

**Immunologische Variablen und andere
Entzündungsmarker im Speichel bei Patienten mit
Parodontitis**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae
(Dr. med. dent.)**

vorgelegt dem
Rat der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Isabelle Hiese
geboren am 03.07.1978 in Mühlhausen

Gutachter:

1. Prof. Wolfgang Pfister, Universität Jena
2. PD Dr. Sigrun Eick, Universität Bern
3. Prof. Thomas Hoffmann, Universität Dresden

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.11.2010

Abkürzungsverzeichnis

a.a.	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
A.a.IgA	Aggregatibacter actinomycetemcomitans-spezifisches ImmunglobulinA
A.a.IgG	Aggregatibacter actinomycetemcomitans-spezifisches ImmunglobulinG
Abb.	Abbildung
aP	aggressive Parodontitis
AMP	antimikrobielle Peptide
API	Approximalplaqueindex
Asn	Asparagin
ATCC	American Type culture collection
BSA	bovine serum albumin
BoP	Blutung
°C	Grad Celsius
CAL	clinical attachment level
CDT	Cytolethal distending toxin
cP	chronische Parodontitis
CTSC	Cathepsin C
d	Schichtdicke
DB	Dilutionbuffer
dd	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA, DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
Fc	Fragment crystalline
GCF	Sulkusflüssigkeit
GesIgA	Gesamtimmunglobulin A
GesIgG	Gesamtimmunglobulin G
GSH	Glutathion

Abkürzungsverzeichnis

GSHPx	Glutathionperoxidase
GSSG	Glutathion-Disulfid
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
hCAP-18	humanes Cathelicidin 18
HNP 1-3	human neutrophil Peptides 1-3
HRP	Horseradish peroxidase
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-2	Interleukin-2
K	Kontrollgruppe
kgp-Gen	Lys-gingipain
LJP	lokalisierte juvenile Parodontitis
M	Mittelwert
m	männlich
MDA	Malondialdehyd
mM	Mikromol
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MPO	Myeloperoxidase
nM	nanomolar
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaN ₃	Natriumazid
NE	neutrophile Elastase
nm	Nanometer
L [•]	Lipidradikal
LG	Lockerungsgrad
LH	ungesättigte Fettsäure
LOO [•]	Lipidperoxyradikal
LOOH	Lipidperoxid

Abkürzungsverzeichnis

LPO	Lipidperoxidase
O ₂	Sauerstoff
OMP	outer membran proteine, äußere Membranproteine
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
P.g.	Porphyromonas gingivais
P.g.IgA	Porphyromonas gingivalis spezifisches Immunglobulin A
P.g.IgG	Porphyromonas gingivalis spezifisches Immunglobulin G
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
Prot3	Proteinase 3
RgpA	Arg-spezifisches gingipain-A
RgpB	Arg-gingipainspezifisches gingipain-B
ROS	reactive oxygen species
s-IgA	sekretorisches Immunglobulin A
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
ST	Sondierungstiefe
STAW	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TBA	Tetrabutylammonium
TBS	Tetrapropylbenzolsulfonat
TMB	Tetramethylbenzidin
TCA	Trichloressigsäure
T.f.	Tannerella forsythia
T.d.	Treponema denticola
TNF- α	Tumornekrosefaktor - α
U	Units
V	Volumen
W	weiblich
WST	2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium
XO	Xanthinoxidaseaktivität

Abkürzungsverzeichnis

ε	Extinktionskoeffizient
μl	Mikroliter

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Klassifikation der Parodontitis	3
2.1.1	Chronische Parodontitis	4
2.1.2	Aggressive Parodontitis	5
2.2	Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis	5
2.2.1	Parodontopathogene Bakterien	7
2.3	Angeborene Immunantwort	11
2.3.1	Antimikrobielle Peptide (AMP's)	11
2.3.2	Cathepsin C	12
2.3.3	Serinproteinasen	13
2.4	Antioxidative und oxidative Mechanismen	14
2.4.1	Bedeutung von reaktiven Sauerstoffspezies	14
2.4.2	Oxidative Mechanismen	16
2.4.3	Antioxidative Mechanismen	18
2.5	Erworbene Immunantwort	20
2.5.1	Immunglobulin A	20
2.5.2	Immunglobulin G	21
2.6	Speichel als diagnostisches Medium	22
3	Zielstellung	23
4	Material und Methoden	24
4.1	Auswahl der Probanden	24

4.2	Klinische Befundaufnahme und Mikrobiologische Analyse	25
4.2.1	Parodontalstatus	25
4.2.2	Molekularbiologische Methoden zur Identifizierung mikrobieller Organismen	26
4.3	Speichelanalysen	29
4.3.1	Speichelprobenentnahme:	29
4.3.2	Bestimmung des Proteingehaltes	30
4.3.3	Bestimmung von antimikrobiellen Peptiden	30
4.3.4	Bestimmung der Aktivität von Proteasen	30
4.3.5	Oxidative Parameter	30
4.3.6	Antioxidative Parameter	31
4.3.7	Bestimmung der erworbenen Immunantwort	35
4.4	Statistische Auswertung	36
5	Ergebnisse	37
5.1	Klinische Parameter	37
5.2	Bestimmung der Mikroflora in der subgingivalen Plaque mittels Real-Time-PCR	38
5.3	Proteingehalt des Speichels	41
5.4	Variablen der angeborenen Immunantwort im Speichel	42
5.4.1	Humanes Cathelicidin	42
5.4.2	Humane neutrophile Peptids 1-3	43
5.4.3	Cathepsine C	44
5.4.4	Serinproteinasen	45
5.5	Antioxidative und oxidative Parameter im Speichel	47
5.5.1	Antioxidative Parameter	47
5.5.2	Oxidative Parameter	50
5.6	Erworbene Immunität	52

5.6.1	Immunglobulin G	52
5.6.2	Immunglobulin A	55
6	Diskussion	59
6.1	Klinische Parameter	60
6.2	Gesamtproteingehalt des Speichels	61
6.3	Antimikrobielle Peptide	61
6.4	Cathepsin C und Serinproteinasen	63
6.5	Antioxidaktive und oxidative Parameter im Speichel	65
6.6	Immunglobuline	67
7	Schlussfolgerungen	70
8	Literaturverzeichnis	I
9	Anhang	XXIII

1 Zusammenfassung

Die Parodontitis ist neben der Karies die häufigste Ursache für den Zahnverlust im Erwachsenenalter. Die Parodontalerkrankungen treten als Folge des Ungleichgewichtes zwischen den potentiell pathogenen Mikroorganismen und der lokalen Immunantwort in der Mundhöhle auf.

Zu denen am engsten mit den Parodontitiden verbundenen Bakterien zählen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola*. Die Mundhöhle ist die erste immunologische Barriere. Einen Teil der Abwehrfunktion übernimmt der Speichel mit seinen Antioxidantien. Freie Radikale, die exogen zugeführt werden oder endogen im Rahmen der Immunantwort durch polymorphkernige Lymphozyten gebildet werden, werden durch diese Antioxidantien abgefangen. Erfolgt keine Reaktion durch die Antioxidantien, kommt es zum oxidativen Stress für das umliegende Gewebe, welcher wiederum zur Lipidperoxidation, DNA-Schädigung bis hin zum Zelltod führen kann. Bei Parodontitispatienten ist eine erhöhte oxidative und antioxidative Belastung nachweisbar. Die Immunglobuline spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Parodontitis. Ein weiterer Teil des Immunsystems stellt die angeborene Immunabwehr dar. Mit den antimikrobiellen Peptiden und granulozytären Enzymen wird ihm eine große Bedeutung in der Abwehrreaktion zugesprochen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die oxidative und antioxidative Belastung sowie der immunologische Status des Speichels von Parodontitispatienten untersucht. Die Versuche sollen zeigen, ob diese Parameter im Speichel zur Diagnostik und Differenzierung von aggressiver und chronischer Parodontitis angewandt werden können.

Im Rahmen der Studie wurden 22 Patienten mit Parodontitis untersucht, wobei 7 Probanden der Gruppe mit aggressiver Parodontitis und 15 der chronischen Parodontitis zugeordnet wurden. Die Versuchspersonen waren Nichtraucher, wiesen keine Allgemeinerkrankungen auf, eine Antibiotikaeinnahme in den letzten 3

Monaten sowie eine Schwangerschaft und Stillzeit wurden ausgeschlossen. 19 Probanden dienten als Kontrollgruppe. Bei allen Personen wurden klinische Parameter ermittelt, eine Plaqueprobe für den Nachweis von parodontopathogenen Bakterien mittels Real-Time PCR und eine unstimulierte Speichelprobe entnommen. Zu den Parametern der angeborenen Immunantwort zählten die Neutrophile Elastase, die Proteinase 3, das Cathepsin C (CTSC), die humanen neutrophilen Peptide 1-3 (HNP1-3) und das humane Cathelicidin 18 (hCAP-18). Die Analysen des Speichels, durchgeführt an der Jagiellonen-Universität in Krakau, zeigten, dass Patienten mit chronischer Parodontitis tendenziell die höchsten Werte oder Aktivitäten erzielten. In der Kontrollgruppe wurden die geringsten Werte mit Ausnahme von HNP1-3 ermittelt.

Die Ergebnisse der antioxidativen und oxidativen Belastung, ermittelt durch photospektroskopische Messung, waren in den Parodontitisgruppen erhöht, wobei auch hier in der Gruppe der chronischen Parodontitis häufig die größten Resultate erzielt wurden.

Die Antikörper der erworbenen Immunantwort, gemessen durch den ELISA, waren in der chronischen Parodontitisgruppe gegenüber den zwei Vergleichsgruppen erhöht. Die bakterienspezifischen Immunglobuline G wiesen höhere Werte im Zusammenhang mit einem quantitativ höheren Nachweis des Bakteriums auf. Diese Ergebnisse wurden nicht in Bezug auf Immunglobulin A gefunden.

Schlussfolgernd lässt sich feststellen, dass Parameter der oxidativen und antioxidativen Belastungen als Marker für die Parodontitis genutzt werden können.

Weitere epidemiologische Studien hinsichtlich der Relevanz zur Nutzung der Immunglobuline als Parodontitismarker sind erforderlich.

2 Einleitung

Erkrankungen des Parodontium befallen 10-15% der Weltbevölkerung und sie werden als Hauptursache für den Zahnverlust angesehen (Chapple et al. 2002). Bei Erwachsenen steigt die Häufigkeit von Zahnextraktionen ab dem 40. Lebensjahr aus parodontalen Gründen an (Reich et al.1993). So weist die dritte deutsche Mundgesundheitsstudie in der Gruppe der 35- bis 44-jährigen bei 30 % der Personen schwere Parodontalerkrankungen auf, während ihre Zahl in der Gruppe der 65 bis 74-jährigen auf 55 % steigt (Michaelis, Reich 1999).

Zwei wichtige, zusammenhängende Faktoren sind in die pathophysiologische Entwicklung der Parodontitis mit einbezogen: die Aktivierung des Immunsystems sowie die damit im Zusammenhang entstehenden Stoffwechselprodukte einschließlich der Produktion von Sauerstoffradikalen. Die wachsende Produktion von Sauerstoffradikalen tragen zum oxidativen Stress bei. Dieser ist bei verschiedenen Erkrankungen, darunter der Parodontitis, von Bedeutung (Wei P-F, et al. 2004).

Faktoren der Wirtsabwehr können im Speichel nachgewiesen werden. Ziel der Arbeit war es, einige Variablen im Speichel von Parodontitispatienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zu untersuchen.

2.1 Klassifikation der Parodontitis

Auf dem „ Internationalen Workshop for a classification of Periodontal Diseases and Conditions “ 1999 wurde eine neue Klassifizierung der parodontalen Erkrankungen eingeführt. Ziel der Neuerungen war eine klare Definition und damit eine entsprechende Abgrenzung der entsprechenden Krankheitsbilder.

Die parodontalen Erkrankungen werden wie folgt unterteilt (Armitage 1999):

1. Gingivitiden
2. chronische Parodontitis
3. aggressive Parodontitis
4. Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen
5. nekrotisierende Erkrankung
6. Abszesse des Parodonts
7. Parodontitis in Zusammenhang mit endodontalen Läsionen

8. Entwicklungsbedingte oder erworbene Deformationen und Zustände

In der hier vorliegenden Arbeit wird sich auf die chronische und aggressive Parodontitis bezogen, deshalb werden diese beiden Formen genauer vorgestellt.

2.1.1 Chronische Parodontitis

Die am weitesten verbreitete Form, früher als adulte Parodontitis bezeichnet, ist die chronische Parodontitis (Amitage 1999). Die chronische Parodontitis ist Hauptursache von Zahnverlust im Erwachsenenalter. Der Altersgipfel liegt bei über 35 Jahren (Altmann et al 1985, Suzuki 1988, Genco 1990, Ranney 1992). Die chronische Parodontitis ist durch Entzündung des Zahnhalteapparates sowie durch progressiven Attachment- und Knochenverlust gekennzeichnet. Charakteristisch sind die Bildung von Zahnfleischtaschen und/oder Gingivarezessionen. Während die bakterielle Plaque als ätiologischer Faktor fungiert, ist die Pathogenese durch die Wirtsreaktion determiniert. Die Unterteilung kann nach Ausmaß und Schweregrad vorgenommen werden (Deutsche Gesellschaft für Parodontologie 2001).

1. lokalisierte Form:

Weniger als 30 % der Zahnflächen sind betroffen.

2. generalisierte Form:

Mehr als 30 % der Zahnflächen sind betroffen.

Eine weitere Einteilung richtet sich nach der Größe des Attachmentverlustes (CAL):

1. leichte Form: CAL 1-2mm

2. moderate Form: CAL 3-4mm

3. schwere Form: CAL ist größer als 5mm

Die chronische Parodontitis tritt überwiegend im Erwachsenenalter auf. Die Destruktion steht mit lokalen Reizfaktoren in Zusammenhang, hierbei ist die Plaquezusammensetzung variabel. Eine vorwiegend langsame Progression ist vorherrschend, wobei auch Aktivitätsschübe vorkommen können (Deutsche Gesellschaft für Parodontologie 2001). Im Röntgenbild ist ein horizontaler Knochenabbau sichtbar (Karpinia et al. 2000, Fowler et al. 2001).

Als Risikofaktoren gelten Systemerkrankungen wie Diabetes mellitus oder HIV-Infektionen, Tabakkonsum, Osteoporose oder emotionaler Stress. Des Weiteren zählen eine spezifische Mikroflora, eine abgelaufene Parodontitisprogression, sozioökonomische Faktoren sowie lokale zahnspezifische Faktoren, insbesondere der iatrogenen Art zu den Risikofaktoren.

2.1.2 Aggressive Parodontitis

Die aggressive Parodontitis ist eine infektiöse, entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates mit raschem Attachment- und Knochenverlust bei sonst gesunden Patienten. Oft ist ein Missverhältnis an bakteriellen Ablagerungen und dem Ausmaß der Gewebedestruktion zu beobachten. Ein häufiges familiäres Auftreten ist möglich. In der subgingivalen Plaque können erhöhte Mengenanteile von *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* sowie teilweise *Porphyromonas gingivalis* vorliegen (Armitage 1999, Müller et al. 2001).

Es wird auch hier eine lokalisierte und eine generalisierte Form unterschieden. Die erst genannte Form beginnt während der Pubertät. Betroffen sind die ersten Molaren und Schneidezähne. Diagnostisch können Serumantikörper gegen bakterielle Agzien nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu sind die Patienten bei der generalisierten Form meist jünger als 30 Jahre, zudem liegt ein approximaler Befall mit Attachmentverlust an mindestens drei Zähnen, außer den ersten Molaren und Schneidezähnen, vor. Diese Form ist durch einen episodenhaften Verlauf charakterisiert (Sanderik 2004). Ein besonderes Kennzeichen ist das Auftreten von kurzen aktiven und inaktiven Schüben, bzw. ruhenden Intervallen. Der röntgenologische Befund weist einen horizontalen und vertikalen Knochenabbau auf.

2.2 Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis

Die Hauptursache für das Entstehen der Parodontitis ist die bakterielle Infektion. Wesentlich ist die Ausbildung einer mikrobiellen Plaque, welche in mehreren Phasen erfolgt. Die Mikroorganismen, lokalisiert in der sub- und supragingivalen Plaque, stellen den wichtigsten pathogenen Faktor dar (Pfister und Eick 2001). Der mit parodontopathogenen Mikroorganismen besiedelte Biofilm induziert eine

Entzündungsreaktion in das umliegende Bindegewebe. Die induzierte Entzündungsreaktion ist in der Initialphase mit leukozytären Abwehrmechanismen und im weiteren Verlauf durch lymphozytäre Abwehrmechanismen, Makrophagen, Plasmazellen und extravaskulären Immunglobulinen gekennzeichnet (König 1987, Page et al. 1976., Hellwig, Klimek, Attin 1999). Die resultierende parodontale Destruktion findet hauptsächlich im Rahmen der Abwehrreaktion wirtseigener Zellen des Parodontiums durch lytische Enzyme neutrophiler Granulozyten (z. B. Elastase, Laktoferrin), aber auch durch Proteasen (z.B. Matrixmetalloproteasen) statt. Es folgt, wenn auch nur zu einem geringen Anteil, der Abbau von Bindegewebe und Knochen durch direkte Einwirkung bakterieller proteolytischer Enzyme und Zytokine (Nieminen et al. 1995).

Spezielle Zellwandstrukturen, die als Endotoxin oder auch als Lipopolysaccharide bezeichnet werden, besitzen ein hohes immunologisches Potential und verursachen eine starke Immunantwort des Wirtes (Teng 2003, Sanderink et al. 2004). Parodontopathogene Bakterien nutzen verschiedene Möglichkeiten, die Epithelbarriere zu überwinden. Sie bilden proteolytisch wirkende Enzyme (z. B. Hyaluronidasen, Kollagenasen). Matrixbestandteile und Kollagen werden denaturiert. Andere bakterielle Stoffe und Bakterien können somit in das Gewebe eindringen (Katz et al. 2000, Hintermann et al. 2002, Potempa et al. 2000). Die Wirtsantwort versucht, durch oxidative und nichtoxidative Mechanismen, die Bakterien zu eliminieren (Miyasaki et al. 1991). Das erworbene Immunsystem tritt nach einer Latenzzeit von 6 - 7 Tagen in Aktion. Dabei werden die Bakterien durch Antikörper opsoniert.

Die Pathogenese der Parodontitis wird durch eine Vielzahl von Risikofaktoren beeinflusst. Begünstigend für das Entstehen einer Parodontitis wirken Rauchen, Stress, Störungen des Stoffwechsels, z. B. Erkrankungen des Blutes, Immundefekte, Veränderungen im Hormonhaushalt, Fehl- und Mangelernährung, die zur Schädigung des Parodonts führen sowie mechanisch bedingte Traumata durch Okklusionsstörungen, falsche Putztechnik (Lang et al. 1985).

2.2.1 Parodontopathogene Bakterien

Mehr als 300 Arten von Mikroorganismen befinden sich in der Mundhöhle, aber nur einige wenige dieser Bakterien sind parodontopathogen. Folgende Mikroorganismen können beteiligt sein: *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* und andere Spirochäten, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Streptococcus intermedius*, *Prevotella nigrescens*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum* und *Eikenella corrodens* (Flemming et al. 1999). Allerdings werden diese Spezies auch mitunter bei parodontal gesunden Personen nachgewiesen, wie z. B. *A. actinomycetemcomitans*. Demgegenüber wurde *P. gingivalis* weder in gesunden noch bei Gingivitispatienten diagnostiziert (Dounoudomadacha et al. 2000). Die Vermehrung dieser Mikroorganismen ist von den ökologischen Bedingungen in der parodontalen Tasche, wie z. B. dem pH-Wert, dem osmotischen Druck, der Temperatur, der Eisenkonzentration und dem Antikörperspiegel abhängig (Holt et al. 1991).

Definierte Merkmale, die parodontopathogene Keime beschreiben, sind (Genco et al. 1996):

- Die Bakterien sind in einer großen Anzahl in progressiven Läsionen, verglichen mit ihrer Abwesenheit bzw. ihrer Anwesenheit in kleinen Zahlen nicht progressiver Läsionen, vorhanden.
- Der Wirt reagiert mit einer spezifischen Immunantwort.
- Deren Elimination hat Regeneration bzw. Reparation des erkrankten Gewebes zur Folge.
- Die Bakterien besitzen Virulenzfaktoren, die zur Manifestation der Erkrankung beitragen.
- Im Tierversuch wird eine ähnliche Gewebsdestruktion durch diese Keime erreicht.

2.2.1.1 *Porphyromonas gingivalis*

Im Jahre 1986 wurde diese Gattung definiert und umfasst schwarz pigmentierte, asaccharolytische bzw. nur schwach saccharolytische Stäbchenbakterien der Familie

Bacteroidaceae (Sanderik et al. 2004). Das gramnegative obligat anaerob Bakterium *P. gingivalis* ist eines der Organismen, das am meisten mit der chronischen Parodontitis assoziiert ist. Darüber hinaus konnte *P. gingivalis* bei Wurzelkanalinfektionen, anderen odontogenen Abszessen sowie aus dem Speichel und der Zungenoberfläche und Tonsillen von Parodontitispatienten isoliert werden (Loos et al. 1993).

P. gingivalis weist zahlreiche Virulenzfaktoren, wie Fimbrien, Hämagglutinine, Lipopolysaccharide, verschiedene bakterielle und proteolytisch wirkenden Enzyme, welche Proteasen genannt werden, auf. Proteasen sind zur Hydrolyse von Kollagen, Immunglobulinen, Eisenbindungsproteinen und Komplementfaktoren fähig (Lynch et al. 1999). Die Aufspaltung der Proteine dient zum Zweck der Nahrungsgewinnung. Somit wird ein Wachstum von *P. gingivalis* ermöglicht, was zu einer Zerstörung des Wirtsgewebes führt (Loesche et al. 1985). Unter allen parodontopathogenen Keimen weist *P. gingivalis* mit Abstand die größte proteolytische Aktivität auf (Eley et al. 2003, Courant et al. 1966). Spezielle Cysteinproteasen mit trypsinähnlicher Wirkung, die Gingipaine, sind für 85 % der proteolytischen Aktivität von *P. gingivalis* verantwortlich (Potempa et al. 1997). Die Gingipaine werden in verschiedene Gruppen aufgrund der Spaltung der Aminosäureresten unterteilt.

Gingipain R sind argininspezifische Cysteinendopeptidasen und werden von den Genen *rgpA* und *rgpB* transkribiert. Gingipain K ist eine lysinspezifische Endopeptidase und wird vom *kgp*-Gen transkribiert (Potempa et al. 2000). Gingipaine tragen wesentlich zur Virulenz von *P. gingivalis* bei. Gingipain R hat zum einen Einfluss auf die Kaskade der Blutgerinnung, wo durch die Gerinnung gesteigert wird, zum anderen kommt es durch Gingipain K zur Denaturierung von Fibrin und Fibrinogen und somit zur Verlängerung der Blutungszeit (Imamura et al. 2000). Es konnte bei Parodontitispatienten nachgewiesen werden, dass die Blutungstendenz mit der Anwesenheit von *P. gingivalis* korreliert (Albander et al. 1990). Wirtsproteine, die durch die Gingipaine in-vitro abgebaut werden, sind Proteine der extrazellulären Matrix, wie Laminin, Fibronectin und Kollagen des Typs III, IV und V (Potempa et al. 2000). Gingipain K ist zusätzlich für eine erhöhte vaskuläre Permeabilität, für eine verstärkte Bindung von Fimbrien an Fibroblasten

und die Zerstörung von Komplementfaktoren verantwortlich (Pike et al.1994). Die Ginigpaine sind weiterhin in der Lage, Interleukin-8 hydrolytisch zu spalten, wodurch die Rekrutierung von Leukozyten behindert wird (Darveau et al. 1998).

Ein Enzym, welches ebenfalls zur Virulenz dieses Organismus beiträgt, ist die Superoxiddismutase (Sanderik et al. 2004). Weiterhin wirken verschiedene Stoffwechselprodukte, wie z. B. Propionate, proinflammatorisch (Pöllänen et al. 1997).

2.2.1.2 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A. actinomycetemcomitans ist ein nichtbewegliches, gram-negatives, kapnophiles, fermentatives, und kokoides Stäbchen, welches einigen Hämophilusarten ähnlich ist, aber keine Wachstumsfaktoren X und V benötigt. Der Mikroorganismus kann bei der chronischen sowie bei der aggressiven Parodontitis auftreten (Fives-Taylor 1999). *A. actinomycetemcomitans* stellt den Leitkeim der lokalisierten aggressiven Parodontitis dar (Slot et al. 1999).

