

Untersuchungen zur Produktion reaktiver
Sauerstoffspezies und Freisetzung neutrophiler
Elastase durch polymorphkernige
Granulozyten nach Stimulierung mit
parodontopathogenen Spezies

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae
(Dr. med. dent.)

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

von
Rolf-Martin Schenk
geboren am 29.05.1982 in Weimar

Gutachter

Tag der öffentlichen Verteidigung: _____

Abkürzungsverzeichnis

A. a.	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
AB	Antibiotika
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
AK	Antikörper
CR	Komplementfaktor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
Fc-R	Fc-Rezeptor
HNE	Human neutrophil elastase
Ig	Immunglobulin (A, G, M)
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	mitogen activated protein
MMP	Matrix-Metallproteinase
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat + Wasserstoffion
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PBS	physiologische phosphatgepufferte NaCl-Lösung
PG	Prostaglandin
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
P. g.	P. gingivalis
ROS	Reactive Oxygen Species
RNA	Ribonukleinsäure
SA	Standardabweichung
Str.	Streptococcus
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	
Inhaltsverzeichnis.....	
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	3
2.1 Ätiologie, Pathogenese und Einteilung parodontaler Erkrankungen	4
2.1.1 Ätiologie parodontaler Erkrankungen.....	4
2.1.2 Pathogenese der Parodontitis.....	7
2.1.3 Einteilung parodontaler Erkrankungen.....	11
2.2 Chronische Parodontitis.....	12
2.3 Aggressive Parodontitis	13
2.4 Aggregatibacter actinomycetemcomitans	14
2.5 Porphyromonas gingivalis.....	16
2.6 Neutrophile Granulozyten, Phagozytose, oxidative burst.....	18
2.7 Humane Neutrophile Granulozytenelastase	23
3 Ziele der Arbeit.....	25
4 Methodik.....	27
4.1 Medien, Reagenzien, Chemikalien, Zusätze.....	27
4.2 Geräte, Apparaturen, Hilfsmittel.....	29
4.3 Verwendete Bakterienstämme	31
4.4 Gewonnenes Patientenmaterial.....	32
4.5 Versuchsdurchführung.....	33
4.5.1 Präparation der Bakterien	33
4.5.2 Präparation der Granulozyten.....	34
4.5.3 Bestimmung der Aktivität der neutrophilen Elastase.....	35
4.5.4 Bestimmung des oxidative burst der neutrophilen Granulozyten	36
4.6 Statistische Analyse.....	39
5 Ergebnisse	40
5.1 Demographische und klinische Daten.....	40
5.2 Ergebnisse der Aktivität der neutrophilen Elastase.....	41
5.2.1 Aktivität der neutrophilen Elastase ohne bakterielle Stimulation..	41

5.2.2	Aktivität der neutrophilen Elastase nach Stimulation mit Porphyromonas gingivalis ATCC 33277	42
5.2.3	Aktivität der neutrophilen Elastase nach Stimulation mit Aggregatibacter actinomycetemcomitans Y4.....	44
5.2.4	Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse zur Aktivität der neutrophilen Elastase	46
5.3	Ergebnisse des oxidative burst der neutrophilen Granulozyten	48
5.3.1	Gesamte ROS-Produktion der neutrophilen Granulozyten	48
5.3.2	Extrazelluläre ROS-Freisetzung der neutrophilen Granulozyten ..	55
6	Diskussion.....	61
6.1	Methodik	61
6.2	Aktivität der neutrophilen Elastase.....	63
6.3	Oxidative burst der neutrophilen Granulozyten	69
7	Schlussfolgerungen.....	77
8	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	79
9	Abbildungsverzeichnis.....	89
10	Anhang.....	92
	Lebenslauf.....	
	Danksagung	
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	

1 Zusammenfassung

Die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten nimmt bei der Bekämpfung parodontopathogener Mikroorganismen einen wichtigen Stellenwert ein. Die dabei im Rahmen der immunologischen Abwehr aus den neutrophilen Granulozyten freigesetzten Radikale sowie Enzyme tragen entscheidend zur Pathogenese der chronischen sowie aggressiven Parodontitis bei.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Entstehung und Freisetzung von oxidativen Stoffwechselprodukten, welche in Folge der phagozytären Abtötung der Bakterienspezies *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 und *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 durch die neutrophilen Granulozyten gebildet werden, zu untersuchen. Ein weiteres Anliegen war die Bestimmung der Aktivität der neutrophilen Elastase, die während der immunologischen Abwehrmechanismen der neutrophilen Granulozyten aus den zellulären Granula der PMNs ausgeschüttet und in das umliegende Gewebe freigesetzt wird.

Die bakteriellen Stimulationen wurden dabei sowohl bei den neutrophilen Granulozyten von sechs Patienten mit aggressiver und zwölf mit chronischer Parodontitis als auch bei 12 parodontal gesunden Kontrollpersonen (ausschließlich Nichtraucher) durchgeführt. Um in Hinsicht auf die Pathogenese von chronischer und aggressiver Parodontitis spezifische Ergebnisse zu erhalten, wurden die parodontopathogenen Bakterien *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 und *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, die als Leitkeime der aggressiven bzw. chronischen Parodontitis gelten, verwendet.

Bei der Bestimmung der Radikalsynthese wurde neben der Ausschüttung extrazellulärer Radikale auch die gesamte Radikalmenge (intra- sowie extrazellulär auftretend) untersucht. Damit konnte ermittelt werden, welche Anteile der innerhalb der neutrophilen Granulozyten gebildeten Radikale letztendlich in den Extrazellularraum gelangen.

Ein Resultat dieser Studie war, dass sich die PMNs der aggressiven und chronischen Parodontitis ohne bakterielle Stimulation deutlich hyperreaktiv zeigten. Gegenüber den gesunden Kontrollpersonen lag eine erheblich gesteigerte Elastaseaktivität sowie Radikalsynthese vor. Bei den neutrophilen Granulozyten der aggressiven Parodontitis kam es ohne bakterielle Stimulation zur höchsten Elastaseaktivierung. Deren extra- und intrazelluläre Radikalmengen zeigten sich ebenfalls deutlich gesteigert. Auch bei den PMNs der chronischen Parodontitis wurde ohne bakteriellen Reiz eine deutlich höhere Elastaseaktivität als bei bakterieller Stimulation nachgewiesen. Weiterhin konnte ermittelt werden, dass unter Einfluss von *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 eine vermehrte Enzymaktivität resultierte, währenddessen bei Stimulation durch *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 mehr Radikale gebildet wurden.

Untersuchungen zur bakteriellen Reizung der Neutrophilen bei chronischer Parodontitis ergaben eine gesteigerte Produktion von Radikalen. Bei den PMNs der aggressiven Parodontitis stand hingegen die Menge an freigesetzter Elastase im Vordergrund.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse kann geschlossen werden, dass die phagozytäre Abtötung von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 vermehrt auf oxidativen Mechanismen beruht und das Killing von *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 einem eher nichtoxidativen, enzymatischen Weg unterliegt. Sowohl die von den neutrophilen Granulozyten gebildete neutrophile Elastase als auch die reaktiven Sauerstoffverbindungen sind während der Phagozytose von parodontopathogenen Bakterien in großen Mengen vorhanden. Aufgrund derer bereits vielfach nachgewiesenen Eigenschaften, destruktiv auf parodontales Stützgewebe einzuwirken, spielen sie eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der chronischen sowie aggressiven Parodontitis.

2 Einleitung

Durch die in der Mundhöhle des Menschen befindliche residente Bakterienflora, welche beim Gesunden ein Gleichgewicht untereinander eingeht, kann es bei geschwächter Wirtsabwehr zu bestimmten Erkrankungen wie z. B. Gingivitis oder bei progressivem Verlauf zur Parodontitis kommen (Loesche 1988). Neben der Karies stellt die Parodontitis die häufigste Ursache für den Zahnverlust dar (Hellwig et al. 2003).

Die weltweite Prävalenz parodontaler Erkrankungen ist hoch. Nahezu die gesamte in der Bundesrepublik Deutschland lebende erwachsene Bevölkerung leidet unter einer Erkrankung des Parodontiums (Micheelis und Reich 1999). Aus wissenschaftlichen Untersuchungen geht hervor, dass die Gingivitis-Prävalenz bis zum 13. Lebensjahr zunimmt. Während mit fortschreitendem Alter ein Rückgang der Gingiviserkrankungen zu beobachten ist, kommt es gleichzeitig zu einem Anstieg der Parodontitis-Prävalenz. Sie beträgt ab dem 35. bis 40. Lebensjahr nahezu 100 Prozent. Dies ging aus der dritten deutschen Mundgesundheitsstudie (DMS III) hervor (Micheelis und Reich 1999).

Neuere epidemiologische Daten zeigen, dass Erwachsene zu 79 Prozent Zahnfleischbluten, zu 88 Prozent Zahnstein und zu 69 Prozent parodontale Taschen aufweisen, darunter 10 Prozent mit Taschentiefen von über 5,5 Millimetern (Marsh und Martin 2003). Schwere Parodontitiden, die Zahnverluste verursachen, treten bei Erwachsenen in hochindustrialisierten Ländern mit einem Anteil von 20 bis 40 Prozent auf. Der strukturelle Verlust des Zahnhalteapparates steigt hierbei mit zunehmendem Lebensalter an. Sonderformen machen nur einen geringen Anteil aus und beschränken sich bei der lokalisierten aggressiven Parodontitis auf ein Vorkommen von 0,1 bis 0,4 Prozent. Die generalisierte aggressive Parodontitis tritt bei 2 bis 5 Prozent der Bevölkerung auf (Hellwig et al. 2003).

Auch eine hohe Inzidenz von parodontalen Erkrankungen unter Erwachsenen der westlichen Weltbevölkerung wurde in epidemiologisch angelegten Studierenerhebungen nachgewiesen (Ciancio 2003).

2.1 Ätiologie, Pathogenese und Einteilung parodontaler Erkrankungen

2.1.1 Ätiologie parodontaler Erkrankungen

Die in der Mundhöhle resultierende Keimflora, unterschieden wird zwischen der residenten und transienten Flora, setzt sich aus einer Vielzahl von Bakterien, Hefen und Protozoen zusammen. Es konnten bereits über 500 verschiedene Bakterienarten in der Mundhöhle nachgewiesen werden (Paster et al. 2001) [1].

Alle in der menschlichen Mundhöhle befindlichen Bakterienarten bilden beim Gesunden untereinander ein mikrobielles Gleichgewicht. In der Regel liegt eine Keimanzahl von 10^6 pro Milliliter Speichel und höher vor. Kommt es jedoch durch äußere Einflüsse, zum Beispiel durch mangelnde Mundhygiene oder häufige Einnahme von Antibiotika zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten einiger weniger Keime, kann dies zur Entstehung von entzündlichen Krankheiten führen (Loesche 1988).

Die so genannten opportunistischen Infektionen spielen eine entscheidende Rolle bei dem Krankheitsbild der Parodontitiden. Unter opportunistischen Erregern werden Bakterien verstanden, die nur unter bestimmten günstigen Bedingungen pathogen wirken. Auch systemische Erkrankungen und die Schwächung der körpereigenen Immunabwehr können eine Gleichgewichtsverschiebung bedingen. Während bei einer gesunden Mundflora überwiegend grampositive, aerob wachsende Keime vorzufinden sind, stellt sich bei beginnender Erkrankung des Zahnhalteapparates, der Gingivitis, eine Mischflora ein. Diese Mischflora ist durch eine Zunahme des anaeroben Keimspektrums bedingt. Bei weiterem Voranschreiten des Krankheitsverlaufes, welches zum Krankheitsbild der

Parodontitis führt und mit zunehmendem Attachmentverlust verbunden ist, verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung gramnegativer Bakterienspezies. Da aus einem voranschreitenden Attachmentverlust gleichzeitig die Zunahme der Zahnfleischtaschentiefen resultiert, sind im Bereich parodontaler Strukturen überwiegend anaerob wachsende Keime anzutreffen (Hellwig et al. 2003). Genco et al. stellten 1996 bestimmte Anforderungen für eine Zuordnung parodontopathogener Spezies auf. Die Mikroorganismen müssen demnach in hoher Anzahl in progressiven Zahnfleischtaschen vorkommen, währenddessen sie innerhalb gesunder Taschen in nur geringen Mengen oder gar nicht nachweisbar sind. Weiterhin exprimieren die Bakterien Virulenzfaktoren, die mit der Parodontitis in Zusammenhang stehen. Daraus resultiert, dass eine Eliminierung oder Modulation ihrer Virulenzfaktoren zu einer klinischen Verbesserung führt (Genco et al. 1996). Die wichtigsten Vertreter der parodontopathogenen Bakterien stellen *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dar. Weitere Spezies von Bedeutung sind *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Parvimonas micra* und *Streptococcus intermedius*. Daneben gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von *Eikenella corrodens* sowie Enterobakterien und Pseudomonaden (Hellwig et al. 2003, Pfister und Eick 2005).

Betrachtet man die Faktoren, die eine Erkrankung des Zahnhalteapparates verursachen können, so stehen an erster Stelle die parodontopathogenen Mikroorganismen, welche eine Gingivitis oder bei Fortschreiten eine Parodontitis hervorrufen. Sie sind jedoch sowohl beim gesunden Menschen als auch beim Kranken vorzufinden und stellen deshalb eine notwendige, aber keine ausreichende Voraussetzung für die Entstehung von Parodontopathien dar. Vielmehr tragen zahlreiche zusätzliche Faktoren zur Krankheitsentstehung bei und bedingen einander. Entsprechende ätiologische Faktoren sind u. a. genetische Prädispositionen, systemische Erkrankungen, Immunabwehrschwächen, Alter, Geschlecht, ethnische Einflüsse und wirtsabhängige Risikofaktoren. Zu den wirtsabhängigen Risikofaktoren gehören Nikotin- und Medikamentenkonsum, Ernährungsgewohnheiten (auch Mangelernährung), Mundhygiene, Plaquemenge, Zahnstein, Zahnanatomie, Zahnstellungen, Mundatmung, Zustand von

Zahnrestorationen, Anatomie der Weichgewebe, Stress, psychische Komponenten und Einflüsse des endokrinen Systems. Zur Geschlechterverteilung ist grundsätzlich anzumerken, dass bei Männern mehr gingivale und parodontale Erkrankungen als bei Frauen auftreten. Eine Erklärung für das gehäufte Vorkommen von parodontalen Destruktionen bei Männern ist zum einen im stärker ausgeprägten Hygieneverhalten des weiblichen Geschlechts und zum anderen in einem höheren Tabakkonsum der Männer [2], welcher den bedeutendsten Risikofaktor darstellt (Salvi et al. 1997, Oliver et al. 1998, Sopori et al. 1998, Page 1998), zu sehen. Lediglich die lokalisierte aggressive Parodontitis ist bei Mädchen mit einem Verhältnis von 2 bis 4:1 häufiger als bei Jungen anzutreffen (Hellwig et al. 2003). Dies lässt sich auf die hormonellen Hintergründe zurückführen. Durch entwicklungsbedingte Änderungen des Hormonhaushaltes während der Pubertät kommt es zu hormonellen Unterschieden zwischen den Geschlechtern. Sexualhormone besitzen unter anderem die Fähigkeit, Vitamin K zu substituieren, welches als essentieller Wachstumsfaktor für zahlreiche gramnegative Anaerobier dient. Das führt dazu, dass hormonell auf die Verteilung von schwarzpigmentierten Bakterien ein Einfluss ausgeübt wird (Nakagawa et al. 1994). Aufgrund dieses Zusammenhangs und der Gegebenheit, dass in der Regel beim weiblichen Geschlecht die Pubertät früher einsetzt, lässt sich eine frühzeitigere Verbreitung schwarzpigmentierter Bakterien erklären (Kornman und Loesche 1980). Auch mit steigendem Lebensalter, womit meist eine Verminderung der Regenerationskraft der Patienten einhergeht, kommt es zum Anstieg der Parodontitis-Prävalenz (Flores de Jacoby 1990). Micheelis und Reich wiesen 1999 in diesem Zusammenhang nach, dass der maximale CPI (Community Periodontal Index) in der Bundesrepublik Deutschland zwischen den verschiedenen Altersklassen deutlich differenziert auftrat. So wurden bei 54 Prozent der zwölfjährigen Untersuchungsgruppe eine Blutung auf Sondierung, aber keine Sondierungstiefe über 3 mm festgestellt. Bei den 35 bis 44-Jährigen lagen bereits bei 32 Prozent Sondierungstiefen von 4 bis 5 mm vor. Bei den 65 bis 74-Jährigen stieg der Wert sogar auf 40 Prozent an. Auch Sondierungstiefen von 6 mm und mehr traten mit vorangeschrittenem Alter auf. Sie machten bei der mittleren Altersgruppe einen Wert von 14 Prozent aus und wurden bei 24 Prozent der 65 bis 74-Jährigen gemessen (DMSIII Micheelis und Reich 1999). Auch durch Mangel- bzw.

Fehlernährung kann es zur eingeschränkten immunologischen Abwehrleistung des Organismus kommen. Resultat ist eine verstärkte entzündliche Reaktion auf dentale Plaque. Ernährungsstörungen wie Kwashiorkor, eine in Entwicklungsländern auftretende Eiweißmangelkrankung, Unterernährung bei Magersucht (Anorexia nervosa) als auch chronischer Alkoholabusus wirken sich ebenso negativ auf die Abwehrfähigkeit des Parodonts aus wie chronischer Ascorbinsäuremangel (Skorbut, Vitamin-C-Avitaminose), der zur Beeinträchtigung der Kollagensynthese führt [8]. Zur genetischen Prädisposition ist anzumerken, dass es zahlreiche Krankheiten, z. B. Diabetes mellitus, mit einer nachgewiesenen genetischen Determinierung gibt, die einen krankheitsfördernden Einfluss auf die Entstehung von Parodontopathien haben. Weitere Ursachen können systemische Defekte des blutbildenden Systems darstellen, die sich in einer Veränderung der Anzahl und Funktion von Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen äußern.

2.1.2 Pathogenese der Parodontitis

Unter dem Begriff Parodontopathien werden sowohl entzündlich bedingte als auch nicht entzündliche Erkrankungen des Zahnhalteapparates zusammengefasst. Untersuchungen von Løe et al. zeigten, dass die Ursache für die Gingivitis und gewissermaßen auch für die Parodontitis die mikrobielle Plaque ist (Løe et al. 1965, Løe et al. 1986). Zahnplaque stellt einen weichen, strukturierten und zähen mikrobiellen Zahnbelag dar, der auf der Gingiva oder der zervikalen Region des Zahnes lokalisiert ist. Plaque ist in eine organische Matrix eingebettet, welche als Hauptbestandteile die von den Mikroorganismen gebildeten extrazellulären Polysaccharide enthält. Die organische Matrix dient als Gerüst zur Vereinigung der Mikroorganismen zu einer kohärenten, fest haftenden, strukturierten Bakterienaggregation. Gleichzeitig dient sie als Nahrungsreservoir, schützt die Bakterien vor äußeren Einflüssen und kann zur Pathogenitätssteigerung der gebundenen Bakterien beitragen. 1 Milligramm Nassgewicht Plaque enthält ca. 10^8 Bakterien (Hellwig et al. 2003). Die supragingivale Plaque kann sich bei

inadäquater Abwehrleistung der Sulkusflüssigkeit oder unzureichender Mundhygiene nach subgingival in den Sulcus gingivae ausdehnen.

Bei der Entwicklung der subgingivalen Plaque kommt es durch beeinflussende Faktoren wie z. B. ein in den tiefen Zahnfleischtaschen vorliegendes vermindertes Redoxpotential sowie vorhandene Blutprodukte zur Veränderung der Plaquezusammensetzung. Das sauerstoffarme Milieu im Subgingivalraum fördert die Entwicklung anaerober Bakterien. Unterschieden wird zwischen einer adhären (attached Plaque), welche in vielen strukturellen Aspekten der supragingivalen Plaque entspricht, und einer nichtadhären subgingivalen Plaque. Die nichtadhärente Plaque befindet sich nur auf dem Sulkus- bzw. Taschenepithel und weist keine definierte intermikrobielle Matrix auf. Man bezeichnet sie deshalb auch als „schwimmende Plaque“ (swimming Plaque). Bei den schnell fortschreitenden parodontalen Entzündungen beziehungsweise aggressiv verlaufenden Parodontitiden dominiert die virulente nichtadhärente Plaque mengenmäßig über die adhären Plaque. Mit fortschreitendem Parodontitisverlauf und der damit verbundenen Bildung einer parodontalen Tasche wird die Struktur der subgingivalen Bakterienablagerungen komplexer und der mengenmäßige Anteil der gramnegativen und anaeroben Bakterien nimmt bis auf 90 Prozent zu. Es handelt sich hierbei um einen Großteil an fusiformen bzw. filamentösen Mikroorganismen, beweglichen Stäbchen und Spirochäten. Das Verhältnis von beweglichen zu unbeweglichen Mikroorganismen beträgt hier 1 bis 3:1. Im Vergleich dazu liegt beim gesunden Parodontium ein Verhältnis von 1:40 bis 49 vor (Hellwig et al. 2003). Die subgingivale Plaque ist kontinuierlich von der Sulkusflüssigkeit umgeben. Dieses Plasmaderivat enthält sämtliche humoralen infektionsvermeidenden und kontrollierenden Abwehrstoffe wie Antikörper, polymorphkernige neutrophile Granulozyten und Komplementproteine. Die Substratzufuhr der subgingivalen Plaque erfolgt ebenfalls vornehmlich aus dem Sulkusfluid. Ein entscheidender Faktor für die pathogene Wirkung der Plaque ist die Tatsache, dass es sich hierbei um einen mikrobiellen Biofilm handelt. Biofilmbakterien verfügen über die Fähigkeit, sich auf der Wurzeloberfläche auszubreiten und sich somit zu vermehren. Die verschiedenen adhären Bakterienspezies gehen untereinander Stoffwechselkooperationen ein, bilden

Mikrokreisläufe sowie mikroökologische Nischen und interagieren untereinander. Einige Kombinationen von subgingival lokalisierten Bakterien wie z. B. *P. gingivalis*, *Treponema denticola* und *Tannerella forsythia* weisen untereinander synergistische Effekte auf. Dadurch sind die entsprechenden Bakterien in der Lage, ihre ihre Pathogenität zu verstärken (Kuramitsu et al. 2005).

