mean PPD, cumulative PPD from pockets with PPD ≥ 4 mm (CumPPD4+), percentage of sites with PPD ≥ 3 (PPD 3+mm%) or 4 mm (PPD 4+mm%), mean CAL, percentage of sites with CAL ≥ 3 (CAL 3+mm%) or 4 mm (CAL 4+mm%), number of missing teeth (MT count), percentage of sites with plaque, percentage of sites with calculus, a variable combining information on removable prostheses and MT count (Prosthesis/MT), DF-S, and DF-S%.

Probably due to methodological problems associated with the periodontal probe [29], distributions of periodontal variables, which were based on PPD and CAL measures, were implausibly shifted to the left, indicating on average an improvement of the periodontal status. This was contradicting the fact that about 30% of participants lost at least one tooth. Thus, we renounced from the analysis of the progression of periodontitis variables and restricted longitudinal analyses to a 5-year change in the number of teeth as the outcome.

Covariates

Sociodemographic and behavioral parameters have been assessed by computer-assisted personal interviews. The smoking status was classified as never, former, and current smoking. Standardized measurements of the body height and weight were performed with calibrated scales, and the body mass index (BMI) was calculated as weight divided by height² (kg/m²). Diabetes mellitus was defined as having known diabetes in SHIP-2 or glycated hemoglobin level of (HbA1c) $\geq 6.5\%$ or non-fasting serum glucose ≥ 11.1 mmol/l. Known diabetes mellitus in SHIP-2 was defined as physician's diagnosis or antidiabetic medication intake (Anatomic Therapeutic Chemical classification system; code A10) either in SHIP-0, SHIP-1, or SHIP-2. The follow-up time of the examinations was indicated in years.

Saliva samples

For the collection of saliva samples, a hygienic extraction system (Salivette®; Sarstedt, Nümbrecht, Germany) was used. The subjects were instructed to chew on a plain cotton roll to stimulate salivation. After exactly 1 min, the rolls containing the absorbed saliva were placed into the Salivette® and centrifuged immediately at 1000 g for 20 min at 4°C. The ejection of food remnants, cell debris, and insoluble materials led to a supernatant, which was stored at -80°C until further analysis.

Metabolic profiling of saliva samples was conducted by Metabolon Inc. (Hallbergmoos, Germany) using the Metabolon Discovery HD4 platform. For each sample, four different ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) methods were applied to allow for maximum coverage of the small molecule content. Metabolon uses an internal reference library with more than 3000 pure chemical compounds to identify metabolites based on retention time/index, mass to charge ratio, and chromatographic data. All named compounds fulfill tier 1 or tier 2 (indicated by a star) criteria according to the metabolomics reporting standards [30]. Additional mass spectral entries have been created for structurally unnamed biochemicals, which have been identified by virtue of their recurrent nature (both chromatographic and mass spectral). We accounted for daily variation in instrumental performance by applying a run day-median normalization and transformed normalized intensities using the logarithm to the base 2. To account for different dilutions of saliva samples, we applied probabilistic quotient normalization by estimating a dilution factor for each saliva sample based on 174 metabolites common to all samples [16]. We used the Mahalanobis distance on a reduced metabolic space defined by the first ten principal components of the saliva metabolite data.

to identify saliva samples differing more than three standard deviations from the multi-dimensional mean.

After processing, 562 saliva metabolites remained for statistical analyses. Out of these, 64 metabolites could not be unambiguously assigned to a chemical identity and are designated to hereafter with an X, combined with a unique number.

Statistical analysis

Firstly, to replicate previous findings [16], we cross-sectionally evaluated linear associations between the identically defined 13 dental exposure variables with saliva metabolite levels (outcome) adjusting for age (as restricted cubic splines with three knots), sex, BMI, smoking status, and diabetes mellitus (see Fig. 1). We compared effects estimates for 156 commonly detected metabolites with those published in [16] using Pearson correlation coefficients.

To test candidate metabolites for associations with a 5-year tooth loss, we used negative binomial regression models adjusted for the above-named confounders as well as respective baseline levels of the outcome and the follow-up time (as an offset variable). Only metabolites with ≥ 2 significant cross-sectional associations with PPD-, CAL-related variables, DFS, DFS%, or MT count were selected as exposure variables in longitudinal analyses. We derived incidence rate ratios (IRRs) and 95% confidence intervals.

We accounted for chance findings due to multiple testing by controlling the false discovery rate (FDR) at

5%, that is, approximately 5% of the metabolites presented as significant associations might be false-positive ones. This type of error control makes use of the fact that the distribution of p values of multiple unrelated statistical tests on the same cohort follows a uniform distribution if the null hypothesis is true. In other words, the p value can take each value between zero and one with an equal chance and an accumulation of small p values indicates the presence of true positive effects. The 5% threshold reflects this acceptance rate. Adjusted p values were referred to as q values.

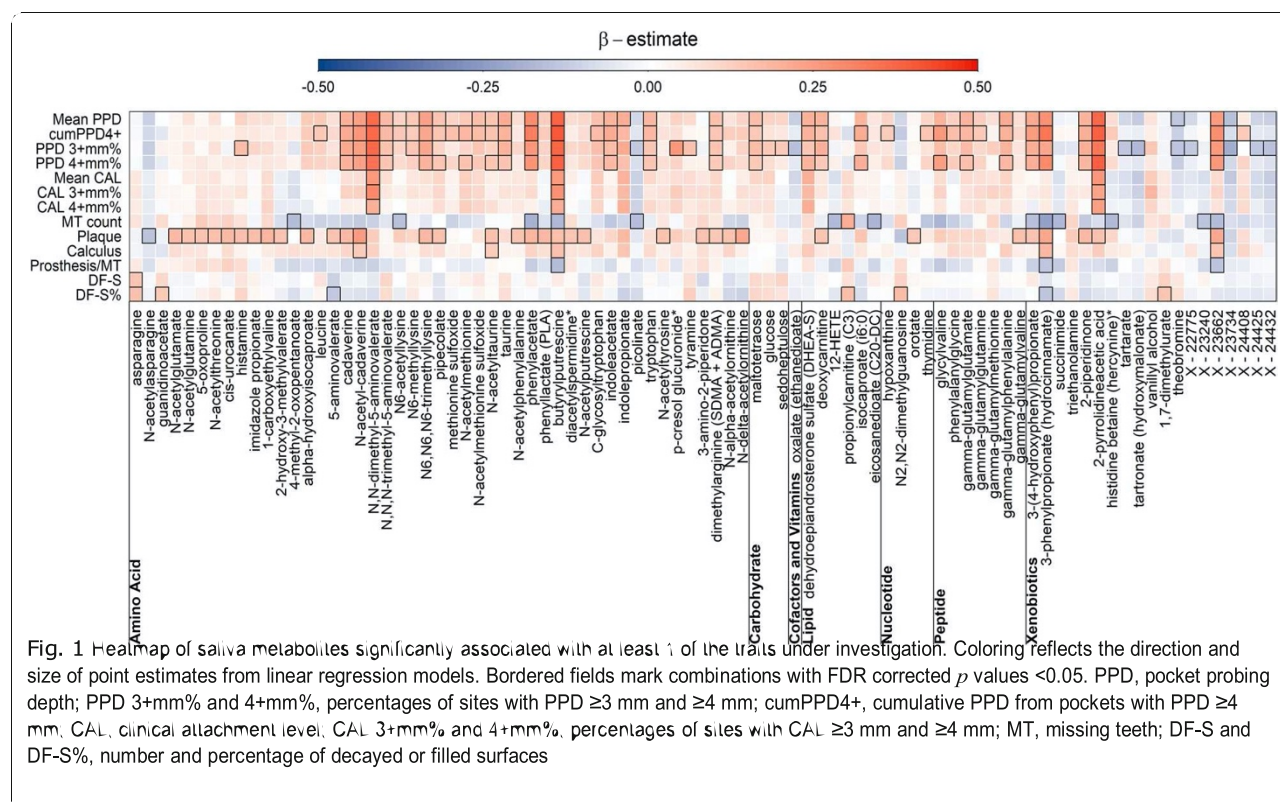
We used Gaussian graphical modeling to derive a data-driven metabolic network based on 260 metabolites with less than 25% missing values and imputed remaining missing values using a Random Forest approach as implemented in the R package “missForest.”