Die Spezies teilt sich in sechs Serotypen (a-f) auf, wobei ca. 10 % nicht mit serologischen Methoden typisierbar sind (Lakio et al. 2003). Studien zur Epidemiologie von *A. actinomycetemcomitans* zeigten, dass die Serotypen a und b häufig bei der lokalisierten juvenilen Parodontitis isoliert wurden. Der Serotyp c kam bei nicht oralen Infektionen sowie bei gesunden Personen vor, während die Serotypen d und e selten in der Gesamtbevölkerung auftraten (Kaplan et al. 2001). Die primäre menschliche Nische, in der das Bakterium vorkommt, ist die Mundhöhle. *A. actinomycetemcomitans* wurde in der sub- und supragingivalen Plaque, in parodontalen Taschen, auf der Zunge, auf den Tonsillen und in der Wangenschleimhaut bei 36 % der Normalbevölkerung nachgewiesen (Zamboon 1985, Asikainen et al. 1991, Müller et al. 2001). Als Virulenzfaktoren werden Kollagenasen, Proteasen, Hyaluronidasen, ein Fibroblasten hemmender Faktor, Lipopolysaccharide, Fimbrien und ein sehr starkes Exotoxin gebildet. Ein hochspezifisches, hitzestabiles Leukotoxin schädigt durch Veränderungen der Zellpermeabilität Makrophagen und PMN (Berthold et al. 1992, Kolodrubetz et al.1996, Paul-Satyaseela et al. 2006). Weiterhin bildet *A. actinomycetemcomitans* Pili, welche festsitzend an der Oberfläche haften können (Kaplan et al 2001). Einen

wichtigen Virulenzmechanismus stellt die Produktion von Proteinen dar, die den Fc-Teil der Immunglobuline binden. Somit kann der komplement- oder antikörperabhängige Immunmechanismus gestört werden. Das Haupt Fc-Bindungsprotein von *A. actinomycetemcomitans* wurde als modifizierbares äußeres Membranprotein (OMP) identifiziert (White et al. 1998). *A. actinomycetemcomitans* OMP 100 induziert die Produktion von Zytokinen und ist in die Adhäsion und Invasion von dem Bakterium in Epithelzellen involviert (Paul-Satyaseela et al. 2006).

Einen weiteren Virulenzfaktor von *A. actinomycetemcomitans* stellt das Cytolethal distending toxin (CDT) dar (Mayer et al. 1999, Shenker et al. 1999, Sugai et al. 1998). CDT ist verschlüsselt auf den drei Genen *cdtA*, *cdtB* und *cdtC*, welche ein Operon bilden. Die am besten beschriebene Wirkung von CDT ist die Fähigkeit, die Zellzyklusprogression durch Blocken von Zellen in der G₂Phase zu inhibieren (Comayras et al. 1999, Cortes-Bratti et al. Pickett et al. 1999). Diese Zellzyklusaktivität wurde bei Zellen in Zusammenhang mit Parodontitis nachgewiesen. Es besteht die Annahme, dass diese durch *A. actinomycetemcomitans* induziert wird (Belibasakis et al. 2002, Yamamoto et al. 2004).

2.2.1.3 *Tannerella forsythia*

Hierbei handelt es sich um ein fusiformes, jedoch pleomorphes, nicht bewegliches, nicht pigmentiertes, saccharolytische Stäbchenbakterium. *T. forsythia* ist in subgingivaler und als Kommensal in supragingivaler Plaque und Biofilmen anzutreffen. Diese Spezies wird häufig bei therapieresistenten Parodontitiden gefunden. Mit Hilfe von *P. gingivalis* ist es in der Lage, in das parodontale Gewebe einzudringen. Als weitere Virulenzfaktoren gelten Proteasen, Sialidasen, welche bei Lymphozyten Apoptose auslösen sowie toxische bzw. Antigene Zellwandbestandteile (Sanderik et al. 2004).

2.2.1.4 *Treponema denticola*

T. denticola gehört zur Familie der Spirochaetaceae. Es sind bewegliche, im Aussehen lange, schmale und korkenzieherähnlich gewundene Bakterien. Beim Menschen lassen sie sich aus reifer Plaque isolieren. Des Weiteren trifft man sie in

großer Zahl in aus Parodontaltaschen entnommener Plaque an. Virulenzfaktoren sind die Fähigkeit zur Adhärenz und zur Expression zytotoxischer Effekte, Abbau von extrazellulärer Matrix und Osteolyse, Aufnahme von Eisen und die Fortbewegung mit Hilfe von Flagellen (Sanderik et al. 2004).

2.3 Angeborene Immunantwort

Die Mundhöhle ist ständig einer Vielzahl von potenziell pathogenen Mikroorganismen ausgesetzt. Dennoch kommt es relativ selten zu Infektionen. Neben der gut erforschten mechanischen epithelialen Barriere wird neuerdings auch eine chemische Barriere diskutiert. Diese als antimikrobielle Peptide bezeichneten Stoffe stellen eine Art körpereigene Antibiotika dar.

Bestandteile der angeborenen Immunantwort sind unter anderem antimikrobielle Peptide (AMP's), wie die Cathelicidine (hCAP-18) und die Defensine (HNP1-3) sowie die neutrophile Elastase, die Cathepsine (CTSC) und die Proteinase.

AMPs sind Effektormoleküle mit direkter antimikrobieller Funktion sowie Mediatorfunktion (Pag et al. 2008, Huttner et al. 1999, Lehrer et al. 1999). Mikroorganismen werden in ihrem Wachstum inhibiert und abgetötet, in dem die Peptide mit den Biomembranen interagieren (Zasloff et al. 2002).

2.3.1 Antimikrobielle Peptide (AMP's)

2.3.1.1 Human Cathelicidin

Das humane Cathelicidin (hCAP-18) ist ein Vertreter der antimikrobiellen Peptide. Cathelicidine sind durch ein N-terminales Signalpeptid, eine hochkonservierte Prosequenz und ein strukturell variables, reifes Peptid am C-terminalen Ende charakterisiert (Gennaro et al. 2000). hCAP-18 ist das einzige beim Menschen gefundene Cathelicidin (Sorensen 2005). Es wurde in den peroxidase -negativen Granula von Neutrophilen, in verschiedenen Epithelien, Mastzellen und Subpopulationen von Lymphozyten und Monozyten nachgewiesen. LL-37 ist die biologisch aktive Domäne des Peptides und befindet sich in der Regel am C-Terminus des Proteins (Sorensen et al. 2001). Es zeigt eine breite antimikrobielle Wirkung gegen gramnegative und grampositive Bakterien, funktioniert als ein

immunmodulierendes Molekül, neutralisiert die Lipopolysaccharidaktivität und wirkt als Zellmembranrezeptor Agonist (Bucki et al. 2007). Es ist bekannt, dass das in den sekundären Granula neutrophiler Granulozyten gelagerte hCAP18 nach Stimulation durch Exozytose entlassen wird. Durch die anschließende Spaltung des Peptids entsteht hieraus, mit Hilfe von Protease 3 oder der neutrophilen Elastase, das reife LL-37 Peptid (Bucki et al. 2007).

2.3.1.2 Human Neutrophil Peptides 1-3

Die Humanen Neutrophilen Peptide 1-3 (HNP 1-3, α -Defensin) sind kleine, antimikrobielle und zytotoxische Peptide, die dem angeborenen Immunsystem zugerechnet werden. Sie bestehen aus 29-35 Aminosäuren (Ganz et al. 1990). Man unterscheidet α - und β -Defensine und eine dritte Gruppe von Theta-Defensinen. Sechs α -Defensine konnten identifiziert werden.

Vier Humane Neutrophil Peptide (HNP)1-4 die sich überwiegend in den azurophilen Granula von neutrophilen Granulozyten und zwei (HNP 5-6), die sich in den Panethzellen der Darmkrypten befinden. Das Defensin HNP 1-3 konnte im Speichel nachgewiesen werden (Abiko et al. 2003). Daneben gibt es β -Defensine (HBD), die in Epithelzellen von Haut, Lunge und Darm nachgewiesen wurden. Hier unterscheidet man 6 Subtypen. Die HBD 1-2 konnte auch im Speichel nachgewiesen werden (Abiko et al 2003).

2.3.2 Cathepsin C

Die Cathepsine bilden eine große Gruppe ubiquitär vorkommender lysosomaler Enzyme. Der Begriff Cathepsine hat seinen Ursprung im Griechischen (verdauen, zerkochen) und wurde im Jahre 1929 von Willstätter und Baumann geprägt. Cathepsine wurden in fast allen Geweben des menschlichen Körpers nachgewiesen. Besonders hohe Konzentrationen fand man in Niere, Milz, Leber und Makrophagen (Uchiyama et al.1994). Die Cathepsine sind am Auf- und Abbau von Proteinen beteiligt und sind somit Bestandteil von physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen (Takahashi et al.1982). Cathepsin C (CTSC) aktiviert die in den PMNs vorhandenen Serinproteasen Elastase, Cathepsin G und Proteinase 3 (de Haar et al. 2006, Sivaparvathi et al. 1996).

Diese proteolytischen Enzyme werden nach den katalytischen Zentren in Klassen eingeteilt. In Tabelle 1 ist die Einteilung der wesentlichen Cathepsine dargestellt (Durand et al. 2000).

Tab 1: Einteilung der Cathepsine

Name	Funktion
Cathepsin A	Carboxypeptidase
Cathepsin B	Cysteinprotease
Cathepsin C	Aspartatprotease
Cathepsin D	Serinprotease
Cathepsin H	Cysteinprotease
Cathepsine L	Cysteinprotease

Diese drei Enzyme spielen eine entscheidende Rolle in der Abwehr pathogener Spezies. Außerdem konnte man zeigen, dass Cathepsin G und Elastase fähig sind A. actinomycetemcomitans und Capnocytophagen zu eliminieren (de Haar et al. 2006). Elastase und Cathepsin G sind in der Lage, das Leukotoxin von A. actinomycetemcomitans zu neutralisieren.

2.3.3 Serinproteinasen

2.3.3.1 Neutrophile Elastase

Die neutrophilen Granulozyten sind die dominanten Leukozyten im gingivalen Taschenepithel und im angrenzenden Gewebe bei Gingivitis und Parodontitis (Christersson et al. 1987). Die neutrophile Elastase (NE) wurde in hohen Konzentrationen in der Sulkusflüssigkeit (GCF) von Parodontitispatienten und im Speichel von Parodontitispatienten gefunden (Cox et al. 2006). Sie wird von den Granulozyten in die GCF abgegeben und marginal der Gingiva mit dem Speichel vermischt. Die neutrophile Elastase (28kD) ist eine neutrale Serinproteinase, die im Zytoplasma der azurophilen Granula der Granulozyten gespeichert wird (Janoff et al. 1985). Das Polypeptidgrundgerüst besteht aus 218 Aminosäuren mit 2 Asn-gebundenen Kohlenhydratseitenketten (Asn95 und Asn144) (Bode et al. 1986, Sinha et al. 1987). Die neutrophile Elastase ist ein stark zerstörend wirkendes

Enzym, welches extrazelluläre Matrix abbauen kann. Zum Beispiel kann sie Komponenten des Bindegewebes Elastin, Kollagen und Proteoglykane sowie die Plasmaproteine IgG, C3 und C5 spalten (Starkey 1976, Solomon 1978).

2.3.3.2 Proteinase 3

Die Proteinase 3 (Prot3) gehört wie die Elastase und Cathepsin G zu den Serinproteinasen. Sie ist in der azurophilen Membran von neutrophilen Granulozyten und der Granula von Monozyten lokalisiert (Rao et al. 1991, Dewald et al. 1975, Gabay et al. 1986). Die primäre Funktion ist die Beteiligung am Abbau von extrazellulären Proteinen in Entzündungsarealen sowie die Regulation der Immunantwort. Die Proteinase3 kann neben der Elastase, Entzündungsmediatoren wie TNF- α (Robache gallea et al. 1995, Coeshott et al. 1999), IL-1 β (Coeshott et al. 1999) sowie den IL-2-Rezeptor (Bank et al. 1999) aktivieren.

2.4 Antioxidative und oxidative Mechanismen

2.4.1 Bedeutung von reaktiven Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) spielen eine potentielle Rolle in der Pathogenese des Parodonts. Die entzündliche parodontale Erkrankung ist ein komplexes Geschehen, einbezogen in ein Ungleichgewicht von enzymatischen und nicht enzymatischen zerstörenden Mechanismen. ROS werden vorwiegend durch polymorphkernige Leukozyten während einer entzündlichen Reaktion gebildet und wirken zerstörend auf die Umgebung (Waddington et al.2000). Bei aggressiver und chronischer Parodontitis werden von den polymorphkernigen Leukozyten vermehrt reaktive Sauerstoffspezies produziert. Die Bedeutung von ROS bei parodontaler Erkrankung ist nicht eindeutig geklärt, antioxidative Mechanismen wirken zudem modulierend. ROS-Moleküle sind fähig, parodontales Gewebe zu zerstören. Sie sind assoziiert mit der Knochenresorption durch Osteoklasten (Chapple et al 2000). Neue Therapien zielen auf die Reduktion von oxidativen Stress im Gewebe auf zellulärer Ebene (McCord et al. 2000).

2.4.1.1 Freie Radikale und Radikalentstehung

Radikale sind Moleküle oder Atome, die ungepaarte Elektronen in ihrer äußeren Atomhülle aufweisen und deshalb sehr instabil und reaktionsfähig sind (Battino et al. 2002, Basu et al. 1999). Die wichtigsten reaktiven Sauerstoffderivate, in der Reihenfolge abnehmender Reaktivität aufgeführt, sind OH^\bullet (Hydroxyradikal), O_2 (Singulett-Sauerstoff) HO_2^\bullet (Hydroxyperoxyradikal), $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Superoxidradikal), RO^\bullet (Alkoxyradikal), ROO^\bullet (Peroxyradikal) und H_2O_2 (Wasserstoffperoxid). Zur Bildung dieser reaktionsfreudigen Substanzen tragen endogene enzymatische Redoxreaktionen und viele exogene Faktoren bei.

Zu den endogenen Radikalquellen zählen die mitochondriale Atmungskette, der Arachidonsäuremetabolismus, der Purinabbau sowie die mikrosomale NAD(P)H-Oxidase und Myeloperoxidase neutrophiler Granulozyten. Exogene Radikalquellen sind Genussgifte (Alkohol, Nikotin), Luftverschmutzung, UV-, Röntgen- und radioaktive Strahlung sowie Medikamente. Auch Autooxidationsreaktionen, die nichtenzymatisch in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck ablaufen, fördern die Radikalentstehung. (Siems, W.G. et al. 1998).

Freie Radikale verursachen den sogenannten oxidativen Stress, der letztendlich häufig in Zellapoptose oder Nekrose endet (Helliwell et al. 1994).

Radikale entstehen in Endothelzellen, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Durch Entzündungsmediatoren stimulierte Makrophagen und neutrophile Granulozyten haben einen gesteigerten Verbrauch an Sauerstoff und Glukose (Respiratory burst) und können in erheblichem Maße zur Bildung von reaktiven Substanzen führen (Rosen, G.M. et al. 1995). Eine Anreicherung von Schwermetallen, wie Kadmium, Blei oder Quecksilber kann die Radikalbildung zusätzlich begünstigen. Auch Eisen und Kupfer haben als Katalysatoren einen Einfluss auf die Radikalbildung und die nachfolgende Lipidperoxidation (Stohs, S.J. et al. 1995). Eisen ist an der Entstehung von Hydroxyradikalen oder Ferrylverbindungen in der Fenton-Reaktion und von Peroxy- bzw. Hydroxyperoxyradikalen in der Haber-Weiss -Reaktion beteiligt (Abbildung 1, Henle et al. 1997, Kehrer 2000).

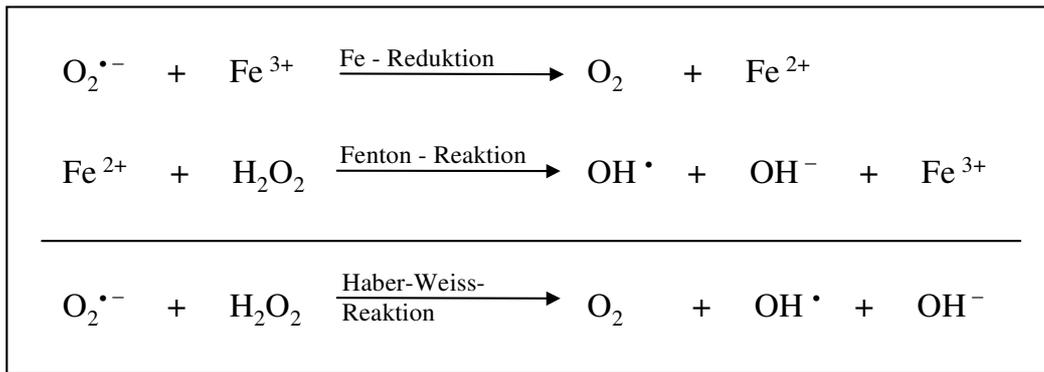


Abb 1: Fentonreaktion, Haber-Weiss-Reaktion (nach Joseph Weiss)

In ähnlicher Weise wie Eisen reagieren Kupferionen. So kann durch Kupfer die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und die Peroxidation von Membranlipiden katalysiert werden. Außerdem steigert Kupfer durch Oxidation die Zytotoxizität von Hydrochinonen, die wiederum DNS-Doppelstrangbrüche verursachen kann (Stohs, S.J. et al. 1995).

2.4.2 Oxidative Mechanismen

Zu dem oxidativ wirkenden Enzymsystem zählen die Myeloperoxidase (MPO) und die Lipidperoxidase (LPO).

2.4.2.1 Myeloperoxidase

Die MPO wurde erstmals 1941 isoliert. Eine MPO-Defizienz wurde 1954 beschrieben (Sheik et al. 2004). Die MPO ist ein Enzym, das zwei Hämgruppen enthält. Das Absorptionsspektrum ist durch einen hohen Soret Peak bei $\lambda_{\text{max}}=430$ nm und durch schwächere Banden bei 570, 620 und 690 nm charakterisiert (Harrison et al. 1976). Die MPO wird in den azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten und in Monozyten gespeichert (Hussam u. Stanley, 1999). Sie kann bereits während der Reifung der Granulozyten im Knochenmark in den Granula nachgewiesen werden (Petrides et al. 1998). Neutrophile Granulozyten werden während des Entzündungsprozesses aktiviert. Sie zerstören eingedrungene Mikroorganismen durch die Freisetzung toxischer Stoffe aus ihren Granula oder durch die Bildung von Sauerstoffmetaboliten (Weiss et al. 1989). Die neutrophilen Granulozyten werden nicht nur durch die Freisetzung von Zytokinen angelockt,

sondern auch durch die MPO im entzündeten Gewebe (Johannsson et al. 1979). Es kommt zu einem Verschmelzen der Granula mit dem Phagosom. Dabei werden Lysozyme, Hydrolasen und Lactoferrin in die Vakuole, jedoch nicht in das Cytosol der neutrophilen Granulozyten freigesetzt. Zu diesem Zeitpunkt findet der sogenannte „respiratory burst“ statt. Der Sauerstoffverbrauch steigt dabei um ein vielfaches an, nachfolgend entsteht Superoxidanion:



Anschließend läuft die Reaktion der Superoxiddismutase unter Bildung der Hydroxylradikale ab. Die MPO katalysiert jetzt die Reaktion:



Kettle et al. (1997) bewiesen in verschiedenen Untersuchungen, dass Superoxid nicht nur als Wasserstoffquelle dient, sondern auch direkt mit der MPO und ihren Produkten reagiert.

2.4.2.2 Lipidperoxidation

ROS induzieren die Lipidperoxidation mit zusammenhängenden Effekten in den Zellen (Guerin et al. 2001). Dieser Prozess beginnt, wenn ungesättigte Fettsäuren in Membranen oder Lipoproteinen mit ROS interagieren. Im Ergebnis der LPO-Kette werden die Fettsäuren zu Primär/Hauptprodukten der Lipidperoxidation oder zu sekundären Metaboliten umgewandelt (Little et al. 1999, Abbildung 2).

LH (ungesättigte Fettsäure) \rightarrow L \cdot (Lipidradikal)

L \cdot + O $_2$ \rightarrow LOO \cdot (Lipidperoxyradikal)

LOO \cdot LH \rightarrow LOOH (Lipidperoxid) + L \cdot

Abb 2: Reaktion im Rahmen der Lipidperoxidation (nach Black Hommer 1987, Fuchs 1993)

Die unkontrollierte Produktion von Lipidperoxiden kann zu oxidativen Stress mit signifikanter Zerstörung der Zellintegrität führen (Little et al. 1999, Marnett 1999). Die Lipidperoxidation ist ein Ergebnis des oxidativen Stresses. Verschiedene Marker steuern diesen Prozess.

Ein Marker ist das sogenannte Malondialdehyd (MDA). Die Hydroperoxide der Fettsäuren zerfallen auf Grund ihrer chemischen Instabilität rasch in Alkane, aliphatische und ungesättigte Aldehyde. Dabei entsteht auch das Malondialdehyd, welches zu den sogenannten sekundären Lipidperoxidationsprodukten gezählt wird und die Eigenschaft besitzt, Proteine und Lipide zu vernetzen. Es entfaltet seine toxischen Wirkungen durch verschiedene Mechanismen auf diversen zellulären Ebenen. Zu diesen Mechanismen gehören Reaktionen mit der DNA, fehlerhafte Transkriptionen und damit veränderte Genprodukte oder Funktionsstörungen intrazellulärer Proteine. Außerdem führen Lipidhydroperoxide zur Störung der Barrierefunktion und weiterer elementarer chemischer und physikalischer Eigenschaften der Zellmembran, mit dem Ergebnis, dass die Membranfluidität ab und die Rigidität zunehmen.

2.4.3 Antioxidative Mechanismen

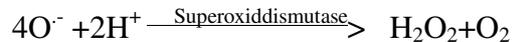
Der Schutzmechanismus gegen oxidativen Stress in der Pathogenese der Parodontitis hat an Bedeutung gewonnen. Es werden enzymatische und nichtenzymatische Antioxidantien unterschieden. Die nichtenzymatischen Antioxidantien wiederum lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Endogene antioxidative Stoffe werden vom Organismus selbst synthetisiert und können sich der oxidativen Belastung in gewissen Maßen anpassen. Dazu zählen unter anderem Harnsäure, Glutathion und das kupferhaltige Coeruloplasmin. Die exogenen Antioxidantien, die mit der Nahrung aufgenommen werden müssen, sind vor allem essentielle Spurenelemente und Vitamine, wie Selen, Kupfer, Zink, Vitamin E und C sowie Betacarotin als Vorstufe des Vitamin A (Winnefeld, K. et al. 1995).

Der sekundäre antioxidative Schutzmechanismus wird durch die Katalase, Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase beschrieben (GOI et al. 2007). Diese Enzyme spielen eine wichtige Rolle beim Abfangen und Inaktivieren von Sauerstoffmetaboliten (Davies K.J. et al. 1995). Sie kommen im Zytosol und in den Mitochondrien vor.

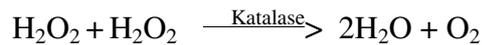
Die im Zytosol vorhandene Superoxiddismutase (SOD) ist mangan- oder kupferzinkabhängig (MnSOD, CuZnSOD). Eisen, Kupfer und Zink nehmen als enzymatische Kofaktoren sowohl strukturelle und katalytische Funktionen wahr, ohne

die keine vollständige Enzymaktivität erreicht werden kann (Hassan, H.M. et al. 1981).

Die Reaktion der Superoxiddismutase ist:

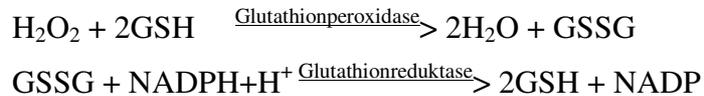


Die Katalase katalysiert Wasserstoffperoxide. Die Reaktion durch die Katalase ist nach McCord (McCord 2000):



Neben Superoxiddismutase, Katalase und Peroxidase, ist das Glutathionsystem eines der wichtigsten antioxidativ wirkenden Enzymsysteme (Meister 1989). Es besteht aus dem Tripeptid Glutathion, der Glutathionperoxidase und der Glutathionreduktase. Glutathion kommt hauptsächlich intrazellulär in reduzierter Form vor und nur zu einem geringen Teil als Glutathiondisulfid. Es ist aus den Aminosäuren Glutamat, Glycin und Cystein zusammengesetzt. Die Sulfhydrylgruppe der Cysteiny-Seitenketten ist die reaktivste Gruppe des Glutathion-Moleküls und kann als nukleophiles Zentrum direkt Radikale abfangen. Zusätzlich trägt Glutathion über Glutathion-S-Transferasen zur Entgiftung von toxischen Substanzen und Xenobiotika bei. Es entstehen Glutathion-S-Konjugate, die dann letztendlich als Cystein-Produkte ausgeschieden werden. Außerdem ist Glutathion unter anderem wichtig für die Regenerierung von anderen Antioxidantien, wie Vitamin C und E sowie für die Aufrechterhaltung der Funktion von Plasmaproteinen und -peptiden (Siems et al. 1996). Die Plasma Glutathionperoxidase ist ein wichtiges extrazelluläres Antioxidant, welches hauptsächlich in den Nieren produziert wird und in zahlreichen Körperflüssigkeiten des Menschen zu finden ist. Die Glutathionperoxidase ist ein selenbindendes Enzym, welches Wasserstoffperoxide und verschiedene Wasserstoffperoxide, die Glutathion als Reduktionsmittel benötigen, entgiftet. Es wurde gezeigt, dass einige parodontopathogene Bakterien die Fähigkeit besitzen, Glutathion und Cysteine für den Wasserstoffsulfid-Aufbau zu nutzen. Darüber hinaus wird NF-κB aktiviert und so die Bildung proinflammatorische Zytokine, welche das Gewebe zerstören, induziert (Wei et al. 2004).