Auch Antikörper und Phagozyten können wegen mangelnder Penetrationsfähigkeit die extrazelluläre Schleimschicht (Glycocalyx) nicht vollständig durchdringen. So werden selbst bei Individuen mit hochentwickelten humoralen und zellulären Immunmechanismen die Bakterien innerhalb des mikrobiellen Biofilms nicht ausreichend abgetötet. Selbst durch Antibiotika sind die innerhalb des Biofilms befindlichen Keime kaum beeinflussbar (Sanderink et al. 2004). Mikroorganismen lösen im parodontalen Spalt zahlreiche immunologische Abwehrreaktionen aus. Die Aktivierung von Makrophagen, Lymphozyten, Plasmazellen und von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten ist dabei Ausdruck der lokalen Abwehr (Hellwig et al. 2003, Faurschou und Borregaard 2003, Wachter 2005, Fuhrmann 2006, Rönnebeck 2006). An der Wirtsabwehr sind auch lokal und systemisch vorkommende, spezifische Antikörper und der Hagemann Faktor (Faktor XII), der die intravasale Gerinnung ermöglicht, beteiligt (Nisengard et al. 1988). Von den in der Mundhöhle sich befindenden Immunglobulinen wird IgG und IgM die größte Bedeutung beigemessen. Sie sind zum größten Teil in der Gingiva und der Sulkusflüssigkeit vorzufinden, was sich bei fortschreitender Parodontitis in einer erhöhten Anzahl an spezifischen AK gegen gramnegative Bakterien widerspiegelt (Nisengard et al. 1988).

Weiterhin besitzen Biofilmbakterien die Fähigkeit, im Parodont die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen zu veranlassen (Kleber 1998, Kohal und Dennison 2000, Hellwig et al. 2003, Faurschou und Borregaard 2003, Puschmann 2003). Zytokine sind induzierbare Signalproteine, die aus Zellen freigesetzt werden, wichtige Zellfunktionen (z. B. die Lympho- und Hämopoese) regulieren und Informationen zwischen Zellen vermitteln. Zytokine unterliegen in ihrer lokalen Wirkung einer starken Abhängigkeit bezüglich der Rekrutierung, Interaktion und Aktivierung von immunkompetenten Zellen. Zu den bei den inflammatorischen

Vorgängen der Parodontitis vorkommenden Zytokinen gehören u. a. IL-1, IL-2, IL-8, IL-10, TNF- α und das monozytenchemotaktische Protein 1 (MCP-1) (Okada und Murakami 1998, Kesavalu et al. 2002, Wachter 2005). Zusätzlich können parodontopathogene Mikroorganismen durch die Expressierung von Virulenzfaktoren die Destruktion des Parodontiums begünstigen. Die Ausschüttung gewebeschädigender Enzyme, wie Kollagenasen oder Matrix-Metallproteinasen sowie die Freisetzung von Mediatoren (z. B. Prostaglandin E₂) münden in den destruktiven Prozessen der Parodontolyse und erleichtern das Eindringen der Mikroorganismen ins Gewebe (Hellwig et al. 2003, Faurschou und Borregaard 2003, Wachter 2005). Prostaglandine stimulieren Osteoklasten, greifen damit in den Knochenstoffwechsel ein und veranlassen Knochenresorptionsvorgänge. Weitere von den Bakterien synthetisierte Enzyme sind verschiedene Peptidasen und Proteasen sowie saure und alkalische Phosphatasen. Hyaluronidasen, Chondroitinsulfatasen und Neuraminidasen gehören ebenfalls dazu. Auch die von den Mikroorganismen ausgeschiedenen Stoffwechselendprodukte wie Fettsäuren, Schwefelwasserstoff, Indol oder Ammoniak greifen das Parodontalgewebe an. Weiterhin werden von den Bakterien kontinuierlich Antigene (LPS) freigesetzt, welche die immunologische Produktion von spezifischen Antikörpern auslösen. Die von den verschiedenen Bakterien entwickelten spezifischen Toxine werden in Endo- und Exotoxine eingeteilt. Exotoxine stellen Antigene dar, welche von Bakterien synthetisiert und gezielt sezerniert werden. Ein bedeutendes Beispiel hierfür ist das Leukotoxin, welches von *A. actinomycetemcomitans* gebildet wird. Es verursacht den Zerfall von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMNs) (Baehni et al. 1981). Endotoxine sind in der Wand gramnegativer Bakterien lokalisierte Lipopolysaccharide, die zu einer gesteigerten entzündlichen Abwehrreaktion des Wirts führen.

Grundsätzlich ist festzuhalten, dass die körpereigene Wirtsabwehr auf der einen Seite primär einen Selbstschutz darstellt, auf der anderen Seite das parodontale Stützgewebe, durch die zahlreichen Folgen der vielfältigen immunologischen Reaktionen, destruktiven und lysierenden Prozessen unterliegt (VanDyke und Hoop 1990, Bartold et al. 1994, Kohal und Dennison 2000). Die

Abwehrmechanismen gegenüber der bakteriellen Invasion tragen damit selbst entscheidend zur Schädigung des körpereigenen Gewebes bei (Nisengard et al. 1988, Wachter 2005, Fuhrmann 2006, Rönnebeck 2006). Das zusätzliche Vorhandensein immunsuppressiver Umweltfaktoren, systemischer Erkrankungen und genetisch bedingter Defekte der Phagozyten und Chemotaxis beeinflusst die körperliche Abwehrleistung und korreliert mit schweren Verlaufsformen der Parodontitiden.

2.1.3 Einteilung parodontaler Erkrankungen

Grundsätzlich werden die krankhaften Veränderungen des Parodontiums dahingehend unterteilt, ob sie sich allein auf die Schleimhaut beschränken, die so genannten gingivalen Erkrankungen, oder ob auch die restlichen Strukturen des Zahnhalteapparates betroffen sind, die parodontalen Erkrankungen. Zusätzlich unterscheidet man entzündliche von nicht entzündlichen Prozessen. Aus dieser Begebenheit heraus wurden auf dem „International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions“, im Jahr 1999, die bisherigen Klassifikationen durch eine in acht Hauptgruppen und zahlreiche Untergruppen untergliederte Einteilung überarbeitet.

Die chronische sowie aggressive Parodontitis wird entsprechend ihres Auftretens in eine lokalisierte und generalisierte Form unterteilt. Die Differenzierung zwischen chronischer und aggressiver Parodontitis sowie zwischen lokalisiertem und generalisiertem Auftreten ergibt sich aus speziellen klinischen Kriterien (siehe Kapitel 2.2 und 2.3).

2.2 Chronische Parodontitis

Die chronische Parodontitis ist eine lympho-plasmozytäre Entzündung der parodontalen Gewebe mit wechselnd ausgeprägtem Resorptionsvermögen, die aufgrund einer polymikrobiellen Infektion im Sinne einer opportunistischen Infektion hervorgerufen wird (Kleber 1998). Die Ausprägung und ihr Verlauf werden bestimmt durch die jeweiligen allgemeinen und lokalen Abwehrreaktionen des von der Infektion betroffenen Wirtes (Lopez 2000, Sanderink et al. 2004, Schacher et al. 2007). Die Parodontitis ist als ein Resultat von komplexen Interaktionen zwischen der Wirtsantwort und einer Infektion mit potentiell parodontalpathogenen Keimen anzusehen (Mutschelknauss 2000). Dabei kommt es zu einer Entzündung des Zahnhalteapparates mit progressiven und destruktiven Veränderungen, welche zum Verlust des Alveolarknochens sowie parodontalen Ligaments, also zum Stützgewebeverlust führen. Kardinalsymptome der chronischen Parodontitis sind die Taschenbildung und/ oder das Auftreten parodontaler Rezessionen. Sie entwickelt sich meist ab dem 30. bis 35. Lebensjahr aus einer Gingivitis. Die Mundhygiene der betroffenen Personen ist meist unzureichend, so dass große Mengen an Plaque sowie supra- und subgingivaler Zahnstein vorzufinden sind. Weiterhin führt die chronische Parodontitis zum Knochenabbau, im fortgeschrittenen Stadium zur erhöhten Zahnbeweglichkeit und damit verbunden zu Zahnwanderungen, Zahnkippen und Parodontalabszessen. Kennzeichnend für die klinische Symptomatik ist der zyklisch progrediente Verlauf je Zahnfläche, wobei kurze aktive Phasen (burst) durch längere nicht aktive Phasen (angepasster Zustand, dormant stage) abgelöst werden (Kleber 1998).

Die Parodontitis ist als eine Erkrankung des einzelnen Parodonts aufzufassen. Deshalb können sich akute Exazerbationen mit aktiven, typische Entzündungszeichen aufweisenden Zahnfleischtaschen neben ruhenden, inaktiven Taschen befinden. Sind weniger als 30 Prozent der Zahnflächen von klinischen Symptomen betroffen, spricht man von einer lokalisierten chronischen Parodontitis. Bei der generalisierten Form sind über 30 Prozent der Flächen befallen.

2.3 Aggressive Parodontitis

Aggressive Parodontitiden zeichnen sich durch einen rasch fortschreitenden Attachmentverlust aus. Sie führen zu schweren Destruktionen, die innerhalb weniger Jahre in einem fast vollständigen Verlust des parodontalen Stützgewebes enden. Die klinischen Symptome treten weitaus gedämpfter auf als bei der chronischen Parodontitis. So sind die Patienten oft nur von geringen Entzündungszeichen der Gingiva befallen. Auch die Menge an supra- und subgingivaler Plaque korreliert nicht mit der Schwere der parodontalen Destruktionen. Die Betroffenen weisen keine allgemeinen systemischen Erkrankungen auf. Die aggressive Parodontitis verläuft zyklisch und ist in den aktiven Destruktionsphasen durch die Entleerung von eitrigem Sekret charakterisiert. Aggressive Parodontitiden können, wie die chronische Form, sowohl lokalisiert als auch generalisiert auftreten. Bei der lokalisierten aggressiven Parodontitis handelt es sich um eine entzündliche Parodontalerkrankung mit anfänglich hoher Destruktionsaktivität, die sich später verlangsamen oder sogar sistieren kann. Sie beginnt während der Pubertät im Alter von 10 bis 13 Jahren (früher auch als lokalisierte juvenile Parodontitis bezeichnet, LJP) und kommt bei 0,1 bis 2,3 Prozent der Jugendlichen vor (Hellwig et al. 2003). In negroiden Bevölkerungsgruppen ist eine höhere Prävalenz zu verzeichnen. Die parodontalen Läsionen beschränken sich auf die mittleren Inzisivi und die ersten Molaren. Es liegt ein stark erhöhter Serumantikörpertiter gegen bakterielle Agenzien vor.

Generalisierte aggressive Parodontitiden beginnen meist vor dem 35. Lebensjahr und kommen bei Patienten, welche keine weiteren systemischen Erkrankungen aufweisen, vor. Sie können sich aus einer lokalisierten Form entwickeln und sind durch schubweise auftretende Destruktionsphasen gekennzeichnet (Hellwig et al. 2003). Das Erkrankungsrisiko kann durch zusätzliche Einflüsse wie Zigarettenkonsum und Stress potenziert werden (Salvi et al. 1997, Oliver et al. 1998, Sopori und Kozak 1998). Im Gegensatz zur lokalisierten Form findet sich bei der generalisierten aggressiven Parodontitis der proximale Attachmentverlust an mindestens drei Zähnen, die nicht den Inzisivi oder ersten Molaren

entsprechen. Der Serumantikörpertiter gegen nachweisbare bakterielle Agenzien ist nur leicht erhöht.

Die mikrobielle Taschenflora setzt sich überwiegend aus gramnegativen anaeroben und kapnophilen Mikroorganismen und Spirochäten zusammen. Insbesondere *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis*, welche die Funktionen der neutrophilen Granulozyten einschränken können, werden für die Entwicklung einer aggressiven Parodontitis verantwortlich gemacht (Lopez 2000, Schacher et al. 2007). Viele der Patienten weisen zusätzlich Defekte der neutrophilen Granulozyten und Monozyten auf. Hierbei können die Abläufe der Migration und Chemotaxis gestört sein. Es wird davon ausgegangen, dass die Defekte der Leukozyten vererbt werden, da eine familiäre Häufung vorliegt (Page 1998, Kohal und Dennison 2000, Fuhrmann 2006). Weiterhin kann ein hyperreaktiver Makrophagen-Phänotyp vorkommen. Dieser Phänotyp führt zur vermehrten Ausschüttung von gewebedestruierenden Faktoren wie PGE-2 oder IL-1 β (Kohal und Dennison 2000).

2.4 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Das 1912 erstmals von Klinger als Begleitkeim der Aktinomykose beschriebene Bakterium stellt einen wichtigen Vertreter parodontopathogener Keime dar. *A. actinomycetemcomitans* ist ein gramnegatives, nicht bewegliches, kokkoides Stäbchen mit einem Ausmaß von ca. 0,4 x 1,0 μ m. Zum Wachstum benötigt es 5 bis 10 Prozent CO₂, ist fakultativ anaerob, nicht hämolysierend und bildet keine Sporen aus. Da der bevorzugte pH-Bereich zwischen 7,0 bis 7,8 mit einem Optimum von 7,5 liegt, weist es keine acidogenen Eigenschaften auf. Wachstumsfördernd wirken sich erhöhte Östrogen-, Progesteron- sowie Testosteronspiegel als auch Cystein, Thiamin und Hefeextrakt aus (Dahlke und Riedel 2000). Eisen hat keinen Einfluss auf den Anabolismus. Es kommen 5 Serotypen (a, b, c, d, e) vor, wovon a, b und c vorwiegend in der Mundhöhle anzutreffen sind. Klinische Isolate kommen meist als Serotyp b vor,

währenddessen es bei gesunden Trägern oft Serotyp c ist. *A. actinomycetemcomitans* bildet beim Wachstum kleine, helle Kulturen mit rauen Oberflächen und einer „starlike inner structure“, die durch das Bild von gekreuzten Zigarren gekennzeichnet ist.

Durch die Ausprägung zahlreicher Virulenzfaktoren ist es *A. actinomycetemcomitans* möglich, die Kolonisation und Persistenz in der Mundhöhle zu fördern. Dazu gehören Faktoren, die mit der Wirtsabwehr interferieren, Faktoren, die zur Gewebedestruktion führen, Faktoren, die das Wachstum und die Adhäsion in den ökologischen Nischen sichern und hemmende Faktoren bezüglich der Regenerationsfähigkeit von Gewebestrukturen. An der Oberfläche von *A. actinomycetemcomitans* kommt es zur Ausbildung von Fimbrien, die häufig in Bündeln vorkommen und bei einem Durchmesser von 5nm mehr als 2µm lang sein können. Sie dienen der Adhäsion an speichelbenetztes Hydroxylapatit, Fibroblasten und Epithelzellen (Puschmann 2003, Gutiérrez-Venegas et al. 2007). Die Adhärenz an Epithelzellen geht dabei sehr schnell und ausgeprägt vonstatten. Weiterhin liegen adhäsive Eigenschaften zu extrazellulären Matrixproteinen des Typs Kollagen I, II, III und V vor. Zum Hauptbestandteil der Basalmembran, dem Kollagentyp IV, existiert keine Bindungsmöglichkeit (Gutiérrez-Venegas et al. 2007). Vesikel, welche von *A. actinomycetemcomitans* in großer Menge in die Umgebung freigesetzt werden, enthalten unter anderem LPS, Bacterocin und Leukotoxin. Besonders Leukotoxin produzierende Stämme setzen eine große Anzahl an Vesikeln frei, die über adhäsive und Knochen resorbierende Eigenschaften verfügen. Bacterocine stellen von Bakterien synthetisierte Proteine dar, die andere Stämme und Spezies abtöten. Das in den extrazellulären Vesikeln und an der Zelloberfläche vorkommende Actinobacillin wirkt verändernd auf die Zellmembranpermeabilität von *Streptococcus sanguis*, *Str. viscosus* und *Str. uberis* (Stevens et al. 1987). Die Möglichkeit der Zerstörung anderer Bakterienspezies sichert *A. actinomycetemcomitans* dabei seine Existenz und eine lokale Vormachtstellung. Aus den Vesikeln ausgeschüttetes Leukotoxin wirkt zellspezifisch gegen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten (Baehni et al. 1981). Es besitzt die Fähigkeit, in die Zielzelle durch Porenbildung einzudringen und dort über die

Caspaseaktivierung die Apoptose zu induzieren. Die Expression von Leukotoxin unterliegt der regulierenden Einflussnahme des Sauerstoffgehalts. Bei einem anaeroben Milieu wird die Synthese gefördert, Fruktose und Glukose hemmen dagegen die Leukotoxinproduktion. Lipopolisaccharide fördern abhängig von IL-1 und Prostaglandin die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem Knochen. Weiteres oberflächenassoziiertes Material führt zur direkten Aktivierung von Osteoklasten. Beide Vorgänge haben Knochenresorptionsvorgänge zur Folge. Gleichzeitig verursachen LPS die Hemmung der Fibroblastenproliferation und verhindern damit die Regeneration des parodontalen Stützgewebes (Okada und Murakami 1998). Aufgrund der durch LPS stimulierten Freisetzung von IL-1 α , IL-1 β und TNF- α , verfügt *A. actinomycetemcomitans* über die Fähigkeit, eine vermehrte Ausschüttung von Entzündungsmediatoren zu verursachen. Nachgewiesen wurde auch, dass bestimmte von *A. actinomycetemcomitans* produzierte Proteine sowohl die DNA-, RNA- und Proteinsynthese der T-Lymphozyten als auch die IgG- und IgM-Synthese hemmen können (Wang et al. 1999, Wang et al. 2001). Der gleiche Effekt wird durch das Leukotoxin hervorgerufen. Eine weitere wichtige Eigenschaft von *A. actinomycetemcomitans* ist die Fähigkeit, aktiv in epitheliale Wirtszellen einzudringen. Damit verfügt *A. actinomycetemcomitans* über einen effektiven Mechanismus die wirtseigene Immunabwehr zu umgehen (Wachter 2005) und ist innerhalb der Epithelzellen gegenüber verschiedenen Antibiotika partiell geschützt (Pischon und Kaner 2008).

2.5 Porphyromonas gingivalis

Die Spezies *P. gingivalis* ist ein obligat anaerobes gramnegatives Stäbchenbakterium, das zum Wachstum eine sauerstoffarme Atmosphäre benötigt. Aufgrund der Sauerstoffempfindlichkeit besteht eine starke und spezifische Abhängigkeit gegenüber dem äußeren Milieu (Pfister und Eick 2005, Fuhrmann 2006). *P. gingivalis* trägt häufig eine Polysaccharidkapsel, deren unterschiedlich starke Ausprägung mit der Virulenz korreliert. Das Lipopolysaccharid von *P. gingivalis* entfaltet im Wirtsorganismus eine geringere

Toxizität als das LPS aerob wachsender gramnegativer Stäbchen (Fuhrmann 2006). Wachstumsfördernd wirkt sich für *P. gingivalis* ein Milieu von 5 bis 10 Prozent CO₂, 80 bis 85 Prozent N₂, sowie 10 Prozent H₂ bei einer Temperatur von 37°C aus. Weiterhin werden zum Wachstum Hämin und dessen Eisenbestandteile, wachstumsstimulierende Proteine und Hormone, Menadion, Succinat und Vitamin K benötigt. Diese benötigten Substrate liegen meistens bereits in größeren Mengen durch Stoffwechselprodukte von Primärbesiedlerkeimen (z. B. *Fusobacterium nucleatum* oder *Streptococcus sanguinis*) vor. *P. gingivalis* ist ein asaccharolytischer, nicht fermentativer Keim, da von ihm Kohlenhydrate weder verstoffwechselt noch oxydiert werden können (Marsh und Martin 2003). Speziell synthetisierte Proteasen spalten u. a. Kollagen, Keratin, Laminin und Fibronectin auf und ermöglichen so die Metabolisierung der Peptide. Durch die entstehenden Stoffwechselendprodukte entsteht ein foetider Geruch, was ein charakteristisches Merkmal bei der Kultivierung auf Schaedler-Agar-Platten darstellt. Nach 7 bis 10 Tagen anaerober Bebrütung entwickeln sich runde, punktförmig erhabene, grünscharze Kolonien. Die dunkle Färbung ergibt sich aus der Produktion eines Pigments, welches einem Hämatinabkömmling entspricht.

Viele Virulenzeigenschaften sind auf die Fimbrien zurückzuführen (Puschmann 2003, Wachter 2005). Durch die Ausbildung von Fimbrien (Typ I bis V) und den daraus bedingten hämagglutinierenden Eigenschaften besitzt *P. gingivalis* über die Bindung an u. a. Fibronectin, Fibrinogen, Statherin und Laktoferrin die Möglichkeit zur Kolonisation. Auch die Fähigkeit zur Anheftung an prolinreiche Proteine, orale Epithelzellen und Bakterien (z. B. Streptokokken, *Fusobacterium nucleatum*) ist gegeben. Fimbrien, welche chemotaktisch wirksam sind, führen, ebenso wie die LPS der Polysaccharidkapsel von *P. gingivalis*, zur Freisetzung von Zytokinen aus den Immunzellen, was eine Entzündungsreaktion im parodontalen Gewebe verursacht. Dabei kommt es zu einer vermehrten Expression von IL-6, IL-8 und TGF- β in den humanen Gingivafibroblasten. Auch die Freisetzung von IL-1 β aus Makrophagen wird durch *P. gingivalis* induziert, welches wiederum, mit zusätzlicher Stimulation durch die LPS, die Produktion von IL-6 in den Gingivafibroblasten verursacht (Diya et al 2008). Durch die

Interaktionsfähigkeit mit den Epithelzellen ist *P. gingivalis* im parodontalen Bindegewebe die Möglichkeit der Vermehrung und Persistenz gegeben. Wie *A. actinomycetemcomitans* kann *P. gingivalis* aktiv in die Epithelzellen eindringen und damit die Wirtsabwehr umgehen. Auch hier liegt ein partieller Schutz gegen AB vor (Pischon und Kaner 2008). Weitere Virulenzeigenschaften werden durch die Produktion zahlreicher Proteasen bedingt. Die sogenannten Gingipaine (Cysteinproteasen), welche ca. 85 Prozent der gesamten proteolytischen Aktivität von *P. gingivalis* ausmachen, lassen sich in Arginin- und Lysinproteasen unterteilen. Davon liegen ca. 46 Prozent argininspezifische Proteasen und 39 Prozent lysinspezifische Proteasen vor (Potempa et al. 1997). Gemeinsame Funktionen der Cysteinproteasen stellen sowohl die Spaltung von IgG, sekretorischem IgA und Serum-IgA als auch den Abbau von Kollagen I und IV dar. Die argininspezifischen Proteasen ermöglichen zusätzlich die Autoaggregation und Koaggregation mit grampositiven Bakterien sowie die Hämagglutination und Freisetzung von MMPs. Weiterhin kann durch sie die Gefäßpermeabilität durch Produktion von Plasma-Kallekrein mit nachfolgender Bradykininfreisetzung erhöht werden. Der Abbau des Komplementfaktors C5 zu C5a fördert die Chemotaxis. Die lysinspezifischen Proteasen verhindern die Koagulation des Fibrinogens. Interne Protease-Inhibitoren wie zum Beispiel der aus dem Gewebe stammende Inhibitor der Matrix-Metallproteinasen Cystatin haben keine inhibierenden Effekte auf die Gingipaine. *P. gingivalis* besitzt sogar die Fähigkeit, über die Synthese seiner bakteriellen Proteasen diese lokalen Proteaseinhibitoren zu eliminieren (Abrahamson et al.1997).