For metabolites with significant associations in the longitudinal study part, we performed phenotype-wide association (PheWAS) and genome-wide association studies (GWAS). The method is described in detail in the Supplementary Methods (Additional file 1 [31–40]).

All statistical analyses were done in R version 3.6.1 (www.r-project.org) and Stata/SE 14.2 (StataCorp, College Station, TX, USA).

Results

A detailed description of the study population is given in Table S1 (Additional file 1). Briefly, participants were on



average 53 years old, women and men were equally represented, 80.9% of whom were non-smokers at the time of the SHIP-2 examination, and 8.5% had known or diagnosed diabetes mellitus.

Cross-sectional associations between oral variables and saliva metabolites

Each of the oral variables was significantly associated with saliva levels of at least one out of 84 metabolites (Fig. 1). Out of those, 51 metabolites have not been reported yet, which might be most likely attributable to the larger coverage of our metabolomics platform. PPD variables (e.g., cumPPD4+ associated with 36 metabolites) and plaque (36 hits) were the most prominent oral variables, whereas CAL variables associated with saliva levels of only a few metabolites (<10). Tooth count was in the middle of the spectrum. The metabolic profile for PPD variables largely overlapped, including strong positive associations with N-methylated amino acids, such as N,N-dimethyl-5-aminovalerate, catabolites of amino acids, such as phenylacetate, or metabolites of likely exogenous origin such as 2-pyrr. Some but not all of these associations were shared with plaque, which was

additionally associated with members of the glutamate metabolism like N-acetylglutamate. We noted that most (168/198 = 85%) of the associations were positive, which might indicate generally higher metabolite levels in states of poor oral health, possibly driven by tissue degradation and enhanced microbial metabolism. Butyrylputrescine was associated with the highest number ($N = 11$) of oral variables.

We observed high correlation coefficients between this study and our previous work when comparing effect estimates (Fig. 2, Additional file 1: Figure S1), most notably for oral variables that showed evidence for any association. In particular, we replicated our most prominent previous findings, namely 3-phenylpropionate, phenylacetate, and 3-(4-hydroxyphenyl)propionate with consistent effect directions.

Association of saliva metabolites with a 5-year tooth loss

A total of 34 metabolites were associated with two or more oral variables, which we used as candidates for longitudinal analyses to minimize the testing burden. Of the 34 candidate metabolites, nine were significantly associated with a 5-year tooth loss, even after adjustment

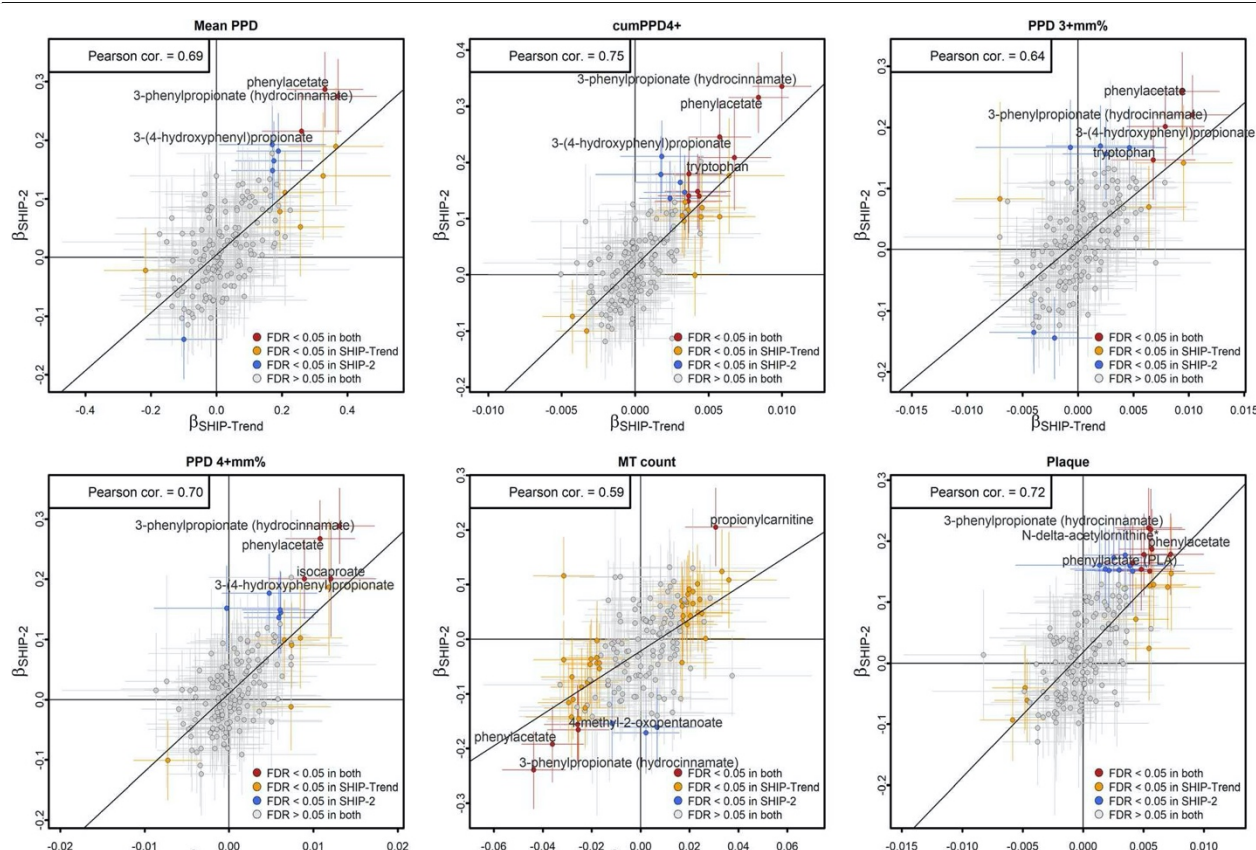


Fig. 2 Point estimates (β) comparison from regression models for selected dental variables between SHIP-2 and SHIP-Trend [16]. The selected variables include the mean PPD, cumPPD4+, PPD 3+mm%, PPD 4+mm%, MT count, and plaque. PPD, pocket probing depth; PPD 3+mm% and 4+mm%, percentages of sites with PPD ≥ 3 mm and ≥ 4 mm; cumPPD4+, cumulative PPD from pockets with PPD ≥ 4 mm; MT, missing teeth

for the baseline oral health status, with IRRs ranging between 1.19 and 1.28 (Fig. 3). The highest IRR value was estimated for N,N-dimethyl-5-aminovalerate (IRR 1.28 (95% CI 1.10, 1.49), q value=0.017). This indicated an additional effect of metabolite levels over and above what might have already been present at baseline.