Die Reaktionen von Glutathionperoxidase und Glutathionreduktase sind (Battino et al. 1999):



Die Glutathionperoxidase besteht aus vier Untereinheiten, an die jeweils ein Atom Selen gebunden ist. Selen trägt so als ein wesentlicher Bestandteil des Enzyms entscheidend zu dessen Funktion bei. Glutathionperoxidase katalysiert die Reduktion von Wasserstoffperoxid und anderen organischen Hydroperoxiden. Dabei wird das reduzierte Glutathion zu Glutathiondisulfid oxidiert, das nachfolgend durch die NADPH+H⁺-abhängige Glutathionreduktase wieder reduziert wird. Das Enzym besitzt in der Leber und den Erythrozyten die höchsten Aktivitäten. Mit seinem zytosolischen und mitochondrialen Vorkommen hat es eine wichtige Schutzfunktion für Plasma- und Mitochondrienmembran. Somit trägt es entscheidend für den Erhalt der Zellfunktionen bei (Flohe, L. 1988).

Die Harnsäure ist ein relativ starkes Antioxidant von wasserlöslichen Radikalen, vor allem von Hypochloridsäure und Einfachsaurestoff. Es besitzt die Fähigkeit Kupfer sowie Eisen zu binden (Davies 1986). Die Reaktion von Harnsäure mit einigen Radikalen (zum Beispiel OH) lässt Harnsäureradikale entstehen. Diese können aber leicht durch Ascorbate entfernt werden (Halliwell et al. 1990). Die Harnsäure ist im Speichel und in der GCF zu finden (Moore et al. 1994).

2.5 Erworbene Immunantwort

Die menschliche Immunantwort, besonders die Produktion von Immunglobulin G (IgG) und Immunglobulin A (IgA), hat eine schützende Rolle in der Entstehung von parodontalen Erkrankungen (Takahashi et al. 1982).

2.5.1 Immunglobulin A

Immunglobulin A ist das dominierende Immunglobulin im Speichel und spielt eine wichtige Rolle im Immunsystem. IgA übt eine antientzündliche Schutzfunktion aus und reguliert die Entzündung bei gehemmter Immunglobulin G (IgG) und

Immunglobulin (IgM)-Funktion herab. Weitere Funktionen dieses Immunglobulins sind die Virusneutralisation, Hemmung der Bakterienkolonisation durch Binden an Epithelzellen oder in der Plaque. In der Mundhöhle erleichtert die Beseitigung der Bakterien die Interaktion des sekretorischen Immunglobulin (s-IgA) mit bakteriellen Rezeptoren (Lie et al. 2007). Man nimmt an, dass die Hauptfunktion der IgA-Antikörper darin besteht, die epithelialen Oberflächen vor Krankheitserreger zu schützen (Dörries 2004). IgA steigert die antimikrobielle Aktivität von Laktoferrin, der Speichelperoxidase, des Agglutinins und des Muzins (Marcote et al. 1998).

Es existieren zwei Unterklassen von IgA, die Unterklasse A1 und A2. Der Unterschied befindet sich in der Fc-Domäne, welche die Gruppe A1 kennzeichnet. Die Unterklasse IgA2 ist durch Proteasen nicht leicht zu spalten und zu inaktivieren (Hägewald et al.). S-IgA (sekretorisches IgA) wurde in den Sekreten des Gastrointestinal-, Respirations-, und Urogenitaltraktes sowie in den Speichel-, Tränen- und Brustdrüsen gefunden. Diese IgA-Untergruppen werden unterschiedlich in den Körperflüssigkeiten sezerniert (Conley et al. 1987). Die Gründe für den relativen hohen Anteil von IgA2 im Speichel sind im Transport von den weit entfernt liegenden produzierenden Gewebe und teilweise zunehmender Zahl von IgA2-enthaltenen Plasmazellen im exokrinen Gewebe zu suchen. Die Änderung der IgA1- und IgA2-Konzentration im Speichel ist ein Resultat von verschiedener Antigenstimulation in der Mundhöhle. (Crago et al. 1984; Brown and Mestecky 1985). Gesamt s-IgA und spezifisches s-IgA reagieren mit Zellextrakten von *A. actinomycetemcomitans*, *A. naeslundii*, *C. rectus*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigresens*, *P. micros*, *T. denticola*, *Candida albicans*, *Streptococcus gordonii* and *Streptococcus mutans* (Lie et al. 2002 und Hägewald et al. 2001).

2.5.2 Immunglobulin G

Neben IgA spielt auch Immunglobulin G (IgG) eine wichtige Rolle bei der Immunität der Schleimhaut. IgG ist im gesamten Speichel vorhanden. Dieses stammt vom Serum und gelangt durch passive transmukosale Diffusion dorthin (Sitig et al. 2002).

Das IgG ist in vier Untergruppen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 zu finden (Takahashi et al. 1997). IgG ist der häufigste Isotyp im Blut und in extrazellulären Sekreten, wie

GCF (Dörries 2004). IgG opsoniert effizient pathogene Mikroorganismen für die Aufnahme durch Phagozyten und aktiviert das Komplementsystem, während IgA ein weniger gutes Opsonin ist und das Komplementsystem kaum aktiviert. IgG2 ist die überwiegend vorkommende Untergruppe und wird auf Reaktion mit bakteriellen Lipopolysacchariden produziert. Speichel IgA - und IgG - Untergruppen wurden bei oralen Erkrankungen noch nicht umfassend analysiert (Sitig et al. 2002).

2.6 Speichel als diagnostisches Medium

Der Speichel ist das erste Medium, mit dem externe Materialien, wie Essen, Getränke, inhalierten Stoffen, in Kontakt treten (Goi et al. 2007).

Der Speichel ist eine komplexe Mischung, welche zum einem durch die Gänge der drei paarig großen Speicheldrüsen, der Parotis, der Submandibularis sowie der Sublinguales und zum anderem durch die Gänge der kleinen Speicheldrüsen, in die Mundhöhle gelangen. Der Speichel besteht zu 99 % aus Wasser. Weiterhin sind Glykoproteine (Lactoferrin, IgA, IgG, Amylase), Proteine, Hormone, Vitamine und andere Ionen vorhanden. Die Speichelfließrate beeinflusst die Konzentration der im Speichel enthaltenen Stoffe. Generell führt eine schwach erhöhte Sekretionsrate zu einem erhöhten Anteil an Natrium, Bikarbonat sowie einem erhöhten pH-Wert und einem erniedrigten Gehalt an Kalium, Kalzium, Phosphat, Chlorid, Harnstoff und Proteinen. Bei einer gesteigerten Sekretionsrate sind die Konzentration von Natrium, Calcium, Chlor, Bikarbonat und Proteinen erhöht, da eine geringere Konzentration von Phosphaten vorliegt. Speichel hilft den Zähnen ihre Integrität durch die Bereitstellung von Ionen vor allem Kalzium, Phosphate, Magnesium und Fluoride für die Remineralisierung von Zahnschmelz aufrechtzuerhalten (Marcotte et al. 1998).

3 Zielstellung

Neben der Erhebung klinischer Parameter hat die Untersuchung diverser Speichelparameter in den letzten Jahren an Aufmerksamkeit gewonnen. Eine erhöhte oxidative Belastung im Speichel konnte bei entzündlichen Vorgängen nachgewiesen werden. Veränderungen im antioxidativen System wurden ebenfalls erkannt. Auch Veränderungen der immunologischen Werte sind nachweisbar.

Die vorliegende Arbeit sollte folgende weitere Fragen beantworten:

- Bestehen Unterschiede zwischen Patienten mit aggressiver Parodontitis, chronischer Parodontitis und parodontal gesunden Personen in Bezug auf oxidative Parameter (Lipidperoxidase, Myeloperoxidase) und dem antioxidativem Status (Katalase, Glutathionperoxidase, Superoxiddismutase, Harnsäure) sowie immunologischen Parameter der angeborenen und erworbenen Immunität im Speichel?
- Eignen sich diese Speichelparameter zur Diagnostik der Parodontitis?
- Kann mit Hilfe dieser Speichelparameter unterschieden werden, ob eine chronische oder eine aggressive Parodontitis vorliegt?

4 Material und Methoden

4.1 Auswahl der Probanden

Für die vorliegende Studie wurden 22 Patienten mit Parodontitis (chronische und aggressive Parodontitis) des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde sowie 19 parodontal gesunde Studenten der Zahnmedizin (Kontrollgruppe) und anderer Fachrichtungen rekrutiert.

Als Kriterien für die Patientengruppe wurde eine Sondierungstiefe $\geq 3,5$ mm an mindestens fünf Zähnen festgelegt. In die Kontrollgruppe wurden nur Personen mit Sondierungstiefen $< 3,5$ mm aufgenommen. Alle Teilnehmer dieser Studie waren Nichtraucher. Weitere Einschlusskriterien waren das Vorhandensein von mindestens 20 in Funktion stehenden Zähnen. Die Probanden durften keine schweren Allgemeinerkrankungen aufweisen. Weitere Ausschlusskriterien waren Schwangerschaft und Stillen sowie die Einnahme von Antibiotika während der letzten drei Monate sowie eine systematische Parodontistherapie während der letzten 12 Monate.

Nach klinischer und röntgenologischer Untersuchung unter Einbeziehung der mikrobiologischen Analyse wurde folgende Einteilung vorgenommen: 15 Probanden wiesen eine chronische Parodontitis (cP) auf, 7 hatten eine aggressive Parodontitis (aP) und 19 waren parodontal gesund (K). Die Alters- und Geschlechtsverteilung ist der Tabelle 2 zu entnehmen.

Tab. 2: Alters- und Geschlechtsverteilung in den Gruppen

	durchschnittliches Alter (Jahre)	Geschlecht (m:w)
aP	38,42 \pm 11,35	5:2
cP	59 \pm 3,03	9:6
K	26 \pm 2,61	7:12

Die Patienten befanden sich in der Initialtherapie unmittelbar vor der Kürettage. Die Entfernung von sub- und supragingivalen Konkrementen wurde durch die

Fachschwester vorgenommen. Die Taschentiefen, der Lockerungsgrad, der Blutungsindex und der Plaqueindex wurden ermittelt. Danach wurden Plaqueproben für die mikrobiologische Analyse an den jeweils tiefsten Stellen eines Quadranten sowie Speichelproben für die weitergehenden diagnostischen Untersuchungen entnommen.

4.2 Klinische Befundaufnahme und Mikrobiologische Analyse

4.2.1 Parodontalstatus

4.2.1.1 Mundhygienestatus

Der Mundhygienestatus wurde mit Hilfe des Approximalplaqueindex (API) ermittelt. Die Beurteilung der Approximalplaqueablagerung erfolgte im ersten und dritten Quadranten oral und im zweiten und vierten Quadranten vestibulär durch eine Ja/Nein Entscheidung. Der API berechnet sich nach folgender Gleichung(Hellwig et al. 1999):

$$\text{API} = \frac{\text{Summe der positiven Plaquemessungen} \times 100}{\text{Summe der Approximalraum Meßpunkte}}$$

Der API wird folgendermaßen eingeteilt:

API < 25% entspricht einer optimalen Mundhygiene

API 25-39% entspricht einer guten Mundhygiene

API 40-69% entspricht einer mäßigen Mundhygiene

API 70-100% entspricht einer unzureichenden Mundhygiene

4.2.1.2 Blutungsindex

Die Dokumentation der Blutung erfolgte während der Untersuchung. Es wurde eine Ja/Nein Entscheidung (Bleeding on Probing) getroffen.

4.2.1.3 Lockerungsgrad

Die Zahnbeweglichkeit wurde manuell mit zwei stabilen Instrumentengriffen horizontal getestet. Die Auslenkung wurde visuell beurteilt. Die Lockerungsgrade I-III wurden nach der Einteilung der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie festgelegt. Der Grad 0 ist die physiologische, nicht erhöhte Zahnbeweglichkeit. Eine erhöhte Zahnbeweglichkeit (Grad I) ist spürbar oder bis 1 mm sichtbar. Ist die erhöhte Beweglichkeit über 1 mm sichtbar, spricht man vom Grad II. Beim Grad III liegt eine erhöhte Beweglichkeit auf Lippen- und Zungendruck in/oder axialer Richtung vor (Hellwig et al. 1999).

4.2.1.4 Sondierungstiefe

Die Bestimmung der Sondierungstiefe erfolgte durch die Sechspunktmessung mit einer millimetergraduierten Parodontalsonde (Hu freidy). Als Referenzpunkt diente der Abstand zwischen Taschenboden und marginaler Gingiva.

4.2.2 Molekularbiologische Methoden zur Identifizierung mikrobieller Organismen

Molekularbiologische Methoden werden vermehrt zur Labordiagnose von Infektionen eingesetzt. Haupteinsatzgebiet ist der direkte Nachweis von Bakterien, die sich nicht kultivieren lassen, nur schwer kultivierbar sind oder sehr langsam wachsen.

4.2.2.1 Plaqueprobenentnahmen

Eine Papierspitze (ISO 30), ohne farbliche Markierung, wurde in die 4 tiefsten Taschen eingeführt. Nach 20 s erfolgte die Entfernung der Papierspitze aus den Taschen und die Lagerung bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung.

4.2.2.2 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion aus Plaqueproben wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt. Aus den entnommenen Plaqueproben wurde die DNA wie folgt isoliert:

In jedes Probenröhrchen wurde zu der mit Papierspitze 100 µl Trispuffer pipettiert, 30 s gevortext und kurz anzentrifugiert. Anschließend wurden 200 µl Total Lysepuffer und 20 µl Proteinase K hinzugefügt und für 20 s mit dem Vortex vermischt. Diese Proben wurden zunächst für 20 min bei 37° C und folgend für weitere 5 min bei 70° C inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 2 min bei 14000 Umdrehungen/min. Der dabei entstandene Überstand wurde in das Auffanggefäß des Filter-Tubes übertragen.

Dieses wurde 1min bei 14000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Der Filtertube wurde wieder in das Auffanggefäß gesetzt, 500 µl Waschpuffer zupipettiert und bei 14000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Der Filtertube wurde in ein neues 2ml Tube eingesetzt, 400 µl Waschpuffer zupipettiert und 2 min bei 14000 zentrifugiert. Die Auffanggefäße wurden verworfen und das Filtertube in ein sauberes 1,5 ml Eppendorf-Tube eingesetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von dem zuvor auf 75°C erhitzten Trispuffer. Die entstandene Lösung wurde bei Raumtemperatur 5 min inkubiert und anschließend zentrifugiert. Das Filtertube wurde verworfen und die Reaktionsgefäße verschlossen. Das entstandene DNA-Extrakt wurde für die Real-Time PCR weiterverwendet.

4.2.2.3 Bestimmung der Mikroflora mittels Real-Time PCR

Die PCR erlaubt eine millionenfache selektive Vervielfältigung einer bestimmten DNA-Sequenz. Die Spezifität dieser Reaktion für eine ausgesuchte Sequenz in der Ziel-DNA wird durch die Verwendung von spezifischen Oligonukleotideprimern erreicht.

Die Real-Time PCR wird allgemein durch die Messung der DNA-Menge in „Echtzeit“ charakterisiert, welche sich in einem Reaktionsgefäß an DNA-spezifischen Farbstoff anlagern kann. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde der Sybr[®]Green (Bio-Rad, Eugene, Oregon, USA) verwendet. Sybr[®]Green lagert sich an die doppelsträngige DNA an, wird bei $\lambda= 470$ nm zur Fluoreszenz angeregt und bei $\lambda=510$ nm digital gemessen (Corbett 2000). Exponentielle Wachstumsraten der DNA-Amplifikate, ergeben sich bei korrekter Amplifikation. Diese lassen sich durch eine überproportionale Zunahme der Fluoreszenzsignale nachweisen.

Für die Real-Time PCR wurden folgende Reagenzien pro Probe in ein 1,5 oder 2 ml Reaktionsgefäß überführt:

- 2 µl 10fach Puffer
- 2 µl MgCl₂ (25 mM)
- 2 µl Nukleotide
- 1 µl Primer 1
- 1 µl Primer 2
- 1 µl Sybr[®]Green
- 1 µl taq Polymerase (1U)
- 8 µl ddH₂O

Des Weiteren wurden eine Verdünnungsreihe der untersuchten Bakterienspezies von 10⁷ bis 10³ als Standard mitgeführt, ergänzt durch eine Negativkontrolle bestehend aus 18 µl Mastermix und 2 µl ddH₂O. Die anderen Reaktionsgefäße enthielten jeweils 18 µl Mastermix und 2 µl DNA.

Die Primer wurden zur Amplifikation bakterienspezifischer 16S rDNA-Abschnitte ausgerichtet. Die Auswahl der Primer erfolgte nach Literaturrecherche. Nach Literaturstudium und Bestimmung der Sensitivität und Spezifität erwiesen sich die von Ashimoto et al. (1996) beschriebenen Primer für die Bestimmung von *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* als geeignet. Die Primer für den *A. actinomycetemcomitans* wurde von Tran und Rudney (1999) beschrieben (Tabelle 3).

Als Kontrollen dienten die Stämme *P. gingivalis* ATCC 33277, *T. denticola* ATCC 35405 und *T. forsythia* ATCC 43037 in einer Konzentration von 10⁶ Keimen. Es handelt dabei sich um gut charakterisierte Stämme.

Tab. 3: Übersicht zu den verwendeten Primern

PCR Primerpaare	Quelle
<p><i>P. gingivalis</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pg-1: 5`AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG 3` • Pg-2: 5`ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT3` 	Ashimoto et al., 1996
<p><i>A. actinomycetemcomitans</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aa-1: 5`ATT GGG GTT TAG CCC TGG TG3` • Aa-2: 5`ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC3` 	Tran & Rudney, 1999
<p><i>T. forsythia</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tf-1: 5`GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA3` • Tf-2: 5`TGCT TC AGT GTC AGT TAT ACC T3` 	Ashimoto et al., 1996
<p><i>T. denticola</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Td-1: 5`TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T3` • Td-2: 5`TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC.TTA3` 	Ashimoto et al., 1996

4.3 Speichelanalysen

4.3.1 Speichelprobenentnahme:

Die Patienten und Probanden wurden gebeten für 10 min den im Mund gesammelten Speichel über einen Glasrichter in ein Röhrchen abzugeben. Dabei wurde darauf geachtet, dass dieser nicht stimuliert und stressfrei sezerniert wurde, um Ruhespeichel zu erhalten. Die Probenentnahme erfolgte vormittags, um Fehlern tageszeitlicher Schwankungen der Speichelsekretion vorzubeugen. Das Sammelgefäß wurde leer und mit Speichel gewogen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Proben bei 3500 Umdrehungen. Der Überstand wurde in ein 10 ml Reaktionsgefäß portioniert und bei -20°C tiefgefroren.

4.3.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Messung des Proteingehaltes erfolgte mit dem Nanodrop. Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurden 2 µl Speichel auf das Gerät pipettiert und die Extinktion mit einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gemessen. Daraus konnte nach der folgenden Formel der Proteingehalt in mg/ml angegeben werden:

$$\text{Proteingehalt} = \frac{260\text{nm}-280}{2,51} = \text{mg/ml}$$

4.3.3 Bestimmung von antimikrobiellen Peptiden

Die Speichelproben wurden zur Analyse der antimikrobiellen Peptide hCAP18 und HNP1-3 an der Universität in Krakau untersucht. Die HNP1-3 wurde mit dem ELISA bestimmt. Die Aktivität von hCAP18 wurde mit Hilfe des Western Blot gemessen.

4.3.4 Bestimmung der Aktivität von Proteasen

Die Aktivitätsmessung der proteolytisch wirkenden Enzyme NE, CTSC sowie Prot3 erfolgte ebenfalls an der Jagiellonen-Universität Krakau.

4.3.5 Oxidative Parameter

4.3.5.1 Bestimmung der Lipidperoxidation

Die Ermittlung des Maßes an Lipidperoxidation wurde am Nanotrop spektrometrisch durchgeführt.

Dazu wurden 100µl Speichelprobe, 300 µl 1,35 mM TCA, 300 µl 20 mM TBA und 40 µl 8,1%iges SDS in einem Kulturröhrchen mit Schraubenverschluss vermischt. Diese Lösung wurde 1h bei 90° inkubiert und anschließend sofort auf Eis gelegt. Es wurden 200 µl H₂O und 1 ml Butanol hinzugefügt, bei 4°C 20 min geschüttelt und 10 min bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei 537 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte anhand eines Standards. Zur Herstellung der Standardlösung wurde Malondialdehyd-Tetrabutylammoniumsalz in 100 ml H₂O gelöst. Die Bezugslösungen waren 0; 2,5; 7,5,10 µM MDA-

Stammlösung. Je 0; 50; 100; 150 und 200 µl MDA-Stammlösungen zu 5ml ddH₂O gegeben.

4.3.5.2 Bestimmung des Gehalts an Myeloperoxidase als Maß für die Anzahl polymorphkerniger Granulozyten (PMNs)

Die Aktivität der Myeloperoxidase wurde fotospektrometrisch bei 450 nm nachgewiesen. Dazu benötigt man Substrat mit und ohne Hemmstoff. Auf Mikrotiterplatten wurden 40 µl Probe und 160 µl Substrat mit und ohne Hemmstoff pipettiert, gemessen(t₀), bei 37°C inkubiert und wieder gemessen.

Das Substrat setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen: 10 ml 0,1 M Na-Citrat-Puffer, pH-Wert 5,5; 64 µl 20% Triton-X-100; 100 µl 20,1 mg/ml O-Dianisidin/DMSO (82,4 mM O-Dianisidin; 40 µl 26,4 mM H₂O₂ (3Teile µl 3 % H₂O₂ und 97 Teile H₂O). Das Substrat mit Hemmstoff besaß die oben genannte Zusammensetzung und enthielt zusätzlich 100 µl NaN₃ 1 % (10 mg/ml NaN₃).

Die Volumenaktivität wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Volumenaktivität (mU/ml)} = \frac{\Delta E \cdot V}{t \cdot \epsilon \cdot d \cdot v}$$

$$t \cdot \epsilon \cdot d \cdot v$$

$\Delta E/t$ Extinktionsdifferenz der Proben mit und ohne Hemmstoff

ϵ Extinktionskoeffizient 11,48* nM⁻¹*cm⁻¹

V Volumen der Messlösung 200 µl

v Volumen der Proben 40 µl

d Schichtdicke der Küvette

4.3.6 Antioxidative Parameter

4.3.6.1 Aktivität der Gluthationperoxidase

Die Aktivitätsmessung der Gluthationperoxidase erfolgte nach der Methode von Lawrence und Burk. Zur Bestimmung dieses Enzyms benötigte man 1 ml

Substratlösung, 20 µl H_2O_2 (0,25 µM) und 20 µl Speichelprobe. Die Substratlösung setzte sich aus folgenden Substanzen zusammen: 20 ml PBS, 20 µl Tetrabutylammonium- (5 µM), 200 µl Gluthationlösung, 20 µl NaN_3 , 200 µl NADPH-Lösung, 1,84 µl Gluthationreduktase (0,25 U/µl). Diese Komponenten wurden miteinander vermischt. Die Aktivität wurde durch die Absorption bei 340 nm zum Zeitpunkt 0 min und nach 1 min am Spektrometer gemessen.

Zur Herstellung der NADPH-Lösung wurden 1,42 g NADPH in 10 ml 0,5 M Tris gelöst. Die Gluthationlösung bestand aus 6,15 mg Gluthation, gelöst in 10 ml PBS (100 fach) und die NaN_3 Lösung wurde aus 8,5 mg NaN_3 , gemischt mit 10 ml PBS (1000 fach), hergestellt. Das 0,25 µM H_2O_2 wurde in einer 3-stufigen 1:1000 Verdünnungsreihe angefertigt. Dazu wurden 30 µl 3 % H_2O_2 und 970 µl H_2O vermischt, davon wurden nochmals 30 µl entnommen und in 970 µl H_2O gelöst. Von dieser Lösung Substrat wurden 3 µl entnommen und mit 997 µl H_2O vermischt.

4.3.6.2 Aktivität der Katalase

Die Aktivität der Katalase wurde nach Das ermittelt. Folgende Substanzen wurden für photometrische Messungen mit einander gemischt: 200 µl H_2O , 100 µl H_2O_2 (1:100 verdünnt) und 2 µl Speichel. Die Lösung wurde alle 10 s 1 min lang bei 240 nm am Nanodrop an Hand des Programms UV-Spektroskopie UV-Vis gemessen. Die maximale Absorption betrug 0,5 %.

4.3.6.3 Aktivität der Superoxiddismutase

Die Aktivitätsmessung erfolgte mit dem 19160 SOD Determination Kit der Firma Flukatec. Die Methode wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die SOD katalysiert die Umwandlung von Superoxidanion (O_2^-) und Wasser (H_2O) in molekularem Sauerstoff (O_2) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Die SOD-Bestimmung ist eine indirekte Methode, die auf jeweils zwei SOD-Well-Platten durchgeführt wird.