2.6 Neutrophile Granulozyten, Phagozytose, oxidative burst

Neutrophile Granulozyten, Monozyten und Gewebsmakrophagen besitzen im menschlichen Organismus die Fähigkeit zur Phagozytose (Page und Kornman 1997, Faurischou und Borregaard 2003, Nauseef 2007).

Als ein Bestandteil der unspezifischen zellulären Immunität sind die neutrophilen Granulozyten neben den Makrophagen in der Regel die ersten phagozytierenden Zellen, die mit Mikroorganismen in Kontakt treten (Page und Kornman 1997, Faurschou und Borregaard 2003). Sie übernehmen im menschlichen Körper eine wichtige Funktion bei der Abwehr von Erregern (Nauseef 2007). Makrophagen sind im Vergleich zu neutrophilen Granulozyten hinsichtlich der Abtötung von Bakterien weniger effektiv. Sie können aber zur Freisetzung von Mediatoren, z. B. IL-1, TNF- α , Chemokine, angeregt werden, über diese eine Entzündungsreaktion auslösen und die Einwanderung von Granulozyten in das Gewebe stimulieren. Potente chemotaktische Faktoren für neutrophile Granulozyten stellen aktivierte Komplementkomponenten, wie C3a, C4a und C5a, Leukotriene, der Plättchen aktivierende Faktor, das bakterielle Tripeptid FMLP sowie einige Zytokine, z. B. IL-8, dar (Levente 2000).

Unter dem keimvernichtenden Prozess der Phagozytose (gr. phagein = fressen) wird die Aufnahme von größeren Nahrungspartikeln bis hin zu kleineren Zellen in eine einzelne eukaryotische Zelle verstanden [3]. Die Phagozytose ist ein multifaktorieller Vorgang, der in mehreren Phasen abläuft: Rezeptorbindung (Adhärenz), Aufnahmephase (Ingestion) und intrazelluläre Abtötung (Digestion) (Faurschou und Borregaard 2003). Die Phagozytose wird durch die Bindung eines Partikels an die Zelloberfläche eines Phagozyten eingeleitet. Die Adhärenz kann sowohl auf direktem Wege zwischen Fresszelle und Bakterium über spezielle Mannose bindende Rezeptoren der Phagozyten als auch über den Mechanismus der Opsonierung erfolgen. Bei einem überwiegenden Anteil werden die zu phagozytierten Partikel jedoch opsoniert (Griffin et al. 1975). Opsonine sind im Körper vorkommende Proteine und können entweder Antikörper oder Komplementfaktoren sein. Wichtige Opsonine stellen in dieser Hinsicht IgA, IgG und Spaltprodukte der Komplementkomponente C3 dar (Brown 1991, Greenberg und Silverstein 1993). Sie binden bei der Opsonierung mit einem Ende an einen spezifischen Rezeptor des Phagozyten und mit dem anderen Ende an das zu phagozytierende Bakterium.

Es lassen sich zwei grundsätzlich verschiedene Phagozytoserezeptoren unterscheiden. Für die Immunglobuline IgA und IgG fungieren spezielle Fc-Rezeptoren. Die von den verschiedenen Phagozyten exprimierten Fc-Rezeptoren unterscheiden sich, abhängig von der Art des Phagozyten, untereinander. FcγRI wird von Monozyten, FcγRII von Monozyten und neutrophilen Granulozyten, FcγRIII von Granulozyten und Gewebsmakrophagen, FcαRI von Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten präsentiert (Greenberg und Silverstein 1993, Ravetch 1994). Fc-Rezeptoren übernehmen jedoch noch eine weitere wichtige Funktion hinsichtlich der immunologischen Abwehr. In Makrophagen aktivieren sie z. B. nach der Antikörperbindung einen Natrium-Kanal, was über eine Depolarisierung zur Aktivierung der Phagozytose und H₂O₂-Produktion führt. Die Komplementrezeptoren, welche von den Phagozyten exprimiert werden, umfassen ebenfalls verschiedene Klassen. Dazu gehören CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) und CR4 (CD11c/CD18) (Roitt et al. 1995). Nach der spezifischen Bindung des zu phagozytierenden Partikels erfolgt die Aufnahme über Phagosomen. Sie stellen große Vesikel mit einem Durchmesser von mehr als 250nm dar, die durch den Prozess der Endozytose entstehen. Die Einverleibung kann dabei durch einen Einstülpungsvorgang, die s. g. Invagination, oder ohne eine Formveränderung der Zelle, durch ein Umfließen der fremdartigen Partikel mit Hilfe von zellulären Ausstülpungen, so genannten Pseudopodien, vonstatten gehen (Griffin et al. 1976). Damit ist den „Fresszellen“ des Immunsystems die Möglichkeit gegeben, die Mikroorganismen endozytotisch ins Zellinnere aufzunehmen, um sie dort weiteren Eliminierungsprozessen zu unterziehen (Abb. 1).

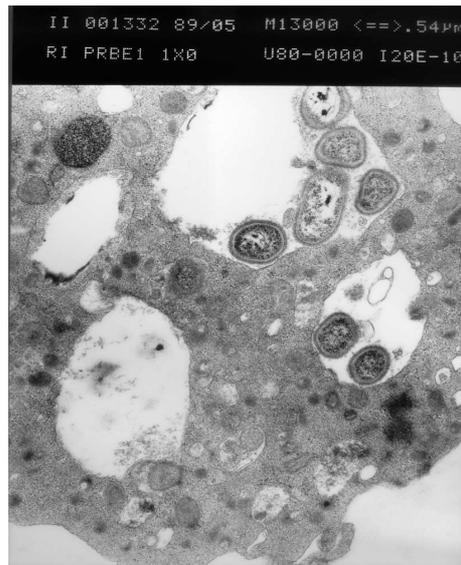


Abbildung 1: Neutrophiler Granulozyt mit aufgenommenen Porphyromonas gingivalis

Im Intrazellularraum fusioniert das primäre Phagosom mit Lysosomen, woraus sich das sekundäre Phagosom (Phagolysosom) bildet. Die Lysosomen stellen nach der Fusion lysosomale Enzyme zur Verfügung, woraufhin das phagozytierte Material einer Reihe von Proteasen ausgesetzt wird. Zu ihnen zählen das Cathepsin G (neutrale Protease), niedrigmolekulare Defensine, bakterizide permeabilitätssteigernde Proteine und hochmolekulare Proteine (Belaouaj et al. 2000, Weinrauch et al. 2002, Lopez-Boado et al. 2004). Außerdem wird das Phagosom nach der Abschnürung mit Säure und Sauerstoffradikalen angereichert und das eisenbindende Laktoferrin entzieht den wachsenden Bakterien zusätzlich Eisen (Faurischou und Borregaard 2003).

Währenddessen die Anreicherung des Phagolysosoms mit Proteasen, der saure pH-Wert sowie der Wirkungsmechanismus des Laktoferrins zu den sauerstoffunabhängigen Mechanismen der PMNs, die der Abtötung von Mikroorganismen dienen, zugeordnet werden, verfügen die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten auch über sauerstoffabhängige Abwehrmöglichkeiten (Halliwell 2000). Beim sauerstoffabhängigen Weg kommt es beim Eindringen des Erregers zu einer starken Aktivitätszunahme im Pentosephosphatzyklus, wodurch in größeren Mengen NADPH gebildet wird. Dieses NADPH wird über die NADPH-Oxidase zur Reduzierung molekularen Sauerstoffs an membranständigen Zytochromen genutzt, woraufhin aus dem Sauerstoff im Verlauf der Reaktion von

Sauerstoff zu Wasser weitere bakterizide Zwischenprodukte entstehen (Levente 2000, Faurschou und Borregaard 2003, Nauseef 2007). Unter „oxidative burst“ versteht man folglich die Freisetzung von aggressiv-lytischen Sauerstoffradikalen durch Makrophagen und PMNs [5]. Dazu zählen Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikale ($\cdot OH$), monomolekularer Sauerstoff (1O_2), Superoxidanionen (O_2^-) und Stickstoffmonoxid (NO), welche zur Auflösung und Zerstörung von Erregerbestandteilen, die zuvor den Prozess der Phagozytose durchlaufen haben, führen (Levente 2000, Faurschou und Borregaard 2003, Schauerte 2004, Nauseef 2007) [9]. Beim Verbrauch von Wasserstoffionen bei der Dismutation von Superoxidanionen durch das Enzym Superoxiddismutase kommt es zum Anstieg des intrazellulären pH-Wertes, so dass die kationischen Proteine optimalen Bedingungen unterliegen (Nauseef 2007). Auch durch das H_2O_2 -Myeloperoxidase-System ist ein zusätzlich wirksames mikrobizides System vorhanden, da es mikrobielle Proteine halogenisieren kann, was meistens letale Folgen hat (Schauerte 2004).

Nach der Phagozytose und Abtötung der Erreger tritt bei den Granulozyten, durch eine irreversible Schädigung der Zellfunktionen hervorgerufen, der Zelltod ein, woraufhin sie rasch zugrunde gehen. Die dabei freiwerdenden eigenen Zerfallsprodukte sowie Bestandteile inaktivierter Mikroorganismen unterhalten dabei weiterhin das entzündliche Geschehen. Die Bereitstellung der nötigen Enzyme, das Vorliegen eines sauren Milieus und die Bildung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten („respiratory burst“, „oxidative burst“), stellen Faktoren dar, die letztendlich alle dem Ziel dienen, die phagosomalen Inhalte abzubauen. Währenddessen ein Großteil der Erreger durch Phagozytose einer vollständigen Eliminierung unterliegt, existieren einige Keime, die durch Phagozytose zwar aufgenommen, aber in den Phagolysosomen nicht abgetötet werden können. Dazu gehören *Mycobacterium leprae*, Parasiten der Gattung *Leishmania* und *Legionella pneumophila*, der als Erreger der Legionärskrankheit die H^+ -ATPase in den Lysosomen hemmt und sich somit in ihnen vermehren kann [6]. Auch die parodontopathogene Spezies *A. actinomycetemcomitans* verfügt über spezielle Fähigkeiten, sich der phagozytären Lyse zu entziehen. Über die Synthese spezieller Proteine, die durch Adhärenz an IgG die Bindungsstellen von Fc-

Rezeptoren belegen, ist er in der Lage die Phagozytoseleistung der neutrophilen Granulozyten deutlich zu vermindern. Die Hemmung der Chemotaxis durch niedermolekulare Proteine trägt ebenfalls dazu bei. Zusätzlich besitzt *A. actinomycetemcomitans* gegenüber bestimmten proteolytischen Enzymen Resistenzen, wodurch er sich der intrazellulären Verdauung entzieht. Die phagozytäre Leistungskapazität des menschlichen Immunsystems unterliegt jedoch nicht ausschließlich bakteriellen Einflüssen. Weitere beeinträchtigende Faktoren stellen Pharmaka wie Glukokortikoide, Colchizin und nichtsteroidale Antiphlogistika dar. Zusätzliche Einschränkungen der Phagozytenfunktion liegen bei Hämodialyse, verschiedenen Tumorerkrankungen, großflächigen Verbrennungen, Diabetes mellitus, Malnutrition sowie in der Neonatalperiode vor [4]. Auch angeborene Defekte der Phagozyten wie z. B. bei der chronischen Granulomatose oder beim Chèdiak Hashi Syndrom sind bekannt. Dabei kann im Einzelnen die Adhärenz, die Deformierbarkeit der Zellen, die Chemotaxis oder die antimikrobielle Aktivität betroffen sein [4].

2.7 Humane Neutrophile Granulozytenelastase

Der Begriff Elastase wird als Bezeichnung für alle Enzyme verwendet, die von dem unlöslichen, vielfach quervernetzten Bindegewebsprotein Elastin kleine lösliche Peptidfragmente abspalten. Neben der in den neutrophilen Granulozyten gebildeten Humanen Neutrophilen Elastase (Leukozyten Elastase) fallen unter den Oberbegriff auch das Verdauungsenzym Pankreaselastase, einige Metalloproteinasen, die aus Mastzellen isolierte Matrix-Metallproteinase Humane Makrophagenelastase (MMP-12) und die Hautfibroblastenelastase, die bei degenerativen Prozessen der Haut eine Rolle spielt (Siedle 2003).

Die HNE (human neutrophil elastase) stellt ein stark basisches Glykoprotein, bestehend aus 218 Aminosäuren, mit Protease-Aktivität dar. Sie gehört zur Gruppe der Serinproteasen wie zum Beispiel auch Trypsin, Chymotrypsin oder die Pankreaselastase. Im Vergleich zu anderen Serinproteasen ist die HNE jedoch

relativ hydrophob, da ca. 90 hydrophobe Reste (>40% der gesamten AS) der wässrigen Umgebung ausgesetzt sind (Bode et al. 1989) (Abb. 2).

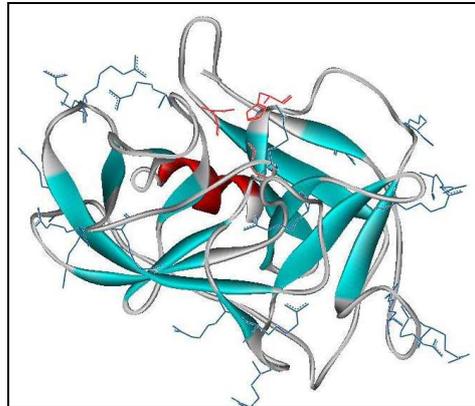


Abbildung 2: Struktur der Humanen Neutrophilen Elastase in der Banddarstellung

HNE wird in den neutrophilen Granulozyten des Menschen in inaktiver Form gespeichert und bei immunologischer Aktivierung der PMNs aus deren Granula freigesetzt. Die Aktivierung der Elastase erfolgt über eine Abspaltung von Peptiden, was zu einer Konformationsänderung und damit zum Erwerb der katalytischen Eigenschaften führt. Aufgabe der Elastase ist es, nach Verschmelzen der azurophilen Granula mit dem Phagosom die phagozytierten Bakterienbestandteile zu lysieren. Die Abbauprodukte dieser Proteolysereaktionen sind für die Bakterien toxisch. Zusätzlich verfügt die HNE nach Abbau von äußeren, bakteriellen Membranproteinen über die Fähigkeit, ins Innere der Bakterien einzudringen und dort Proteine abzubauen, welche für das Bakterienwachstum essentiell sind (Belaouaj 2002). HNE kann neben der Aktivität im Lysosom auch an die Oberfläche der PMNs transportiert und dort in die Membran integriert werden (Siedle 2003). Als Serinprotease katalysiert sie den proteolytischen Abbau von Elastin, Kollagen, Fibronectin sowie von weiteren Proteinen. Wenn die HNE sich an der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten oder im Extrazellulärraum befindet, ist sie deshalb neben ihrer antibakteriellen Funktionsweise maßgeblich am Abbau des Gewebestützgerüsts beteiligt. Die HNE spielt in diesem Zusammenhang bei den chronisch entzündlichen Erkrankungen eine bedeutende Rolle (Siedle 2003).

3 Ziele der Arbeit

Die Bakterienspezies *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* spielen bei der Pathogenese der Parodontitis eine entscheidende Rolle. Sie sind maßgeblich an der Entstehung von chronischen und aggressiven Parodontitiden beteiligt, was Ausdruck ihres parodontopathogenen Potenzials ist. Als Bestandteil der körpereigenen zellulären Immunabwehr dienen die neutrophilen Granulozyten der Eliminierung von Keimen im parodontalen Sulkus. Durch den Prozess der Phagozytose werden dabei die Bakterien ins Zellinnere aufgenommen und lysiert. In diesem Zusammenhang geht aus zahlreichen Studien hervor, dass es bei diesen immunologischen Abwehrprozessen, neben der bakteriziden Wirkung, auch zur Schädigung körpereigener Gewebestrukturen kommt und somit der menschliche Organismus nicht unerheblich für die Progression der Parodontitis selbst verantwortlich ist.

Das Ziel dieser In-vitro-Studie bestand darin, die im Zusammenhang mit der phagozytären Abtötung von *P. gingivalis* ATCC 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 durch die neutrophilen Granulozyten stehende Freisetzung von ROS zu untersuchen. Es sollte überprüft werden, wie sich die oxidativen Abwehrvorgänge der PMNs sowohl unter Einfluss von *P. gingivalis* als auch *A. actinomycetemcomitans* bei aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei einer gesunden Kontrollgruppe verhalten.

Einen weiteren Bestandteil der Untersuchungen stellte die Bestimmung der Aktivität der neutrophilen Elastase dar, welche nach ihrer Aktivierung aus den zellulären Granula der PMNs ausgeschüttet wird und an der Zerstörung parodontaler Gewebestrukturen beteiligt ist. Diese sollte nach der Interaktion der PMNs mit beiden Bakterienstämmen gemessen werden.

Das Ziel dieser Arbeit war, die ermittelten Werte von aggressiven und chronischen Parodontitiden sowohl untereinander als auch mit einer gesunden Kontrollgruppe zu vergleichen. Deshalb wurde in beiden Versuchsansätzen frisch

abgenommenes Venenblut von Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie von einer gesunden Kontrollgruppe verwendet. Ebenso wurde eine Differenzierung der Messergebnisse nach Art der Stimulation der PMNs (P. g., A. a., Positiv- und Negativkontrolle) vorgenommen.

4 Methodik

Sämtliche In-vitro-Versuche wurden in den Laboratorien des Instituts für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Jena durchgeführt. Die folgenden Materialien, Geräte und Hilfsmittel dienten der Versuchsdurchführung.

4.1 Medien, Reagenzien, Chemikalien, Zusätze

Ampuwa:

Hersteller: Fresenius, Bad Homburg, Deutschland

Ampuwa ist steriles, bidestilliertes, pyrogenfreies Wasser. Es dient als neutrales Lösungsmittel.

AnaeroGen:

Hersteller: OXOID, Basingstoke, United Kingdom

AnaeroGen ermöglicht die Erzeugung eines anaeroben Milieus in luftdicht verschließbaren Bruttöpfen.

AnaeroGen-Indikator:

Hersteller: OXOID, Basingstoke, United Kingdom

AnaeroGen-Indikator dient der Kontrolle des anaeroben Milieus, indem er bei Sauerstoffzufuhr von der Farbe weiß nach rosa umschlägt.

Dextran-Lösung (3%):

Hersteller: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Lösung bestehend aus 3% Dextran und 0,9% NaCl, aufgefüllt auf 1 Liter H₂O.

DMSO: Dimethylsulfoxid

Hersteller: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

DMSO wurde als Lösungsmittel bei der Granulozytenelastasebestimmung sowie bei der Positivkontrolle der Chemolumineszenzmessung eingesetzt.

HBSS: Hanks balanced salt solution

Hersteller: Biochrom KG, Berlin, Deutschland

Hanks Salzlösung mit 0,35 g/l NaHCO₃ (Natriumhydrogencarbonat).

Isoluminol: 4-Aminophthalhydrazid

Hersteller: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Isoluminol als Reagenz der chem. Reaktion für die Chemolumineszenzmessung diente der quantitativen Bestimmung der extrazellulären Chemolumineszenz.

Luminol: 3-Aminophthalhydrazid

Hersteller: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Luminol als Reagenz der chem. Reaktion für die Chemolumineszenzmessung diente der quantitativen Bestimmung von extra- sowie intrazellulär freigesetzten ROS.

Medium 199:

Hersteller: Gibco BRL, Paisley, United Kingdom

Medium 199 beinhaltet verschiedene Aminosäuren (u. a. Glutamin) und dient als Nährmedium und dem Einstellen von Bakterienkonzentrationen in einer Lösung.

PBS: Phosphate buffered saline

PBS (Phosphatpuffer) ist eine bidestillierte physiologische NaCl-Lösung, die sich durch einen pH-Wert von $7,2 \pm 0,2$ und Sterilität auszeichnet. Weiterhin enthält sie die Bestandteile KCl, Na₂HPO₄·2H₂O und KH₂PO₄. PBS wurde zum Verdünnen und Spülen benutzt.

PMA: Phorbol-12-Myristat-13-Acetat

Hersteller: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

PMA ist ein Phorbolester, der für die Positivkontrollen bei der Chemolumineszenzmessung eingesetzt wurde.

Schaedler-Agar-Platten:

Hersteller: OXOID, Basingstoke, United Kingdom

Feste Nährmedien mit 8%igem sterilem defibriniertem Schafsblut. Sie dienen sowohl den kapnophilen als auch anaeroben Bakterien zum Wachstum.

4.2 Geräte, Apparaturen, Hilfsmittel

CO₂-Schrank:

Hersteller: Heraeus, Hanau, Deutschland

Der CO₂-Schrank dient der Erzeugung eines anaeroben Milieus (85% N₂, 5% CO₂). Die Temperatur betrug 37 °C bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

Digitale Waage:

Hersteller: Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Die eichfähige elektronische Analysen- und Präzisionswaage kam beim Abwiegen der benötigten Chemikalienmengen zum Einsatz.

Eppendorf-Tubes:

Hersteller: Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Die Eppendorf-Tubes wurden u. a. zum Vermischen der Bakterien und Granulozyten genutzt.

Laminarbox:

Hersteller: Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

Die Laminarbox diente dem sterilen Arbeiten während der Versuchsdurchführung.

Microplate Luminometer TR717:

Hersteller: Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Das Luminometer ermöglichte die Messung der intra- sowie extrazellulären Chemolumineszenz.

Mikroskop:

Hersteller: Carl Zeiss Jena, Jena, Deutschland

Das Lichtmikroskop wurde zum Auszählen der PMNs mittels einer Neubauer-Zählkammer genutzt.

Mikrotiterplatte:

Hersteller: BRAND GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland

In die Mikrotiterplatte wurden sämtliche zu messenden Bakterien- und Blutzellgemische pipettiert. Sie umfasste 96 Nöpfchen (8 x 12) mit einem Füllvolumen von 0,3ml.

Monovetten:

Hersteller: Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland

Bei der Blutentnahme kamen sowohl Lithium-Heparin-Monovetten (7 ml) als auch Serum-Monovetten mit Granulat (2,7 ml) zum Einsatz.

Parodontalsonde PCP-UNC 15:

Hersteller: HU-Friedy Europe, Leimen, Deutschland

Die Parodontalsonde wurde zum Ausmessen der parodontalen Taschentiefen verwendet.

Photometer:

Hersteller: Carl Zeiss Jena, Jena, Deutschland

Das Photometer diente der Einstellung der gewünschten Bakterienkonzentration.

Pipetten:

Hersteller: Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Es kamen Eppendorf-Pipetten mit unterschiedlichen Fassungsvermögen (10 µl, 50 µl, 100 µl, 500 µl, 1000 µl) sowie Saugpipetten zum Einsatz.

Pipettenspitzen:

Zu den Eppendorf-Pipetten wurden die entsprechenden passenden Pipettenspitzen (weiß, blau, gelb) verwendet. Für die Saugpipetten kamen Einwegspitzen mit den Fassungsvermögen von 5 ml und 10 ml zum Einsatz.