A saliva metabolite network

To derive a sparse but informative network to link metabolites and hence group association patterns, we applied Gaussian graphical modeling and were able to map 260 metabolites linked by 215 edges (Fig. 4). Projecting the results from the cross-sectional analysis onto this network enabled us to identify groups of metabolites with less obvious connections compared to literature research. In particular, 2-pyrr belonged to a subnetwork with metabolites such as 3-phenylpropionate and phenylacetate.

Phenome-wide association studies

To gain better insights into the metabolites showing significant associations with a 5-year tooth loss, we leveraged the deep phenotyping of the SHIP-2 cohort and tested associations with 59 different phenotypes (Additional file 1: Tables S2-S10). Smoking was significantly associated with saliva levels of 2-pyrr, X-23662, butyrylputrescine, N,N-dimethyl-5-aminovalerate, cadaverine, and N-acetyltaurine (see Table 1). Characteristics related to cardio-metabolic disorders were significantly associated with saliva levels of X-23662, cadaverine, N6,N6,

N6-trimethyllysine, and N-acetyltaurine. Inflammatory markers were significantly associated with saliva levels of 2-pyrr, X-23662, butyrylputrescine, cadaverine, N6,N6, N6-trimethyllysine, and dimethylarginine. Finally, obesity was significantly associated with saliva levels of X-23662, cadaverine, N6,N6,N6-trimethyllysine, phenylacetate, and dimethylarginine.

Genome-wide association studies

We performed genome-wide association studies to identify genetic determinants of two of our most promising candidate metabolites 2-pyrr and butyrylputrescine motivated by earlier studies with strong effects even at a small or moderate scale [41]. However, we obtained no signal passing the genome-wide significance threshold ($p < 5e-8$) in a standard GWAS analysis (Additional file 1: Supplementary Methods and Results, Table S11 and Figures S2 and S3).

Discussion

Periodontitis is a common chronic condition associated with a large comorbidity burden, and we investigated molecular profiles of saliva samples to identify pathways of periodontitis and tooth loss progression in a large population-based sample. We identified a broad range of periodontitis-associated metabolites indicating tissue destruction, dysbiosis of the oral microbiome, and possibly cell proliferation in cross-sectional analysis replicating and augmenting previous work [16]. Non-invasive biomarkers identifying people at highest risk can spare time

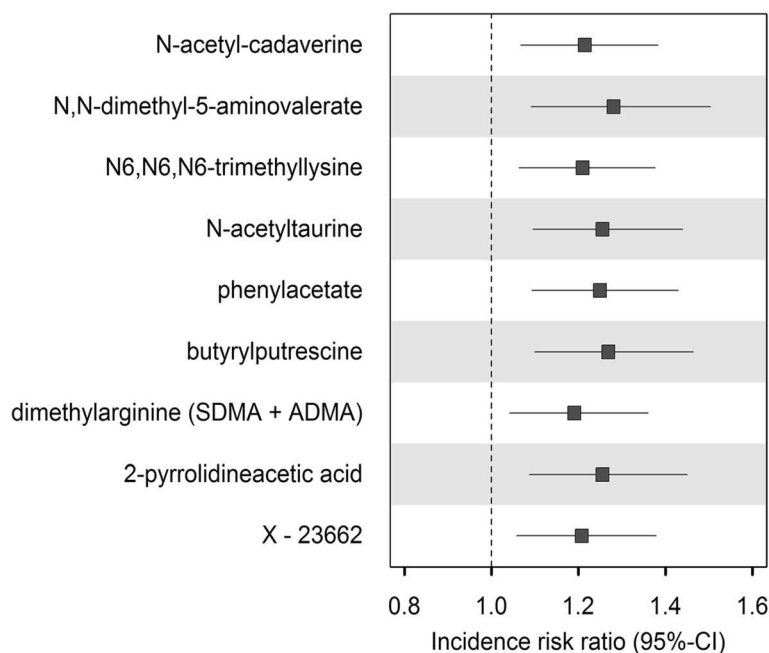


Fig. 3 Forest plot of saliva metabolites significantly (q value<0.05) associated with a 5-year tooth loss. The graphic shows incidence rate ratios (with 95% confidence intervals) from negative binomial regression models for associations of saliva metabolites with a 5-year tooth loss using longitudinal data