Die Nitroblautetrazoliummethode beruht auf der geringen Wasserlöslichkeit von Formazan und der Interaktion mit der reduzierten Form der Xanthinoxidase. Zum Nachweis der SOD dient ein wasserlösliches Tetrazoliumsalz, das WST-1(2-(4-Iodophenyl)-3(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, Monosodiumsalz). Dieses produziert ein wasserlösliches Formazan, welches bei der

Reduktion mit dem Superoxid anion entsteht. Die Geschwindigkeit der Reduktion mit Sauerstoff (O_2) steht in linearer Beziehung mit der Xanthinoxidaseaktivität (XO) und wird gehemmt durch die SOD. Deshalb kann die IC_{50} (50 % der SOD-Aktivität sind gehemmt) mittels der kalorischen Methode nachgewiesen werden (Abbildung 3).

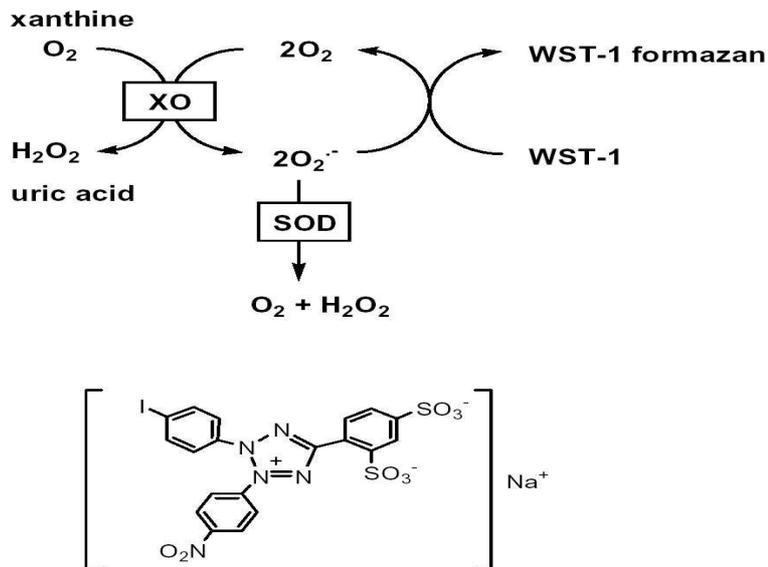


Abb.3: Reaktion der Xanthinoxidase und Superoxiddismutase (Firma Fuklatec)

Zur Durchführung benötigte man verschiedene Lösungen. Für die WST-Arbeitslösung wurden 1,67 ml WST-Lösung und 31,67 ml Pufferlösung benötigt. 15 μ l + 2,5ml Dilutionbuffer (DB) wurden durch pipettieren gemischt. Folgende SOD-Lösung (Ausgang 1000 U/ 100 μ l) lagen vor:

A: 1 μ l + 99 μ l DB	(=100 U/ml)
B: 15 μ l A + 15 μ l DB	(=50 U/ml)
C: 6 μ l A+ 24 μ l DB	(=20 U/ml)
D: 3 μ l A+27 μ l DB	(=10 U/ml)
E: 3 μ l B +27 μ l DB	(=5 U/ml)
F: 3 μ l C+27 μ l DB	(=2 U/ml)
G: 3 μ l D +27 μ l DB	(=1 U/ml)
H: 27 μ l DB	(blank)

Tab. 4: Pipettierschema der Wellplatten

Platte 1:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	■	Standard	Probe	Probe	Probe	■	■	■	■	■	■	■
B	■	Standard	Probe	Probe	Probe	■	■	■	■	■	■	■
C	■	Standard	Probe	Probe	Probe	■	■	■	■	■	■	■
D	■	Standard	Probe	Probe	Probe	■	■	■	■	■	■	■
E	■	Standard	Probe	Probe	Probe	■	■	■	■	■	■	■
F	■	Standard	Probe	Probe	Probe	■	■	■	■	■	■	■
G	■	Standard	Probe	Probe	Probe	■	■	■	■	■	■	■
H	■	Standard	Probe	Probe	Probe	■	■	■	■	■	■	■

Platte 2:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	■	■	Probe	Probe	Probe	■	■	■	■	■	■	■
B	■	■	Probe	Probe	Probe	■	■	■	■	■	■	■
C	■	■	Probe	Probe	Probe	■	■	■	■	■	■	■
D	■	■	Probe	Probe	Probe	■	■	■	■	■	■	■
E	■	■	Probe	Probe	Probe	■	■	■	■	■	■	■
F	■	■	Probe	Probe	Probe	■	■	■	■	■	■	■
G	■	■	Probe	Probe	ddH ₂ O	■	■	■	■	■	■	■
H	■	■	Probe	Probe	ddH ₂ O	■	■	■	■	■	■	■

Einen Überblick über die Pipettierschemen ist in Tabelle 4 dargestellt.

20 µl Speichelproben wurden in die Spalten 3-5 der Platten 1 und 2 pipettiert. Der zuvor hergestellte Standard wurde in die Spalte 1 der Platte 1 platziert.

Anschließend wurde 200µl WST-Arbeitslösung zu jedem Well dazugegeben (außer ■)

20µl DB zu jedem Well auf die Platte 2 (außer ■)

20µl Enzym –Arbeitslösung zu Platte 1 (außer ■)

Die Substanzen wurden vorsichtig vermischt und 20 min bei 37°C inkubiert. Die reduktive Umwandlung von Nitroblautetrazolium in den blauen Farbstoff Formazan ließ sich spektralphotometrisch bei 450 nm verfolgen.

4.3.6.4 Harnsäure

Die Ermittlung des Harnsäurespiegels im Speichel erfolgte im Institut für Klinische Chemie der Friedrich Schiller Universität Jena. Die Untersuchung wurde nach Laborprotokoll durchgeführt.

4.3.7 Bestimmung der erworbenen Immunantwort

4.3.7.1 Bestimmung von *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* spezifischem IgA und IgG

Zum Nachweis der Bakterien wurden polyklonale Antikörper (Anti-Human IgG sowie IgA HRP) im Immunoassays eingesetzt. Als Bakterienstämme wurden der *P.gingivalis* M5 und ATCC, sowie der *A.Actinomycetencomitans* verwendet.

Verwendete Lösungen:

Coatingpuffer: PBS

Blockingpuffer: PBS + 3-4 % BSA

Standardpuffer: PBS + 0,3-0,4 % BSA

Stopplösung: 0,5 M H₂SO₄

Waschlösung: TBS-Tween

Die Aufarbeitung der Stämme erfolgte nach Vorschrift im Labor. Es wurde eine OD 660nm=1,0 eingestellt. Von dieser Suspension wurden je 200µl auf ein Well gegeben und die Platte bei 4°C über Nacht inkubiert. Danach wurden die Wells ausgeklopft, und mit jeweils 400 µl Blockingpuffer für 2h versehen.

Anschließend erfolgte das Waschen mit TBS-Tween. 50 µl Speichel wurden hinzugefügt, mit selbstklebender Folie abgedeckt, bei Raumtemperatur für 60 min inkubiert und 3mal mit TBS-Tween gewaschen. 100µl HRP-konjugierte Anti IgA

und -IgG wurden in einer Verdünnung von 1:10000 hinzugegeben und 60 min inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte dann durch die enzymatische Reaktion. Als Substrat diente TMB (Tetramethylbenzidin), dessen Umsatz photometrisch bei 450 nm im ELISA-Reader detektiert wurde. Die Platten wurde abermals dreimal mit der Waschlösung gespült und im Anschluss wurden 100 µl TMB, pro Well zugegeben. Die Platten wurden dieses Mal verdunkelt und nicht abgeklebt 30 min inkubiert. In dieser Zeit wurde das farblose Substrat in ein blaues Produkt umgewandelt. Diese Reaktion wurde mit der Zugabe von 50 µl 0,5 M H₂SO₄ pro Well beendet, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfand. Als Standard diente eine 6-stufige Verdünnungsreihe von drei Seren, die von Patienten mit Parodontitis gewonnen wurden.

4.3.7.2 Bestimmung des Gesamtimmunglobulingehaltes von IgA und IgG

Die Ermittlung des Gesamtimmunglobulingehaltes IgA und IgG im Speichel fand in dem Institut für klinische Chemie der Friedrich Schiller Universität laut Laborvorschrift statt.

4.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels des t-Testes unter Zuhilfenahme von SPSS Version 15. Die Gruppen wurden untereinander verglichen. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Wurde ein Wert von $p < 0,05$ ermittelt, lag eine statistische Signifikanz vor.

5 Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der klinischen Parameter, der antioxidativen und oxidativen Aktivitäten sowie Variablen der angeborenen und erworbenen Immunität im Speichel von Parodontitispatienten und einer Kontrollgruppe dargestellt. Weiterhin erfolgt die Angabe der parodontopathogenen Bakterien *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, die durch die Real-Time PCR in den oben genannten Gruppen ermittelt wurden. Zur Auswertung der Ergebnisse, mittels t-Tests, wurde das Statistikprogramm SPSS Version 15.0 herangezogen. Die Darstellung der Ergebnisse Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (STAW) erfolgt tabellarisch und im Diagramm. Ein signifikanter Unterschied lag vor, wenn $p < 0,05$ war.

5.1 Klinische Parameter

Die klinischen Parameter Sondierungstiefe, Blutung auf Sondierung, Plaqueindex und Lockerungsgrade der Zähne sind Kriterien der Parodontitis. Als pathologische Werte galten Zähne deren Sondierungstiefe $\geq 3,5$ mm waren. Wurde ein solcher Wert bei mindestens fünf Zähnen pro Person erreicht oder überschritten, erfolgte eine Einordnung in die Parodontitisgruppe.

In den Parodontitisgruppen wurden bei allen klinischen Parametern höhere Werte als in der Kontrollgruppe gemessen.

Die Gruppe der chronischen Parodontitis erreichte die höchsten Mittelwerte bei der Sondierungstiefe und beim Lockerungsgrad. Durchschnittlich wiesen 20,86 \pm 6,23 Sondierungsstellen eine Sondierungstiefe (ST) von $\geq 3,5$ mm und einen Lockerungsgrad (LG) von 5,57 \pm 3,37 Zähne auf. Die Patienten mit aggressiver Parodontitis erreichten beim Blutungsindex (BoP) und bei der Plaqueindex (PL) die höchsten Werte. Durchschnittlich traten 14,86 \pm 10,56 Blutungspunkte nach Sondierung auf und der Plaqueindex betrug 18,2 \pm 8,8%. Die Kontrollgruppe erzielte bei jedem dieser Parameter den geringsten Mittelwert, wobei die Sondierungstiefe und der Lockerungsgrad 0 ergaben (Tabelle 6). Die Ergebnisse des t-Tests sind in der Tabelle 5 dargestellt. Ein signifikanter Unterschied lag bei $*=p < 0,05$ vor.

Tab. 5: Klinische Parameter im Speichel

	ST (ST-stellen)	BoP (Blutungspunkte)	LG (Zähne)	PL (%)
aP	12,57±10,31	14,86±10,56	2,14±3,39	18,2±8,8
cP	20,86±6,23	12,71±5,57	5,57±3,37	15±6,7
K	0±0	5,89±4,34	0±0	9,4±8,6

Tab. 6: Signifikanzprüfung (*=p<0,05)

	ST	BoP	LG	PL
Vergleich (p) a P-K	<0,001*	0,002*	0,004*	0,015*
Vergleich (p) cP – K	<0,001*	0,0002*	<0,001*	0,31
Vergleich (p) aP und cP	0,016*	0,272	0,02*	0,182

5.2 Bestimmung der Mikroflora in der subgingivalen Plaque mittels Real-Time-PCR

Mittels der Real-Time-PCR wurde ermittelt, welche Proben positiv auf die Bakterien *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* reagierten. Die Proben wurden mit einer Papierspitze ISO 30 aus der tiefsten Tasche entnommen und aufgearbeitet. Die quantitative Bestimmung der Bakterien mittels der Real-Time-PCR erfolgte über definierte Schwellenwerte. Dieser Schwellenwert lag für das Bakterium *A. actinomycetemcomitans* bei einer Keimzahl 10^5 . Für *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* wurde ein Schwellenwert von 10^6 verwendet. Sowohl bei Patienten mit chronischer Parodontitis als auch bei Patienten mit aggressiver Parodontitis konnten die Mikroorganismen *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* nachgewiesen werden.

Bei Patienten mit chronischer Parodontitis wurde die höchste Anzahl parodontopathogener Bakterien nachgewiesen. Eine Ausnahme bildete das Bakterium *A. actinomycetemcomitans*. Hier wurde durch die Real-Time-PCR das höchste Ergebnis in der Gruppe der aggressiven Parodontitis ermittelt. Zwei Proben überschritten die Keimzahl von 10^5 . Des Weiteren lag ein Nachweis des *A. actinomycetemcomitans* in der Kontrollgruppe vor. (Tabelle 7). Der t-Test ergab Signifikanzen bei dem Bakterium *A. actinomycetemcomitans* im Vergleich der aggressiven Parodontitis mit der Kontrollgruppe ($p < 0,001$) sowie der chronischen Parodontitis ($p = 0,001$). Der Vergleich chronische Parodontitis mit der Kontrollgruppe ergab keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,093$, Tabelle 8).

Die meisten positiven *P. gingivalis*-Proben wurden bei der chronischen Parodontitis ermittelt, gefolgt von der aggressiven Parodontitis. Sieben der zu untersuchenden Proben der chronischen Parodontitis erreichten eine Keimzahl von 10^6 . In der Kontrollgruppe konnte *P. gingivalis* nicht nachgewiesen werden (Tabelle 7). Signifikant erwiesen sich dabei die Unterschiede zwischen der aggressiven und der chronischen Parodontitis ($p < 0,001$) sowie zwischen chronischer Parodontitis und Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Bei einem Vergleich der aggressiven Parodontitis mit der Kontrollgruppe wurde keine Signifikanz ermittelt ($p = 0,073$, Tabelle 8).

Sechs Proben von Patienten mit chronischer Parodontitis wiesen bei der Bestimmung des Bakterium *T. forsythia* eine Keimzahl von $>10^6$ auf (Tabelle 7). Ein Vergleich der chronischen Parodontitis mit der Kontrollgruppe ergab eine Signifikanz ($p = 0,034$). Die aggressive Parodontitis war im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = 0,114$) und zur chronischen Parodontitis ($p = 0,477$) nicht signifikant verschieden (Tabelle 8).

Für das Bakterium *T. denticola* ergab der t-Test zwischen Parodontitisgruppen und mit der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede. Vier Proben von Patienten mit der chronischen Parodontitis enthielten eine Keimzahl $>10^6$ (Tabellen 7,8).

Tab. 7: Anzahl der positiv getesteten Proben

	A.a. ($\geq 10^5$)	P.g. ($\geq 10^6$)	T.f. ($\geq 10^6$)	T.d. ($\geq 10^6$)
aP	7 (2)	2 (1)	4(3)	2(1)
cP	3(0)	14(7)	11(6)	7(4)
K	1(0)	0(0)	4(1)	3(0)

Tab. 8: Signifikanzprüfung (*= $p < 0,05$)

	A.a. ($\geq 10^5$)	P.g. ($\geq 10^6$)	T.f. ($\geq 10^6$)	T.d. ($\geq 10^6$)
Vergleich (p) a P-K	<0,001*	0,073	0.114	0,304
Vergleich (p) cP – K	0,093	<0,001*	0,034*	0,131
Vergleich (p) aP und cP	0,001*	<0,001*	0,477	0,145

5.3 Proteingehalt des Speichels

Der Proteingehalt des Speichels wurde photospektrometrisch mit dem Nanodrop gemessen. Der höchste Proteingehalt wurde in der Gruppe der aggressiven Parodontitis mit $5,989 \pm 8,408$ mg /ml erreicht, gefolgt von der Gruppe der chronischen Parodontitis ($3,727 \pm 2,336$ mg/ml) und der Kontrollgruppe ($2,726 \pm 1,750$ mg/ml, Abbildung 4). Der t-Test ergab keine signifikanten Unterschiede.

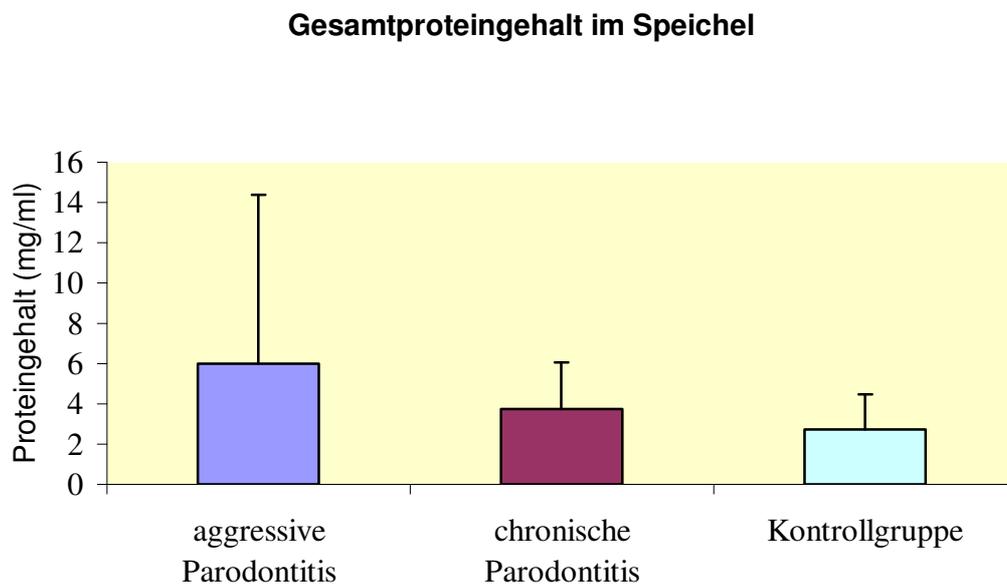


Abb. 4: Durchschnittlicher Proteingehalt

5.4 Variablen der angeborenen Immunantwort im Speichel

In dem folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der Variablen der angeborenen Immunantwort dargestellt. Zu diesen zählten hCAP-18, HNP1-3, die Aktivitäten von CTSC, Prot3 und NE. Die chronische Parodontitis zeigte bei den untersuchten Parametern die höchsten Werte. Eine Ausnahme stellte Cathepsin C dar, welches die größte Aktivität in der aggressiven Parodontitis erreichte.

5.4.1 Humanes Cathelicidin

Die Menge des Proteins hCAP-18 wurde durch den Western Blot an der Jagiellonen-Universität Krakau Polen ermittelt. Die Intensität der Banden von hCAP-18 wurde zur Referenz gemessen und diese war 4 Units (U).

In Abbildung 5 sind die gemessenen Werte dargestellt. Die Bestimmung von hCAP-18 ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Bei der chronischen Parodontitis wurde mit $0,727 \pm 1,366$ U die höchste durchschnittliche Aktivität an hCAP-18 gemessen. Es folgte die aggressive Parodontitis mit $0,348 \pm 0,778$ U und die Kontrollgruppe mit $0,198 \pm 0,559$ U.

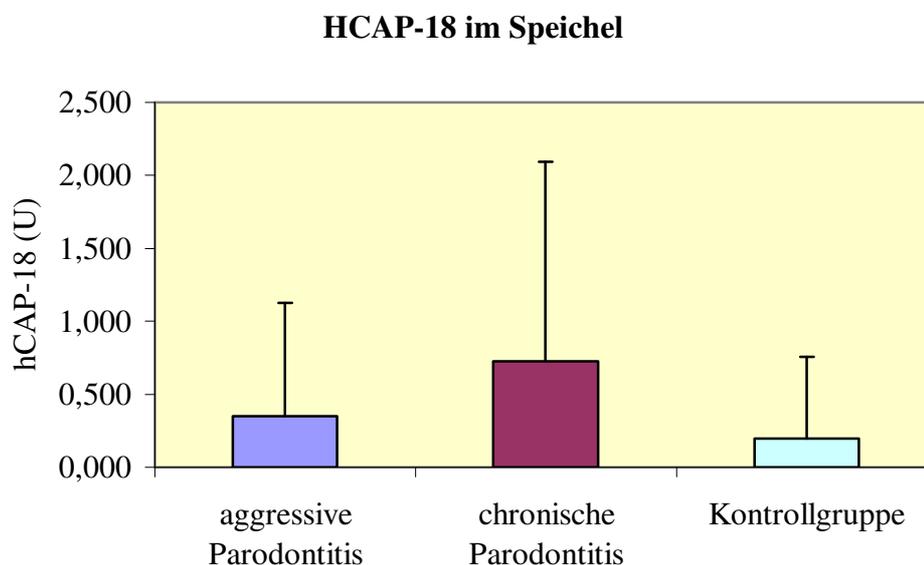


Abb.5: Aktivität von hCAP-18

5.4.2 Humane neutrophile Peptids 1-3

Die höchste durchschnittliche Menge an HNP1-3 wurde bei der chronischen Parodontitis gemessen ($4307 \mu\text{g/l} \pm 4293 \mu\text{g/l}$) gefolgt von der Kontrollgruppe ($484 \mu\text{g/l} \pm 450 \mu\text{g/l}$). Die niedrigste Konzentration von HNP1-3 wurde bei der aggressiven Parodontitis ermittelt ($146 \mu\text{g/l} \pm 206 \mu\text{g/l}$, Abbildung 6).

Der t-Test ergab einen signifikanten Unterschied im Vergleich der aggressiven Parodontitis mit der chronischen Parodontitis ($p=0,049$) sowie der chronischen Parodontitis mit der Kontrollgruppe ($p=0,042$). Die Gruppe der aggressiven Parodontitis war zur Kontrollgruppe nicht signifikant verschieden ($p \geq 0,05$).

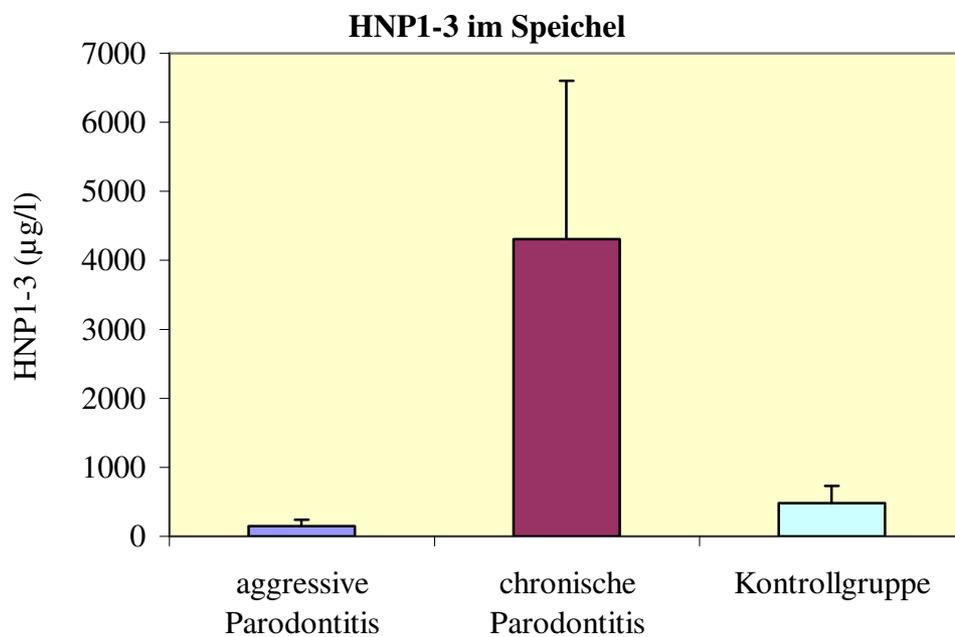


Abb. 6: Durchschnittliche Konzentrationen von HNP1-3

5.4.3 Cathepsine C

Die Bestimmung der Enzymaktivität von CTSC im Speichel ergab den größten Mittelwert von $15,039 \pm 21,835$ U/ml in der Gruppe der aggressiven Parodontitis. Dieser Unterschied war mit $p=0,013$ zur Kontrollgruppe signifikant, welche einen durchschnittlichen Enzymaktivität von $0,984 \pm 0,43$ U/ml zeigte (Abbildung 7). Bei Patienten mit chronischer Parodontitis wurden $5,873 \pm 10,73$ U/ml gemessen. Keine statistischen Unterschiede wurden mit dem t-Test bei der Gegenüberstellung chronischer Parodontitis mit der aggressiven Parodontitis sowie der Kontrollgruppe ermittelt ($p \geq 0,05$).