Spectra Rainbow:

Hersteller: TECAN, Crailsheim, Deutschland

Im ELISA-Reader Spectra Rainbow fanden die Messungen zur Granulozytenelastase statt.

Vortex-Gerät:

Hersteller: Heidolph, Fisher Scientific, Kahla, Deutschland

Das Vortex-Gerät wurde zum Durchmischen verschiedener Lösungen und Suspensionen benutzt.

Zentrifuge:

Hersteller: Eppendorf Zentrifuge 5804R, Hamburg, Deutschland

Die Zentrifuge kam während des Präparationsablaufs von Granulozyten und der Bakterienstammlösungen zum Einsatz.

4.3 Verwendete Bakterienstämme

Während der Versuchsdurchführung wurden zwei Bakterienstämme benutzt. Dabei handelte es sich zum einen um den Referenzstamm ATCC 33277 der Spezies *P. gingivalis*. Als zweite Bakterienart kam *A. actinomycetemcomitans* mit dem Stamm Y4 zum Einsatz. Beide Bakterienkulturen wurden der Stammsammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena entnommen. Ursprünglich wurden diese Stämme von der deutschen Stammsammlung des DSMZ aus Braunschweig in Deutschland bezogen.

4.4 Gewonnenes Patientenmaterial

An der Zahnklinik der Friedrich-Schiller-Universität Jena wurden in der Poliklinik für Konservierende Zahnheilkunde im Rahmen einer systematischen Parodontitisbehandlung bei speziell selektierten Patienten mit chronischer oder aggressiver Parodontitis Blutproben entnommen. Die Einteilung nach chronischen und aggressiven Parodontitiden basierte auf dem Klassifizierungssystem des International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions aus dem Jahre 1999 (siehe Kap. 2.1.3).

Patienten mit generalisierter chronischer Parodontitis wurden in die Studie mit einbezogen, wenn bei ihnen an mehr als 30% der Messpunkte ein Attachmentverlust ≥ 5 mm vorlag und sie mindestens 35 Jahre alt waren. Bei den Patienten mit aggressiver Parodontitis musste ein Attachmentverlust von ≥ 5 mm an mindestens 3 verschiedenen Zähnen (nicht die ersten Molaren und oberen Schneidezähne) und bei mindestens 2 Zähnen ein radiologischer Knochenverlust von $\geq 50\%$ vorliegen. Das Alter durfte bei Beginn der Erkrankung die 35 Jahre nicht überschreiten. Die parodontal gesunde Untersuchungsgruppe durfte keinerlei Anzeichen von parodontaler Erkrankung aufweisen, was sich in gemessenen Taschentiefen ≤ 3 mm und keinerlei Attachmentverlust äußerte.

Sämtliche Messungen der parodontalen Taschen erfolgten mit der Parodontalsonde PCP-UNC 15 der Firma HU-Friedy und wurden an jeweils 6 Stellen pro Zahn durchgeführt. Der Blutungsindex (BOP) ergab sich aus dem Prozentsatz der positiv nachgewiesenen Blutungsstellen zur Gesamtzahl der Sondierungsmessungen auf Blutung an allen Zähnen (Tabelle 1). Weiterhin fanden bei der Probandenauswahl die Empfehlungen der Amerikanischen Akademie für Parodontologie Berücksichtigung. Entsprechende Einschlusskriterien waren mindestens 20 in Okklusion stehende Zähne, keine Antibiotikaeinnahme während der letzten drei Monate, und dass keine schweren Allgemeinerkrankungen, wie Diabetes mellitus, koronale Herzerkrankungen oder Tumore vorlagen. Für die weiblichen Probanden galten als zusätzliche Kriterien,

dass sie sich weder in der Schwangerschaft noch in der Stillzeit befanden. Raucher wurden von der Studie ausgeschlossen.

Alle an der Studie teilnehmenden Patienten wurden im Voraus ausführlich informiert und das Einverständnis eingeholt. Es lag ein Votum von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena vor.

12 der insgesamt 18 Blutproben entstammten von Patienten mit einer chronischen Form der Parodontitis. Bei den restlichen 6 Probanden wurde eine aggressive Parodontitis diagnostiziert. Die Blutentnahme fand zwischen 8.00 und 10.00 Uhr vor Beginn der Parodontalbehandlung statt. Die Blutentnahme erfolgte intravenös aus einer der oberflächlich verlaufenden Unterarmvenen in zwei Lithium-Heparin-Monovetten (Fassungsvermögen 7 ml) sowie zusätzlich für eine Serum-Monovette (2,7 ml). Das gewonnene Patientenblut wurde umgehend nach Abnahme verarbeitet. Für die Kontrollversuche spendeten 12 Probanden ohne eine diagnostizierte Form der aggressiven bzw. chronischen Parodontitis ihr Blut. Die Entnahme erfolgte unter gleicher Vorgehensweise. Für die Kontrollen galten die gleichen Ein- und Ausschlusskriterien wie für die erkrankten Personen.

4.5 Versuchsdurchführung

4.5.1 Präparation der Bakterien

Bevor die Versuche durchgeführt werden konnten, wurden zunächst die entsprechenden Bakterienstämme kultiviert. Die Spezies *P. gingivalis* mit dem Referenzstamm ATCC 33277 sowie *A. actinomycetemcomitans* Y4 mussten 48 Stunden vor der Versuchsdurchführung auf Schaedler-Agar-Platten ausplattiert werden. Anschließend war darauf zu achten, dass *P. gingivalis* in luftdicht abgeschlossenen Bruttöpfen inkubiert wurde, um für sein Wachstum ein anaerobes Milieu zu gewährleisten. Die Agarplatten mit *A. actinomycetemcomitans* befanden sich im CO₂-Schrank.

Nach Ablauf von 48 Stunden Wachstum wurden die Bakterienstämme von den Schaedler-Agar-Platten entnommen und jeweils in einer Küvette mit Medium 199 auf eine Bakteriendichte von $OD_{640} = 0,1$ (entspricht 5×10^8) eingestellt. Das geschah mittels eines Photometers, welches vor Messbeginn auf eine Wellenlänge von 640 nm programmiert wurde. Zuvor diente eine bakterienfreie Lösung zur Eichung des Gerätes. Pro Bakterienstammlösung wurden anschließend 2,5 ml für 10 min bei 5000 g zentrifugiert. Es folgte das Entfernen des Überstands. Nun wurden 200 µl PBS und 200 µl Patientenserum ins Sediment zugegeben.

Nach 10 min Inkubationszeit im CO₂-Schrank erfolgte erneut die Zentrifugation bei 5000 g für 10 min. Anschließend wurde der Überstand entfernt und zu jeder Bakterienlösung 2,5 ml HBSS zugegeben. Die Lösungen wurden nochmals kräftig mit der Pipette durchgemischt.

4.5.2 Präparation der Granulozyten

In einem Glasröhrchen wurden zunächst 12,5 ml heparinisiertes Blut mit 12,5 ml 3%iger Dextran-Lösung vermischt. Die Granulozyten verblieben in der Dextranschicht, die Erythrozyten sanken daraufhin auf den Boden. Das vermischte Blut sedimentierte dabei für 20 min bei Raumtemperatur. Weiterhin wurden 2,5 ml Serum aus der Serum-Monovette in ein separates Glasröhrchen entnommen.

Nach 20 min Sedimentation folgte die Entnahme des Überstandes in ein neues Röhrchen. Der Überstand wurde bei 20°C und 400 g für 4 min zentrifugiert. Die 2,5 ml des Serums wurden ebenfalls zentrifugiert. Es folgte die Entfernung des Überstandes und die Zugabe von 5 ml eisgekühltem Ampuwa ins Sediment. Nach 40 Sekunden Einwirkungszeit wurden 5 ml doppelt konzentriertes HBSS zugegeben. Die Lösung wurde kräftig durchgemischt und bei 250 g und 20°C für 10 min zentrifugiert. Anschließend erfolgten erneut die Entfernung des Überstandes und die Verdünnung des Sediments mit 5 ml HBSS.

20 µl Zelllösung wurden nun zusammen mit 80 µl HBSS in einem Eppendorf-Tube vermischt und auf einen Objektträger gegeben. Daraufhin fand das Auszählen der Zellen unter dem Lichtmikroskop statt, wobei 10 diagonale Felder der Neubauer-Zählkammer ausgezählt wurden, um daraus einen Mittelwert zu ermitteln. Zur Einstellung der notwendigen Zelldichte (10^6 Zellen / ml) für die Gesamtmenge der Zelllösung von 7,5 ml, erfolgte die entsprechende Zugabe von HBSS.

4.5.3 Bestimmung der Aktivität der neutrophilen Elastase

Die Funktionsweise der Elastasemessung basiert auf dem Prinzip, dass es durch die durch Elastase verursachte enzymatische Hydrolyse des Substrates zur Freisetzung des Chromogens *p*-Nitroanilin kommt, wodurch die spektrophotometrische Analyse bei 405 nm ermöglicht wird.

Zur Bestimmung der Granulozytenelastase war zunächst die Herstellung einer Substratlösung notwendig. Hierfür wurden 1 Teil 0,5 M TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)-Puffer (pH 7,5), 8 Teile H₂O und 1 Teil 10 mM *N*-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-*p*-Nitroanilid (enthalten in einer 100 ng/ µl DMSO-Lösung) vermischt. 10 µl der gekühlten Substratlösung wurden anschließend pro Well auf eine Mikrotiterplatte pipettiert, woraufhin die erste Messung zum Zeitpunkt t_{0min} erfolgte. Da kein Gerät zur Kinetikmessung zur Verfügung stand, mussten die gesamten Messungen im ELISA-Reader Spectra Rainbow der Firma TECAN bei Zimmertemperatur zu bestimmten Zeitpunkten stattfinden. Die Aufzeichnung der photometrischen Messwerte der enzymatischen Reaktionen realisierte die Computersoftware EasyWin fitting 6.1 bei einer Wellenlänge von 405 nm. Nach abgeschlossener Anfangsmessung folgte die Zugabe von 90 µl Überstand in jedes Well der Mikrotiterplatte. Durch ein spezielles Pipettierschema wurden die Sedimente von chronischen und aggressiven Parodontitiden sowie der Kontrollgruppe voneinander getrennt, um später eine genaue Auswertung der Messergebnisse zu garantieren. Es schloss sich die Inkubation über 30 min bei

einer Temperatur von 37°C an. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde unverzüglich die Endmessung zum Zeitpunkt $t_{30\text{min}}$ im ELISA-Reader durchgeführt.

Über die Differenz zwischen dem Ausgangswert des Zeitpunktes $t_{0\text{min}}$ und der Endmessung nach 30 Minuten kann letztendlich auf die Menge und Aktivität der neutrophilen Granulozytenelastase geschlossen werden. Eine Maßeinheit (U) entspricht dabei der Menge des Enzyms Elastase, welches 1 nmol Substrat in 1 Minute hydrolysiert.

4.5.4 Bestimmung des oxidative burst der neutrophilen Granulozyten

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die von den neutrophilen Granulozyten nach immunologischer Aktivierung freigesetzt werden, können durch Chemolumineszenz detektiert werden. In diesem Zusammenhang diente zur Messung der Radikalproduktion der neutrophilen Granulozyten das Microplate Luminometer TR717 der Firma Applied Biosystems.

Zur Detektion der ROS war die Zugabe von luminogenen Substanzen erforderlich. Durch die Reaktion mit freien Radikalen werden sie in einen energiereichen Zustand versetzt und geben beim Zerfall der Zwischenprodukte die Energie in Form von Photonen frei, welche durch das Luminometer quantitativ erfasst wurden.

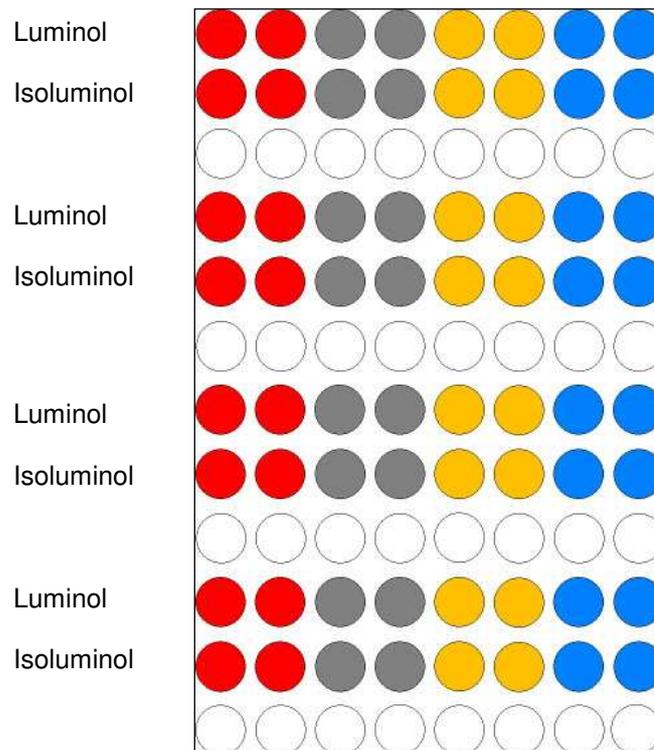
Bei der Versuchsdurchführung kamen als luminogene Substanzen Luminol und Isoluminol zum Einsatz. Luminol (3-Aminophthalhydrazid) detektiert Photonen bei einer Wellenlänge von 460 nm und diente der quantitativen Bestimmung von intra- sowie extrazellulären ROS. Isoluminol (4-Aminophthalhydrazid) wurde zur Messung extrazellulärer Sauerstoffradikale verwendet, da es durch einen Unterschied bezüglich der Aminogruppe im Phthalatring, im Gegensatz zum Luminol, hydrophiler ist und folglich weniger die Fähigkeit aufweist in biologische Membranen einzudringen (Frederiksson et al. 2003).

Zur Generierung der Lichtquanten kamen für jede Probe 50 µl Luminol bzw. 50 µl Isoluminol zum Einsatz. Die Luminol- und Isoluminollösung wurde zuvor auf Basis von 5,316 mg Luminol bzw. Isoluminol mit 20 µl 0,25 M NaOH und 9 ml PBS vermischt. Anschließend unterlagen diese einer luftdichten sowie lichtgeschützten Aufbewahrung, um vorzeitige Reaktionsabläufe zu verhindern.

Die Bakterienstamm- und Granulozytenlösungen wurden wie zuvor beschrieben hergestellt (siehe Kap. 4.5.1 und 4.5.2). PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat), das als Phorbolester zur Generierung der Positivkontrolle zum Einsatz kam, wurde zuvor mit einer 100 ng/ µl DMSO-Lösung versetzt. Anschließend erfolgte, einem Konzentrationsverhältnis von 1:100 entsprechend, die Verdünnung der PMA-Lösung mit HBSS, wobei für die benötigte Menge 4 µl PMA in 400 µl HBSS zugegeben wurde. PMA dient der Aktivierung der Proteinkinase C, welche eine vermehrte Produktion von ROS in den Granulozyten stimuliert und darüber zu einer höheren Fluoreszenzintensität führt (Frederiksson et al. 2003). Dabei wird durch die Proteinkinase C die Phosphorylierung der NADPH-Oxidase, welche für die Produktion von ROS verantwortlich gemacht wird, gesteigert.

Beim Pipettieren galt es eine bestimmte Reihenfolge einzuhalten, um eine frühzeitige Reaktion vor Messungsbeginn zu vermeiden. Zuerst wurde HBSS als Negativprobe zugegeben. Als zweites wurden die kurz zuvor nochmals auf dem Vortexer durchmischten Bakterien pipettiert. Anschließend folgten das PMA und zum Schluss die Granulozyten.

Die Durchführung der Chemolumineszenzmessungen erfolgte nach folgendem Pipettierschema (Abb. 3):



- Positivkontrollen (100 μ l PMN + 100 μ l PMA + 50 μ l Luminol/ Isoluminol)
- Negativkontrollen (100 μ l PMN + 100 μ l HBSS + 50 μ l Luminol/ Isoluminol)
- P.g. ATTC (100 μ l PMN + 100 μ l P.g. ATTC + 50 μ l Luminol/ Isoluminol)
- A.a. Y4 (100 μ l PMN + 100 μ l A.a. Y4 + 50 μ l Luminol/ Isoluminol)

Abbildung 3: Mikrotiterplatte mit Pipettierschema zur Bestimmung der Gesamt-ROS-Produktion sowie der extrazellulären ROS-Freisetzung

Daraufhin erfolgte umgehend die computergestützte Messung der frisch pipettierten Agenzien, um die Reaktionen von Anfang an registrieren zu können. Zur Messwertaufzeichnung diente das Programm WinGlow 1.24 der Firma Tropix. Gemessen wurde bei einer Temperatur von 37°C über einen Zeitraum von 120 min, wobei ein Messpunkt einer bestimmten Anzahl von auftretenden Lichtquanten entsprach.

4.6 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach der univariaten Varianzanalyse ANOVA (analysis of variance) und wurde mit dem post-hoc Bonferroni-Test durchgeführt.

Für alle statistischen Analysen kam die Statistik-Software SPSS 13.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) zum Einsatz.

Ein statistisch signifikanter Unterschied bestand ab einem Wert $p < 0,05$, was einer 5%igen Irrtumswahrscheinlichkeit entspricht.

Die klinischen Daten und die Messergebnisse wurden mit einem Mittelwert \pm der Standardabweichung (SA) angegeben.

5 Ergebnisse

5.1 Demographische und klinische Daten

Im Rahmen der klinischen Diagnostik erfolgten bei jedem Patienten zahlreiche Untersuchungen. Für die Versuchsauswertung wurden Alter und Geschlecht der Probanden sowie deren gemessenen parodontalen Taschentiefen und BOP-Werte herangezogen.

Die Analyse der klinischen Daten ergab, dass die Patienten mit chronischer bzw. aggressiver Parodontitis deutlich höhere Werte an ermittelten Taschentiefen als die gesunden Kontrollpersonen aufwiesen. Die ermittelten BOP-Werte lagen ebenfalls signifikant ($p < 0,05$) über denen der Kontrollgruppe. Zwischen den chronischen und aggressiven Parodontitiden bestanden bezüglich der klinischen Merkmale keine signifikanten Unterschiede. Auch die Geschlechterverteilung innerhalb der Gruppen wurde ausgeglichen gewählt. Lediglich bei den Probanden mit chronischer Parodontitis waren die männlichen Teilnehmer mit einem Verhältnis von 7:5 stärker vertreten. Das Durchschnittsalter der Probanden mit chronischer Parodontitis lag mit $52 \pm 9,4$ Jahren sowohl über dem der Kontrollen ($38,1 \pm 10,7$ Jahre) als auch über dem der aggressiven Parodontitiden ($35,5 \pm 6,9$ Jahre) (Tabelle 1).

Tabelle 1: Demographische und klinische Daten der in die Studie eingeschlossenen Probanden

	Kontrollen n=12	chronische Parodontitis n=12	aggressive Parodontitis n=6
Alter (Mittelwert \pm SA) (Jahre)	38,1 \pm 10,7	52,3 \pm 9,4*#	35,5 \pm 6,9
Geschlecht (M:W)	6:6	7:5	3:3
Taschentiefe (Mittelwert \pm SA) (mm)	1,58 \pm 0,30	5,31 \pm 0,76*	5,67 \pm 0,59*
BOP (Mittelwert \pm SA) (%)	6,98 \pm 8,78	80,76 \pm 22,28*	79,84 \pm 19,76*

* Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ($p < 0.05$)

Signifikanter Unterschied zur aggressiven Parodontitis ($p < 0.05$)

5.2 Ergebnisse der Aktivität der neutrophilen Elastase

Nachfolgend sind die Ergebnisse zur Aktivitätsbestimmung der neutrophilen Elastase dargestellt. Um möglichst aussagekräftige Ergebnisse zu liefern, wurden die photometrischen Messungen sowohl am Anfang als auch nach 30 Minuten Inkubationszeit durchgeführt. Die Bestimmung der Differenz zwischen dem gemessenen Ausgangswert und dem Endwert nach 30 min diente zur Ermittlung der HNE-Aktivität.

5.2.1 Aktivität der neutrophilen Elastase ohne bakterielle Stimulation

Ohne eine bakterielle Stimulation konnte bei den erkrankten Untersuchungsgruppen im Gegensatz zur gesunden Kontrollgruppe eine deutlich gesteigerte HNE-Aktivität im Überstand der Granulozyten festgestellt werden. Hierbei kam es zwischen der nachgewiesenen HNE bei aggressiver Parodontitis und der Kontrollgruppe zu einem signifikanten Unterschied ($p < 0,5$) von bis zu 96,23% ($t_{60\text{min}}$).

Bei aggressiver Parodontitis lagen ohne bakteriellen Einfluss grundsätzlich die höchsten HNE-Aktivitäten vor. Der Maximalwert der ermittelten Gesamtmenge von HNE wurde dabei zum Zeitpunkt $t_{0\text{min}}$ erreicht.

Bei der chronischen Parodontitis konnte während des gesamten Versuchszeitraumes ein stetiger Abfall der HNE-Aktivität nachgewiesen werden. Lag anfänglich zum Zeitpunkt $t_{0\text{min}}$ lediglich eine Differenz von 20,3% zur aggressiven Parodontitis vor, so nahm die HNE-Aktivität bei der chronischen Parodontitis im Gegensatz zur aggressiven Parodontitis zum Zeitpunkt $t_{120\text{min}}$ bis zu 94% ab (Abb. 4).