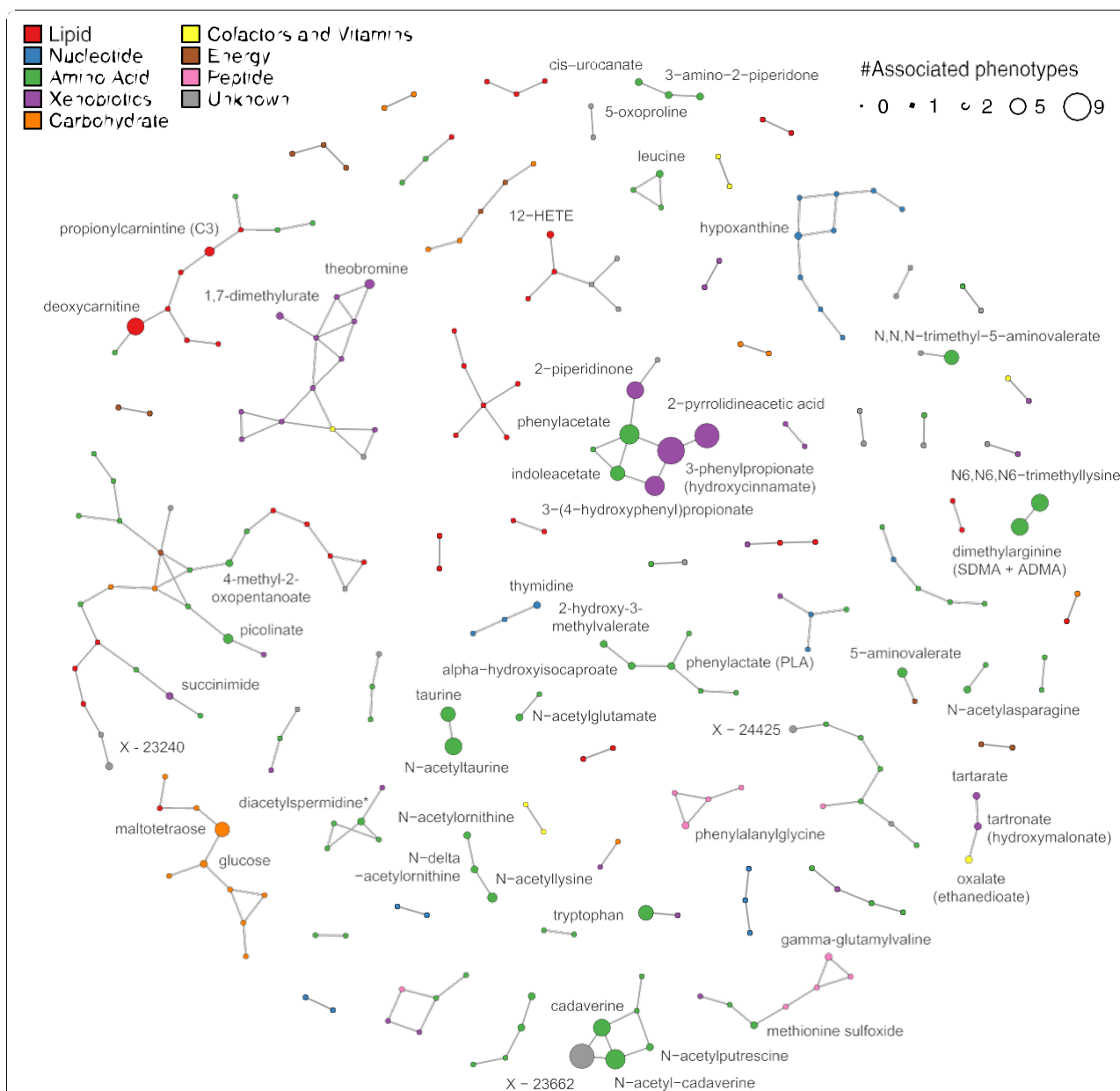


Fig. 4 Partial correlation network of metabolites, having significant interactions with other metabolites. Metabolites are displayed as nodes and significant interactions are displayed as lines. Only metabolites with at least one association to a phenotype in the cross-sectional analysis were annotated. The size of a node corresponds to the number of associated phenotypes in cross-sectional analyses. The color markings classify the metabolites into different substance groups

for both, the patient and the dentist, because periodontitis is a silent disease, often overlooked and under-treated in dental offices and can only be accurately diagnosed by cumbersome clinical examinations with a certain discomfort.

We next showed that molecular profiles of periodontitis, representing multiple biological mechanisms, partially translate into prospective associations, that is, saliva levels at baseline being strongly associated with tooth loss after 5 years of follow-up. While tooth loss

can be caused by multiple factors, including caries, trauma, and prosthetic treatment decisions, periodontitis is the most important contributor among middle-aged and older individuals and the convergence of metabolites associated with periodontitis at baseline on tooth loss at follow-up adds a novel biological layer, including severe periodontal breakdown, which triggered the dentist to extract these teeth. At baseline, subjects without tooth loss had a mean CAL of 2.28 ± 1.17 mm, while subjects with tooth loss had a mean CAL of 3.13 ± 1.44 mm

Table 1 Overview on PheWAS results for nine metabolites significantly related to a 5-year tooth loss

PheWAS variable	2-Pyridolineacetic acid	X-Butyrylputrescine Z3662	N,N-dimethyl-5-aminovalerate	N-acetyl-cadaverine	N6,N6-trimethyllysine	N-acetyltaurine	Phenylacetate	Dimethylarginine (SDMA + ADMA)
Smoking	+ 0.0001	+ 0.031	+ 0.00013	+ 0.047	-	- 0.020		
Cardio-metabolic disorders								
Known or diagnosed diabetes mellitus		+						
Known diabetes mellitus		+						
Diagnosed high blood pressure		+						
Systolic blood pressure (mmHg)		+		+	+			
Triglycerides (total) (mmol/l)		+		0.034	0.023			
Inflammation								
Fibrinogen acc. to Clauss (g/l)			+		+			+
Leukocytes (Gpr/l)	+	+	+	+	+			+
Mean corpuscular haemoglobin (mmol/l)	0.03	0.0003	0.00044	0.00004	0.021			0.002
Red cell distribution width (%)		- 0.023		- 0.015				+
Obesity								0.019
Weight (kg)		+		+	+			
Waist circumference (cm)		0.003		0.002	0.015			
Hip circumference (cm)		+		+	+	+	0.032	+
Others								
Bad breath		+	+	+	+			+
Sodium (mmol/l)			0.033		0.023			0.047
Serum amylase (katal/l)			+	0.005	0.032			
			0.029					
					- 0.023			

Only associations with $q < 0.05$ are listed. Plus sign: Beta (from linear regression models) > 0 ; minus sign: Beta < 0 ; Benjamini-Hochberg-adjusted p values are given (referred to as q value)

(Additional file 1: Table S1). On tooth level, retained teeth had a maximum CAL of 3.22 ± 1.74 mm, whereas extracted teeth had a maximum CAL of 6.07 ± 3.06 mm. Thus, the periodontal breakdown was closely related to a 5-year tooth loss in SHIP.

We showed that nine metabolites, including the yet unreported 2-pyrr and butyrylputrescine, as well as previously reported ones such as phenylacetate, associated with a 5-year tooth loss over and above oral health status at baseline pointing towards the opportunity to use simple non-invasive saliva sampling to identify people at risk for tooth loss. Only one (phenylacetate) of the nine identified metabolites was also associated with oral health status in the cross-sectional analysis, clearly emphasizing the gain using the state-of-the-art metabolomics techniques for biomarker discovery. In accordance with previous studies, the identified molecular signatures for tooth loss point to surrogates of bacterial metabolism, cell proliferation, and host defense mechanisms (Additional file 1: Table S12). These data support the assumption that these periodontal metabolites predict tooth loss.

We chose a 5-year tooth loss as the primary outcome in longitudinal analysis, as it represents the most severe end of the spectrum of periodontitis. To our knowledge, we are the first to successfully associate baseline metabolite levels in saliva with a 5-year tooth loss, thereby opening also new perspectives for tooth loss prediction.

2-Pyrrolidineacetic acid

Saliva levels of 2-pyrr were strongly associated with tooth loss. Biomedical literature about this metabolite, however, is sparse. One potential biological source of 2-pyrr is the tobacco plant [42] and our PheWAS approach highlighted smoking as one of the very few health characteristics associated with 2-pyrr (see Additional file 1: Figure S4), and it is well known that smoking increases periodontal disease progression [43]. Besides 2-pyrr being an exogenous smoking metabolite, smoking shifts the subgingival microbiome towards a pathogen enriched community [44]. This shift may favor bacterial species that can produce 2-pyrr or related catabolites. The high detection frequency of 2-pyrr across all participants makes it, however, less likely that 2-pyrr is solely of exogenous origin or due to smoking-induced microbiome shift. A hypothesis further supported by the persistence of the association in statistical models controlling for smoking status. The missing association with other major cardiometabolic and anthropometric health variables in our PheWAS pinpoints to the local origin of 2-pyrr, which is supported by the metabolic network, in which 2-pyrr was in close proximity to previously described bacterial degradation products such as 3-phenylpropionate, phenylacetate, or 3-(4-

hydroxyphenyl)propionate (Fig. 4) [16, 45]. Another potential local source of 2-pyrr could be collagen turnover in the periodontium, since pyrrolidine residues contribute to the stability of collagen [46] and increased collagen turnover has been suggested as a predictive marker of alveolar bone loss [47].

Butyrylputrescine, N-acetylcadaverine, and N,N-dimethyl-5-aminovaleate

Butyrylputrescine and N-acetylcadaverine, which are both polyamine derivatives, were among the most consistently associated metabolites in our study and our PheWAS results (Table 1) confirmed the association of butyrylputrescine with bad breath (using a "Sulphide Monitor") [48], a typical symptom of periodontitis. Polyamines contribute to various eukaryotic and prokaryotic cellular processes, and their levels are tightly controlled by multiple factors [49, 50], as both the absence and excessive accumulation of polyamines lead to cell death [51]. The fact that higher levels of N-acetylcadaverine associated with periodontitis and ensuing tooth loss might therefore indicate a local excess of polyamines in the periodontal tissues [18, 45, 52]. The primary source of polyamine excess, however, remains to be established, but our PheWAS approach implicated systemic inflammatory host factors to be associated with saliva levels of polyamines (Table 1), which may be caused by a spill-over of inflammatory markers into the circulation. One might speculate that, again, oral microbiota contribute to polyamine excess by metabolizing periodontal host amino acids such as ornithine and lysine [53, 54]. Further, 5-aminovaleate is a metabolite produced by the catabolism of cadaverine [55] and its increased occurrence induces cellular excess of cadaverine. Altogether, the increased bacterial load associated with periodontitis might lead to increased polyamine levels reflected by the mutual increase of modified catabolites, which may have a longer half-life in the oral metabolome.