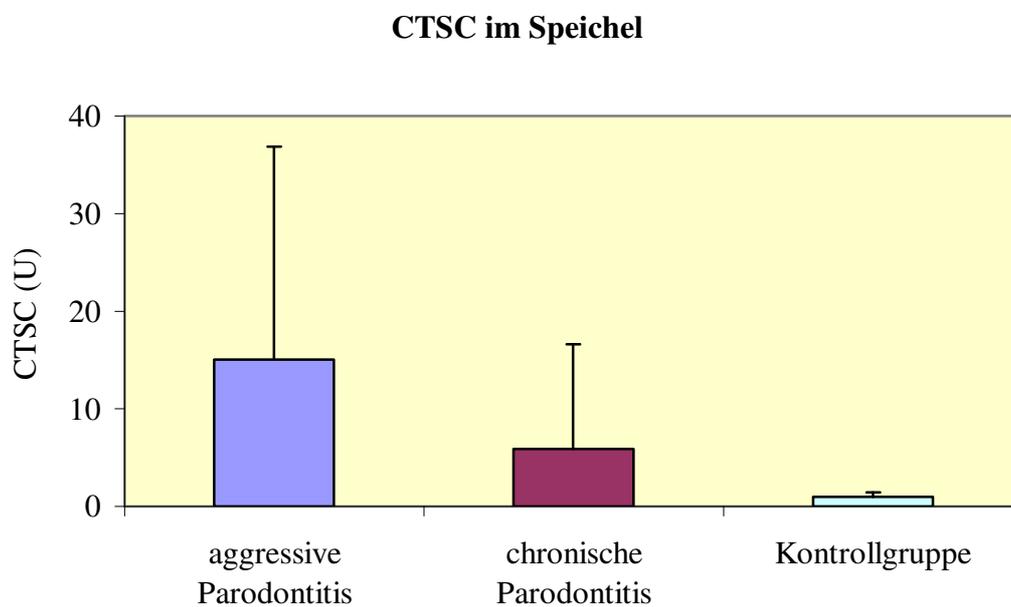


Abb. 7: Durchschnittliche Aktivität von CTSC

5.4.4 Serinproteinasen

5.4.4.1 Proteinase 3

Bei einem Vergleich der drei Gruppen zeigte sich, dass die chronische Parodontitis den höchsten Mittelwert ($26,443 \pm 21,743$ U/ml; Abbildung 8) aufweist, gefolgt von der aggressiven Parodontitis ($10,633 \pm 8,080$ U/ml) und der Kontrollgruppe ($7,769 \pm 6,950$ U/ml). Beim Vergleich der chronischen Parodontitis mit der Kontrollgruppe war eine Signifikanz erkennbar ($p=0,004$).

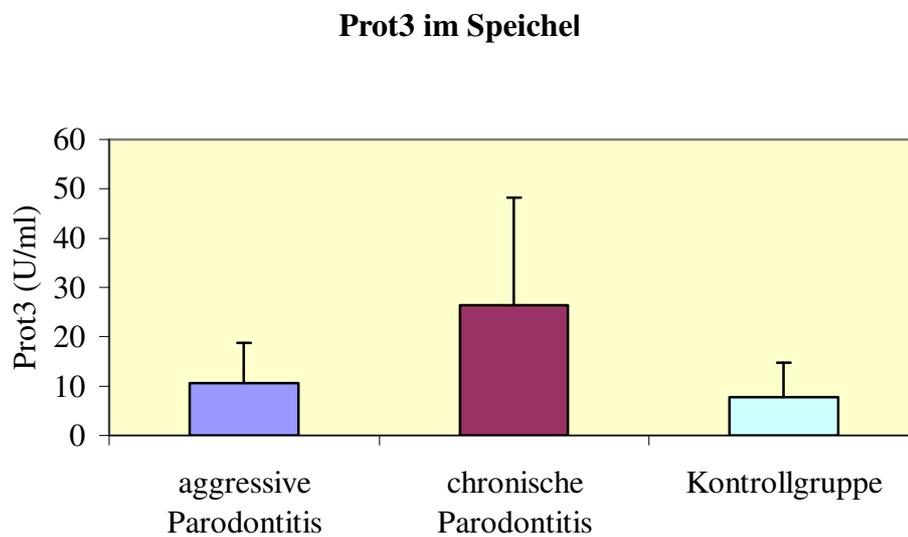


Abb. 8: Durchschnittliche Aktivität der Prot3

5.4.4.2 Neutrophile Elastase

Die NE wurde bei Patienten mit chronischer Parodontitis ($5,644 \pm 7,133$ U/ml) mit dem höchsten Mittelwert nachgewiesen (Abbildung 9). Die aggressive Parodontitis hatte eine durchschnittliche Aktivität von $1,988 \pm 2,009$ U/ml. Die geringsten Werte wurde in der Kontrollgruppe ermittelt ($0,028 \pm 0,077$ U/ml).

Bei der Ermittlung der durchschnittlichen Aktivität des Enzyms NE wurde ein hoch signifikanter Unterschied beim Vergleich der aggressiven Parodontitis mit der Kontrollgruppe ($p=0,001$) sowie der chronischen Parodontitis mit der Kontrollgruppe ($p=0,005$) festgestellt. Die Parodontitisgruppen waren untereinander nicht signifikant verschieden ($p \geq 0,05$).

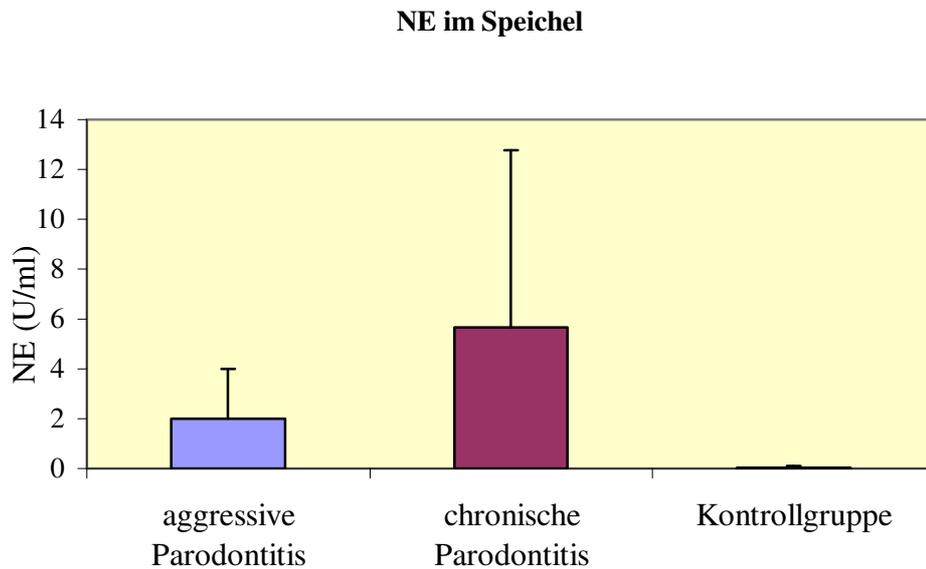


Abb. 9: Durchschnittliche Aktivität der NE

5.5 Antioxidative und oxidative Parameter im Speichel

5.5.1 Antioxidative Parameter

Bei einem Vergleich der antioxidativen Parameter Katalase, Glutathionperoxidase, Superoxiddismutase und Harnsäure zeigte sich, dass vor allem bei chronischer Parodontitis die Enzymaktivitäten mit Ausnahme der Katalase im Mittel am höchsten waren.

5.5.1.1 Katalase

Die höchste Aktivität der Katalase wurde bei der aggressiven Parodontitis mit $0,120 \pm 0,210$ U/ml gemessen, gefolgt von der chronischen Parodontitis ($0,062 \pm 0,051$ U/ml) und der Kontrollgruppe ($0,030 \pm 0,027$ U/ml, Abbildung 10).

Der t-Test ergab, dass die Katalaseaktivität in der Kontrollgruppe signifikant niedriger als in der Gruppe der aggressiven ($p=0,036$) als auch in der chronischen Parodontitis ($p=0,015$) war. Keine Signifikanz konnte im Vergleich aggressive Parodontitis mit chronischer Parodontitis ermittelt werden ($p \geq 0,05$).

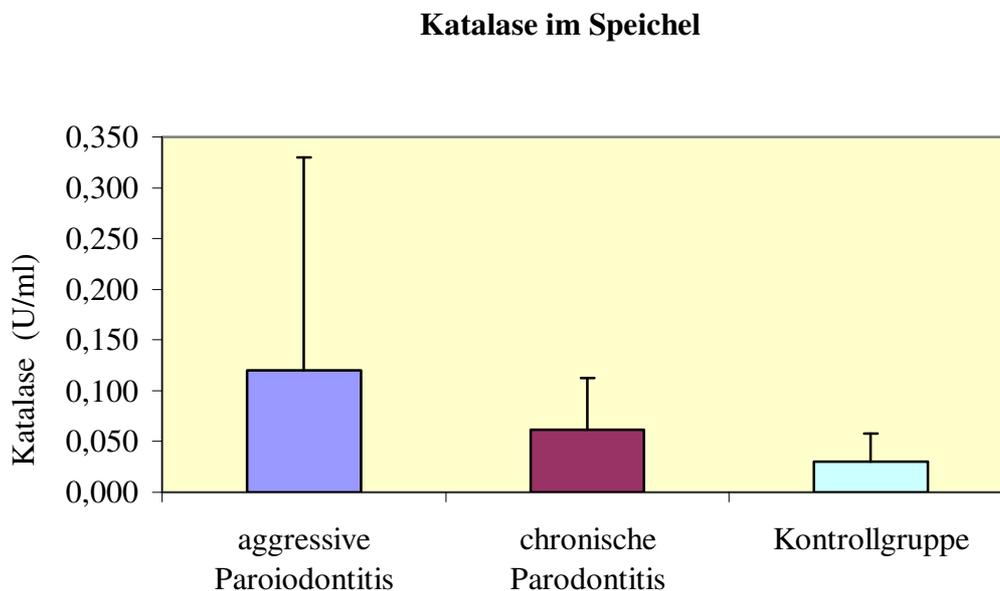


Abb. 10: Durchschnittliche Aktivität der Katalase.

5.5.1.2 Glutathionperoxidase

Die größte Konzentration der Glutathionperoxidase wurde bei der chronische Parodontitis ($0,101 \pm 0,080$ U/ml) ermittelt. Die Messung in der aggressiven Parodontitis ergab einen durchschnittlichen Wert von $0,094 \pm 0,090$ U/ml, gefolgt von der Kontrollgruppe mit $0,07 \pm 0,060$ U/ml (Abbildung 11).

Bei der statistischen Analyse ergab der t-Test für die chronische Parodontitis mit der Kontrollgruppe einen statistischen Unterschied von $p=0,039$.

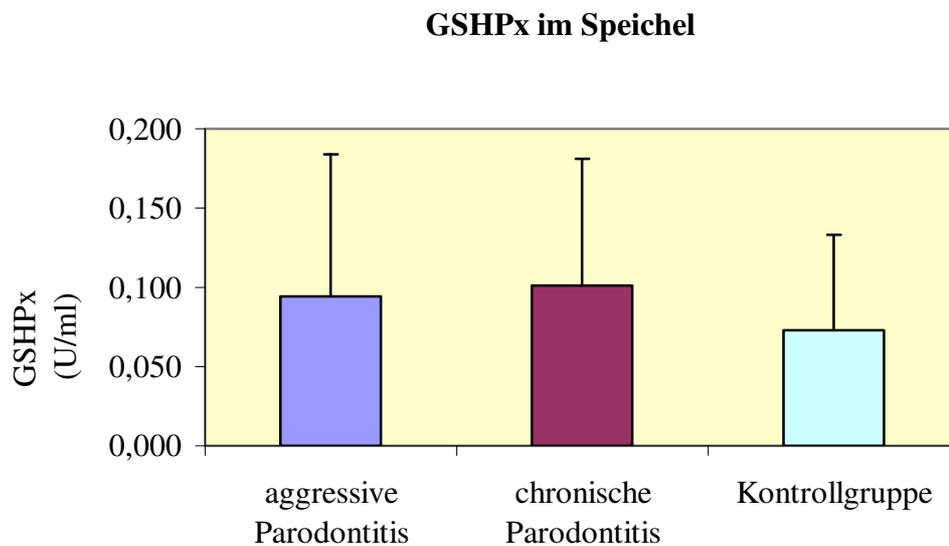


Abb. 11: Durchschnittliche des Aktivität der GSHPx

5.5.1.3 Superoxiddismutase

In der Gruppe der chronischen Parodontitis ($4,193 \pm 3,278$ U/ml) wurde die höchste Aktivität der Superoxiddismutase ermittelt, gefolgt von der aggressiven Parodontitis ($3,551 \pm 1,817$ U/ml) und der Kontrollgruppe ($2,217 \pm 1,349$ U/ml; Abbildung 12). Signifikante Unterschiede ergaben ein Vergleich der aggressiven Parodontitis und chronischen Parodontitis jeweils mit der Kontrollgruppe ($p=0,026$ bzw. $p=0,012$).

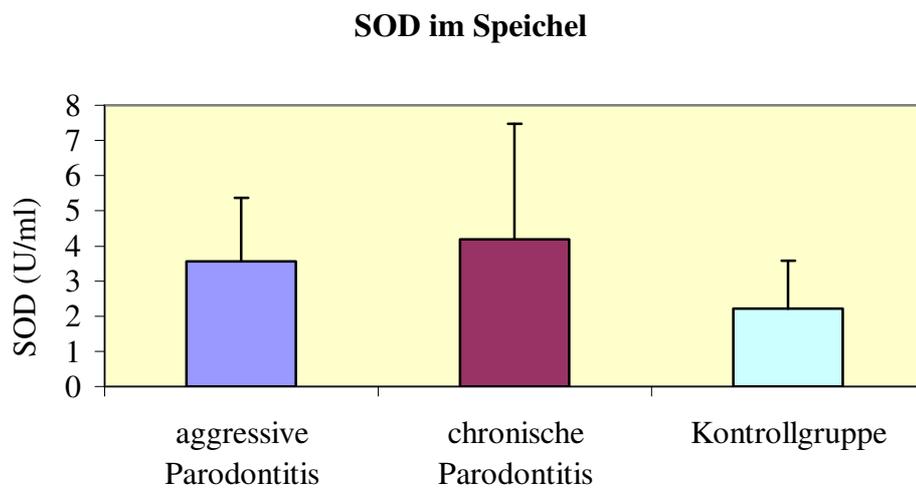


Abb. 12: Durchschnittliche Aktivität der SOD

5.5.1.4 Harnsäure

Bei den antioxidativen Parametern lag der Harnsäuregehalt im Mittel bei der chronischen Parodontitis ($210,481 \pm 126,93 \mu\text{mol/l}$) am höchsten. Die durchschnittliche Konzentration betrug bei der Kontrollgruppe $181,36 \pm 73,258 \mu\text{mol/l}$ und bei der aggressiven Parodontitis $149,643 \pm 69,27 \mu\text{mol/l}$. Bei dem untersuchten Parameter wurden keine signifikanten Unterschiede im t-Test ermittelt ($p \geq 0,05$; Abbildung 13).

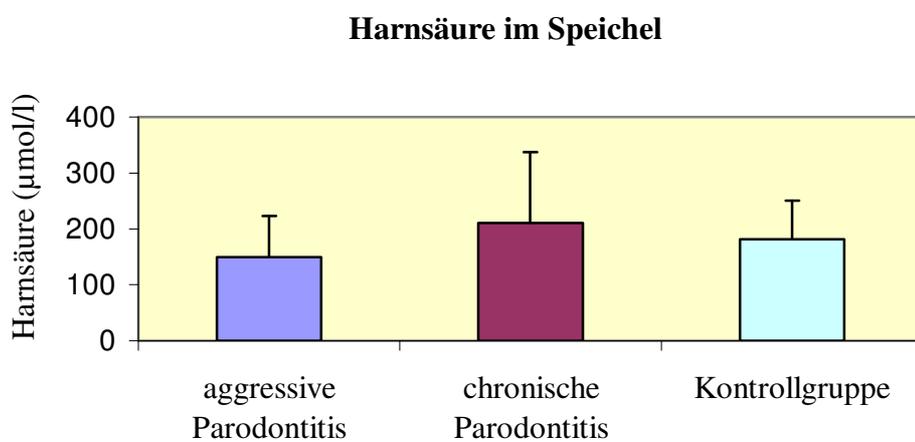


Abb. 13: Durchschnittliche Konzentration der Harnsäure

5.5.2 Oxidative Parameter

Als oxidative Parameter wurden die Enzyme Lipidperoxidase und Myeloperoxidase in den zwei Parodontitisgruppen und der Kontrollgruppe gemessen. Hier zeigte sich, dass die beiden zu untersuchenden Enzyme im Mittel die höchsten Werte bei der aggressiven Parodontitis aufwiesen.

5.5.2.1 Lipidperoxidation

In der Abbildung 14 ist erkennbar, dass der höchste Wert ($0,110 \pm 0,119 \text{ U/ml}$) der LPO in der aggressiven Parodontitis erreicht wurde. Die Untersuchung des Speichels bei Patienten mit chronischer Parodontitis und der Kontrollgruppe ergaben $0,090 \pm 0,077 \text{ U/ml}$ und $0,033 \pm 0,051 \text{ U/ml}$.

Der t-Test zeigte, dass die Kontrollgruppe sich sowohl zur aggressiven Parodontitis ($p=0,025$) als auch zur chronischen Parodontitis ($p=0,016$) signifikant unterschied. Nicht signifikant verschieden waren aggressive und chronische Parodontitis ($p \geq 0,05$).

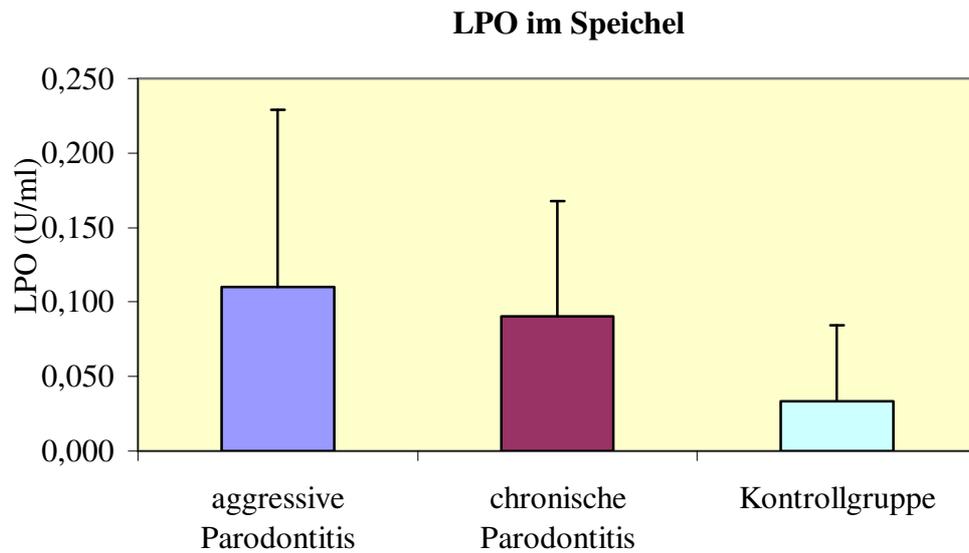


Abb. 14: Durchschnittliche Aktivität der LPO

5.5.2.2 Myeloperoxidase

Aus den Mittelwerten ließ sich erkennen, dass mit $3,904 \pm 1,068$ U/ml in der aggressiven Parodontitis die höchste Aktivität gemessen wurde, gefolgt von der chronischen Parodontitis mit einer Enzymaktivität von $3,762 \pm 0,647$ U/ml und der Kontrollgruppe mit $3,473 \pm 1,483$ U/ml (Abbildung 15).

Der t-Test ergab in den Gruppen keine Signifikanz.

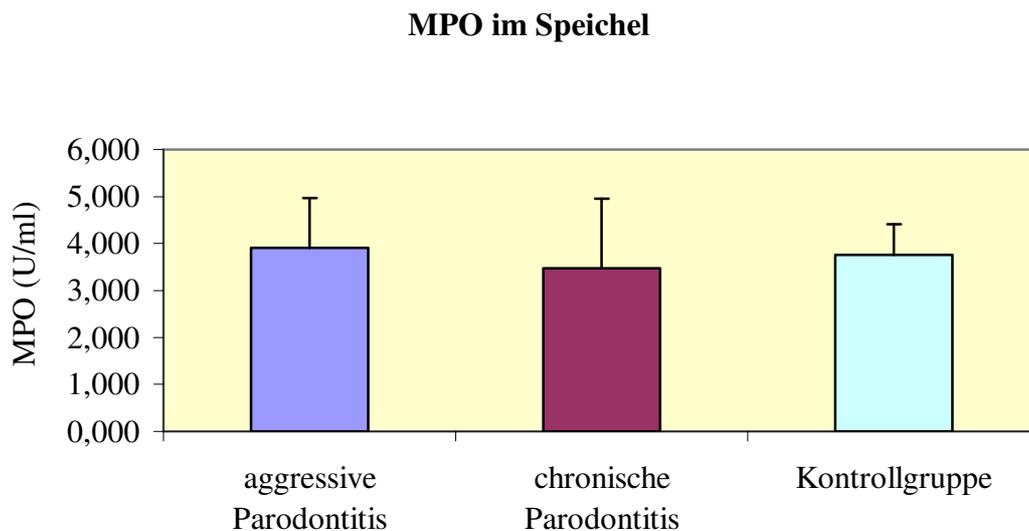


Abb. 15: Durchschnittliche Aktivität der MPO

5.6 Erworbene Immunität

Die Immunglobuline IgG und IgA, die spezifisch gegen die Bakterien *A. actinomycetencomitans* (A.a.IgG/ A.a.IgA) und *P.gingivalis* (P.g.IgA/ P.g.IgG) gebildet werden, wurden mittels ELISA untersucht.

Weiterhin wurden der Gesamtimmunglobulingehalt (GesIgG/GesIgA) bestimmt.

5.6.1 Immunglobulin G

Bei den zu untersuchenden Immunglobulinen wurden in der Gruppe mit chronischer Parodontitis die höchsten Konzentrationen ermittelt, außer bei dem Immunglobulin A.a.IgG. Dieser Wert war bei Patienten mit aggressiver Parodontitis erhöht.

5.6.1.1 Aggregatibacter actinomycetemcomitans-spezifisches IgG

In der aggressiven Parodontitis konnte der größte Mittelwert ($1,062 \pm 0,585$ U) des Immunglobulines A.a.IgG nachgewiesen werden. Die chronische Parodontitis erreichte $0,620 \pm 0,502$ U. Die niedrigste Aktivität erzielte die Kontrollgruppe mit $0,258 \pm 0,229$ U (Abbildung 16). Die aggressive Parodontitis war signifikant verschieden im Vergleich mit der Kontrollgruppe $p < 0,001$ und mit der chronischen Parodontitis $p = 0,047$. Eine Gegenüberstellung der chronischen Parodontitis mit der Kontrollgruppe ergab eine Signifikanz von $p = 0,005$.

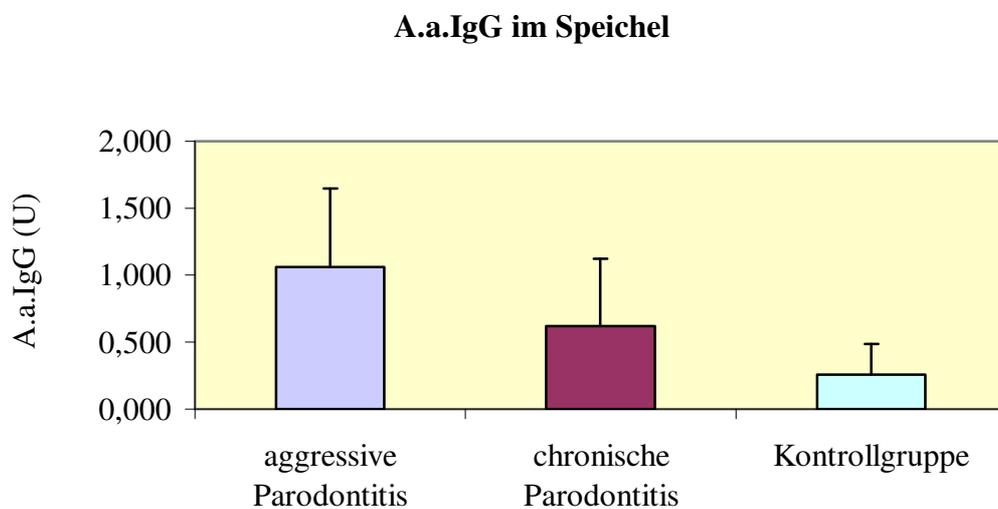


Abb. 16: Durchschnittliche Aktivität von A.a.IgG

5.6.1.2 Porphyromonas gingivalis spezifisches IgG (P.g.IgG)

Patienten mit chronischer Parodontitis wiesen die höchsten spezifisch gegen *P. gingivalis* gerichteten IgG-Spiegel auf ($0,652 \pm 0,407$ U). Die aggressive Parodontitis hatte eine mittlere Aktivität von ($0,440 \pm 0,273$ U). Der geringste Wert war in der Kontrollgruppe mit ($0,186 \pm 0,119$ U) vorhanden (Abbildung 17). Dieser war signifikant niedriger als bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis (beide jeweils $p < 0,001$). Ein Vergleich beider Parodontitisgruppen ergab keine Signifikanz ($p \geq 0,05$).