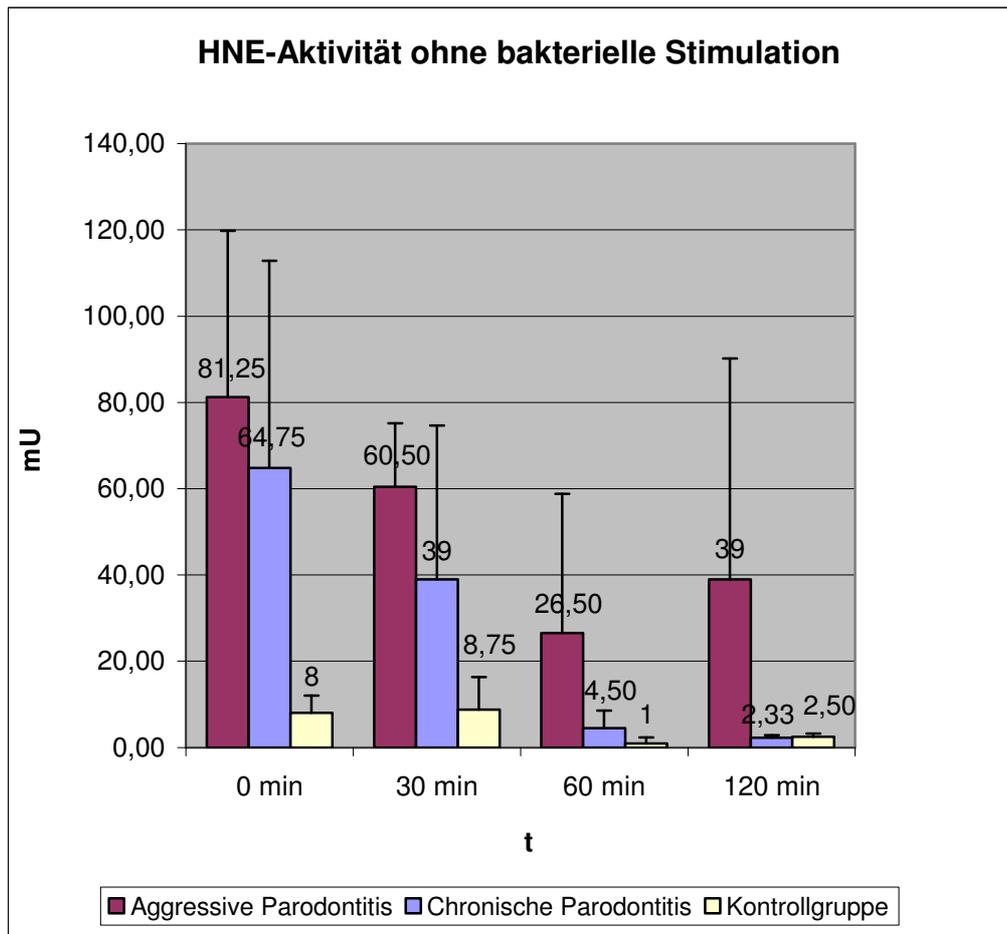


Abbildung 4: HNE-Aktivität der neutrophilen Granulozyten ohne bakterielle Stimulation bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe zu den verschiedenen Zeitpunkten

5.2.2 Aktivität der neutrophilen Elastase nach Stimulation mit *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

Die aggressiven Parodontitiden wiesen auch unter bakterieller Stimulation im Vergleich zu den chronischen Parodontitiden und Kontrollpersonen höhere HNE-Aktivitäten auf. Die HNE-Werte waren dabei generell niedriger als ohne bakteriellen Stimulus.

Während bei den chronischen Parodontitiden über den gesamten Versuchszeitraum ein kontinuierlicher Abfall von freigesetzter HNE zu verzeichnen war (bei Zeitpunkt $t_{120\text{min}}$ größter Unterschied von 84,5% zwischen aggressiver und

chronischer Parodontitis), lag bei den aggressiven Parodontitiden unter Einfluss von *P. gingivalis* ATCC 33277 zum Zeitpunkt $t_{60\text{min}}$ ein niedrigerer Wert als zu den beiden anderen Zeitpunkten vor. Dies spiegelte sich durch eine beim Zeitpunkt $t_{60\text{min}}$ um 63,2% niedrigere HNE-Aktivität der aggressiven Parodontitis als beim Zeitpunkt $t_{30\text{min}}$ wider.

Stets durch eine deutlich unter den Werten der aggressiven Parodontitis liegende HNE-Aktivität gekennzeichnet, lagen die HNE-Werte der gesunden Kontrollgruppe zu den Zeitpunkten $t_{60\text{min}}$ sowie $t_{120\text{min}}$ signifikant über denen der chronischen Parodontitis ($p < 0,05$). Während nach 30 min die HNE-Freisetzung bei den Kontrollen am geringsten war, konnte nach 60 min der höchste Wert nachgewiesen werden (Abb. 5).

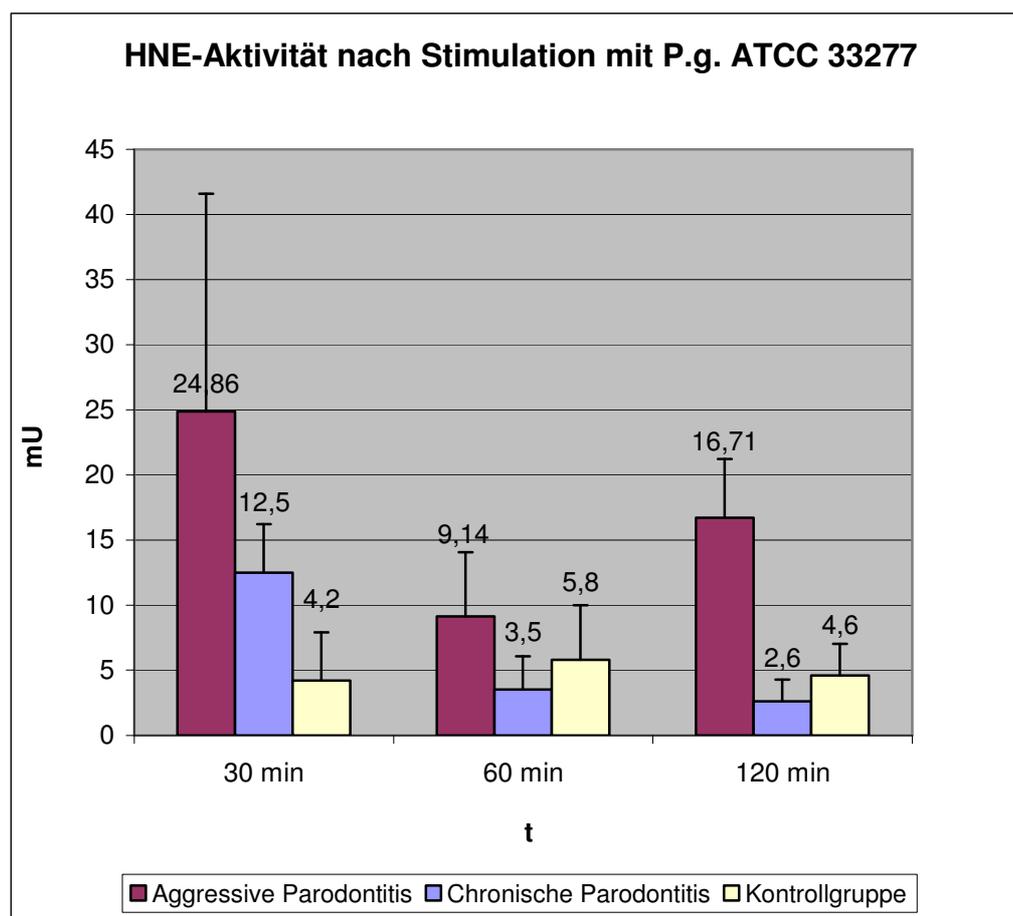


Abbildung 5: HNE-Aktivität der neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe zu den verschiedenen Zeitpunkten

5.2.3 Aktivität der neutrophilen Elastase nach Stimulation mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4

Im Gegensatz zum Einfluss von *P. gingivalis* ATCC 33277 auf die Parodontitispatienten, kam es nach der Stimulation von *A. actinomycetemcomitans* Y4 zu deutlich niedrigeren HNE-Aktivitäten. Lediglich bei der Kontrollgruppe konnte ein leichter Anstieg der Enzymaktivität nachgewiesen werden. Die HNE-Freisetzung der Kontrollen lag dabei über der der Parodontitiden.

Auch unter der verminderten Stimulation von *A. actinomycetemcomitans* Y4 war bei der chronischen Parodontitis über den gesamten Versuchszeitraum ein kontinuierlicher Abfall der HNE-Werte zu beobachten. Diese lagen dabei signifikant unter denen der aggressiven Parodontitis, was nach 120 min mit einem Unterschied von 59,9% zur aggressiven Parodontitis am deutlichsten zum Ausdruck kam ($p < 0,05$). Die Differenz bezüglich der nachgewiesenen Enzymaktivität zwischen chronischer Parodontitis und Kontrollgruppe lag zu diesem Zeitpunkt bei 88,3%.

Die HNE-Aktivität bei der aggressiven Parodontitis wies beim Zeitpunkt $t_{60\text{min}}$ wiederholt den niedrigsten Wert auf, während nach 30 min die höchste Aktivität festgestellt werden konnte (Abb. 6).

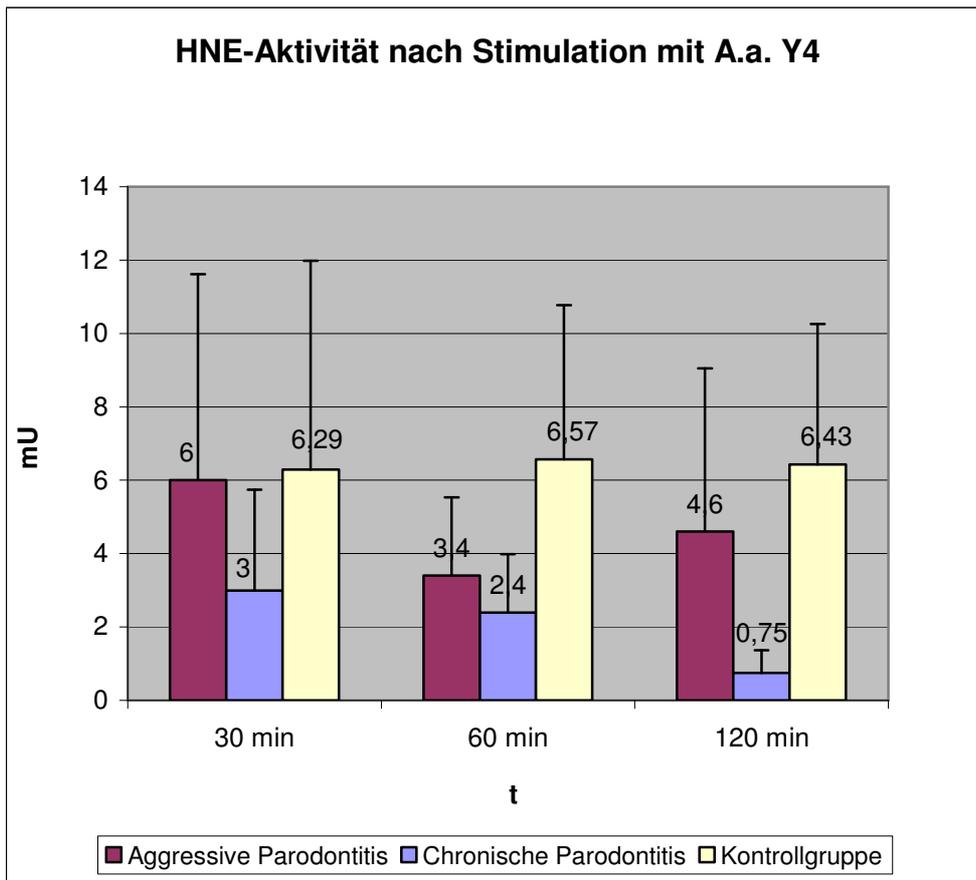


Abbildung 6: HNE-Aktivität der neutrophilen Granulozyten nach Stimulation durch *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe zu den verschiedenen Zeitpunkten

5.2.4 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse zur Aktivität der neutrophilen Elastase

Unabhängig von der Art der Stimulation wurde bei Patienten mit aggressiver Parodontitis am meisten HNE ausgeschüttet. Weiterhin lagen bei allen Untersuchungsgruppen ohne bakteriellen Reiz die höchsten Elastasewerte vor. Am deutlichsten stellte sich dies bei den Patienten mit aggressiver Parodontitis dar. Signifikant niedriger fielen die HNE-Werte der Personen mit chronischer Parodontitis und bei den Kontrollpersonen aus ($p < 0,05$) (Abb. 7).

Bei den Patienten mit chronischer Parodontitis wurde ein stetiger Abfall der HNE-Aktivität festgestellt. Auch in Abwesenheit bakterieller Reize nahm die Enzymaktivität kontinuierlich ab.

Unter den Personen mit aggressiver Parodontitis kam es nach bakterieller Stimulation mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 zum Zeitpunkt $t_{60\text{min}}$ ebenfalls zu geringeren Elastaseaktivitäten im Vergleich zu den Anfangswerten beim Zeitpunkt $t_{30\text{min}}$ (bakterielle Stimulation) und Zeitpunkt $t_{0\text{min}}$ (ohne bakterielle Stimulation). Nach 60 min war grundsätzlich die niedrigste HNE-Aktivität zu verzeichnen (Abb. 18 im Anhang).

Die gemessenen Elastasewerte der gesunden Kontrollpersonen unterschieden sich in Anwesenheit von *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 nicht wesentlich voneinander. Zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten konnten keine signifikanten Abweichungen festgestellt werden ($p < 0,05$). Lediglich ohne einen bakteriellen Einfluss wiesen die Kontrollen zu den Zeitpunkten $t_{60\text{min}}$ und $t_{120\text{min}}$ niedrigere HNE- Aktivitäten auf (Abb. 19 im Anhang).

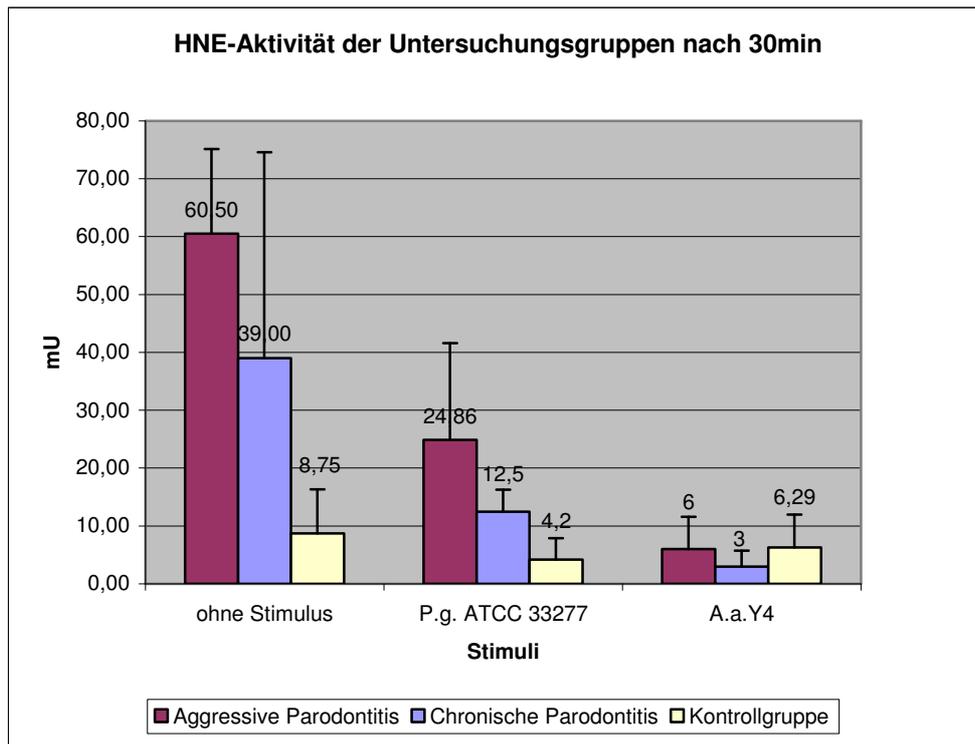


Abbildung 7: HNE-Aktivität der neutrophilen Granulozyten ohne bakterielle Stimulation und nach Einfluss durch *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 sowie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe nach einem Zeitraum von 30 Minuten

5.3 Ergebnisse des oxidative burst der neutrophilen Granulozyten

Nachfolgend sind die Ergebnisse zur Radikalsynthese von polymorphkernigen Granulozyten aufgeführt. Zur genauen Betrachtung des oxidative burst wurden sowohl die gesamte ROS-Produktion (intra- sowie extrazellulär auftretende Radikale) als auch die rein extrazellulären Radikalmengen untersucht.

5.3.1 Gesamte ROS-Produktion der neutrophilen Granulozyten

Gesamte ROS-Produktion der neutrophilen Granulozyten ohne bakterielle Stimulation

Die gemessene Gesamtmenge der durch die neutrophilen Granulozyten produzierten Radikale über einen Zeitraum von 120 min lag bei den parodontal erkrankten Personen ohne eine bakterielle Stimulation deutlich über den Werten der gesunden Kontrollgruppe (Abb. 8).

Die höchste Anzahl von ROS konnte bei den aggressiven Parodontitiden ermittelt werden, diese war um 9,74% signifikant gegenüber der ROS-Produktion der chronischen Parodontitiden erhöht ($p < 0,05$).

Eine deutliche Differenz von 86,5% bezüglich des oxidative burst bestand zwischen aggressiver Parodontitis und der Kontrollgruppe ($p < 0,05$).

Zwischen der chronischen Parodontitis und der Kontrollgruppe wurde ein Unterschied von 76,76% verzeichnet ($p < 0,05$).

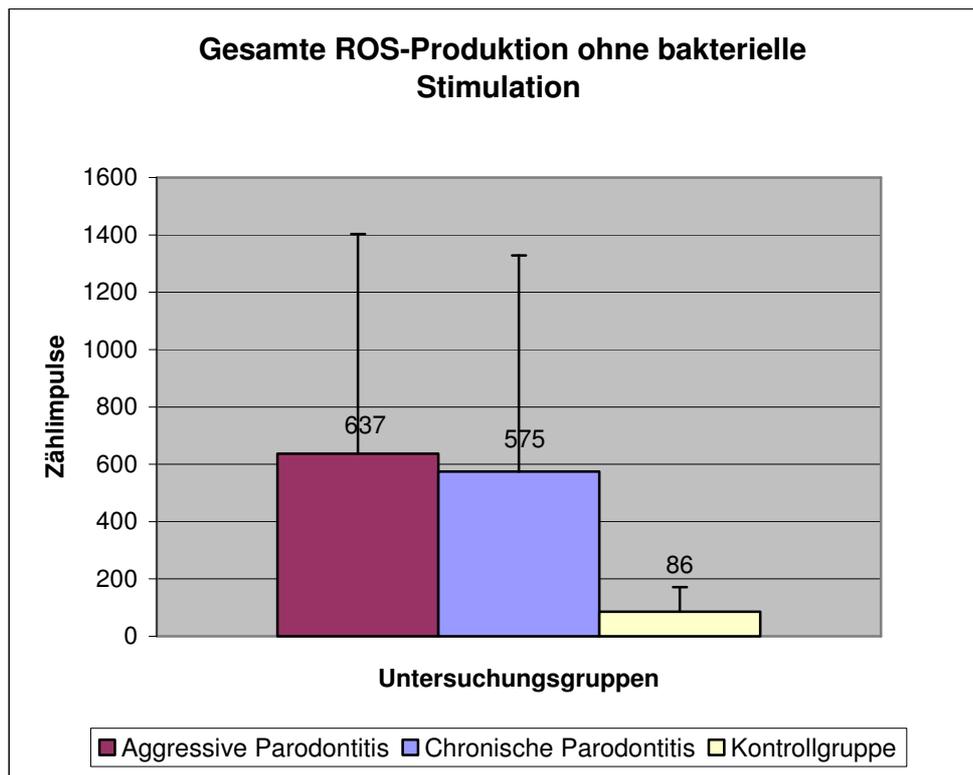


Abbildung 8: Gesamte ROS-Produktion der neutrophilen Granulozyten ohne bakterielle Stimulation bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe

Gesamte ROS-Produktion der neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit PMA

Unter der Einwirkung von PMA konnten intra- sowie extrazellulär bei den neutrophilen Granulozyten deutlich gesteigerte Radikalmengen nachgewiesen werden (Abb. 9).

Das Resultat der gemessenen Gesamtmenge von ROS unter Stimulation von PMA über 120 min spiegelte sich in einem signifikant höheren oxidative burst bei den Kontrollpersonen im Gegensatz zu den Parodontitisformen wider (jeweils $p < 0,05$).

Die aggressive Parodontitis wies dabei mit einer Differenz von 19,63% zur chronischen Parodontitis und 37,6% zur Kontrollgruppe den niedrigsten Wert auf.

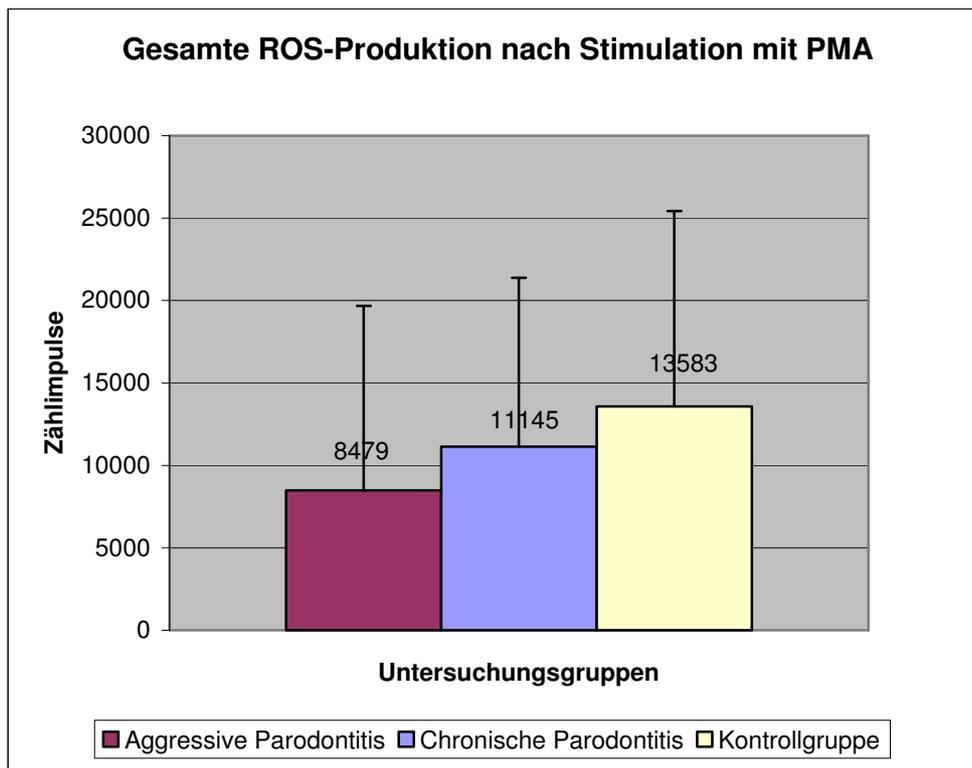


Abbildung 9: Gesamte ROS-Produktion der neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit PMA bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe

Gesamte ROS-Produktion der neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

Unter der Stimulation von *P. gingivalis* ATCC 33277 kam es bei der chronischen Parodontitis, im Vergleich zur aggressiven Parodontitis, zu einer um 47,4% signifikant höheren Radikalproduktion ($p < 0,05$) (Abb. 10).

Auch der oxidative burst der Kontrollgruppe lag mit 38,4% über dem der aggressiven Parodontitis, wodurch die aggressive Parodontitis unter dem Einfluss von *P. gingivalis* ATCC 33277 die niedrigste Radikalsynthese aufwies.

Bei der chronischen Parodontitis konnten die höchsten ROS-Werte ermittelt werden.