Dimethylarginine and N6,N6,N6-trimethyllysine

Various oral bacteria rely on the breakdown of host dipeptides as an energy resource and the documented association of dimethylarginine and N6,N6,N6-trimethyllysine with a 5-year tooth loss might well fit into this pattern. Briefly, periodontal tissue breakdown is carried out by activated proteases of host and bacteria, resulting in higher levels of dipeptides [17, 56], free amino acids, and amino acid metabolites [16, 18]. The ability of bacteria to produce proteolytic enzymes constitutes a survival strategy [57, 58]. Dimethylarginine and N6,N6,N6-trimethyllysine are arginine and lysine derivatives, and they might be linked to *Porphyromonas (P.) gingivalis*. *P. gingivalis* is considered a central periodontal pathogen, which shifts a healthy into a dysbiotic

subgingival microbiome, initiating inflammatory breakdown [12]. Arginine-gingipain and lysine-gingipain, which are virulence factors of *P. gingivalis*, cleave protein substrates after arginine and lysine residues in oligo-peptides [59, 60].

Phenylacetate

We replicated our previous observation of a strong and consistent association between saliva levels of phenylacetate and oral variables and further showed that saliva levels were associated with a 5-year tooth loss. While we speculated previously that 3-phenylacetate, similar to 3-phenylpropionate and 3-(4-hydroxyphenyl)propionate, likely originates from microbial metabolism, the current study allowed us to expand on this. The derived metabolic network puts those metabolites in close proximity to 2-pyrr, which might point towards a common community of bacteria contributing to the saliva pool of all of these metabolites. Further, our PheWAS approach identified waist circumference (which is a host factor) positively associated with phenylacetate, which led us to hypothesize on a systemic origin of phenylacetate. This metabolite has been measured in body fluids other than saliva, including blood and urine [61–63], and (passive) exchange processes between blood and saliva might explain a connection between both. However, higher plasma levels of phenylacetate have been associated with chronic renal failure [64], arterial vascular properties in patients with end-stage chronic kidney disease [61], and high fat diet-induced initiation of insulin resistance in mice [65].

N-acetyltaurine

The association between saliva levels of N-acetyltaurine and a 5-year tooth loss is puzzling, since little is known about this compound in general. It may relate to the antioxidant properties of its closely related compound taurine [66, 67], which might have a role in the host response releasing reactive oxygen species to fight bacteria. If the imbalance between reactive oxygen species and the antioxidant defense continues in favor of free radicals, the antioxidant capacity is exhausted, which contributes to periodontal tissue destruction [68]. However, N-acetyltaurine might also be host derived since saliva levels were associated with host characteristics, such as smoking and serum triglyceride levels (see Table 1), and previous studies have already linked this metabolite to exogenous health-modifying circumstances, including intake of alcohol and endurance sports [69–72].

Strengths and limitations of our study

Major strengths of our analyses are the longitudinal design, large sample size, replication of cross-sectional findings [16], and a detailed assessment of the oral

health status. However, our study was explorative and not designed to establish causality.

Clinical implications

Periodontitis is often overlooked [73] and undertreated, and there is no accurate biomarker to indicate the presence of periodontitis and/or to monitor periodontal stability after active treatment. In our cross-sectional analysis, 2-pyrr and N6,N6,N6-trimethyllysine were not significantly associated with supragingival plaque, which causes gingivitis, but with phenotypes of periodontitis. This finding indicates that at least these two biomarkers are exclusively increased during periodontal breakdown and thus might be highly sensitive for periodontitis. Further, prospective studies are needed to quantify the sensitivity, specificity, and diagnostic accuracy of such biomarkers or combinations thereof.

Preventive dental care in which consumers can evaluate their periodontal health and communicate with the dental team on an ongoing or as-needed basis may reduce health care cost and offer new possibilities to deliver care. A point-of-care (POC) device, based on non-invasive biomarkers, such as identified in the present study, may open a new avenue for such periodontal home care. If patients were able to screen themselves for periodontitis, they could initiate self-treatment, because incipient and moderate periodontitis can be halted or at least retarded by improved oral home care measures [74].

To improve prediction, many attempts were made and some commercial kits based MMP-8 as the product of the host response or on putative periodontal pathogens were launched, but neither of these biomarkers was sensitive and specific enough and no breakthrough was achieved for monitoring periodontal stability [75]. Furthermore, periodontal progression is often very slow and maintenance sessions could be extended [76], if home monitoring by these biomarkers would be feasible. Future treatment studies have to find out if our detected biomarkers add diagnostic benefit to periodontal care.

If a combination of biomarkers was predictive for future tooth loss, the periodontal community would have a tool to deliver a tailored periodontal therapy. A large multicenter study showed that hitherto used clinical variables were insufficient to predict tooth loss [77]. The 2017 World Workshop on the classification of periodontal conditions suggested that the extent of tooth loss has to be a part of staging periodontal disease severity, but periodontitis case definitions should extend beyond phenotypic disease symptom description and include biological features, which may help to adopt a more precise periodontitis management in the future, because not all patients respond equally good to standard therapeutic measures and some patients are more prone to tooth

loss than others. It provided a diagnostic framework which calls for the inclusion of biomarkers for prognosis [78].

Conclusions

We identified a distinct profile of saliva metabolites associated with tooth loss. Specifically, 2-pyrr and butyryl-putrescine were strongly associated with a 5-year tooth loss over and above current oral status and might hence have potential as biomarkers for screening purposes to identify periodontally diseased subjects (diagnostic), but also to identify subjects at risk for more tooth loss (prediction). The metabolic profile seemed to be enriched for markers of a dysbiotic oral microbiome and the respective host response. The ability of identified candidate metabolites to enable effective screening or prediction has to be established in appropriate settings. However, it should be noticed that tooth loss is not an outcome that is specific to periodontitis. Thus, the saliva metabolites associated with tooth loss may also be linked with other non-periodontal mechanisms. We further note that replication of the results in cohorts of different age and ethnic distribution, and health conditions is warranted, as is the integration of oral microbiome data to improve our understanding of how host and microbial metabolism is interlinked and possibly drives periodontitis progression.

Abbreviations

BMI: Body mass index; CAL: Clinical attachment level; cumPPD4+: Cumulative PPD from pockets with PPD ≥ 4 mm; FDR: False discovery rate; GWAS: Genome-wide association study; PheWAS: Phenome-wide association study; HbA1c: Glycated hemoglobin; IRR: Incidence rate ratio; MS/MS: Mass spectrometry/mass spectrometry; MT count: Total number of missing teeth; PCP-11: Periodontal clinical probe 11; PPD: Pocket probing depth; PPD 3+mm%: Percentage of sites with PPD ≥ 3 mm; PPD 4+mm%: Percentage of sites with PPD ≥ 4 mm; SHIP: Study of Health in Pomerania; ULPLC-MS/MS: Ultra-high-performance liquid-chromatography and tandem mass spectrometry; WBC: White blood cell count; 2-pyrr: 2-Pyrrolidineacetic acid

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12916-021-02035-z>.