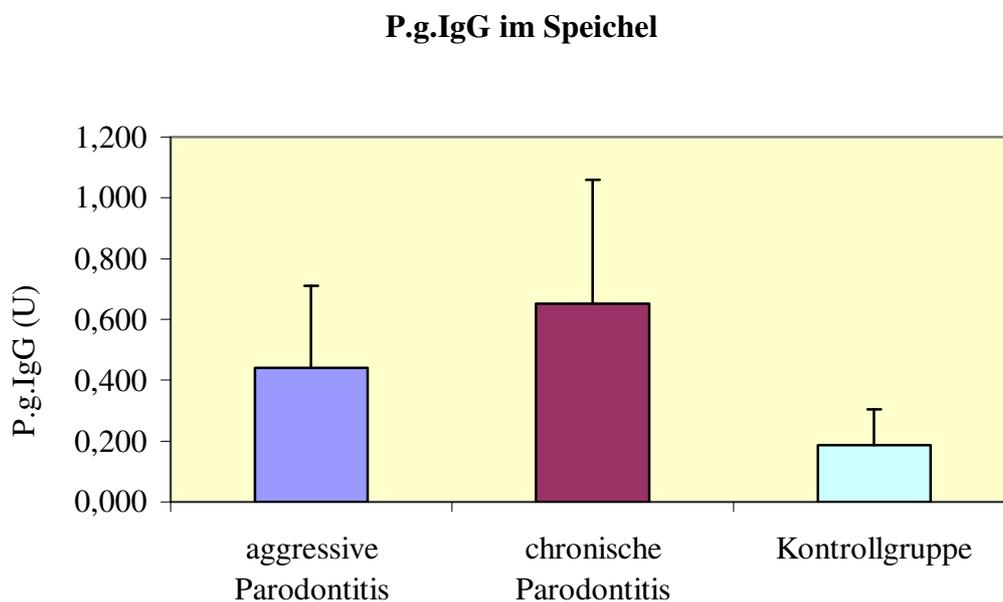


Abb. 17: Durchschnittliche Aktivität von P.g.IgG

5.6.1.3 Gesamt-IgG

Der durchschnittlich höchste GesIgG-Gehalt wurde bei chronischer Parodontitis (74,373 ± 76,087 mg/l) gemessen, gefolgt von der aggressiven Parodontitis (28,975 ± 26,745 mg/l) und der Kontrollgruppe (17,514 ± 19,121 mg/l, Abbildung 18). Beim Vergleich der Mittelwerte der chronischen Parodontitis mit der Kontrollgruppe des Parameters GesIgG stellte sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,007$) dar. Der t-Test ergab in den anderen Vergleichsgruppen keine Signifikanz ($p \geq 0,05$).

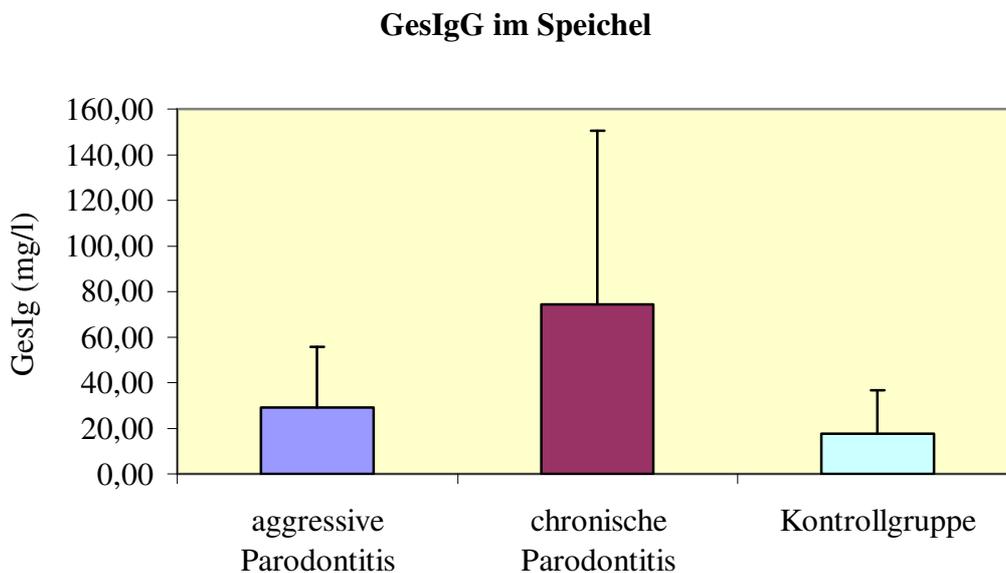


Abb. 18: Durchschnittliche Konzentrationen von GesIgG

5.6.2 Immunglobulin A

Tendenziell zeigte sich ein hoher Wert der Immunglobuline A gegen die parodontopathogenen Bakterien in der aggressiven Parodontitis. Der Gesamtimmunglobulingehalt war dagegen bei Patienten mit chronischer Parodontitis von den drei untersuchten Gruppen am höchsten.

5.6.2.1 Aggregatibacter actinomycetemcomitans-spezifisches IgA

Der größte Wert des A.a.IgA ($0,941 \pm 0,624$ U) war in der Gruppe der aggressiven Parodontitis zu finden. Der zweitgrößte Wert wurde in der Gruppe der chronischen

Parodontitis ($0,855 \pm 0,426$ U) gemessen. Der Durchschnittswert für die Kontrollgruppe betrug bei A.a.IgA $0,740 \pm 0,416$ U.

Ein Vergleich der Gruppen ergab keine Signifikanzen (Abbildung 19).

A.a.IgA im Speichel

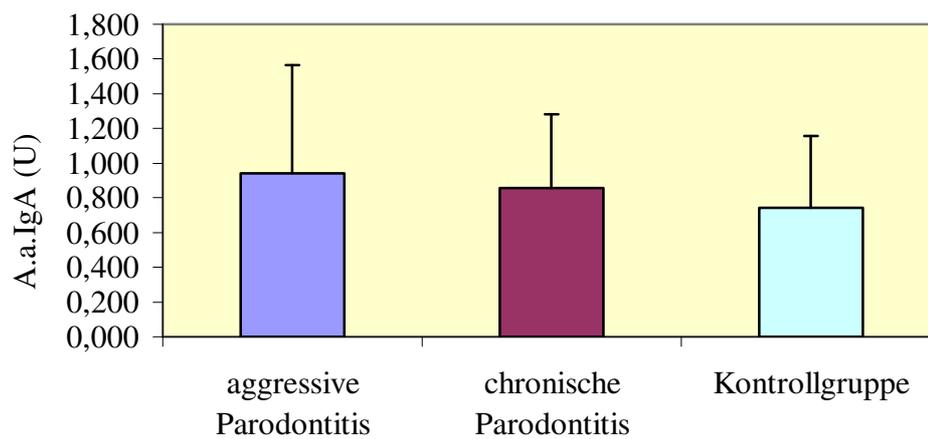


Abb. 19: Durchschnittliche Aktivität des A.a.IgA

5.6.2.2 Porphyromonas gingivalis spezifisches IgA

Die gemessenen Werte des P.g.IgA lagen zwischen $0,682 \pm 0,489$ U bei aggressiver Parodontitis und $0,638 \pm 0,253$ U bei chronischer Parodontitis und unterschieden sich somit nicht wesentlich voneinander. $0,586 \text{ U} \pm 0,407 \text{ U}$ wurden in der Kontrollgruppe ermittelt (Abbildung 20). Ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ beim Vergleich der Gruppen wurde nicht erreicht.

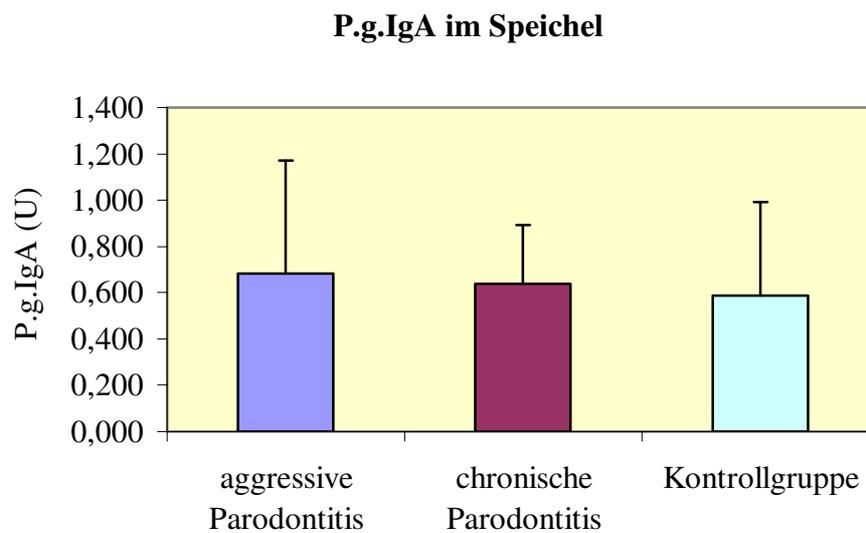


Abb.20: Durchschnittliche Aktivität des P.g.IgA

5.6.2.3 Gesamt-IgA (GesIgA)

Patienten mit chronischer Parodontitis besitzen einen signifikant ($p=0,029$) höheren Gehalt an Gesamt-IgGA im Speichel verglichen mit der Kontrollgruppe ($125,00 \pm 100,292$ mg/l versus $58,843 \pm 48,134$ mg/l). Im Mittel wurden in der Gruppe der aggressiven Parodontitis $64,677 \pm 39,75$ mg/l gemessen (Abbildung 21). Eine Signifikanz wurde zwischen der Kontrollgruppe und der chronischen Parodontitis ermittelt ($p=0,029$).

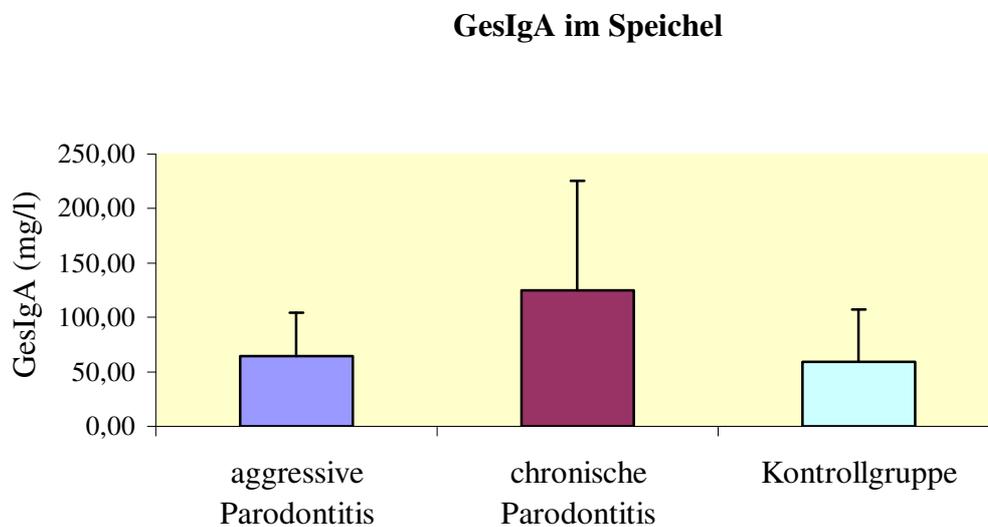


Abb. 21: Durchschnittliche Konzentration des GesIgA

6 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden antioxidative und oxidative Parameter sowie immunologische Parameter im Speichel der von Parodontitispatienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis und parodontal gesunden Personen entstammte untersucht. Die Mundhöhle ist ein offenes System, über das neben Speisen, Bakterien und diverse Noxen in den menschlichen Organismus gelangen (Hanning 2006). Die Zusammensetzung des Speichels kann physiologisch stark variieren. Um diese Einflüsse zu minimieren bzw. konstant zu halten, wurden Ausschlusskriterien beachtet und es erfolgten sämtliche Messungen standardisiert. So galt als ein Kriterium für die Patientengruppe eine Sondierungstiefe $\geq 3,5$ mm an mindestens 5 Zähnen. In die Kontrollgruppe wurden nur Personen mit Sondierungstiefen $< 3,5$ mm aufgenommen. Alle Teilnehmer dieser Studie waren Nichtraucher.

Weitere Einschlusskriterien waren das Vorhandensein von mindestens 20 in Funktion stehenden Zähnen. Die Probanden durften keine schweren Allgemeinerkrankungen aufweisen. Weitere Ausschlusskriterien waren Schwangerschaft und Stillen. Die Einnahme von Antibiotika während der letzten drei Monate sowie eine systematische Parodontitistherapie während der letzten 12 Monate waren ebenso untersagt.

Speichel ist ein besonderes Medium, welches in den letzten Jahren in den Mittelpunkt des Interesses gerückt ist. So konnte mit Speichel die Einnahme von Drogen sowie orale und systemische Krankheiten nachgewiesen werden (Streckfus et al. 2002). Immer wieder wurden in den vergangenen Jahren Versuche unternommen, anhand von Speichelproben nicht nur das Kariesrisiko zu bestimmen, sondern auch das Risiko für eine Parodontitis, bzw. Speichel als Hilfsmittel zur Diagnostik parodontaler Erkrankungen einzusetzen. Es gibt verschiedene Methoden zur Gewinnung von Speichel. Moore et al. 1994 verwendeten stimulierten Speichel zur Analyse der antioxidativen Kapazität. Edgar (1992) wiederum untersuchte unstimulierten Speichel in Bezug auf die Antioxidantien.

In unserer Studie wurde auf eine Standardisierung der Entnahme des Speichels geachtet, so wurde unstimulierter Speichel stets zur gleichen Uhrzeit gewonnen.

6.1 Klinische Parameter

Die ersten klinischen Zeichen einer Parodontitis sind Attachmentverlust, Knochenverlust und die Entzündung der Gingiva wie Blutung, Rötung und Schwellung. (Flemming 1999).

Die durchschnittlich höchste Anzahl der Zähne mit einer Sondierungstiefe $\geq 3,5$ mm wurden in der Gruppe der chronischen Parodontitis mit durchschnittlich $20,86 \pm 6,23$ Sondierungspunkten erzielt.

Untersuchungen von Greenstein (Greenstein et al. 1981) ergaben eine Korrelation zwischen dem Bluten auf Sondieren und den histopathologischen Veränderungen im Zahnbett. In der Gruppe mit aggressiver Parodontitis stellte sich die Blutungsneigung mit $14,86 \pm 10,56$ Zähnen im Durchschnittswert dar.

Parodontopathogene Bakterien mit deutlichem Bezug zur Parodontitis und Aktivität der Entzündung sind neben dem *A. actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis* *T.forsythia* und *T.denticola* (Gencon1996, Slots 1979). Diese Leitkeime treten sowohl bei chronischer als auch bei aggressiver Parodontitis auf (Mombelli et al.1994).

Somit wurde das parodontopathogene Potential von *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *B. forsythia* aber auch von *P. intermedia* und *T. denticola* in zahlreichen Studien belegt (Genco et al. 1996, Buchmann 1999, 2001).

Diese parodontopathogenen Bakterien wurden in der hier vorliegenden Studien mittels der Real-Time PCR nachgewiesen. Die Real-Time PCR ist eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR. Die Nachweisgrenze liegt meistens bei 10^3 - 10^4 Zellen und gestattet eine anschauliche Therapieüberwachung. In der aggressiven Parodontitis wurde *A. actinomycetemcomitans* am häufigsten nachgewiesen. Sieben Plaqueproben zeigten ein positives Ergebnis, zwei davon lagen über dem definierten Schwellenwert von 10^5 . Weiterhin wurde *A. actinomycetemcomitans* in der Kontrollgruppe in geringer Anzahl gefunden. Bekannt ist, dass er bei parodontal gesunden Personen nachgewiesen wurde (Kaplan et al.

2001), jedoch erfolgte in dieser Studie keine Serotypisierung. Der Mikroorganismus *P. gingivalis* wurde in den Parodontitisgruppen, aber nicht in der Kontrollgruppe detektiert.

6.2 Gesamtproteingehalt des Speichels

Die ermittelten Proteinwerte lagen im Bereich von 2,73 mg/ml - 6 mg/ml. Der höchste Gesamtproteingehalt lag dabei in der Patientengruppe mit aggressiver Parodontitis. Statistische Unterschiede konnten jedoch nicht nachgewiesen werden. In der Literatur sind Werte von 1,8 - 4,2 mg/ml zu finden, welche durch Hansen (1961) und Edgar (1992) beschrieben wurden. In Analysen von Korb, Gänßler (2008) und Seifert (2002) wurden Werte zwischen 1,0 mg/ml bis 2,0 mg/ml gemessen. Henskens stellte signifikante Unterschiede des Gesamtproteingehaltes zwischen den Parodontitisgruppen und der Kontrollgruppe fest, wobei die aggressive Parodontitis den höchsten Gehalt aufwies. Die Speichelproteine besitzen verschiedene biologische Aktivitäten. Einige von ihnen sind mit eingebunden in die Verdauung wie zum Beispiel die Amylase, die Maltase, die Peptidase. Andere haben eine schützende Funktion in der Mundhöhle und im Verdauungstrakt, wie die Immunglobuline, antioxidative und oxidative Enzyme (Grigoriev et al. 2003) sowie Parameter der angeborenen Immunabwehr. Der Gesamtproteingehalt ist assoziiert mit der Speichelfließrate. Die Speichelfließrate hat einen entscheidenden Einfluss auf die Speichelzusammensetzung. Laut Marcotte et al. 1998 ist bei einer höheren Sekretionsrate Natrium, Calcium, Chlorid, Bikarbonat, die Proteinkonzentration und der pH-Wert erhöht. Die Phosphatkonzentration und Kalium ist reduziert (Marcotte et al 1998). Aufgrund der gesteigerten Entzündungs- und Immunreaktion kommt es zu einem erhöhten Gesamtproteingehalt in der aggressiven Parodontitis. Daraus resultiert in dieser Gruppe eine gesteigerte Speichelfließrate.

6.3 Antimikrobielle Peptide

In der Mundhöhle spielen AMP's eine entscheidende Rolle zur Aufrechterhaltung der oralen Gesundheit (Beverly et al. 2005). Die neutrophilen Granulozyten mit ihren AMP's sind unabkömmlich für die Eliminierung von lokalisierten bakteriellen Infektionen (Puklo et al. 2008).

Der Anstieg der AMP-Konzentrationen bei einer Parodontitis wird deutlich, wenn die Konzentrationen von gesunden Probanden und Parodontitispatienten verglichen werden. In den hier vorliegenden Ergebnissen lässt sich erkennen, dass die höchste Aktivität der AMP's in der chronischen Parodontitis ermittelt werden konnte. Mit Ausnahme des CTSC, welches mit den höchsten Werten in der aggressiven Parodontitis lag.

Die HNP1-3 haben eine entscheidende Schutzfunktion im Speichel und sind bei Patienten mit Entzündungen in der Mundhöhle, gegenüber gesunden Probanden erhöht (Mizukawa et al.1999).

Auch in unserer Studien konnten deutliche Unterschiede beobachtet werden. Die Konzentration der HNP1-3 war bei der chronischen Parodontitis 9fach höher als in der Kontrollgruppe und 30fach höher als bei Patienten mit aggressiver Parodontitis. Bei der statistischen Auswertung konnte eine Signifikanz beim Vergleich der Gruppen chronische Parodontitis und aggressive Parodontitis ($p=0,049$) sowie zwischen chronischer Parodontitis mit der Kontrollgruppe ($p=0,042$) ermittelt werden.

Puklo et al. 2008 untersuchten den Gehalt an HNP1-3 in der gingivalen Sulkusflüssigkeit (GCF) von aggressiver und chronischer Parodontitis. Hier wurden in der Gruppe der chronischen Parodontitis ebenfalls höhere Werte als bei aggressiver Parodontitis gemessen. Die Kontrollgruppe wies in dieser Studie die geringsten Konzentrationen auf.

Allerdings beschrieben Dale et al, dass HNP1-3 relativ unwirksam gegen die meisten Bakterien in der Mundhöhle sind (Dale et al.2005).

In der Studie von Puklo et al. 2008 wurde auf einen Zusammenhang zwischen der Bakterienflora und Krankheitsformen hingewiesen. Der Mikroorganismus *P. gingivalis* wurde häufiger in der chronischen Parodontitis nachgewiesen. Die erhöhten Werte des HNP1-3 in der chronischen Parodontitis korrelierten mit den Zahlen des *P. gingivalis* (Puklo et al.2008).

Ebenso traten höhere Werte in der Kontrollgruppe gegenüber der aggressiven Parodontitis auf. Hier besteht noch ein Bedarf an Aufklärung durch weitere klinische Studien.

Das hCAP18 zeigte ebenfalls erhöhte Werte bei Parodontitispatienten gegenüber der Kontrollgruppe, allerdings erwies sich der Unterschied nicht als signifikant. Die höchste Konzentration wurde in der chronischen Parodontitis bestimmt. Cathelicidin ist vor allem in neutrophilen Granulozyten und auch im Epithel vorhanden (Frohm et al. 1997). Besonders nichtkeratinisierte Epithelzellen der Gingiva am Taschengrund produzieren AMP's bei Kontakt mit Plaquebakterien (Ouhara et al. 2005). LL37 kann das Wachstum der pathogenen Mundflora in - vitro hemmen (Guthmiller et al. 2001). Laut Dale et al. 2005 sind die wichtigsten Bakterien *A. actinomycetemcomitans*, *S. mutans*, *F. nucleatum* und *Capnocytophaga sputigena* (Dale et al. 2005), gegen die die antimikrobielle Aktivität gerichtet ist. In der hier vorliegenden Studie wurden bei aggressiver Parodontitis nicht die höchsten Spiegel gemessen, ein Mangel könnte das Entstehen dieser Parodontitisform begünstigen.

6.4 Cathepsin C und Serinproteinasen

Das Enzym Cathepsin C wies in der Gruppe der aggressiven Parodontitis die höchste Aktivität auf. Der Unterschied zur Kontrollgruppe erwies sich als signifikant. Ein Vergleich der chronischen Parodontitis mit der Kontrollgruppe und der aggressiven Parodontitis erbrachte keine statistischen Unterschiede. Cathepsin C ist die entscheidende Protease zur Aktivierung der neutrophilen Serinproteasen Elastase, Cathepsin G und Proteinase 3. Bei Patienten mit Papillon –Lefèvre –Syndrom und dem *A. actinomycetemcomitans* liegen Mutationen im Gen von Cathepsin C vor (Noack et al. 2008). Diese Patienten sind vermehrt mit *A. actinomycetemcomitans* infiziert. Die Leukozytenfunktion zur Neutralisierung des Leukotoxin und zur Eliminierung des *A. actinomycetemcomitans* ist reduziert (de Haar et al. 2005). Unsere Studie legt die Vermutung nahe, dass zur Elimination von *A. actinomycetemcomitans* offensichtlich eine vermehrte Aktivierung von CTSC erfolgt.

Die neutrophile Elastase ist eine Serinprotease, welche entscheidend zur Zerstörung parodontaler Strukturen beiträgt. Während der Phagozytose oder bei Lysis wird sie aus den primären, azurophilen Granula freigesetzt. Die neutrophile Elastase wurde in GCF von Parodontitispatienten nachgewiesen. Die Höhe der

Aktivität hängt mit der Schwere und dem Verlauf der Erkrankung zusammen (Cox et al.2006). Auch konnte Cox et al.2006 diese Protease im Speichel von Parodontitispatienten nachweisen. Im Speichel ist ebenfalls ein Regulator dieses Enzyms, der sekretorische Leukozyten Protease Inhibitor zu finden (Cox et al.2006). Nach Jin et al. 2003 ist die Elastase der GCF ein Indikator für Gingivitis und Parodontitis (Jin et al.2003). Zusammenhänge zwischen parodontaler Destruktion und proteolytischer Aktivität in der Sulkusflüssigkeit wurde in Untersuchungen von Cimasoni und Kowashi (1980) und Jenzsch et al. 2009 beschrieben.

Uitto 1996 zeigte, dass die orale Elastaseaktivität als einfacher Indikator für die parodontale Gesundheit genutzt werden konnte. Deutlich erhöhte Speichelwerte wurden hier bei Patienten mit Taschentiefen von ≥ 6 mm ermittelt. Diese Berichte werden durch unsere Studie bestätigt. Das Enzym neutrophile Elastase erzielte die höchste Aktivität in der chronischen Parodontitis. Eine statistische Signifikanz ($p=0,005$) lag zwischen der Kontrollgruppe und der chronischen Parodontitis vor.

Die Proteinase ist wie die Elastase eine Serinproteinase. Dieses Enzym zeichnet sich durch verschiedene biologische Aktivitäten aus. Unter anderem zählt der Abbau der extrazellulären Matrix dazu. Kollagen, Elastin, Proteoglykan und Fibrinogen werden abgebaut (Ohlsson et al. 1974). Außerdem stimuliert Proteinase 3 die Freisetzung der Entzündungsmediatoren TNF- α , IL-1 β aus Monozyten und die Produktion von IL-8 und MCP-1 durch Endothelzellen (Uehara et al. 2009).

Die höchste Aktivität wurde wiederum in der Gruppe der chronischen Parodontitis gemessen. Ein signifikanter Unterschied wurde zwischen der Kontrollgruppe und der chronischen Parodontitis ermittelt. Hier wurde gezeigt, dass es durch die entzündliche Veränderung des Parodonts und durch die parodontopathogene Bakterien zu einer erhöhten Aktivierung der Proteinase gekommen ist.