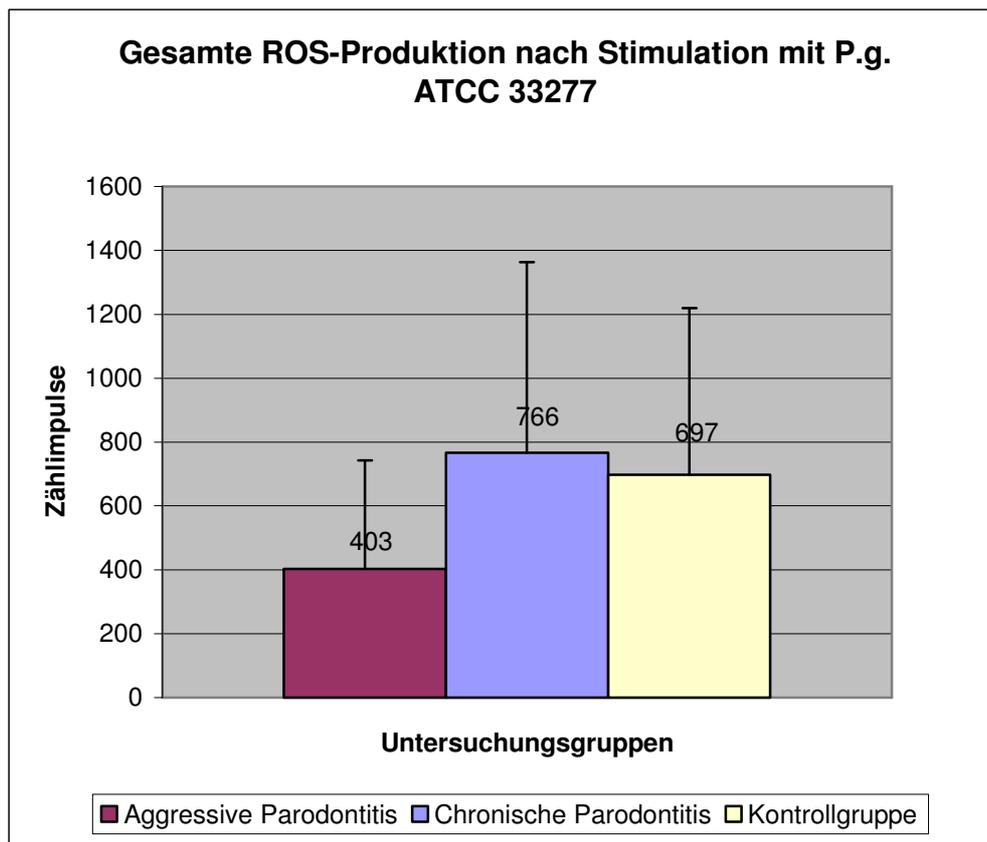


Abbildung 10: Gesamte ROS-Produktion der neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe

Gesamte ROS-Produktion der neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit Aggregatibacter actinomycetemcomitans Y4

Aus den Untersuchungen zur Stimulation durch *A. actinomycetemcomitans* Y4 ging hervor, dass es auch unter diesem bakteriellen Stimulus bei der chronischen Parodontitis und bei der gesunden Kontrollgruppe zur gesteigerten ROS-Entstehung kam (Abb. 11).

Die Werte der ROS lagen dabei signifikant ($p < 0,05$) über den Werten, welche während der Stimulation durch *P. gingivalis* ATCC 33277 ermittelt wurden.

So lag die gesamte ROS-Produktion der chronischen Parodontitis unter der Stimulation von *A. actinomycetemcomitans* Y4 68,53% über dem Wert, der unter dem Einfluss mit *P. gingivalis* ATCC 33277 ermittelt wurde.

Auch die Kontrollen wiesen einen um 41,46% und die aggressiven Parodontitiden einen um 28% gesteigerten oxidative burst auf.

Wiederum kam es bei der chronischen Parodontitis zur höchsten ROS-Produktion, währenddessen bei den aggressiven Parodontitiden ein um 60% niedrigerer Wert vorlag.

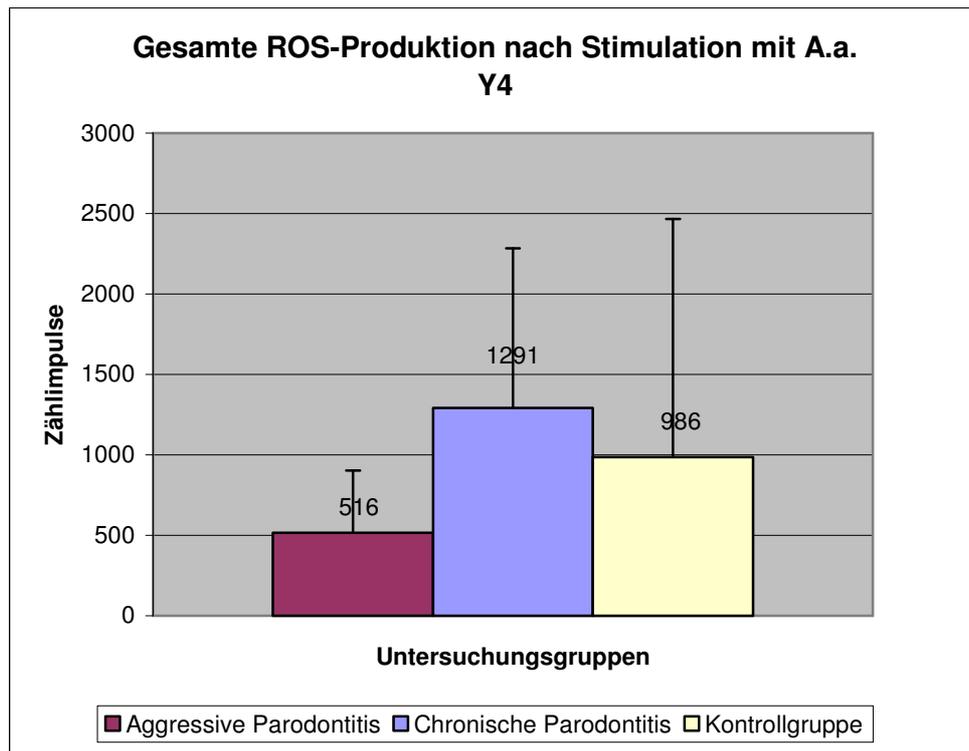


Abbildung 11: Gesamte ROS-Produktion der neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe

Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse zur gesamten ROS-Produktion

Vergleicht man die gesamte ROS-Produktion der einzelnen Untersuchungsgruppen bezüglich der unterschiedlichen bakteriellen Stimuli untereinander, so wird deutlich, dass bei der aggressiven Parodontitis die höchsten ROS-Werte ohne bakteriellen Einfluss vorlagen. Im Vergleich hierzu kam es unter Einwirkung von *A. actinomycetemcomitans* Y4 zu einer um 19% und unter Stimulation von *P. gingivalis* ATCC 33277 zu einer um 36,73% niedrigeren ROS-Produktion (Abb. 12).

Im Gegenzug konnte auf die neutrophilen Granulozyten der Patienten mit chronischer Parodontitis der stärkste Reiz durch *A. actinomycetemcomitans* Y4 ausgeübt werden. Dies spiegelt sich durch eine um 40,67% niedrigere intra- und extrazelluläre ROS-Menge nach Präsenz von *P. gingivalis* ATCC 33277 wider. Ohne bakterielle Stimulation war der oxidative burst der PMNs der chronischen Parodontitis am geringsten (55,46% unter dem Maximalwert von *A. actinomycetemcomitans* Y4).

Bei der Kontrollgruppe konnte eine ähnliche Entwicklung der Radikalsynthese und Ausschüttung dieser wie bei der chronischen Parodontitis beobachtet werden. Auch hier wurde durch *A. actinomycetemcomitans* Y4 der stärkste oxidative burst hervorgerufen, wobei unter *P. gingivalis* ATCC 33277 ein um 29,3% und ohne bakterielle Stimulation ein über 91,28% niedrigerer ROS-Wert vorlag. Die nachgewiesenen Radikalmengen bei den gesunden Kontrollen lagen generell unter denen der Untersuchungsgruppe mit chronischer Parodontitis.

A. actinomycetemcomitans Y4 rief von den bakteriellen Stimuli (ausgenommen Positivkontrolle mit PMA) den sowohl bei der chronischen als auch bei der gesunden Kontrollgruppe höchsten oxidativen burst hervor. Bei der chronischen Parodontitis konnte hierbei der Maximalwert festgestellt werden.

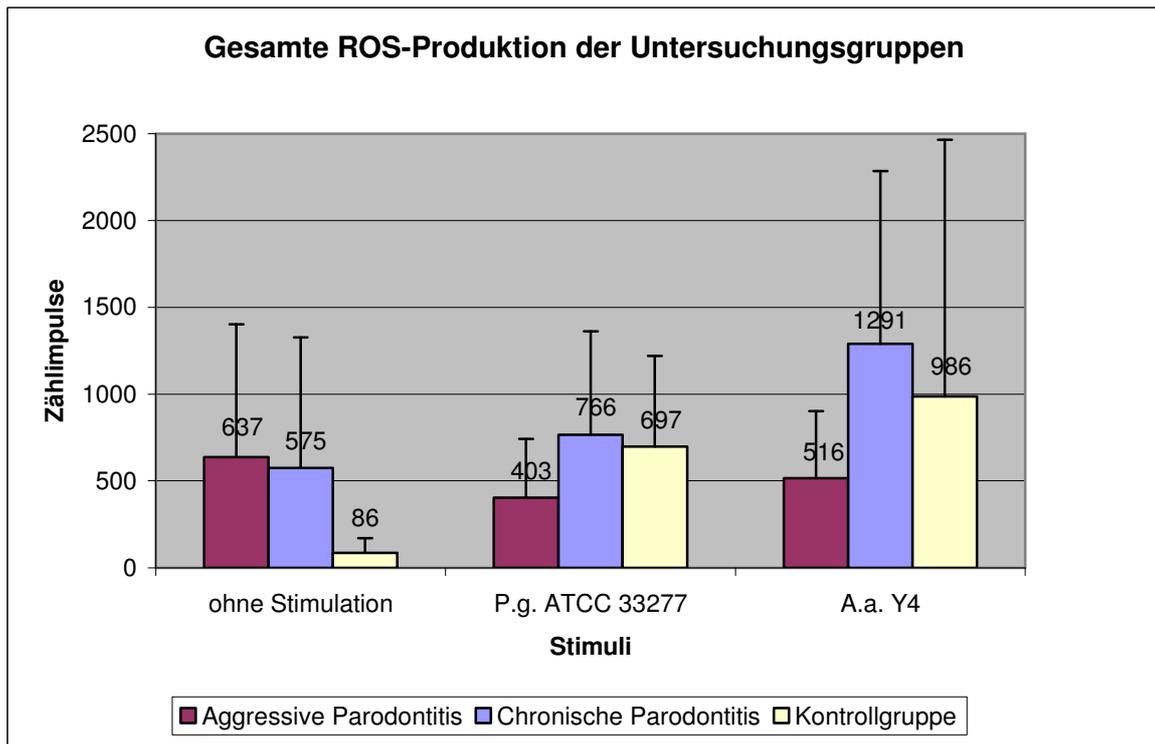


Abbildung 12: Gesamte ROS-Produktion der neutrophilen Granulozyten ohne bakterielle Stimulation und nach Einfluss durch *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 sowie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe

5.3.2 Extrazelluläre ROS-Freisetzung der neutrophilen Granulozyten

Extrazelluläre ROS-Freisetzung der neutrophilen Granulozyten ohne bakterielle Stimulation

Die extrazelluläre ROS-Ausschüttung der neutrophilen Granulozyten war bei der Untersuchungsreihe ohne bakterielle Stimulation durch generell höhere Werte bei den Parodontitiden gegenüber denen der Kontrollgruppe gekennzeichnet (Abb. 13).

Die aggressive Parodontitis wies dabei die signifikant höchste ROS-Freisetzung auf, währenddessen sie bei der chronischen Parodontitis um 16,7% niedriger gemessen wurde ($p < 0,05$).

Die Differenz zwischen dem höchsten Wert extrazellulär nachweisbarer Radikale bei der aggressiven Parodontitis im Vergleich zur Kontrollgruppe, die den niedrigsten Wert aufwies, betrug 42,7%.

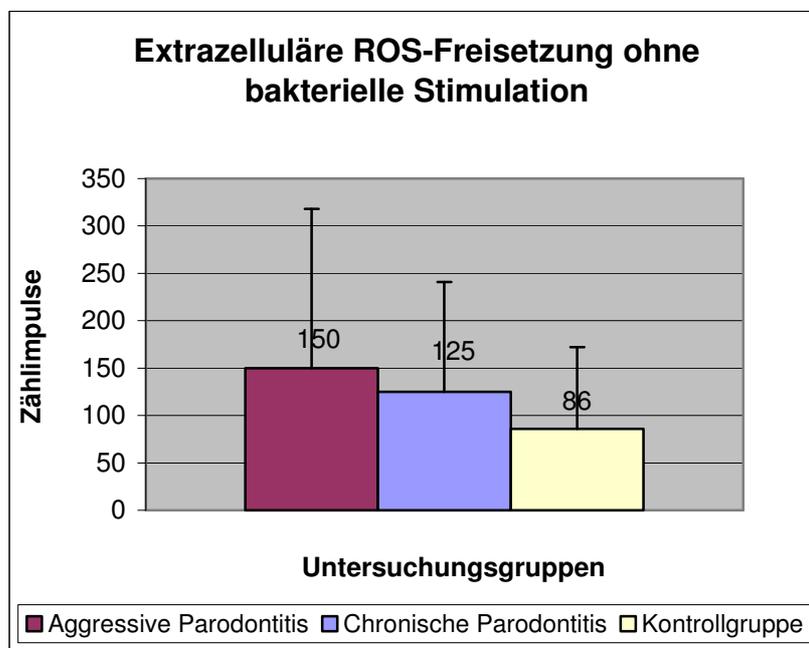


Abbildung 13: Extrazelluläre ROS-Freisetzung der neutrophilen Granulozyten ohne bakterielle Stimulation bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe

Extrazelluläre ROS-Freisetzung der neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit PMA

Grundsätzlich wurde durch die Zugabe von PMA eine Steigerung der Radikalausschüttung bewirkt, was sich in den deutlich höheren Messwerten ausdrückte (Abb. 14).

Durch Stimulation mit PMA zeigte sich bei der gesunden Kontrollgruppe eine höhere ROS-Freisetzung als bei den Parodontitiden. Die aggressive Parodontitis wies dabei mit einem signifikanten Unterschied von 12% zur chronischen Parodontitis den niedrigsten Wert der extrazellulären Radikalausschüttung auf ($p < 0,05$).

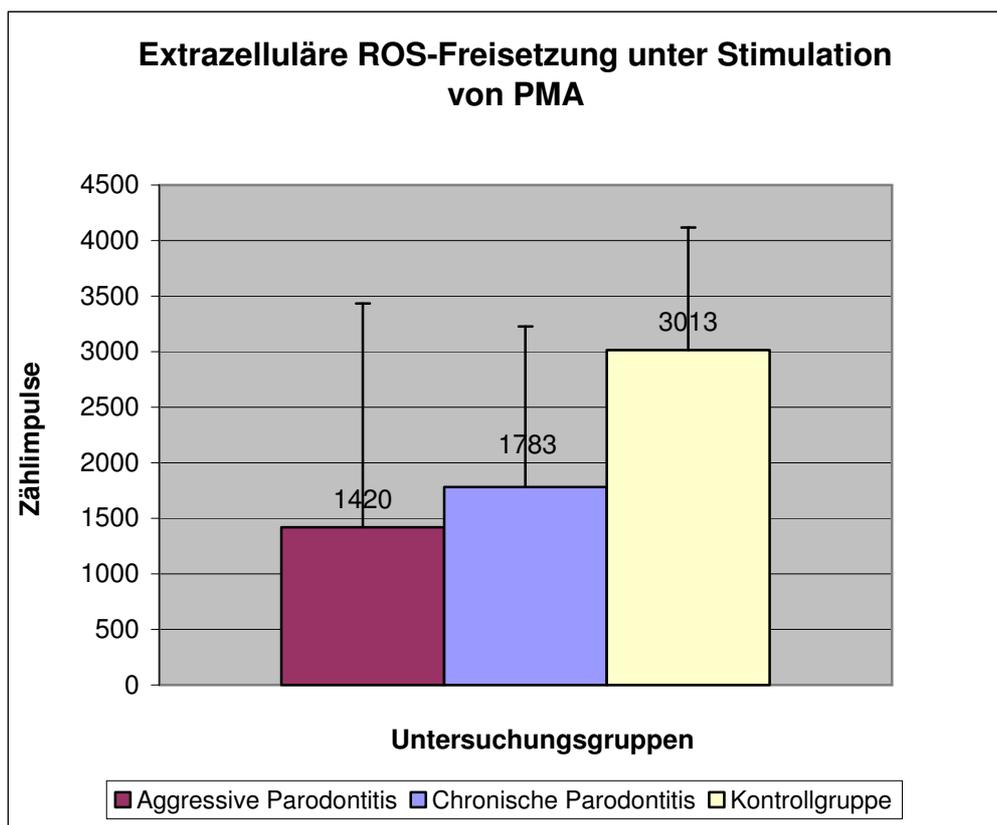


Abbildung 14: Extrazelluläre ROS-Freisetzung der neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit PMA bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe

Extrazelluläre ROS-Freisetzung der neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit *Porphyromonas gingivalis*

Unter Stimulation von *P. gingivalis* ATCC 33277 kam es bei den chronischen Parodontitiden und der Kontrollgruppe zur deutlichen Steigerung der extrazellulären ROS-Freisetzung ($p < 0,05$). Die chronischen Parodontitiden wiesen dabei den höchsten ermittelten Wert auf (Abb. 15).

Bei den aggressiven Parodontitiden kam es unter bakterieller Stimulation zu einem Abfall der ROS-Ausschüttung. Die Differenz zur chronischen Parodontitis betrug 48%. Auch verglichen mit der Kontrollgruppe lag die extrazelluläre ROS-Freisetzung der aggressiven Parodontitis 31,18% unter der der Kontrollen.

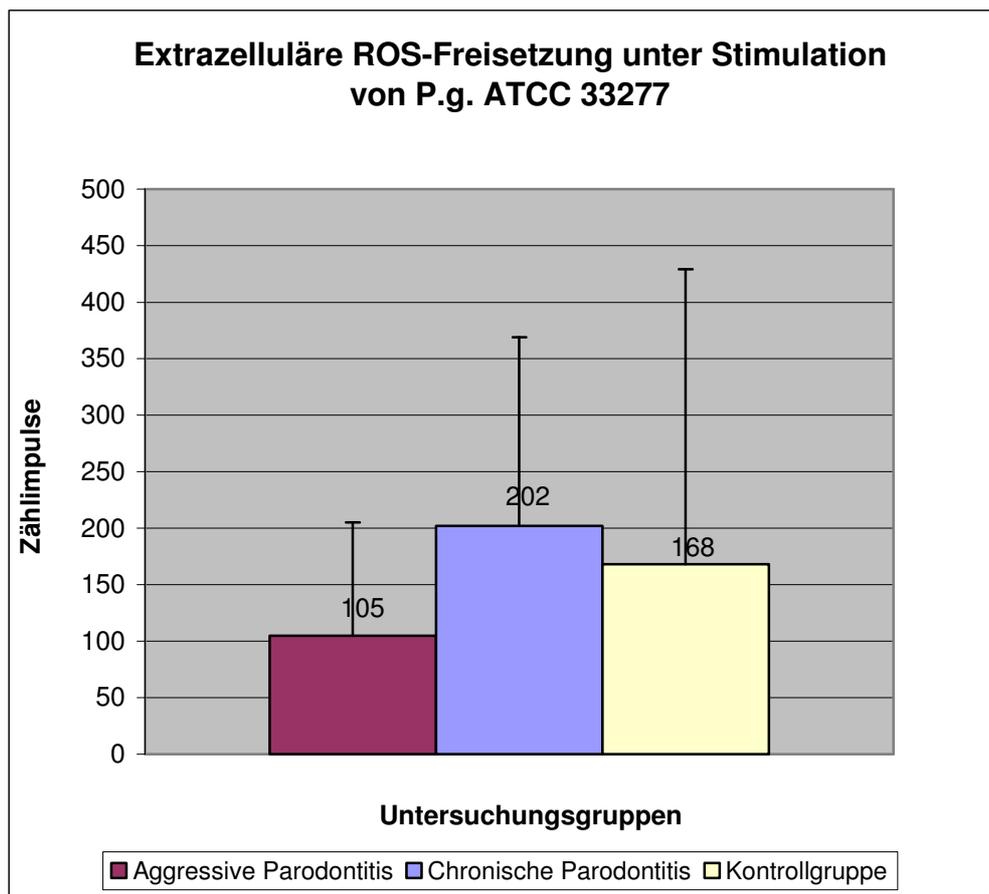


Abbildung 15: Extrazelluläre ROS-Freisetzung der neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe

Extrazelluläre ROS-Freisetzung der neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Die höchste extrazelluläre ROS-Freisetzung unter Stimulation von *A. actinomycetemcomitans* Y4 konnte bei der chronischen Parodontitis nachgewiesen werden (Abb. 16).

Bei den aggressiven Parodontitiden und der Kontrollgruppe lagen nach Einfluss von *A. actinomycetemcomitans* Y4 keine signifikanten Unterschiede bezüglich der extrazellulären ROS-Freisetzung unter Stimulation mit *P. gingivalis* ATCC 33277 vor ($p < 0,05$).

Die extrazelluläre Radikalfreisetzung der chronischen Parodontitiden wies gegenüber den aggressiven Parodontitiden einen um 69,7% gesteigerten Wert auf. Auch nach Stimulation durch *A. actinomycetemcomitans* Y4 wurde bei der aggressiven Parodontitis, im Vergleich zur chronischen Parodontitis sowie der gesunden Kontrollgruppe, der niedrigste extrazelluläre ROS-Wert ermittelt.

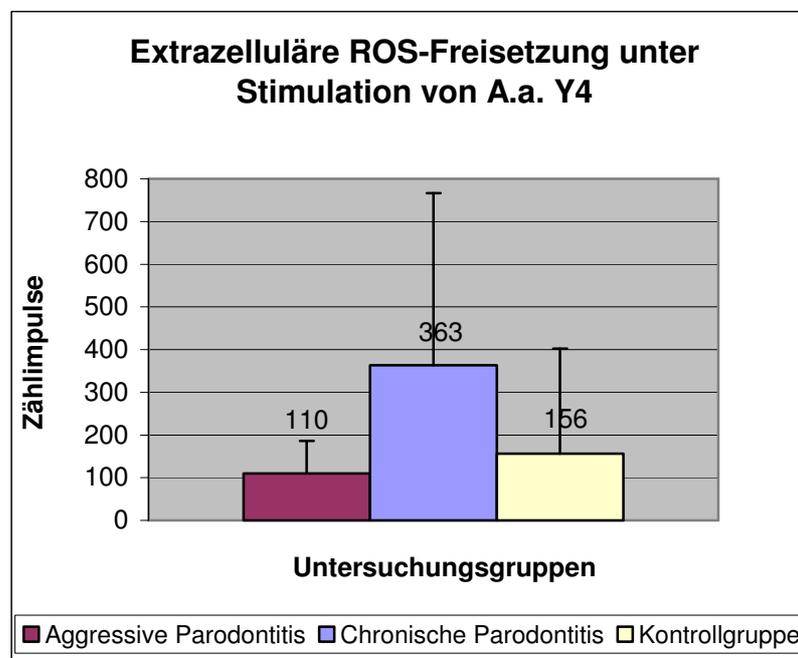


Abbildung 16: Extrazelluläre ROS-Freisetzung der neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe

Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse zur extrazellulären ROS-Freisetzung

Vergleicht man die extrazelluläre ROS-Freisetzung der Untersuchungsgruppen bezüglich der verschiedenen bakteriellen Reize, so zeigt sich eine verhältnismäßig gleiche Verteilung der ermittelten ROS-Werte (Abb. 12, Abb. 17). Die nachgewiesenen Radikalmengen liegen dabei logischerweise deutlich unter denen der gesamten ROS-Produktion, da lediglich die extrazellulären Radikale detektiert wurden.