Additional file 1. Title of data: Detailed information about baseline characteristics of study participants, the in-vitro test, the phenome-wide association study, and the genome-wide association study. Description of data We provide detailed information about baseline characteristics of study participants, the phenome-wide association study (for 2-pyrrolidineacetic acid, X-23662, butyrylputrescine, N,N-dimethyl-5-aminovalerate, N-acetylcadaverine, N6,N6,N6-trimethyllysine, N-acetyltaurine, phenylacetate, dimethylarginine (SDMA + ADMA)), and the genome-wide association study (for 2-pyrr and butyrylputrescine). Information is split into the Supplementary Methods, the Supplementary Results, the Tables S1-S12, and the Figures S1-S4.

Acknowledgements

The authors acknowledge the investigative group of the SHIP study, the study staff, and all study participants.

Authors' contributions

LA contributed to data interpretation, and drafted and critically revised the manuscript. BH contributed to the conception, design, data analysis, and interpretation, and drafted and critically revised the manuscript. VP contributed to the interpretation and critically revised the manuscript. SW, RM, LNC, and COS contributed to the data analysis and interpretation, and critically revised the manuscript. SS and MN contributed to the data acquisition and critically revised the manuscript. GK and KS contributed to the data acquisition and critically revised the manuscript. UV and HV contributed to the conception, design, and data acquisition and critically revised the manuscript. MP contributed to the data analysis and interpretation and drafted and critically revised the manuscript. TK contributed to the conception, design, and data interpretation and drafted and critically revised the manuscript. The authors read and approved the final manuscript.

Funding

The SHIP project is part of the Community Medicine Research net, University of Greifswald, Germany, which is funded by the German Federal Ministry of Education and Research (grants 01ZZ96030 and 01ZZ0701), the Ministry of Education, Research and Cultural Affairs, as well as the Ministry of Social Affairs of the Federal State of Mecklenburg–West Pomerania. KS was supported by the Biomedical Research Program funds at the Weill Cornell Medicine in Qatar, a program funded by the Qatar Foundation. RM was supported by the German Federal Ministry of Education and Research (grant FKZ 13N11181). LNC was supported by the National Science Foundation under grant IOS-1456829. None of the funding bodies had any influence on the design of the study or collection, analysis, and interpretation of data or the writing of the manuscript. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Availability of data and materials

Data from SHIP are available after data application and signature of a data transfer agreement. The data dictionary and the online application form are available at: fvc.med.uni-greifswald.de/dd_service/data_use_intro.php. Involving a local collaborative partner to facilitate the application process is recommended.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

All SHIP studies were positively evaluated by the ethics committee of the University of Greifswald (SHIP-0: issued on July 31, 1995; SHIP-1: III UV 73/01 issued on December 12, 2001; SHIP-2: BB 39/08 issued on June 19, 2008; SHIP-3: BB 122/13 issued on November 5, 2013). All participants were informed about the study protocol and signed the informed consent and the privacy statement. Reporting was done in accordance with the Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) guidelines.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Department of Restorative Dentistry, Periodontology, Endodontology, and Preventive and Pediatric Dentistry, University Medicine Greifswald, Fleischmannstr. 42, 17475 Greifswald, Germany. ²Interfaculty Institute for Genetics and Functional Genomics, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany. ³DZHK (German Center for Cardiovascular Research), partner site Greifswald, Greifswald, Germany. ⁴Institute for Community Medicine, SHIP/Clinical Epidemiology Research, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany. ⁵Department of Prosthetic Dentistry, Gerodontology and Biomaterials, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany. ⁶Institute of Bioinformatics and Systems Biology, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany. ⁷Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany. ⁸Department of Biological Sciences, Purdue University, West Lafayette, USA. ⁹Weill Cornell Medicine–Qatar, Education City, Qatar

Foundation, Doha, Qatar. ¹⁰Computational Medicine, Berlin Institute of Health (BIH), Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany.