6.5 Antioxidaktive und oxidative Parameter im Speichel

Im menschlichen Körper gibt es möglicherweise einen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und anderen Erkrankungen. Der oxidaktive Stress leistet einen Beitrag zu allen entzündlichen Erkrankungen, wie zum Beispiel Arthritis, Vaskulitis, Herzerkrankungen, Neurologische Erkrankungen, Parodontitis oder Bluthochdruck (McCord 2000). Auch in unserer Studie wurden verschiedene antioxidative und oxidative Variablen untersucht. So wurde bei den oxidativen Parametern die Aktivität der MPO bestimmt und zum anderen Malondialdehyd (MDA) gemessen.

Die höchste Aktivität der MPO wurde in der aggressiven Parodontitis ermittelt. In einer Studie von Yamalik (1993) wurde die höchste Aktivität von MPO bei der progressiv verlaufenden Parodontitis, heute aggressiven Parodontitis ermittelt. Dieser Untersuchungsbefund deutet auf eine Beziehung zwischen MPO-Aktivität und Schweregrad der parodontalen Zerstörung hin (Yamalik et al.1993). Ursache dafür könnte das Bakterium der *A. actinomycetemcomitans* sein. So wurde eine erhöhte Aktivität der neutrophilen MPO gegenüber *A. actinomycetemcomitans* beschrieben (Miyasaki 1987).

Freie Radikale und andere ROS haben eine extrem kurze Halbwertszeit und können nicht direkt in vivo gemessen werden. Deshalb werden in klinischen Studien Biomarker des oxidativen Stresses ermittelt. Einen solchen Biomarker stellt MDA dar. Es gehört zu den Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS). MDA entsteht beim Abbau von Lipidperoxiden und kann somit als indirekter Radikalnachweis zur Abschätzung des oxidativen Stresses benutzt werden (Winnefeld et al. 1995, Winnefeld 1996, Draper et al. 1990). Bei der Entzündung des Parodontiums kommt es zu einer verstärkten Abwehrreaktion durch Aktivierung von neutrophilen Granulozyten. Ursache für diese Aktivierung sind parodontopathogene Bakterien und vermehrte Freisetzung von Sauerstoffradikalen. In Folge nimmt die Lipidperoxidation zu und somit auch der Gehalt an Malondialdehyd (Chapple 1996, Chapple and Matthews 2007, Pfeiffer 2008).

In einer Querschnittstudie von Klinger et al. 2000 wurden sowohl im Gesamtspeichel als auch im stimulierten und unstimulierten Parotisspeichel von Parodontitispatienten

im Vergleich mit Speichel von parodontal Gesunden ebenfalls signifikant höhere Konzentrationen an MDA ermittelt.

Auch in unserer Studie wurden bei beiden Parodontitisformen signifikant höhere Spiegel an MDA, verglichen mit der Kontrollgruppe gemessen, wobei die höchsten Werte bei aggressiver Parodontitis vorlagen.

An antioxidativen Parametern wurden in unserer Studie die Aktivität an Katalase, GSHPx, SOD sowie der Spiegel an Harnsäure bestimmt. Die größte Enzymaktivität der SOD wurde bei Patienten mit chronischer Parodontitis ermittelt. Für den erhöhten Wert in der chronischen Parodontitis kann das Vorhandensein des *P. gingivalis* und die Aktivierung des antioxidativen Mechanismus verantwortlich sein. Ein Abwehrmechanismus des Bakterium *P.gingivalis* ist die SOD. Das Enzym wandelt das Sauerstoffradikal (O_2^-) in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) um. Das entstandene H_2O_2 wird durch die Katalase abgebaut (McCord 2000). H_2O_2 ist das Endprodukt bei der Reaktion der SOD und entsteht auch bei der Lipidperoxidation (Lehninger et al. 2001). Im Gingivasulkus wurde vereinzelt über vermehrte Aktivität der Katalase bei Parodontitis berichtet (Panjamurthy et al. 2005, Borges et Borges et al. 2007). In der Literatur wird wenig über die Katalase im Speichel bei Parodontiserkrankung beschrieben. Die Aktivität von SOD und Katalase war in beiden Parodontitisgruppen signifikant höher als bei parodontal gesunden Personen. Die Aktivität war bei Patienten mit aggressiver Parodontitis am höchsten. Die Katalase und SOD können Anwendung zur Diagnostik der aggressiven Parodontitis finden.

Die GSHPx des Speichels, erstmals 1987 von Hojo beschrieben, stellt neben anderen Peroxidasen einen entscheidenden Schutz gegen reaktive Sauerstoffradikale dar. Dieses Enzym stellt einen wichtigen Bestandteil des menschlichen Speichels dar, da es von Bakterien gebildetes Wasserstoffperoxid inaktivieren kann (Carlsson 1987). Im Speichel könnte ein Anstieg der GSHPx-Aktivität aufgrund einer Parodontitis und des damit verbundenen Reizes somit erklärt werden. In der vorliegenden Studie war die antioxidative Reaktion durch die Glutathionperoxidase in der chronischen Parodontitis erhöht. Ein ähnliches Ergebnis stellten Wei et al. 2004 fest, die die Sulkusflüssigkeit von Patienten mit Gingivitis, chronischer Parodontitis sowie Gesunden untersuchten. Die Parodontitispatienten wiesen die stärkste antioxidative

Reaktion auf. Dem gegenüber konnte Tsai 2005 keine Unterschiede zwischen Parodontitispatienten und Gesunden feststellen. Chapple et al. 1996 fanden eine reduzierte Konzentration an Antioxidantien bei Parodontitispatienten (Chapple et al. 1996). Die Aktivität der Glutathionperoxidase gilt als ein Zeichen der antioxidativen Abwehr. Eine erhöhte Aktivität spricht für eine Adaptation des antioxidativen Systems an eine dauerhaft gesteigerte oxidative Belastung (Flohe 1988, Chapple 1996, Winnefeld 1996).

Harnsäure ist das Hauptantioxidans im Speichel (Moore et al. 1994, Chapple et al. 1996). In unserer Studie war die Konzentration der Harnsäure bei chronischer Parodontitis am größten. Moore et al. (1994) haben ebenfalls eine nicht signifikante Erhöhung des Harnsäurespiegels bei Patienten mit chronischer Parodontitis ermittelt.

6.6 Immunglobuline

Immunglobuline sind sekretorische Antikörper, die den Makroorganismus vor potentiell schädlichen Mikroorganismen schützen soll (Genco & Slots 1984; Childers & McGhee 1989). Die menschliche Immunantwort, insbesondere die Produktion von IgG und IgA, haben eine schützende Rolle in der Pathogenese bei parodontalen Erkrankungen. Über das Sulkusfluid gelangen stets geringe Mengen IgA, IgM und IgG in den Speichel. Sie werden hauptsächlich als Immunantwort auf gingivale Plaquerzitze gebildet. In der hier durchgeführten Studie wurde der Gesamtimmunglobulingehalt sowie die spezifisch gegen *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* gerichtete IgA und IgG ermittelt.

Neben IgA spielt auch IgG eine wichtige Rolle bei der Immunität der Schleimhaut. IgG ist im gesamten Speichel vorhanden. Dieses stammt vom Serum und gelangt durch passive transmukosale Diffusion in den Speichel (Sitig et al. 2002). Die Konzentration wird mit 14 mg/l (Carlen & Olsson 1995) und 46 mg/l (Ciba-Geigy 1977) angegeben. Für parodontal gesunde Personen können wir diese Werte mit $17,51 \pm 19,12$ mg/l bestätigen. Die Patienten mit aggressiver Parodontitis hatten einen Spiegel von $28,97 \pm 26,74$ mg/l. Die Werte bei chronischer Parodontitis mit $74,37 \pm 76,09$ mg/l übertrafen deutlich, die in der Literatur angegebenen Werte und spiegeln somit das Abwehrgeschehen wieder.

Der Spiegel an spezifisch gegen *A. actinomycetemcomitans* gerichteten IgG war bei Patienten mit aggressiver Parodontitis am höchsten.

Es kam hier offensichtlich zu einer vermehrten Antigenstimulation auf Grund des in höherer Menge vorkommenden *A. actinomycetemcomitans* in der Plaque. Wilson et al. 1995 konnten erhöhte Serumspiegel von A.a.-IgG bei LJP, heute aggressive Parodontitis, messen (Wilson et al.1995).

Der Spiegel an spezifisch gegen *P. gingivalis* gerichtetes IgG war bei Patienten mit chronischer Parodontitis am höchsten. In dieser Gruppe wurde auch die höchste Zahl positiver Plaqueproben mit diesem Bakterium ermittelt. Auch hier ist von somit einer vermehrten Antigenstimulation auszugehen. Auch Takeuchi et al. 2006 ermittelten höhere Werte des spezifischen IgG bei aggressiver und chronischer Parodontitis gegenüber der Kontrollgruppe (Takeuchi et al.2006).

Das IgA ist das überwiegende Immunglobulin des Speichels. Es spielt eine wichtige Rolle im lokalen Immunsystem (Hägewald et al. 2002). Laut Marcotte et al. 1998 ist das Immunglobulin das prädominante Immunglobulin im Speichel. Das bestätigt sich in unserer Studie. Das Ges-IgA war gegenüber dem Ges-IgG erhöht. Wenig ist über den Zusammenhang von s-IgA und parodontalen Erkrankungen bekannt.

So existieren widersprüchliche Daten über die Konzentration sekretorischer Antikörper im Speichel von parodontal Kranken und Gesunden (Orstavik & Brandtzeag, 1975; Ranney et al., 1981; Sandholm & Gronblad, 1984; Henskens et al., 1996; Myint et al., 1997; Hägewald et al, 2000).

Der Immunglobulingehalt A des Speichels wurde mit $58,84 \pm 48,13$ mg/l in der Kontrollgruppe ermittelt. Das Ges-IgA ist gegenüber dem Ges-IgG erhöht. Das IgA ist das prädominante Immunglobulin im Speichel, dagegen kommt das IgG häufiger im Serum vor. Unsere IgA-Werte lagen deutlich über denen von Hägewald et al. (2000, 2003) ermittelten von 0,0112 - 0,121 mg/ml, allerdings unter denen von Carlen und Olsson (1995) mit 194 mg/l. Diese Werte wurden auch nicht von unseren Patienten mit chronischer Parodontitis, wo durchschnittlich $125,00 \pm 100,29$ mg/l existierten, erreicht. Die Regulation der IgA Reaktion ist sehr komplex. Sie wird durch Faktoren, wie zum Beispiel die Verteilung der T-Helferzellenpopulation, beeinflusst (Celenligil et al. 1997, Katz et al. 1998; Bos et al 2001, Bosch et al. 2001).

In unserer Studie waren die spezifisch gegen *A. actinomycetencomitans* bzw. *P. gingivalis* gerichteten IgA-Spiegel leicht, aber nicht signifikant erhöht. Das unterstreicht, dass IgG bei Parodontitis eine größere Rolle als IgA spielt. In Versuchen von Ebersole et al. 1981 waren die spezifische gegen *A. actinomycetencomitans* gerichtete IgA (A.a.-IgA) gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (Ebersole 1981). In Untersuchungen von Hägewald et al. 2002 war das A.a.-IgA der aggressiven Parodontitis niedriger als in der Kontrollgruppe (Hägewald et al. 2002).

Weiterhin sah Hägewald et al. 2000 in einer Studie keine Unterschiede in der Konzentration und der Sekretion des P.g.-IgA zwischen der Kontrollgruppe und GEOP (Generalisierte, früh beginnende Parodontitis, heute aggressive Parodontitis). Die Kontrollgruppe zeigte in seiner Studie erhöhte Werte gegenüber der Parodontitisgruppe (Hägewald et al. 2000).

Verschiedene Studien haben uns gezeigt, dass Patienten mit Parodontitis eine sekretorische Immunantwort gegen Antigene von einem oder mehreren parodontopathogenen Bakterium besitzen, welche individuell verschieden sind (Myint et al. 1997). Die Regulation des Immunglobulin A ist ein komplexer Prozess, der von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird. Zu diesen zählen die Verteilung der T-Helferzellen, die B-zellpopulation oder die selbstständige Aktivierung. (Bosch et al. 2001).

7 Schlussfolgerungen

Der Speichel ist ein einfach zu gewinnendes Untersuchungsmedium. Somit besitzen Speicheltests große Bedeutung zur Diagnostik und Verlaufskontrolle von Erkrankungen in der Mundhöhle.

Entzündungsprozesse führen in der Mundhöhle einschließlich der Speicheldrüsen zu oxidativem Stress. Die aggressive Parodontitis weist die höchste Aktivität bei den oxidativen Parametern auf und könnte somit als Marker für diese Parodontitisform verwendet werden. Hohe Werte bei den antioxidativen Parametern sprechen hingegen eher für eine chronische Parodontitis. Das Immunsystem ist ein wichtiges Schutzsystem des menschlichen Körpers.

Ein Marker für die chronische Parodontitis im Speichel könnten hohe Spiegel an HNP1-3 darstellen. Auch weitere Marker der angeborenen Immunantwort sind bei chronischer Parodontitis gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Eine Ausnahme ist CTSC, welches offensichtlich einen Zusammenhang zur aggressiven Parodontitis aufweist. Die bakterienspezifischen Immunglobuline G sind erhöht, wenn ein quantitativ höherer Nachweis der jeweiligen Bakterien vorliegt. So besteht ein Zusammenhang der aggressiven Parodontitis mit *A. actinomycetemcomitans* und dessen bakterienspezifischen IgGs. Für eine chronische Parodontitis sprechen hohe spezifische *P. gingivalis*-IgG-Spiegel. Immunglobulin A eignet sich nicht zur Parodontitisdiagnostik.

Weitere klinische Studien sind erforderlich, um einen Unterschied zwischen aggressiver Parodontitis, chronischer Parodontitis und parodontal gesunden Personen zu spezifizieren.

8 Literaturverzeichnis

1. **Abiko Y., Nishimura M., Kaku T. 2003.** Defensins in saliva and the salivary glands. *Med Electron Microsc. Dec;36(4):247-52*
2. **Agerberth B., Charo J., Werr J., Olsson B., Idali F., Lindbom L, Kiessling R, Jörnvall H, Wigzell H, Gudmundsson GH. 2000.** The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood. ; 96(9):3086-93.*
3. **Albander J. , Olsen I., Gjermo P. 1990.** Association between DNA probe-detected periodontal bacteria and alveolar bone loss and other clinical signs of periodontitis. *Acta Odontol Scand: 415-423*
4. **Armitage GC.1999.** Development of classification System for Periodontal diseases and Conditions. *Ann Periodontal (4) 1-6*
5. **Altmann L.C., Page R.C. Vandestein, G.E., Dixon, L.I., Bradford, C. 1985.** Abnormalities of leukocyte chemotaxis in patients with various forms of periodontitis. *J Periodontal Res.; 20:553-563*
6. **Asikainen S., Alaluusa S, Saxen L. 1991.** Recovery of Actinobacillus actinomycetemcomitans from teeth, tongue and saliva. *J Periodontal, 62: 203-206*
7. **Bank U., Reinhold D., Schneemilch C., Kunz D., Synowitz H.J., Ansorge S. 1999.** Selective proteolytic cleavage of IL-2 receptor and IL-6 receptor ligand binding chains by neutrophil-derived serine proteases at foci of inflammation. *J Interferon Cytokine Res.;19(11):1277-87*

8. **Battino M., Bullon P., Wilson M. H. Newman 1999** Oxidative Injury and Inflammatory Periodontal Diseases : the Challenge of Anti-Oxidants to Free Radicals and Reactive Oxygen Species. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, Vol. 10, No. 4, 458-47)*
9. **Beikler T., Karch H. Flemmig T.F. 2005.** Mikrobiologische Diagnostik in der Parodontitistherapie. Gemeinsame Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie (DGP) und der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK). *Deutsche Gesellschaft für Parodontologie Kassenzahnärztliche Vereinigung Hessen, Landeszahnärztekammer Hessen. Klassifikation der Parodontalerkrankungen DZZ 60 (2005) 660-662*
10. **Belibasakis, G., Johansson, A., Wang, Y., Claesson, R., Chen, C., Asikainen, S. & Klafas, S.2002.** Inhibited proliferation of human periodontal ligament cells an gingival fibroblasts by Actinobacillus actinomycetemcomitans involvement of the cytolethal distending toxin. *Eur j Oral Sci 110, 366-37*
11. **Berthold P. 1992.** Electron immunocytochemical localization Actinobacillus actinomycetemcomitans leukotoxin. *Oral Microbiol Immunol, 11. 7: 24-27*
12. **Beverly A. Dale and L. Page Fredericks. 2005.** Antimicrobial Peptides in the Oral Environment: Expression and Function in Health and Disease. *Curr Issues Mol Biol. 7(2): 119–133*
13. **Black H. S., Lenger W.A., Gerguis J. and Thornby J.I. 1985.** Relation of Antioxidants and Level of Dietary Lipid to Epidermal Lipid Peroxidation and Ultraviolet Carcinogenesis .*Cancer Research 45, 6254-625*

14. **Bode W., Wei A.Z., Huber R., Meyer E., Travis J., Neumann S. 1986.** X-ray crystal structure of the complex of human leukocyte elastase (PMN elastase) and the third domain of the turkey ovomucoid inhibitor. *EMBO J. (10):2453-8*
15. **Borges I. Jr., Machado Moreira E.A., Filho D.W, de Oliveira T.B., Spirella da Silva M.B. and Fröde T.S. 2007.** Proinflammatory and Oxidative Stress Markers in Patients with Periodontal Disease. *Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation Volume Article ID 45794, 5 pages*
16. **Bos N, Jiang HQ, Cebra JJ. 2001.** T cell control of the gut IgA response against commensal bacteria. *Gut 48:762-764*
17. **Bosch Jos A , De Geus Eco J.C, Kelder Angele, Veerman Enno C.I., Jo Hoogstarn Johan and Amerongen Arie V. Nieuw, Merongen. 2001.** Differential effects of active versus passive coping on secretory immunity. *Psychophysiology 38:5:836-846*
18. **Brissette C und Fives-Taylor PM. 1999.** Actinobacillus actinomycetemcomitans may utilize either actin-dependent or actin-independent mechanisms of invasion. *Oral Microbiol Immunol, 14: 137-142.*
19. **Brown L und Loe H. 2002.** Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontol : 57-71.*
20. **Buchmann R., Müller R.F., Heinecke A., Lange D.E. 2000** Actinobacillus actinomycetemcomitans in destructive periodontal disease. Three-year follow-up results. *J Periodontol.; 71(3):444-53.*
21. **Bucki R., Byfield F.J., Janmey P.A. 2007.** Release of the antimicrobial peptide LL-37 from DNA/F-actin bundles in cystic fibrosis sputum. *Eur Respir J. 29(4):624-32.*

22. **Challacombe S.-J., Sweet S.P. 2002.** Oral mucosal immunity and HIV infection: current status. *Oral Diseases* Volume 8 Issue 2, Pages 55 - 62
23. **Chapple, ILC., Brock G., Eftimiadi C., Matthews J.B. 2002.** Glutathione in gingival crevicular fluid and its relation to local antioxidant capacity in periodontal health and disease. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 55: 367-373
24. **Chapple Iain L C. 1996.** Role of free radicals and antioxidants in the pathogenesis of the inflammatory periodontal diseases. *Clin Mol Pathol.* 49(5): M247–M255
25. **Çelenligil H., Ebersole J.L. 1997.** Characteristics and responses of EBV immortalized B cells from periodontal disease patients. *Oral disease* Volume 3 Issue 4, Pages 262-271
26. **Coeshott C., Ohnemus C., Pilyavskaya A., Ross S., Wieczorek M., Kroona H., Leimer A.H., Cheronis J. 1999.** Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* , 11, :6261-6.
27. **Comayras, C., Tasca, C., Peres, S.Y., Ducommun, B., Oswald, E& De Rycke, J.1999.** Escheria coli cytolethal by distending toxin blocks the HeLa cell cycle at the G₂ /M transition by preventing cdc2 proteinkinase dephosphorylation and activation. *Infect Immun* 65, 5088-5095
28. **Cortes-Bratt, X., Chaves-Olarte, E., Lagergard, T. Thelestam, M. 1999.** The cytolethal distending toxin from the chancroid bacterium *Haemophilus ducreyi* induces cell-cycle arrest in the G₂ phase. *J Clin Invest* 103, 107-115
29. **Courant P, Bader H. 1966.** *Bacteroides melaninogenicus* and its products in the gingiva of man. *Periodontics*, 4:131-136

30. **Cox S.W., Rodriguez-Gonzalez E.M., Booth V., Eley B.M. 2006.** Secretory leukocyte protease inhibitor and its potential interactions with elastase and cathepsin B in gingival crevicular fluid and saliva from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res.*,41(5):477-485
31. **Dale B.A., Fredericks L.P. 2005.** Antimicrobial peptides in the oral environment expression and function in health and disease. *Curr Issues Mol Biol.* 7(2):119-133
32. **D`Aiuto, F. Nibali, L., Parkar, M., Suvan, J.& Tonetti, M.S.2005.** Short-term effects of intensive periodontal therapy on serum inflammatory markers and cholesterol. *J Dent Res* 84, 269-273
33. **Darveau R., Belton C., Reife R., Lamont R. 1998.** Lokal chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 66: 1660-1665.
34. **Davies K.J., A Sevanian A., Muakkassah-Kelly S.F. and Hochstein P. 1996.** Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem J. May 1; 235(3): 747-754.*
35. **de Haar Susanne F. , Hiemstra Pieter S., van Steenbergen Martijn T. J. M,Everts Vincent and Beertsen Wouter .2006.** Role of Polymorphonuclear Leukocyte-Derived Serine Proteinases in Defense against *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infection and Immunity*, 74(9):p. 5284-5291
36. **Del Vigna de Almeida ,Patricia, Gregio, Ana Maria Trindade, Machado, Maria Angela, Naval, Soares de Lima Antonio Adilson, Azevedo Luciana Reis. 2008.** Saliva Composition and Functions: A Comprehensive Review. *Journal of contemporary dental practice, Volume 9 Number 3*

37. **Deutsche Gesellschaft für Parodontologie 2001.** Klassifikation der Parodontalerkrankungen. *Quintessenzverlag*
38. **Dewald B, Rindler-Ludwig R, Bretz U, Baggiolini M. 1975.** Subcellular localization and heterogeneity of neutral proteases in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med.*1;141(4):709-23.
39. **Dörries, R., Hof, H. 2004.** Medizinische Mikrobiologie. *Georg Thieme Verlag*
40. **Doungudomdacha S., Rawlinson A., Douglas C.W.I. 2000.** Enumeration of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque samples by a quantitative-competitive PCR method.*J. Med.Microbiol Vol. 49 , 861-874*
41. **Draper, H.H., Haley, M, 1990.** Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.,186:421-31*
42. **Durand Patrick, Fabrega Sylvie, Henrissat Bernard, Mornon Jean-Paul and Lehn Pierre. 2000.** Structural features of normal and mutant human lysosomal glycoside hydrolases deduced from bioinformatics analysis. *Human Molecular Genetics, Vol. 9, No. 6 967-977*
43. **Edgar WM. 1992.** Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J, 172:305-312.*
44. **Edgerton M., Koshlukova S.E. .2000.** Salivary histatin 5 and its similarities to the other antimicrobial proteins in human saliva. *Adv Dent Res 14: 16-21*
45. **Eley B, Cox S.2003** Proteolytic and hydrolytic enzymes from putative periodontal pathogens: characterization, molecular genetics, effects on host defenses and tissues and detection in gingival crevice fluid. *Periodontol.,31 105-124*

46. **Fives-Taylor P., Meyer D., Mintz K., Brisette C. 2000.** Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontology 2000*, 20:136-167
47. **Flemming, T.F.; Milian E., Kopp C., Karch H., Klaiber B. 1998.** Differential effects of systemic metronidazole and amoxicillin on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in intraoral habits. *J Clin Periodontol.* 25: 1-10
48. **Flemming, T.1999.** Periodontitis. *Ann Periodontol* ;4:32-37
49. **Flohé L.1988** Glutathione peroxidase. *Basic Life Sci.* 1988; 49:663-8
50. **Fowler E.B., Brealut L.G., Cuein M.F. 2001.** Periodontal disease and its association with systemic disease. *Mil Med*, 166 (1): 85-89
51. **Frederiksson, M.I., Figuerredo C.M., Gustafsson, A. Bergstrom, K.G., Asman B.E. 1999.**Effect of periodontitis and smoking on blood leukocytes and acute phase proteins. *J Periodontol* 70, 1355-1360
52. **Fuchs J, Schöfer H., Milbradt R., Freisleben H.J., Buhl R, Siems W, Grune T.. 1993.** Studies on lipoate effects on blood redox state in human immunodeficiency virus infected patients. *Arzneimittelforschung.* 43(12):1359-62
53. **Gänßler P, Korb A. 2006.** Oxidativer Stress im Blut und Speichel von Nichtrauchern und Rauchern bei der Therapie der aggressiven Parodontitis [Dissertation]. *Jena:Friedrich-Schiller-Universität.*
54. **Gamonal J., Acevedo A., Bascones A., Jorge O., Silva A. 2001.** Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and chemokines in adult periodontitis. *J Periodontal Res.*,36(3):194-203