So setzten auch hier die PMNs der aggressiven Parodontitis ohne eine bakterielle Reizung am meisten ROS frei, währenddessen unter Einwirkung von *P. gingivalis* ATCC 33277 sowie *A. actinomycetemcomitans* Y4 niedrigere Werte ermittelt wurden (um 30% bzw. 26,67%) (Abb. 17).

Ebenfalls konnte bei den chronischen Parodontitiden unter Stimulation von *A. actinomycetemcomitans* Y4 ein Maximalwert der extrazellulären ROS-Freisetzung, gefolgt von einem um 44,4% niedrigeren Wert nach Einfluss von *P. gingivalis* ATCC 33277, festgestellt werden.

Lediglich die PMNs der gesunden Kontrollen entwickelten unter Stimulation von *P. gingivalis* ATCC 33277 ihren stärksten oxidativen burst. Dieser lag ohne deutlichen Unterschied um lediglich 7,14% über dem Wert nach Präsenz von *A. actinomycetemcomitans* Y4.

Die neutrophilen Granulozyten der Kontrollen als auch der chronischen Parodontitis wiesen ohne jegliche bakterielle Stimulation niedrigere extrazelluläre Radikalmengen verglichen mit der aggressiven Parodontitis auf.

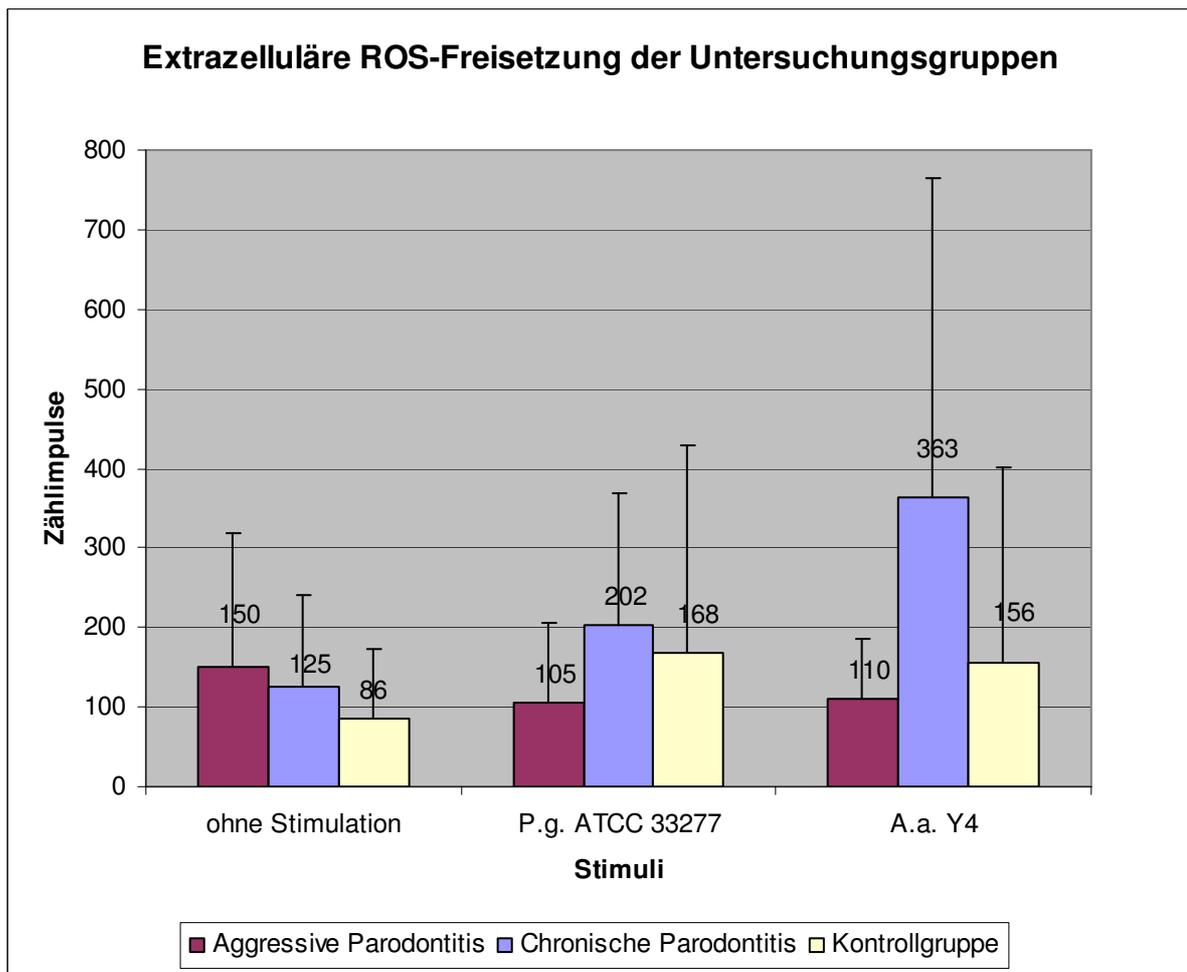


Abbildung 17: Extrazelluläre ROS-Freisetzung der neutrophilen Granulozyten ohne bakterielle Stimulation und nach Einfluss durch *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 sowie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe

6 Diskussion

Chronische sowie aggressive Parodontitiden sind durch eine komplexe Interaktion zwischen parodontopathogenen Mikroorganismen und der immunologischen Wirtsabwehr im Parodontium charakterisiert (Kohal und Dennison 2000). Zwar stellen *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* parodontopathogene Bakterien dar und werden als Hauptauslöser parodontaler Erkrankungen angesehen (Genco et al. 1996), jedoch sind die Keime nicht allein, sondern vielmehr die wirtseigene Immunantwort für die Destruktion des parodontalen Gewebes verantwortlich (Offenbacher 1996).

In dieser In-vitro-Studie wurde die Synthese und Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies, die im Rahmen der Phagozytose von *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* innerhalb der PMNs entstehen, untersucht. Weiterhin stand die Bestimmung der Aktivität der neutrophilen Elastase im Vordergrund. Hier sollte ermittelt werden, inwiefern die neutrophilen Granulozyten enzymatisch auf die verschiedenen bakteriellen Reize reagieren.

Es existieren bereits einige Studien zur bakteriell stimulierten neutrophilen Radikalfreisetzung und Elastaseaktivierung durch parodontopathogene Bakterien (Giannopoulou et al. 1994, Katsuragi et al. 2003, Matthews et al. 2007). Diese beiden speziellen immunologischen Funktionsmechanismen wurden jedoch zuvor noch nicht bei Personen mit chronischer und aggressiver Parodontitis gleichzeitig untersucht.

6.1 Methodik

Das für die Studie notwendige Serum wurde von Patienten mit zuvor diagnostizierter chronischer sowie aggressiver Parodontitis gewonnen. Die Blutentnahme erfolgte im Rahmen der parodontalchirurgischen Behandlung vor Therapiebeginn, woraufhin sich die umgehende Verarbeitung der Proben anschloss. Um die immunologische Grundaktivität der PMNs von chronischer und

aggressiver Parodontitis beurteilen zu können, wurde eine gesunde Versuchsgruppe in den Versuchsaufbau mit eingebunden. Damit konnten sämtliche Untersuchungsergebnisse einem relativierenden Vergleich unterzogen werden.

Da die Ausprägung von Virulenzfaktoren bei den verschiedenen Bakterienstämmen einer Spezies häufig variieren und dies Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse haben kann (Sandros et al. 2000, Eick et al. 2002, Eick und Pfister 2004), wurden einheitliche Referenzstämme verwendet. Es kamen *P. gingivalis* ATCC 33277 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 zum Einsatz. Diese mit der Pathogenese der Parodontitiden eng verbundenen Mikroorganismen wurden bereits zuvor in zahlreichen Studien eingesetzt (Wang et al. 1999, Chang et al. 2002, Nassar et al. 2002, Eick et al. 2002, Eick und Pfister 2004). In dem Zusammenhang muss aber darauf hingewiesen werden, dass Studien mit einzelnen Stämmen einer Bakterienspezies nur begrenzt auf die In-vivo-Bedingungen übertragbar sind, da im menschlichen Parodontium verschiedene Bakterienstämme vorkommen.

Um eine detaillierte Aussage über die Entstehung und Freisetzung von Radikalen treffen zu können, wurden die PMNs der Untersuchungsgruppen einer Chemolumineszenz mit Luminol sowie Isoluminol unterzogen. So konnte kontrolliert werden, in welchen Mengen die in den Phagozyten gebildeten Radikale in das umliegende Gewebe gelangen. Eine Differenzierung zwischen aktiv ausgeschütteten und passiv durch Apoptose der neutrophilen Granulozyten in den Extrazellulärraum gelangten Radikalverbindungen ist dadurch nicht möglich. Dieser Aspekt spielt jedoch eine untergeordnete Rolle, da bei den reaktiven Sauerstoffspezies, genauso wie bei der neutrophilen Elastase, die reine Präsenz im parodontalen Gewebe entscheidend ist.

6.2 Aktivität der neutrophilen Elastase

Als Serinprotease verfügt die humane neutrophile Elastase über die Fähigkeit, viele verschiedene Proteine abzubauen. Dies ist ausschlaggebend für ihre physiologische Funktion bei der Abwehr eingedrungener Fremdorganismen. Zu den potentiellen Substraten von HNE zählen neben den Proteinen eingedrungener Bakterien fast alle Komponenten der extrazellulären Matrix und verschiedenste lösliche Proteine wie Blutgerinnungsfaktoren, Komplement, Immunglobuline und Zytokine (Lee et al. 2000). Daraus ist zu schlussfolgern, dass aufgrund der katabolischen Eigenschaften der Elastase auch körpereigene Strukturen angegriffen sowie zerstört werden können. Auch ein Eingriff seitens der HNE in die modulatorischen Regulierungsmechanismen der Immunabwehr ist dadurch gegeben.

Analysiert man unsere Ergebnisse bezüglich der Reaktionen der neutrophilen Granulozyten auf die verschiedenen bakteriellen Stimuli, wird ersichtlich, dass unter dem Einfluss von *P. gingivalis* mehr HNE ausgeschüttet wird als unter Stimulation von *A. actinomycetemcomitans*.

Ein bei der aggressiven Parodontitis unter Stimulation von *A. actinomycetemcomitans*, der als entscheidender Leitkeim der aggressiven Parodontitis angesehen wird (Schacher 2007), vermuteter erhöhter Elastasewert konnte damit im direkten Vergleich zur chronischen Parodontitis nicht nachgewiesen werden. *A. actinomycetemcomitans* scheint also weniger Einfluss auf die Freisetzung von Elastase aus den neutrophilen Granula zu haben. Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass die Bildung von Elastase bei der Phagozytose von *A. actinomycetemcomitans* eine untergeordnete Rolle spielt und dessen Abtötung eher auf oxidativen Abwehrvorgängen beruht.

Demgegenüber stimulierte *P. gingivalis* in unseren Untersuchungen im Vergleich zu *A. actinomycetemcomitans* teilweise eine 3 bis 4fach höhere Enzymaktivität. Die Ausschüttung von HNE durch die neutrophilen Granulozyten scheint deshalb

bei der phagozytären Bekämpfung von *P. gingivalis* einen wichtigen Stellenwert einzunehmen.

Betrachtet man in unserer Studie die Elastasefreisetzung der verschiedenen Untersuchungsgruppen, konnte bei den erkrankten Personen grundsätzlich eine gesteigerte HNE-Aktivität, in Verbindung mit der immunologischen Aktivierung der PMNs und der damit verbundenen Ausschüttung von HNE in den Extrazellularraum, beobachtet werden. Hierin ist eine Bestätigung der vermuteten, sehr spezifischen antibakteriellen Abwehrleistung der Elastase gegenüber gramnegativen Mikroorganismen zu sehen. In-vitro-Untersuchungen zum Mechanismus der bakteriziden Wirkung der Elastase zeigten, dass HNE nur gegen gramnegative Bakterien einen ausreichenden Schutz bietet. Grampositive Bakterien wurden nicht abgetötet (Siedle 2003). Es wird davon ausgegangen, dass die neutrophile Elastase als Substrat ein Protein der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien (OmpA = outer membrane protein A) bevorzugt. Experimente mit Elastase-Knock-out-Mäusen bestätigen diese Vermutung, da diese, ohne eine extreme Immunschwäche sowie Infektanfälligkeit aufweisend, eine Infektion mit gramnegativen Bakterien nicht lange überlebten (Siedle 2003).

Die in einer bereits zuvor durchgeführten Studie nachgewiesene erhöhte Elastaseaktivität bei Patienten mit chronischer und aggressiver Parodontitis gegenüber gesunden Probanden (Giannopoulou et al. 1994) kann durch unsere Ergebnisse bestätigt werden. Bei der differenzierten Betrachtung unserer Studie kam jedoch ein deutlicher Unterschied bezüglich der Untersuchungsgruppen zum Vorschein.

Bemerkenswert erschien, dass bei Probanden mit aggressiver Parodontitis eine generell höhere Enzymaktivität im Vergleich zu Personen mit chronischer Parodontitis vorlag. Dies konnte sowohl ohne als auch mit bakteriellem Stimulus beobachtet werden. In Abwesenheit bakterieller Stimuli sind bei der aggressiven Parodontitis sogar deren höchsten Werte ermittelt worden. Diese am deutlichsten ausgeprägte Hyperreaktivität bei den PMNs der aggressiven Parodontitis lag sowohl bei unseren Ergebnissen zur Elastase als auch beim oxidativen Burst vor.

Da auch die gemessenen intra- sowie extrazellulären ROS bei der aggressiven Parodontitis ohne bakteriellen Einfluss einen Spitzenwert erreichen, lässt sich schlussfolgern, dass sich die PMNs bei Menschen mit aggressiver Parodontitis ohne weitere Reize in einem besonders angeregten Zustand befinden. Sie setzen daraufhin mehr Elastase sowie ROS als bei Personen mit chronischer Parodontitis bzw. Gesunden frei, was letztendlich zu einer stärkeren Gewebeschädigung führt. In diesem Zusammenhang ist anzunehmen, dass bei den neutrophilen Granulozyten der Patienten mit aggressiver Parodontitis höchstwahrscheinlich genetische Ursachen eine Rolle spielen (Nicu et al. 2007).

Die vermutete erhöhte HNE-Aktivität bei der chronischen Parodontitis unter Einwirkung von *P. gingivalis*, welcher als bedeutendster Keim bei der Pathogenese der chronisch verlaufenden Parodontitis gilt (Lopez-Boado 2004), wurde jedoch bestätigt.

Bemerkenswert war aber, dass auch bei den neutrophilen Granulozyten der chronischen Parodontitis, ohne jeglichen bakteriellen Reiz, höhere HNE-Werte als bei bakterieller Stimulation vorlagen. Das bedeutet, dass nicht nur bei der aggressiven Parodontitis, sondern auch bei der chronischen Parodontitis die PMNs bereits ohne jeglichen Stimulus hyperreaktiv sind. Aufgrund dieser Erkenntnis und dem Fakt, dass in einem gesunden menschlichen Organismus täglich schätzungsweise 300 bis 500 mg Elastase umgesetzt wird (Travis und Fritz 1991) und dieser Wert bei einer entzündlichen Erkrankung auf das mehr als 10fache ansteigen kann, wird ersichtlich, dass von den zahlreichen proinflammatorischen Wirkungen der HNE eine beachtliche parodontopathogene Potenz ausgeht.

Elastase verfügt über die entzündungsbeeinflussende Eigenschaft, die Migration der PMNs zu verstärken. Ein Zusammenhang ist hierbei in der Sekretion bestimmter Zytokine zu sehen. Lee et al. wiesen darauf hin, dass die HNE auf Epithelzellen stimulierend einwirken kann und damit die Freisetzung von IL-6, IL-8 sowie GM-CSF bewirkt. Auch die Fähigkeit zur Abspaltung des körpereigenen

Proteaseinhibitors (α 1-Antitrypsin) führt über die Fragmententstehung zur Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten (Lee et al. 2000). Andere Untersuchungen zeigen, dass HNE im Zusammenspiel mit verschiedenen Matrix-Metallproteinasen wie z. B. MMP-9 die Wanderung der PMNs durch die Basalmembran erleichtern kann (Moraes et al. 2003).

Weiterhin ist die Elastase befähigt, Bestandteile der Basalmembran und Proteoglykane in der Glykokalix abzubauen. Das Endothel von Kapillaren kann dadurch geschädigt werden und als Folge des Flüssigkeitsaustritts ins Gewebe kommt es zur Entstehung von Ödemen (Moraes et al. 2003). Dies korreliert mit dem klinischen Erscheinungsbild fortgeschrittener chronischer sowie aggressiver Parodontitiden, bei denen teilweise starke Schwellungszustände vorliegen. Die in unserer Studie nachgewiesene erhöhte Elastaseaktivität bei Patienten mit aggressiver Parodontitis kann somit im direkten Zusammenhang mit den klinischen Entzündungszeichen gesehen werden.

Aktiv als auch passiv sezernierte Elastase wird jedoch nicht nur im parodontalen Gewebe, sondern im gesamten menschlichen Organismus mit einigen pathologischen Prozessen von chronisch-entzündlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Zu den Krankheiten zählen rheumatoide Arthritis, Lungenfibrose, ARDS (adult respiratory distress syndrome) und die cystische Fibrose. Dies zeigt, welchen wichtigen Stellenwert die HNE in der Pathogenese chronisch-entzündlicher Krankheitsbilder einnimmt.

Auch eine direkte Beeinflussung bei der Diapedese der neutrophilen Granulozyten wird diskutiert. So wird der Durchtritt durch die Basalmembran mit Hilfe von proteolytischen Enzymen, wie Elastase oder Kollagenasen begünstigt. Bis auf die Tatsache, dass HNE die Permeabilität der Endothelien erhöht (Lee et al. 2000, Moraes et al. 2003) und somit die Diapedese der PMNs indirekt fördern kann, ist nichts Weiteres bekannt. Welche Rolle der Elastase bei der Wanderung der Neutrophilen zukommt, muss deshalb noch im Detail geklärt werden und benötigt weitere Untersuchungen.

Gesichert ist jedoch, dass die HNE neben der Entfaltung ihrer proinflammatorischen Wirkungen auch bei der antiinflammatorischen Rückkopplung eine entscheidende Rolle spielt. Diese Hemmung der Immunzellantwort durch die Elastase ist dann nötig, wenn HNE aufgrund einer aktiven Exozytose oder bei „frustrierter Phagozytose“ (Partikel sind für Phagozyten zur Invagination zu groß) in den Extrazellularraum gelangt. Um die eigenen destruktiven proinflammatorischen Wirkungen einzudämmen, werden seitens der HNE antiinflammatorische Signale eingeleitet. Die Funktionsweise der antiinflammatorischen Rückkopplung besteht darin, dass zahlreiche Zytokine wie z. B. IL-1 β , IL-2, IL-6 oder TNF- α sowie die Komplementfaktoren als Substrate der HNE einzuordnen sind. Durch die Spaltung der Zytokine kommt es zur verminderten Rekrutierung von Immunzellen. Die Destruktion der Komplementfaktoren bewirkt hingegen eine Verminderung der Opsonierung, woraufhin weniger neutrophile Granulozyten aktiviert werden können (Doering 1994). Lee und Downey konnten 2000 nachweisen, dass durch die peptidischen Zytokin-Spaltprodukte die Funktion von T-Zellen beeinträchtigt wird (Lee et al. 2000).

Auch wenn viele Eigenschaften der Elastase im Körper sehr nützlich sind, kommt es im Verlauf von Entzündungsprozessen immer wieder zu einem destruktiven, durch die körpereigenen immunologischen Abwehrreaktionen verursachten Gewebeabbau. Auch bei unseren Patienten konnte teilweise ein starker parodontaler Attachmentverlust nachgewiesen werden. Trotz zahlreicher Mechanismen zur Gegenregulierung der durch die Elastase mitverursachten inflammatorischen Vorgänge, scheinen der Immunabwehr die entsprechenden Mittel zur Eindämmung dieser zu fehlen.

Die Synthese mehrerer Elastaseinhibitoren zeigt ebenfalls nur eingeschränkte Wirkung. Kennzeichnend für diese Inhibitoren ist ein Methioninrest, der eine Bindung zur HNE eingeht. Der Versuch des Körpers, sich durch die Inaktivierung des Enzyms vor dessen schädlichen Wirkungen zu schützen, unterliegt dem Nachteil, dass dieser Methioninrest sehr oxidationsempfindlich ist (Siedle 2003).

Einige Studien wiesen nach, dass die Inhibitorreste besonders gegenüber den von neutrophilen Granulozyten gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies anfällig sind. Durch die ROS- bedingte Oxidation unterliegen die Methioninreste einer Inaktivierung, so dass keine stabilen Enzym-Inhibitor-Komplexe mehr gebildet werden können (Theron und Anderson 1985, Travis und Fritz 1991, Ohbayashi 2002).

Elastaseinhibitoren sind zusätzlich über die Aktivierung von MAP-Kinasen in der Lage die Fibroblastenproliferation und Kollagensynthese zu stimulieren und damit an Zellwachstum und Gewebereparatur beteiligt. Entscheidende regenerative Prozesse seitens der PMNs können damit durch die Freisetzung von oxidativen Substanzen gestört werden. Der parodontalen Regeneration wird deshalb durch die Radikalfreisetzung entgegengewirkt.

Eine in dieser Hinsicht interessante Beobachtung im Rahmen unserer Studie war der generell nachweisbare kontinuierliche Abfall der Elastaseaktivität bei Patienten mit chronischer Parodontitis.