Received: 6 April 2021 Accepted: 11 June 2021
Published online: 14 July 2021

References

- Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990–2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res*. 2014;93(11):1045–53. <https://doi.org/10.1177/0022034514552491>.
- Tonetti MS, Van Dyke TE. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol*. 2013;84(4 Suppl):S24–9. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.1340019>.
- Pietiläinen M, Liljestrand JM, Kopra E, Pussinen PJ. Mediators between oral dysbiosis and cardiovascular diseases. *Eur J Oral Sci*. 2018;126(Suppl 1):26–36. <https://doi.org/10.1111/eos.12423>.
- Taylor JJ, Preshaw PM, Lalla E. A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *J Periodontol*. 2013; 84(4 Suppl):S113–34. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.134005>.
- de Smit MJ, Westra J, Brouwer E, Janssen KM, Vissink A, van Winkelhoff AJ. Periodontitis and rheumatoid arthritis: what do we know? *J Periodontol*. 2015;86(9):1013–9. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.150088>.
- D'Aiuto F, Sabbah W, Netuveli G, Donos N, Hingorani AD, Deanfield J, et al. Association of the metabolic syndrome with severe periodontitis in a large U.S. population-based survey. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(10):3989–94. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2522>.
- Schutzholt S, Holtfreter B, Schiffner U, Hoffmann T, Kocher T, Mischeilis W. Clinical factors and self-perceived oral health. *Eur J Oral Sci*. 2014;122(2): 134–41. <https://doi.org/10.1111/eos.12117>.
- Peres MA, Macpherson LMD, Weyant RJ, Daly B, Venturelli R, Mathur MR, et al. Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet*. 2019; 394(10194):249–60. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31146-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31146-8).
- Watt RG, Daly B, Allison P, Macpherson LMD, Venturelli R, Listl S, et al. Ending the neglect of global oral health: time for radical action. *Lancet*. 2019;394(10194):261–72. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31133-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31133-X).
- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*. 2005;43(11):5721–32. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005>.
- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*. 2001;183(12): 3770–83. <https://doi.org/10.1128/JB.183.12.3770-3783.2001>.
- Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(10):717–25. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2873>.
- Hajishengallis G, Korostoff JM. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontol*. 2017;75(1):116–51.
- Ji S, Choi Y. Point-of-care diagnosis of periodontitis using saliva: technically feasible but still a challenge. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015;5:65.
- Patti GJ, Yanes O, Shriver LP, Courade JP, Tautenhahn R, Manchester M, et al. Metabolomics implicates altered sphingolipids in chronic pain of neuropathic origin. *Nat Chem Biol*. 2012;8(3):232–4. <https://doi.org/10.1038/nchembio.767>.
- Liebsch C, Pitchika V, Pink C, Samietz S, Kastenmuller G, Artati A, et al. The saliva metabolome in association to oral health status. *J Dent Res*. 2019; 98(6):642–51. <https://doi.org/10.1177/0022034519842853>.
- Barnes VM, Ciancio SG, Shibly O, Xu T, Devizio W, Trivedi HM, et al. Metabolomics reveals elevated macromolecular degradation in periodontal disease. *J Dent Res*. 2011;90(11):1293–7. <https://doi.org/10.1177/0022034511416240>.
- Barnes VM, Teles R, Trivedi HM, Devizio W, Xu T, Mitchell MW, et al. Acceleration of purine degradation by periodontal diseases. *J Dent Res*. 2009;88(9):851–5. <https://doi.org/10.1177/0022034509341967>.
- Huang Y, Zhu M, Li Z, Sa R, Chu Q, Zhang Q, et al. Mass spectrometry-based metabolomic profiling identifies alterations in salivary redox status and fatty acid metabolism in response to inflammation and oxidative stress in periodontal disease. *Free Radic Biol Med*. 2014;70:223–32. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.024>.
- Novakovic N, Cakic S, Todorovic T, Raicevic BA, Dozic I, Petrovic V, et al. Antioxidative status of saliva before and after non-surgical periodontal treatment. *Srp Arh Celok Lek*. 2013;141(3-4):163–8. <https://doi.org/10.2298/SARH1304163N>.
- Machtei EE, Hausmann E, Dunford R, Grossi S, Ho A, Davis G, et al. Longitudinal study of predictive factors for periodontal disease and tooth loss. *J Clin Periodontol*. 1999;26(6):374–80. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051X.1999.260607.x>.
- Ramseier CA, Anerud A, Dulac M, Lulic M, Cullinan MP, Seymour GJ, et al. Natural history of periodontitis: disease progression and tooth loss over 40 years. *J Clin Periodontol*. 2017;44(12):1182–91. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12782>.
- Nilsson H, Sanmartin Berglund J, Renvert S. Longitudinal evaluation of periodontitis and tooth loss among older adults. *J Clin Periodontol*. 2019; 46(10):1041–9. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13167>.
- Glockmann E, Panzner K-D, Huhn P, Sigusch B, Glockmann K. Ursachen des Zahnverlustes in Deutschland – Dokumentation einer bundesweiten Erhebung (2007) [Reasons for tooth loss in Germany - Documentation of a nationwide survey (2007)]. Köln: Institute of German Dentists (IDZ); 2011.
- John U, Greiner B, Hensel E, Ludemann J, Piek M, Sauer S, et al. Study of Health In Pomerania (SHIP): a health examination survey in an east German region: objectives and design. *Soz Präventivmed*. 2001;46(3):186–94. <https://doi.org/10.1007/BF01324255>.
- Keil U, Stieber J, Doring A, Chambless L, Hartel U, Filipiak B, et al. The cardiovascular risk factor profile in the study area Augsburg. Results from the first MONICA survey 1984/85. *Acta Med Scand Suppl*. 1988;728:119–28. <https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1988.tb05563.x>.
- Volzke H, Alte D, Schmidt CO, Radke D, Lörbe R, Friedrich N, et al. Cohort profile: the study of health in Pomerania. *Int J Epidemiol*. 2011;40(2):294–307. <https://doi.org/10.1093/ije/dyp394>.
- World Health Organization. Oral health surveys: basic methods. Geneva: World Health Organization; 1997.
- Holtfreter B, Alte D, Schwahn C, Desvarieux M, Kocher T. Effects of different manual periodontal probes on periodontal measurements. *J Clin Periodontol*. 2012;39(11):1032–41. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2012.01941.x>.
- Sumner LW, Amberg A, Barrett D, Beale MH, Beger R, Daykin CA, et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics*. 2007;3(3):211–21. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>.
- Pendergrass SA, Brown-Gentry K, Dudek SM, Torstenson ES, Ambite JL, Avery CL, et al. The use of phenome-wide association studies (PheWAS) for exploration of novel genotype-phenotype relationships and pleiotropy discovery. *Genet Epidemiol*. 2011;35(5):410–22. <https://doi.org/10.1002/gepi.20589>.
- Das S, Forer L, Schönherr S, Sidore C, Locke AE, Kwong A, et al. Next-generation genotype imputation service and methods. *Nat Genet*. 2016; 48(10):1284–7. <https://doi.org/10.1038/ng.3656>.
- Marchini J, Howie B. Genotype imputation for genome-wide association studies. *Nat Rev Genet*. 2010;11(7):499–511. <https://doi.org/10.1038/nrg2796>.
- Rider JE, Hacker A, Mackintosh CA, Pegg AE, Woster PM, Casero RA Jr. Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *Amino Acids*. 2007;33(2):231–40. <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0513-4>.
- Casero RA Jr, Pegg AE. Spermidine/spermine N1-acetyltransferase—the turning point in polyamine metabolism. *FASEB J*. 1993;7(8):653–61. <https://doi.org/10.1096/fasebj.7.8.8500690>.
- Ozeki M, Nozaki T, Aoki J, Bamba T, Jensen KR, Murakami S, et al. Metabolomic analysis of gingival crevicular fluid using gas chromatography/mass spectrometry. *Mass Spectrom (Tokyo)*. 2016;5(1):A0047. <https://doi.org/10.5702/massspectrometry.A0047>.
- Kerner J, Hoppel C. Genetic disorders of carnitine metabolism and their nutritional management. *Annu Rev Nutr*. 1998;18(1):179–206. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.18.1.179>.
- Takahashi N. Oral microbiome metabolism: from “who are they?” to “what are they doing?”. *J Dent Res*. 2015;94(12):1628–37. <https://doi.org/10.1177/0022034515606045>.
- Sun Jang J, Piao S, Cha YN, Kim C. Taurine chloramine activates Nrf2, increases HO-1 expression and protects cells from death caused by hydrogen peroxide. *J Clin Biochem Nutr*. 2009;45(1):37–43. <https://doi.org/10.3164/jcbn.08-262>.
- Sree SL, Sethupathy S. Evaluation of the efficacy of taurine as an antioxidant in the management of patients with chronic periodontitis. *Dent Res J (Isfahan)*. 2014;11(2):228–33.
- Nag A, Kurushima Y, Bowyer RCE, Wells PM, Weiss S, Pietzner M, et al. Genome-wide scan identifies novel genetic loci regulating salivary metabolite levels. *Hum Mol Genet*. 2020;29(5):864–75. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz308>.
- Tomita H, Tamaki E, Mitsuaki S. Chemical studies on ninhydrin-positive compounds in cured tobacco leaves. 1. Identification of 2-pyrrolidine acetic acid new amino acid + 1-pipecolic acid. *Agr Biol Chem Tokyo*. 1964;28(7):451.