55. **Ganz T., Selsted M.E., Lehrer R.I. 1990.** Defensins. *Eur J Haematol.*, 44(1):1-8.
56. **Gennaro R., Zanetti M.2000**Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers*.55(1):31-49
57. **Gabay J.E., Heiple J.M., Cohn Z.A:1986.**Nathan C.F. Subcellular location and properties of bactericidal factors from human neutrophils. *J Exp Med. 1;* 164(5):1407-21
58. **Genco R.J. 1996,** Current view of risk factors for periodontal disease. *J Periodont* 67,1041-1049
59. **Genco R. J. 1990.** Classification and clinical radiographic features of periodontal disease. *Contemporaray Periodontics. St. Louis: CV Mosby, 63-81*
60. **Goi N., Hirai Y., Harada H., Ikari A., Ono T., Kinae N., Hiramatsu M., Nakamura K., Takagi K.2007.** Comparison of peroxidase response to mental arithmetic stress in saliva of smokers and non-smokers. *J Toxicol Sci.*, 32(2):121-7.
61. **Greenstein G., Caton J., Polson A.M. . 1981.** Depth of periodontal probe penetration related to clinical and histologic signs of gingival inflammation. *J Periodontol.* 52(10):626-9
62. **Grigoriev I.V.; Nikolaeva L.V.; Artamonov I.D. 2003.**Protein Content of Human Saliva in Various Psycho-emotional States. *Biochemistry (Moscow)*, Volume 68,Number 4, pp. 405-406(2)

63. **Guthmiller, Janet M.; Vargas, Kaaren G. , Rupasree Srikantha, Lori L. Schomberg, Paula L. Weistroffer, Paul B. McCray Jr., and Brian F. Tack. 2001.** Susceptibilities of Oral Bacteria and Yeast to Mammalian Cathelicidins Antimicrobial *Agents and Chemotherapy*, p. 3216-3219, Vol. 45, No. 11
64. **Halliwell B., Gutteridge J.M. 1990.** Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an over view. *Methods Enzymol.* 1990; 186:1-85
65. **Hannig M., Joiner A.2006.**The structure, function and properties of the acquired pellicle, in Monogr. *Oral Sci, Duckworth R., Editor.* p. 29-64.
66. **Hannig C., Hannig M., Attin T. 2005.** Enzymes in the acquired enamel pellicle. *Eur J Oral Sci* 113: 2-13
67. **Hanson H. 1961.** Zusammensetzung und Funktion des Speichels. *Dtsch Zahnarztl Z*, 16:143-152.
68. **Hassan H.M., Fridovich I.1981.**Chemistry and biochemistry of superoxide dismutases. *Eur J Rheumatol Inflamm.* 4(2):160-72
69. **Hellwig, Klimek, Attin, 1999** Einführung in die Zahheilkunde, *Urban & Fischer Verlag*
70. **Henderson, B., Wilson, M. & Hyams J.1989.** Cellular micribiology: cycling into the millenium. *Trends Cell Biol* 8, 384-387
71. **Henle Ernst, Stuart Linn.1997.** Formation, Prevention, and Repair of DNA Damage by Iron/Hydrogen Peroxide.*The Journal of biological chemistry.* Vol. 272, No. 31, Issue of August 1, pp. 19095–19098

72. **Henskens Y.M.C. van den Keijbus P. A. M., E.C.I. Veerman, G.A. Van der Weijden, M.F. Timmerman, C. M. Snoek, U. Van der Velden, A. V. Nieuw Amerongen.1996.** Protein composition of whole and parotid saliva in healthy and periodontitis subjects. Determination of cystatins, albumin, amylase and IgA .*Journal of Periodontal Research Volume 31 Issue 1,Pages 57-65*
73. **Hintermann E., Haake S., Christen U., Sharabi A., Quaranta V. 2002.** Discrete proteolysis of focal contact and adherens junction components in Porphyromonas gingivalis infected oral keratinocytes: a strategy for cell adhesion and migration disabling. *Infect Immun, 70: 5846-5856*
74. **Holt S.C., Bramanti T.E.1991.** Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med. 2(2):177-281.*
75. **Huttner K.M., Bevins C.L.1999.** Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense. *Pediatr Res., 45(6):785-94.*
76. **Imamura T. 2003.** The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. *L Periodontal, 74: 111-118*
77. **Janoff A.** Elastase in tissue injury.1985. *Annu Rev Med 36: 207-16.*
78. **Jenzsch, A., Eick, S, Rassoul, F, Purschwitz R. and Jentsch H. 2009.** Nutritional intervention in patients with periodontal disease: clinical, immunological and microbiological variables during 12 months. *British Journal of Nutrition 101, 879–885*
79. **Jessup J.M. 1994.** "Cathepsin B and other proteases in human colorectal carcinoma [comment]." *Am J Pathol, 145: 253-62*

80. **Jin L, Yu C, Corbet E.F. 2003.** Granulocyte elastase activity in static and flow gingival crevicular fluid. *J Periodontal Res.* 38(3):303-10
81. **Kaplan J., Schreiner H., Furgang D., Fine D. 2002.** Population structure and genetic diversity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains isolated from localized juvenile periodontitis patients. *J Clin Microbiol*, 40: 1181-1187.
82. **Karpinia K.; Magnussen I.2000.**Recent approaches to periodontal therapy. *Export Opin Pharmacother.* 1(6): 1219-26
83. **Kasuga, Y., Kazuyuki I., Katsuji O. 2000.** Significance of detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and *Treponema denticola* in periodontal pockets. *Bull.Tokyo Coll, Vol.41No 3, pp109-117,*
84. **Katz J., Sambandam V., Wu J.H., Michalek SM, Balkovetz DF.2000.** Characterization of *Porphyromonas gingivalis*-induced degradation of epithelial cell junctional complexes *Infect. Immun.* 68(3):1441-9.
85. **Katz J., Michalek S.M. 2009.**Effect of immune T cells derived from mucosal or systemic tissue on host responses to *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiology and Immunology Volume 13 Issue 2,Pages 73-80*
86. **Kehrer JP.2000.** The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology.* 14;149(1):43-50
87. **Kolodrubetz, D., Spitznagel, J., Jr, Wang, B., Phillips, L. H., Jacobs, C. & Kraig, E. 1996.** Cis elements and trans factors are both important in strain-specific regulation of the leukotoxin gene in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 64, 3451–3460
88. **König, K.G. 1987.** Karies und Parodontopathien. *Thieme. Stuttgart*

89. **Kowashi, Y., Cimasoni, G., Matter, J. 1980:** Collagen breakdown by gingival collagenase and elastase. *Experientia* 36, 395
90. **Lakio, L., Paju S., Alfthan, G., Tirola T., Asikainen, S., Pussinen P. 2003.** Actinobacillus Actinomycetemcomitans Serotype d-specific Antigen Contains the O Antigen of Lipopolysaccharide; *Infection and Immunity* 71: 5005-5011
91. **Lang, N.P. Gusberti F.A., B.E. Sigrist. 1985.** Ätiologie der Parodontalerkrankungen. *Acta Parod.* 14,1
92. **Lehrer R.I., Ganz T.1999.** Antimicrobial peptides in mammalian and insect host Defence. *Curr Opin Immunol.*11(1):23-7
93. **Lehninger Albert L., Nelson David L und. Cox Michael M 2001.** Lehninger Biochemie Springer Verlag. 3.Auflage
94. **Lie M.A., Myint M.M., Schenck K., Timmerman M.F., van der Velden U., van der Weijden G.A, Loos B.G.2002** Parotid salivary S-IgA antibodies during experimental gingivitis in smokers and non-smokers *J Periodontal Res.*(2):86-92
95. **Little R.E, Gladen B.C., 1999.** Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy a review of the literature. *Reprod Toxicol.*13(5):347-52
96. **Loesche W., Syed S., Morrison E. 1985.** Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. *J Periodontol*, 56: 447-456
97. **Loos, B.G., Craandijk, J., Koek, F.J., Wertheim-van Dillen, P.M. & van der Velden, U. 2000.** Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *J Periodontol* 71, 1528-1534

98. **Loos, B. G., D.W. Dyer, T.S. Whittam, R.K. Selander. 1993.** Genetic structure of population of *Porphyromonas gingivalis* associated with periodontitis and other oral infections. *Infect Immun.* 61: 204-212
99. **Lynch M.C., Kuramitsu H.K.1999.** Role of Superoxid Dismutase Activity in the Physiology of *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity* p.3367-33375
100. **Machperson A.j, Macpherson A.J., Gatto D., Sainsbury E., Harriman G.R, Hengartner H., Zinkernagel R.M. 2000.** A primitive t-cell-independent mechanism. *Science.* 23;288(5474):2222-6
101. **Mandell R.L., Sokranskys SS. 1981.** A selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the incidence of the organism in juvenile periodontitis. *J. Periodontol,* 52: 593-598
102. **Marcotte, Harold and Lavoie, Marc C. 1998.** Oral Microbial Ecology and the Role of Salivary Immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev,* p. 71-109, Vol. 62, No.
103. **Marnett L.J.1999.** Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. *IARC Sci Publ. (150):*17-27
104. **Mattila, K., Vesanen, M., Valtonen, V., Nieminen, M., Palossuo, T., Rasi, V. & Asikainen, S.2002.** Effect of treating periodontitis on C-reactive protein levels; a pilot study. *BMC infect Dis* 2, 30
105. **Mayer, M. P., Bueno, L.C., Hansen, E.J. & DiRienzo, J.M. 1999.** Identification of cytoethal distending toxin gene locus and features of a virulence-associated region in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 67, 1227-1237.

106. **McCord, J.M. 2000.** The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American Journal of Medicine* 108, 652-659
107. **Michaelis W., E. Reich. 1999.** "Dritte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS III), Ergebnisse, Trends, Problemanalysen auf der Grundlage bevölkerungsrepräsentativer Stichproben in Deutschland" Herausgeber: IDZ, *Deutscher Ärzteverlag Köln*
108. **Miyasaki K. 1991.** The neutrophil: mechanisms of controlling periodontal bacteria. *J Periodontol*, 62: 761-764
109. **Miyasaki K., Zambo. F., Jones C., Wilson M. 1987.** Role of the High-avidity Binding of Human Neutrophil Myeloperoxidase in the Killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 55(5):1029-36
110. **Mizukawa, Nobuyoshi, Sugiyama Katsumi, Ueno Takaaki, Mishima Katsuaki, Takagi Shin, DDS, Sugahara, Toshio. 1999.** Levels of human defensin-1, an antimicrobial peptide, in saliva of patients with oral inflammation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1; 87:539-43
111. **Moore S., Calder K.A., Miller N.J, Rice-Evans C.A. .1994 .**Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. *Free Radic Res.* 21(6):417-25
112. **Mombelli A, Gmür R, Gobbi C, Lang NP. 1994.** *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in adult periodontitis. Characterization of isolated strains and effect of mechanical periodontal treatment. *J Periodontol.* 65(9):827-34
113. **Mueller H., Heinecke A., Fuhrmann A., Eger T., Zoller L. 2001.** Intraoral distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in young adults with minimal periodontal disease. *J Periodont Res*, 36: 114-123

114. **Myint M., Steinsvoll S., Odden K. , Dobloug J.; Schenck K. 1997.** Salivary IgA responses to bacteria in dental plaque as related to periodontal and HIV infection status. *European Journal of Oral Sciences Volume 105 Issue 6, Pages 562-570*
115. **Nieminen, A., Siren E., Wolf J., Asikainen S.. 1995** Prognostic criteria for the efficiency of non-surgical periodontal therapy in advanced periodontitis. *J Clin Periodontol. 22:153-161*
116. **White P., Near S., Kim M.-J., Wilson, Henderson, B.1998.** Molecular Characterization of an Outer Membran Protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Belong to the OmpA Family. *Infection and Immunity 66: 369-372*
117. **Ohlsson K., Olsson I. 1974.**The Neutral Proteases of Human Granulocytes, Isolation and Partial Characterization of Granulocyte Elastase *Eur.J. Biochem,42,519-527*
118. **Ouhara K., Komatsuzawa H., Yamada S., Shiba H., Fujiwara T., Ohara M., Sayama K., Hashimoto K., Kurihara H., Sugai M. 2005.** Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, {beta}-defensins and LL37, produced by human epithelial cells. *J Antimicrob Chemother., 55(6):888-96.*
119. **Pfister W. und Eick S.2001.** Mikrobiologische Diagnostik progressiver Formen der Parodontitis marginalis. *tzb 02: 22-28.*
120. **Pag U., Oedenkoven M., Sass V., . Shai Y., Shamova O., Antcheva N., Tossi A. and H.-G. Sahl H.G.2008.** Analysis of in vitro activities and modes of action of synthetic antimicrobial peptides derived from an α -helical sequence template. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2008) 61, 341–352*

121. **Page R.C., Schroeder HE.1976.** Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest. 1, 34(3):235-49.*
122. **Panjamurthy K., Manoharan S., Ramachandran C.2005.** Lipidperoxidation and Antioxidants status in Patients with periodontitis. *Cellular & Molecular Biology Letters. Volume 10, pp 255-264*
123. **Paul-Satyaseela M, Karched M., Bian Z., Ihalin R., Boren T., Arnqusi A., Chen C., Asikainen S. 2006.** Immunoproteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* outer-membrane proteins reveal a highly immunoreactive peptidoglycan-associated lipoprotein. *J Med Micro 55, 931-942*
124. **Pickett, C.L. & Whitehouse, C.A. 1999.** The cytolethal distending toxin family. *Trends Microbiol 7, 292-297*
125. **Pike R, McGraw W, Potempa J, Travis J. 1994.** Lysine and arginine specific proteinase from *Porphyromonas gingivalis*. Isolation, characterization and evidence for the existence of complexes with hemagglutinins. *J Biol Chem, 269:406-411.*
126. **Pink R., Simek J., Vondrakova J., Faber E., Michl P., Pazdera J., Indrak K. 2009.** Saliva as a diagnostic medium. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.153(2):103-10*
127. **Potempa J., Agnieszka B., Travis J.2000.** Role of bacterial proteinase in matrix destruction and modulation of host response. *Periodontol 24: 153-192.*
128. **Potempa J., Pike R., Travis J. 1997.** Titration and mapping of the active site of cysteine proteinase from *porphyromonas gingivalis* (gingipains) using peptidyl chloromethans. *Biol chem, 378:223-230*

129. **Pussinen, P.J., Vilkuna-Rautianinen, T., Alfthan, G., Mattila, K. & Asikainen, S. 2002.** Multiserotyp enzymen-linked immunosorbent assay as a diagnostic aid for periodontitis in large-scale studies. *J Clin Microbiol* 40, 512-518
130. **Pussinen, P.J., Jauhiainen, M., Vilkuna-Rautiainen, T., Sundvall, J., Vesanen, M., Mattila, K., Palosuo, T., Alfthan, G. & Asikainen, S. 2004.** Periodontitis decreases the antiatherogenic potency of high density lipoprotein. *J lipid Res* 45, 139-147
131. **Rannay R.R. 1991.** Immunologic mechanisms of pathogenesis in periodontal diseases: an assement *.J.Periodontal Res.* 26 (3 Pt2): 243-54
132. **Reich E., Hiller K.A. 1993.** Reason for tooth extraction in the western states of Germany. *Community Dent Oral Epidemiology* 21(6):379-83
133. **Rao N.V., Wehner N.G., Marshall B.C., Gray W.R., Gray B.H., Hoidal J.R. 1991.** Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. Structural and functional properties. *J Biol Chem.* 25; 266(15):9540-8.
134. **Reich "Dritte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS III), 1999.** Ergebnisse, Trends, Problemanalysen auf der Grundlage bevölkerungsrepräsentativer Stichprobe in Deutschland". Gesamtbearbeitung W. Michaelis u. E. Reich, Herausgeber: IDZ, Deutscher Ärzteverlag Köln.
135. **Robache-Gallea S., Morand V., Bruneau J.M., Schoot B., Tagat E., Réalo E., Chouaib S., Roman-Roman S. 1995.** In vitro processing of human tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem.* 6;270(40):23688-92

136. **Sanderik R., Bernhardt H., Knoke M., Meyer J., Weber C., Weiger R .2004.** Curriculum Orale Mikrobiologie und Immunologie. *Quintessenz Verlags GmbH*
137. **Seifert M. 2002.** Untersuchungen zum Einfluss von Parodontitis auf Schwangerschaftsverlauf und Speichelzusammensetzung [Dissertation]. *Jena: Friedrich-Schiller-Universität.*
138. **Sela M. 2001.** Role of Treponema Denticola in Periodontal Diseases *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 12; 399
139. **Shenker, B.J., McKay, T., Datar, S., Miller, M., Chowhan, R. & Demuth D. (1999).** Actinobacillus actinomycetemcomitans immuno-suppressive protein is a member of the family of cytolethal distending toxins capable of causing a G₂ arrest in human T cells. *J Immunol* 162, 4773-4780
140. **Sinha S., Watorek W., Karr S., Giles J., Bode W., Travis J. 1987.** Primary structure of human neutrophil elastase. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;84(8):2228-32
141. **Sivaparvathi M., McCutcheon I., Sawaya R., Nicolson G.L., Rao J.S. 1996.** Expression of cysteine protease inhibitors in human gliomas and meningiomas. *Clin Exp Metastasis.* ; 14(4):344-50
142. **Slots J. 1979.** Subgingival mikroflora and periodontal disease. *J Clin Periodontol*; 351-382
143. **Slot J., Ting M. 1999.** Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in human periodontal disease. *Periodontol*, 20:82-121

144. **Solomon A., Gramse M., Havemann K.1978.** Proteolytic cleavage of human IgG molecules by neutral proteases of polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Immunol.* 8(11):782-5
145. **Sørensen O.E., Follin P., Johnsen A.H., Calafat J., Tjabringa G.S., Hiemstra P.S., Borregaard N.. 2001.** Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood.* 15; 97(12):3951-9.
146. **Sorensen O.E., Borregaard N.2005.** Cathelicidins nature's attempt at combinatorial chemistry. *Comb Chem High Throughput Screen.* 8(3):273-80
147. **Starkey P.M., Barrett AJ Human lysosomal elastase.1976.** Catalytic and immunological properties. *Biochem J. 1; 155(2):265-71.*
148. **Stohs S.J., Bagchi D., 1995.** Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med.* 18(2):321-36
149. **Streckfus C.F., Bigler L.R.,2002.** Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Dis.*8(2):69-76
150. **Sugai, M. Kawamoto, t., Peres, S.Y., Ueno, Y., Komatsuzawa, H., Fujiwara, T., Kurihara, H., Suginaka, H. & Oswald, E. (1998).** The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a cytolethal distending toxin. *Infect Immun* 66, 5008-5019
151. **Sugawara S., Uehara A., Nochi T., Yamaguchi T., Ueda H., Sugiyama A., Hanzawa K., Kumagai K., Okamura H. and Takada H., 2001.** Neutrophil Proteinase 3-Mediated Induction of Bioactive IL-18 Secretion by Human Oral Epithelial Cells *The Journal of Immunology*, 167: 6568-6575

152. **Suzuki J.B., 1988.** Diagnosis and classification of periodontal disease. *Dent. Clin. North Am* 1988; 32 195-216
153. **Tanner A., Maiden M.F.J., Macuch P. J., Murray L. L., Kent R. L Jr., 1998.** Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* ,Volume 25 Issue 2,Page 85-98
154. **Takahashi S., Murakami K., Miyake Y., 1982.** "Activation of kidney prorenin by kidney cathepsin B isoenzyme." *J Biochem* 91:419-22.63
155. **Teng Y.T., 2003.** The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med*, 14:237-252
156. **Uehara A., Sugawara Y., Sasano T., Takada H., Sugawara S., 2004.** Proinflammatory cytokines induce proteinase 3 as membrane-bound and secretory forms in human oral epithelial cells and antibodies to proteinase 3 activate the cells through protease-activated receptor-2. *J Immunol.* 15;173(6):4179-89
157. **Uchiyama Y., Waguri S., Sato N., Watanabe T., Ishido K., Kominami E., 1994.** "Review: Cell and Tissue Distribution of Lysosomal Cysteine Proteinases, Cathepsins B, H, and L, and their Biological Roles." *Acta Histochem Cytochem* ;27:287-308
158. **Van Winkelhoff Aj., Van der Velden U., Winkel E.G., De Graaf J., 1986.** Black-pigmented Bacteroides and motile organismen oral mucosal surfaces in individuale with and without periodontal breakdown. *J Periodont Res* , 21:434-439
159. **Uitto V-J., Nieminen A., Coil J., Hurttia H., Larjava H. 2005.** Oral fluid elastase as an indicator of periodontal health. *Journal of Clinical Periodontology* Volume 23 Issue 1, Pages 30 -37

160. **Waddington R.J., Moseley R., Embery G. 2006.** Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Disease* : 138-151
161. **Wei P-F., Ho K-Y., Ho Y-P., Wu Y-M., Yang Y-H., Tsai C-C.2004.** The investigation of glutathione peroxidase, lactoferrin, myeloperoxidase and interleukin-1 β in gingival crevicular fluid: implication for oxidative stress in human periodontal diseases. *J Periodont Res* ; 39 ; 287-293
162. **Wilson M.E. Wilson, P.M. Bronson, and R.G Hamilton.1995.** Immunoglobulin G2 antibodies promote neutrophil killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 63(3): 1070–1075
163. **Winnefeld K., Sperschneider H., Thiele R., Peiker G., Klinger G. 1995.** Antioxidantienstatus, Analytik und klinische Bedeutung. *Labor-Medizin*, 18:355-357.
164. **Winnefeld K., Schirrmeister W., Thiele R., Sperschneider H., Klinger G. 1995.** Selenium and antioxidant status in various diseases. *Med Klin (Munich)*. 15;90 Suppl 1:7-9
165. **Wimley W.C., Selsted M.E., White S.H. 1994.** Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci.* 3(9):1362-73
166. **Wolff L., Dahlén G., Aepli D. 1994.** Bacteria as risk markers for periodontitis. *J Periodontol.* 65(5 Suppl):498-510
167. **Over C., Yamalik N., Yavuzilmaz E., Ersoy F., Eratalay K. 1993.** Myeloperoxidase activity in peripheral blood, neutrophil crevicular fluid and whole saliva of patients with periodontal disease. *J Nihon Univ Sch Dent.* 35(4):235-40

168. **Yamamoto, K., Tominaga, K., Sakedai, M., Okinaga, T., Iwanaga, K. Nishihara, T. & Fukada, J. 2004.** Delivery of cytolethal distending toxin B induces cell cycle arrest and apoptosis in gingival squamous cell carcinoma in vitro. *Eur J Oral Sci* 112, 445-451
169. **Zambon J., Reynolds H.S. and Slots J. 1981.** Black-pigmented *Bacteroides* spp. in the human oral cavity. *Infect Immun.* 32(1): 198-203
171. **Zambon J. 1985.** *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. : *J Clin Periodontol.* 12(1):1-20
172. **Zambon J. 1996.** Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol,* 1:879-925.

9 Anhang

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskript unterstützt haben, Frau PD Dr. Sigrun Eick und Herr Dr. Arndt Güntsch (Poliklinik für Konservierende Zahnheilkunde),

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder anderer wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Weberstedt,

Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bei Frau PD Dr. Sigrun Eick und Herrn Prof. Dr. Wolfgang Pfister für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas sowie die ständige fachliche Unterstützung bei den Versuchsdurchführungen und deren Auswertung bedanken.

Des Weiteren danke ich für die Unterstützung bei der Datensammlung Frau Dr. Tina Seltmann und Herrn Dr. Arndt Güntsch.

Für die Unterstützung bei der Ausführung der praktischen Versuche danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität-Jena, insbesondere gilt mein Dank Frau Claudia Ranke.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Institutes für klinische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität-Jena für die Ermittlung des Harnsäure- und des Gesamtimoglobulingehaltes sowie Frau Magdalena Puklo von der Jagiellonen-Universität in Krakau für die Unterstützung bei der Analyse der Parameter der angeborenen Immunantwort bedanken.

Meinen Eltern Margrit und Manfred sowie meiner Schwester Luisa und meinem Freund Carsten sei besonders gedankt für die unvergessliche Unterstützung.

Bei meinen Freunden und Bekannten bedanke ich mich für die Motivation und aufmunternden Worte, insbesondere gilt mein Dank Mike und Nadine.

Lebenslauf**Hiese, Isabelle**

03.07.1978	geboren in Mühlhausen
1985-1992	Polytechnische Oberschule Gerhardt Eisler Weberstedt
1992-1997	Friedrich-Ludwig-Jahn Gymnasium Großengottern
1997	Abitur
1997-2001	Studium der Ernährungswissenschaften an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
2001-2003	Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen
2003-2007	Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
05.01.2007	Abschluss des Hochschulstudiums an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
03/2007-05/2008	Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis Dr. Th. Hacker in Erfurt
06/2008-02/2009	Elternzeit
03/2009-12/2009	Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis Dr. Th. Hacker in Erfurt
01/2010-02/2010	Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis Margrit Hiese in Mülverstedt
seit 02/2010	Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis Dr. Kirschbaum Gotha

Weberstedt, _____