43. Johnson GK, Hill M. Cigarette smoking and the periodontal patient. *J Periodontol*. 2004;75(2):196–209. <https://doi.org/10.1902/jop.2004.75.2.196>.
44. Jiang Y, Zhou X, Cheng L, Li M. The impact of smoking on subgingival microflora: from periodontal health to disease. *Front Microbiol*. 2020;11:66. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00066>.
45. Sakanaka A, Kuboniwa M, Hashino E, Bamba T, Fukusaki E, Amano A. Distinct signatures of dental plaque metabolic byproducts dictated by periodontal inflammatory status. *Sci Rep*. 2017;7(1):42818. <https://doi.org/10.1038/srep42818>.
46. Krane SM. The importance of proline residues in the structure, stability and susceptibility to proteolytic degradation of collagens. *Amino Acids*. 2008; 35(4):703–10. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0073-2>.
47. Giannobile WV, Lynch SE, Denmark RG, Paquette DW, Fiorellini JP, Williams RC. Crevicular fluid osteocalcin and pyridinoline cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP) as markers of rapid bone turnover in periodontitis. A pilot study in beagle dogs. *J Clin Periodontol*. 1995;22(12):903–10. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1995.tb01793.x>.
48. Goldberg S, Kozlovsky A, Gordon D, Gelemter I, Sintov A, Rosenberg M. Cadaverine as a putative component of oral malodor. *J Dent Res*. 1994; 73(6):1168–72. <https://doi.org/10.1177/00220345940730060701>.
49. Miller-Fleming L, Olin-Sandoval V, Campbell K, Ralser M. Remaining mysteries of molecular biology: the role of polyamines in human diseases. *Clin Nutr*. 2015;24(2):184–97. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2004.11.001>.
50. Moinard C, Cynober L, de Bandt JP. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin Nutr*. 2005;24(2):184–97. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2004.11.001>.
51. Bettuzzi S, Davalli P, Astancolle S, Pinna C, Roncaglia R, Borsali F, et al. Coordinate changes of polyamine metabolism regulatory proteins during the cell cycle of normal human dermal fibroblasts. *FEBS Lett*. 1999;446(1): 18–22. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00182-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00182-9).
52. Kuboniwa M, Sakanaka A, Hashino E, Bamba T, Fukusaki E, Amano A. Prediction of periodontal inflammation via metabolic profiling of saliva. *J Dent Res*. 2016;95(12):1381–6. <https://doi.org/10.1177/0022034516661142>.
53. Fothergill JC, Guest JR. Catabolism of L-lysine by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol*. 1977;99(1):139–55. <https://doi.org/10.1099/00221287-99-1-139>.
54. Chou HT, Li JY, Peng YC, Lu CD. Molecular characterization of PauR and its role in control of putrescine and cadaverine catabolism through the gamma-glutamyl pathway in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*. 2013;195(17):3906–13. <https://doi.org/10.1128/JB.00275-13>.
55. Callery PS, Geelhaar LA. Biosynthesis of 5-aminopentanoic acid and 2- piperidone from cadaverine and 1-piperidine in mouse. *J Neurochem*. 1984;43(6):1631–4. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1984.tb06088.x>.
56. Barnes VM, Kennedy AD, Panagakos F, Devizio W, Trivedi HM, Jonsson T, et al. Global metabolomic analysis of human saliva and plasma from healthy and diabetic subjects, with and without periodontal disease. *PLoS One*. 2014;9(8):e105181. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105181>.
57. Ohara-Nemoto Y, Rouf SM, Naito M, Yanase A, Tetsuo F, Ono T, et al. Identification and characterization of prokaryotic dipeptidyl-peptidase 5 from *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem*. 2014;289(9):5436–48. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.527333>.
58. Takahashi N, Sato T. Dipeptide utilization by the periodontal pathogens *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol Immunol*. 2002;17(1):50–4. <https://doi.org/10.1046/j.0902-0055.2001.00089.x>.
59. Kadowaki T, Nakayama K, Okamoto K, Abe N, Baba A, Shi Y, et al. *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence determinants in progression of periodontal diseases. *J Biochem*. 2000;128(2):153–9. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022735>.
60. Travis J, Pike R, Imamura T, Potempa J. *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. *J Periodontol Res*. 1997;32(1 Pt 2):120–5. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1997.tb01392.x>.
61. Scholze A, Jankowski V, Henning L, Haass W, Wittstock A, Suvd-Erdene S, et al. Phenylacetic acid and arterial vascular properties in patients with chronic kidney disease stage 5 on hemodialysis therapy. *Nephron Clin Pract*. 2007;107(1):c1–6. <https://doi.org/10.1159/000105137>.
62. Holmes E, Li JV, Athanasiou T, Ashrafian H, Nicholson JK. Understanding the role of gut microbiome-host metabolic signal disruption in health and disease. *Trends Microbiol*. 2011;19(7):349–59. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.05.006>.
63. Gonzalez-Sastre F, Mora J, Guilmart R, Queralt JM, Alvarez E, Udina C, et al. Urinary phenylacetic acid excretion in depressive patients. *Acta Psychiatr Scand*. 1988;78(2):208–10. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.1988.tb06325.x>.
64. Jankowski J, van der Giet M, Jankowski V, Schmidt S, Hemeier M, Mahn B, et al. Increased plasma phenylacetic acid in patients with end-stage renal failure inhibits iNOS expression. *J Clin Invest*. 2003;112(2):256–64. <https://doi.org/10.1172/JCI200315524>.
65. Feamside JF, Dumas ME, Rothwell AR, Wilder SP, Cloarec O, Toye A, et al. Phylometabonomic patterns of adaptation to high fat diet feeding in inbred mice. *PLoS One*. 2008;3(2):e1668. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001668>.
66. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med*. 1991;91(3C):14S–22S. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90279-7](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90279-7).
67. Chapple IL. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol*. 1997;24(5):287–96. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1997.tb00760.x>.
68. Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol*. 2000. 2007;43:160–232.
69. Shi X, Yao D, Chen C. Identification of N-acetyltaurine as a novel metabolite of ethanol through metabolomics-guided biochemical analysis. *J Biol Chem*. 2012;287(9):6336–49. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.312199>.
70. Luginbuhl M, Rutjens S, König S, Furrer J, Weinmann W. N-Acetyltaurine as a novel urinary ethanol marker in a drinking study. *Anal Bioanal Chem*. 2016; 408(26):7529–36. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9855-7>.
71. Miyazaki T, Nakamura Y, Ebina K, Mizushima T, Ra SG, Ishikura K, et al. Increased N-acetyltaurine in the skeletal muscle after endurance exercise in rat. *Adv Exp Med Biol*. 2017;975(Pt 1):403–11. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1079-2_33.
72. Johnson CH, Patterson AD, Krausz KW, Lanz C, Kang DW, Luecke H, et al. Radiation metabolomics. 4. UPLC-ESI-QTOFMS-Based metabolomics for urinary biomarker discovery in gamma-irradiated rats. *Radiat Res*. 2011; 175(4):473–84. <https://doi.org/10.1667/RR2437.1>.
73. Peres MA, Daly B, Guarnizo-Herreno CC, Benzan H, Watt RG. Oral diseases: a global public health challenge - Authors' reply. *Lancet*. 2020;395(10219): 186–7. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32997-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32997-6).
74. Pitchika V, Pink C, Volzke H, Welk A, Kocher T, Holtfrete B. Long-term impact of powered toothbrush on oral health: 11-year cohort study. *J Clin Periodontol*. 2019;46(7):713–22. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13126>.
75. Giannobile WV, McDewitt JT, Niedbala RS, Malamud D. Translational and clinical applications of salivary diagnostics. *Adv Dent Res*. 2011;23(4):375–80. <https://doi.org/10.1177/0022034511420434>.
76. Giannobile WV, Braun TM, Caplis AK, Doucette-Stamm L, Duff GW, Kornman KS. Patient stratification for preventive care in dentistry. *J Dent Res*. 2013; 92(8):694–701. <https://doi.org/10.1177/0022034513492336>.
77. Schwendicke F, Arsiwala LT, Krois J, Baumer A, Pretzl B, Eickholz P, et al. Association, prediction, generalizability: cross-center validity of predicting tooth loss in periodontitis patients. *J Dent*. 2021;109:103662. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2021.103662>.
78. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: framework and proposal of a new classification and case definition. *J Clin Periodontol*. 2018;45(Suppl 20):S149–S61. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12945>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