Eine Ursache hierfür könnte in der antiinflammatorischen Rückkopplung der HNE gesehen werden. Es lässt den Schluss zu, dass die gegenregulatorischen Fähigkeiten bezüglich einer Abschwächung der destruktiven Abwehrvorgänge seitens der neutrophilen Elastase bessere Wirkung zeigen, als bei der aggressiven Parodontitis. Erklärbar wäre damit der langsamere Gewebeabbau bei der chronischen Parodontitis im Vergleich zur aggressiven Form. Auch die inhibitorische Deaktivierung der HNE durch die gegenüber Sauerstoffradikalen sehr empfindlichen Elastaseinhibitoren könnte bei der chronischen Parodontitis eine effektivere Rolle spielen. Der gedankliche Ansatzpunkt, dass dann eine niedrigere Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffsubstanzen bei den PMNs der chronischen Parodontitis vorherrscht, konnte in unserer Studie jedoch nicht bewiesen werden. Im Gegenteil, unter der Stimulation von *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* lagen die ROS-Werte bei den chronischen Parodontitiden sogar höher als bei den Vergleichsgruppen.

Weiterhin denkbar wäre, dass die Methionin-Inhibitoren bei Patienten mit chronischer Parodontitis weniger ROS anfällig sind, was wiederum auf genetische Ursachen hindeuten würde. Auch die umgekehrte Annahme, dass bei Personen mit aggressiver Parodontitis eine gesteigerte ROS-Anfälligkeit der Elastaseinhibitoren besteht, käme als Grund für deren progressive parodontale Destruktion in Frage. Obwohl bisher diesbezüglich keinerlei wissenschaftliche Beweise existieren und diese Aussagen lediglich Vermutungen darstellen, können sie weiteren Forschungsaktivitäten Ansatzpunkte bieten.

Wichtig ist jedoch herauszuheben, dass neben der HNE-Aktivität auch dem oxidative burst eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der chronischen und aggressiven Parodontitis beigemessen werden muss.

6.3 Oxidative burst der neutrophilen Granulozyten

Die Aktivierung neutrophiler Granulozyten geht mit einer gesteigerten Radikalfreisetzung, dem so genannten oxidative burst einher. Bereits zuvor wiesen Sheikhi et al. in ihrer In-vitro-Untersuchung mit Hilfe des Bakteriums *Fusobacterium nucleatum* nach, dass Bakterien die Fähigkeit besitzen, PMNs zur ROS-Produktion anzuregen (Sheikhi et al. 2001).

Vergleicht man die extrazelluläre Radikalfreisetzung mit der gesamten ROS-Produktion der neutrophilen Granulozyten, wird anhand unserer Studienergebnisse ersichtlich, dass deutlich weniger Radikale in den Extrazellulärraum gelangen als insgesamt gebildet werden. Als Grund dafür ist die primär intrazelluläre Abtötung der Bakterien durch die PMNs anzusehen. Die durch aktive Sezernierung oder durch zelluläre Apoptose bedingte Freisetzung von Radikalen aus den neutrophilen Granulozyten in den Extrazellulärraum besitzt dem gegenüber mengenmäßig einen untergeordneten Anteil. Dennoch stehen die sich rein außerhalb der PMNs befindlichen Radikale und die Gesamt-ROS-Produktion in einem logischen Verhältnis. Die extrazellulären Oxidantien machten

ca. ein Viertel der Gesamt-ROS-Menge aus. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass speziell die ins periphere Gewebe gelangten reaktiven Oxidantien für den Abbau des parodontalen Stützgewebes verantwortlich sind (Sheikhi et al. 2001, Katsuragi et al. 2003, Tsai et al. 2005).

In diesem Zusammenhang ist in der Literatur schon vielfach untersucht und nachgewiesen worden, dass mit dem vermehrten Auftreten von reaktiven Stoffen im Bindegewebe eine Destruktion von Gewebekomponenten einhergeht. Sheikhi et al. wiesen 2001 in ihrer Studie darauf hin, dass der Prozess der Lipidperoxidation, welcher durch die freigesetzten Radikale beschleunigt wird, entscheidend zum Abbau von parodontalen Bindegewebsstrukturen beiträgt (Sheikhi et al. 2001). Unter Lipidperoxidation versteht man den oxidativen Abbau von Lipiden, welche durch ein Abspalten der Elektronen von Lipiden aus Zellmembranen durch freie Radikale verursacht wird. Dies führt zu einer Kettenreaktion, die letztendlich in einer Zellschädigung endet. Besonders ungesättigte Fettsäuren sind davon aufgrund ihrer zahlreichen Doppelbindungen, zwischen denen sich besonders reaktive Methylengruppen befinden, betroffen [7]. Auch Tsai et al. schätzten in ihrer wissenschaftlichen Untersuchung 2005 die durch ROS stimulierte Lipidperoxidation als eine wichtige Voraussetzung in Bezug auf die Destruktion parodontaler Gewebe während der Progression der chronischen Parodontitis ein (Tsai et al. 2005). Die extrazellulär auftretenden Radikale spielen aus diesem Grund bei der Pathogenese der Parodontitiden eine entscheidende Rolle (Meisel und Kocher 2004).

Die intra- sowie extrazelluläre Freisetzung von Sauerstoffradikalen während der Phagozytose von *P. gingivalis* und von *A. actinomycetemcomitans* wurde bereits zuvor von Katsuragi et al. in ihrer In-vitro-Studie untersucht (Katsuragi et al. 2003). Das Resultat dieser Arbeit stellte die höhere Radikalentstehung nach phagozytärer Abtötung von *A. actinomycetemcomitans* im Vergleich zur Bildung von Radikalen nach der Phagozytose von *P. gingivalis* dar. Dies konnte auch im Rahmen unserer Untersuchungen in Bezug auf die PMNs von Patienten mit chronischer Parodontitis bestätigt werden. An dieser Stelle sollte jedoch erwähnt werden, dass es Hinweise darauf gibt, dass einzelne Bakterienspezies

unterschiedliche Fähigkeiten besitzen, eine mit Luminol verstärkte Chemolumineszenz auszulösen (Holm und Kalfas 1993).

In unserer Studie konnten im Rahmen der bakteriellen Stimulation bei den neutrophilen Granulozyten der chronischen und aggressiven Parodontitis gesteigerte extrazelluläre ROS-Werte nachgewiesen werden. Hier kam besonders die Potenz von *A. actinomycetemcomitans* bezüglich der Entwicklung eines oxidativen Bursts zum Ausdruck. Sowohl bei den PMNs der erkrankten Personen als auch bei der gesunden Kontrollgruppe wurden in Anwesenheit von *A. actinomycetemcomitans* am meisten reaktive Sauerstoffspezies ausgeschüttet.

Durch die Möglichkeit von *A. actinomycetemcomitans*, gegen Granulozyten mit Hilfe von aus Vesikeln ausgeschüttetem Leukotoxin vorzugehen, damit in die PMNs einzudringen und dort über die Caspaseaktivierung deren zelluläre Apoptose zu induzieren, verfügt *A. actinomycetemcomitans* über die Fähigkeit, sich teilweise der phagozytären Elimination zu entziehen (Permpanich et al. 2006). Dadurch kann er sich im parodontalen Gewebe besser etablieren und für einen längeren Zeitraum persistieren.

Eine aufgrund der phagozytosehemmenden Eigenschaft von *A. actinomycetemcomitans* angenommene, niedrigere Phagozytoserate der PMNs und die daraus resultierende niedrigere Radikalentstehung, konnte unsererseits sowohl bei der aggressiven als auch bei der chronischen Parodontitis nicht nachgewiesen werden. Vielmehr reagierten die neutrophilen Granulozyten nach Exposition gegenüber *A. actinomycetemcomitans* mit der bereits erwähnten Steigerung der Radikalsynthese.

Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass aus der längeren Penetrationsmöglichkeit von *A. actinomycetemcomitans*, intra- und extrazellulär der PMNs, ein vermehrter Ausstoß von bakteriellen Stoffwechselprodukten resultiert. Da diese bakteriellen Substanzen stimulierend auf die Radikalsynthese innerhalb der PMNs wirken, wird die Freisetzung oxidativer Stoffe aus den PMNs gefördert. Ein weiterer Grund für die erhöhte Radikalfreisetzung während der Phagozytose von *A.*

actinomycetemcomitans könnte sein, dass dessen zelluläre Abtötung vornehmlich über die Bildung von oxidativen Substanzen realisiert wird.

Die ROS-Werte nach Phagozytose von *P. gingivalis* lagen im Vergleich stets unter denen von *A. actinomycetemcomitans*. Bei allen Untersuchungsgruppen, besonders unter den chronischen Parodontitispatienten, traten niedrigere intra- sowie extrazelluläre Radikalmengen auf. Die Empfänglichkeit der PMNs bezüglich der Entwicklung eines oxidativen Bursts gegenüber *A. actinomycetemcomitans* war bei dieser Gruppe im Vergleich zu *P. gingivalis* um fast das Doppelte erhöht. In diesem Zusammenhang lässt sich vermuten, dass das Killing von *P. gingivalis* im Gegensatz zum Killing von *A. actinomycetemcomitans* auf eher nichtoxidativen Prozessen basiert.

Auch bei den parodontal gesunden Kontrollpersonen konnte die parodontopathogene Potenz, über die *A. actinomycetemcomitans* sowie *P. gingivalis* verfügen, bestätigt werden (Taubmann et al. 1992, Sanderink et al. 2004). Unter dem bakteriellen Einfluss kam es zu einer deutlichen Anregung der gesamten ROS-Produktion, was bei den PMNs der gesunden Probanden zu einer Steigerung der Radikalfreisetzung um das achtfache (Stimulation durch *P. gingivalis*) bzw. elffache (Stimulation durch *A. actinomycetemcomitans*) führte.

Ein weiteres Anliegen unserer Untersuchungen war zu analysieren, wie die ROS-Produktion bei der aggressiven Parodontitis unter dem Einfluss von *A. actinomycetemcomitans*, welcher als entscheidender Erreger der aggressiven Parodontitis postuliert wird (Schacher et al. 2007), ausfällt. Die vermutete gesteigerte Radikalsynthese konnte in dieser Studie zwar nachgewiesen werden, jedoch fiel sie niedriger als angenommen aus, zumal auch bei der chronischen Parodontitis sowie bei der Kontrollgruppe nach Exposition von *A. actinomycetemcomitans* höhere Radikalmengen vorlagen. Eine auf den bakteriellen Reiz von *P. gingivalis* im Vergleich zu *A. actinomycetemcomitans* erhöhte Reaktionsbereitschaft der PMNs der chronischen Parodontitis konnte in diesem Zusammenhang nicht ermittelt werden.

Weiterhin wurde in unserer Studie nachgewiesen, dass in Abwesenheit von bakteriellen Reizen bei den erkrankten Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen eine deutlich gesteigerte ROS-Produktion vorlag. Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen von Matthews et al. aus dem Jahr 2007 überein. Resultat einer dieser Arbeiten war, dass in Abwesenheit jeglicher bakterieller Reize die PMNs von Patienten mit chronischer Parodontitis in Bezug auf die extrazelluläre Freigabe von ROS hyperreaktiv sind (Matthews et al. 2007a). Weiterhin wiesen Matthews et al. nach, dass unter gleichen Grundvoraussetzungen auch nach erfolgter Parodontitistherapie eine Hyperreaktivität von neutrophilen Granulozyten bei der chronischen Parodontitis existiert (Matthews et al. 2007b). Die Vermutung, dass eine nicht exogen stimulierte Hyperreaktivität von PMNs vorliegen kann, wird damit zunehmend gestärkt (Matthews et al. 2007).

Besonders unsere Ergebnisse bezüglich der neutrophilen Granulozyten von Patienten mit aggressiver Parodontitis, die ohne einen äußeren, bakteriell herbeigeführten Reiz ihren generell stärksten oxidativen Burst entwickeln, korrelieren mit dieser Annahme. Zusätzlich wird diese Vermutung durch die in unserer Studie ermittelte rein extrazelluläre Radikalausschüttung bekräftigt. Auch hier wurde deutlich, dass die PMNs bei chronischer und aggressiver Parodontitis ohne äußere Reize bereits hyperreaktiv waren. Es wurden deutlich mehr reaktive Sauerstoffspezies in den Extrazellulärraum abgegeben als bei der gesunden Kontrollgruppe.

In diesem Zusammenhang wird die Möglichkeit der genetischen Determinierung diskutiert, welche die Ursache und einen entscheidenden Risikofaktor für eine gesteigerte Zerstörung parodontaler Strukturen bei Patienten mit progressiv verlaufenden Parodontalerkrankungen darstellen könnte (Nicu et al. 2007). Aufgrund dieser Annahme hat die Suche nach den Zusammenhängen zwischen den genetischen Faktoren und dem parodontologischen Erkrankungsrisiko deutlich zugenommen. Untersuchungen bezüglich der Erbanlagen von parodontal erkrankten Personen ergaben, dass das Geschlecht sowie die ethnische Herkunft die Anfälligkeit für die Erkrankung beeinflussen und sich vermutlich auch auf die

Mikroflora auswirken können (Marsh und Martin 2003). So wurde bereits in Studien über Zwillinge nachgewiesen, dass Zwillingsgeschwister, eine sich weitaus mehr ähnelnde subgingivale Mikroflora im Gegensatz zu der von nicht miteinander verwandten Kindern gleichen Alters besaßen. Auch die Mikroflora von eineiigen Zwillingen war identischer verglichen mit zweieiigen Zwillingen, was auf einen möglichen genetischen Kontrollmechanismus hindeutet (Marsh und Martin 2003). Weiterhin stellte sich heraus, dass bestimmte Stämme von *A. actinomycetemcomitans*, die ausschließlich von aus dem Nordwesten Afrikas stammenden Probanden isoliert wurden, ein bestimmtes Leukotoxin in großen Mengen bildeten (Poulsen et al. 2003, Haubek et al. 2007). Bei Patienten mit chronischer Parodontitis konnte bei Kaukasiern vermehrt *Fusobacterium nucleatum* nachgewiesen werden, während *P. gingivalis* und *Peptostreptococcus anaerobius* gehäuft bei der schwarzen Populationsgruppe auftraten. Eine mögliche Ursache hierfür könnten Unterschiede in der lokalen Immunabwehr sein.

Während im Rahmen unserer Studie besonders bei den Patienten mit aggressiver als auch mit chronischer Parodontitis eine deutlich gesteigerte ROS-Synthese festgestellt werden konnte, war bei der Kontrollgruppe ohne bakteriellen Stimulus keine vermehrte ROS-Produktion zu verzeichnen. In dieser Hinsicht ist anzunehmen, dass die PMNs von gesunden Personen über keine genetisch bedingte Hyperreaktivität verfügen.

Vergleicht man unsere Ergebnisse der Untersuchungsgruppen bezüglich der Entwicklung eines oxidativen Bursts, so münden diese in der Erkenntnis, dass die neutrophilen Granulozyten von Patienten mit chronischer Parodontitis gegenüber bakteriellen Einflüssen eine stärker ausgeprägte Reaktivität besitzen. Bei den chronischen Parodontitiden konnten in dieser Hinsicht im Vergleich zu den aggressiven Parodontitiden, nach Einwirkung von *A. actinomycetemcomitans* als auch unter Einfluss von *P. gingivalis*, höhere intra- sowie extrazelluläre Radikalmengen festgestellt werden. Die Entstehung von Radikalen scheint damit bei der Entwicklung einer chronischen Parodontitis, besonders unter Einfluss von *A. actinomycetemcomitans*, einen wichtigen Stellenwert einzunehmen.

Die PMNs der aggressiven Parodontitis reagierten in unserer Studie auf die bakteriellen Reize mit einer niedrigen Radikalsynthese. Ihre Gesamt-ROS-Werte lagen dabei unter denen der Patienten mit chronischer Parodontitis und der gesunden Kontrollgruppe. Das lässt vermuten, dass die neutrophilen Granulozyten von Personen mit aggressiver Parodontitis über eine verminderte Fähigkeit verfügen, auf bakterielle Stimuli zu reagieren. Diese Ergebnisse stehen konträr zu den Daten, welche Shapira et al. veröffentlichten, da sie eine Hyperreaktivität von PMNs der generalisierten aggressiven Parodontitis nach Anregung mit opsonierten Bakterien feststellten (Shapira et al. 1991). In deren Studie wurden jedoch mit Histon opsonierte Streptokokken zur bakteriellen Stimulation verwendet und nicht, wie in unserer Studie, die speziellen parodontopathogenen Mikroorganismen eingesetzt. Diese unterschiedliche Methodik der Versuchsansätze könnte die Ursache für die differierenden Ergebnisse sein.

Eine ebenfalls niedrigere Stimulierbarkeit zur ROS-Produktion lag bei den PMNs der erkrankten Personen während der Interaktion mit PMA vor. Wieder zeigten dabei die neutrophilen Granulozyten der aggressiven Parodontitis die geringste Reaktionsbereitschaft, währenddessen es bei den gesunden Probanden zum deutlichsten Anstieg der Radikalsynthese kam. Hierbei muss bedacht werden, dass bei den PMNs der Parodontitiden eine Vorschädigung durch die vorausgegangenen immunologischen Interaktionen mit den pathogenen Mikroorganismen die Ursache sein kann. Aber auch auf die bereits angesprochene Möglichkeit der genetischen Determinierung, besonders bei der aggressiven Parodontitis, muss wiederum verwiesen werden.

In diesem Zusammenhang sind die an der Pathogenese von marginalen Parodontitiden beteiligten Mechanismen für die Wissenschaft äußerst interessant. Speziell an bestimmten chromosomalen Lokalisationen auftretende genetische Polymorphismen rücken dabei in den Vordergrund (Sanderink et al. 2004). Als genetischer Polymorphismus wird ein Basenaustausch an einer bestimmten DNA-Sequenz angesehen (Passarge 1994). Das bedeutet, dass Gene, die ein bestimmtes Molekül codieren, in verschiedenen Individuen mit unterschiedlichen Basen-/Aminosäuresequenzen vorkommen. Entscheidender Effekt eines IL-1-

Polymorphismus ist, dass die proinflammatorische Wirkung von Zytokinen verstärkt werden kann (Kornman et al. 1997, McDevitt et al. 2000).

Ausreichend belegt wurden zudem bisher Polymorphismen der Myeloperoxidase sowie der Fcy-Rezeptoren für IgG (Meisel und Kocher 2004). Dies ist besonders in Bezug auf die Synthese von freien Radikalen interessant, da durch die Myeloperoxidase neben der Hypochlorsäure auch reaktive Sauerstoffradikale und Wasserstoffradikale gebildet werden. Diese Verbindungen müssen in Hinsicht auf ihre Interaktion mit dem peripheren Gewebe als sehr aggressiv eingeschätzt werden.

Die überschießende Sezernierung von Mediatoren wie Prostaglandinen, Zytokinen und Matrix-Metallproteinase aus den Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sowie der vermehrte Ausstoß von reaktiven Sauerstoffverbindungen kann somit maßgeblich zur Verstärkung der klassischen Entzündungsreaktion beitragen. Diese immunologischen Abwehrvorgänge führen letztendlich in ihrer gesteigerten Form zur progressiven Destruktion von parodontalen Strukturen, was Stützgewebe- und Knochenabbau zur Folge hat (Bartold et al. 1984, VanDyke und Hoop 1990, Offenbacher 1996, Kohal and Dennison 2000).

7 Schlussfolgerungen

Neutrophile Granulozyten reagieren während der Phagozytose von *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 mit einer vermehrten Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffverbindungen sowie der Freisetzung von Elastase.

Auf den Reiz von *A. actinomycetemcomitans* Y4 werden durch die PMNs der an Parodontitis erkrankten Personen vermehrt Radikale gebildet. Die Aktivierung der neutrophilen Elastase spielt deshalb bei der Abtötung von *A. actinomycetemcomitans* Y4 eine untergeordnete Rolle. Unter Stimulation von *P. gingivalis* ATCC 33277 kommt es zur gesteigerten HNE-Aktivität. Hier rückt die Synthese reaktiver Sauerstoffspezies in den Hintergrund. Dies ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass die phagozytäre Abtötung der beiden Parodontalkeime auf unterschiedliche Art und Weise vonstatten geht. Das Killing von *P. gingivalis* ATCC 33277 beruht wahrscheinlich auf nichtoxidativen enzymatischen Mechanismen wie der Zerstörung durch die Elastase. *A. actinomycetemcomitans* Y4 unterliegt demgegenüber bei seiner Elimination mehr dem Einfluss reaktiver oxidativer Verbindungen.

Generell reagieren die PMNs der chronischen und aggressiven Parodontitis auf die mikrobiellen Reize mit einer Hyperreaktivität. Die spezifische Reaktion unterscheidet sich jedoch je nach Parodontitistyp. Während es bei den Neutrophilen der aggressiven Parodontitis zu einer gesteigerten HNE-Aktivität kommt, ist bei den PMNs der chronischen Parodontitis ein erhöhter Ausstoß von Radikalen zu beobachten. Entsprechend ihrer parodontopathogenen Potenz können die beiden Bakterienspezies die immunologischen Abwehrvorgänge entscheidend beeinflussen. So reagieren die PMNs der aggressiven Parodontitis unter Stimulation von *P. gingivalis* ATCC 33277 besonders stark mit einer Elastaseaktivierung. ROS treten hingegen vermehrt bei der chronischen Parodontitis nach Phagozytose von *A. actinomycetemcomitans* Y4 auf. Dadurch wird deutlich, wie spezifisch die neutrophilen Granulozyten mit den verschiedenen

Bakterien interagieren. Die unterschiedlichen Reaktionen der Neutrophilen von chronischer und aggressiver Parodontitis werden ebenfalls aufgezeigt.

Die PMNs von chronischer sowie aggressiver Parodontitis weisen auch ohne bakterielle Stimulation eine Hyperreaktivität auf. Besonders bei der aggressiven Parodontitis wird dies deutlich. Das lässt die Vermutung einer genetischen Ursache aufkommen, welche in weiteren Studien zu spezifizieren ist.

Die nachgewiesenen hohen Werte an Elastase und Oxidantien können in engem Zusammenhang mit den Gewebedestruktionen gesehen werden und sollten deshalb Anlass für die weitere Erforschung von parodontalen Abwehrvorgängen und deren Ursachen sein.

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abrahamson M, Kikstrom M, Potempa J, Renvert S, Hall A. 1997.
Modification of cystatin C activity by bacterial proteinases and neutrophil elastase in periodontitis.
Mol Pathol, 50: 291-297.
- Baehni P, Tsai CC, McArthur W, Hammond B, Shenker B, Taichman N. 1981.
Leukotoxic activity in different strains of the bacterium Actinobacillus actinomycetemcomitans isolated from juvenile periodontitis in man.
Arch Oral Biol, 26: 671-676.
- Bartold PM, Wiebkin OW, Thonard JC. 1984.
The effect of oxygen-derived free radicals on gingival proteoglycans and hyaluronic acid.
J Periodontal Res, 19: 390-400.
- Belaouaj A, Kim K, Shapiro S. 2000.
Degradation of outer membrane protease A in Escherichia coli killing by neutrophil elastase.
Science, 289: 1185-1188.
- Belaouaj A. 2002.
Neutrophil elastase-mediated killing of bacteria: lessons from targeted mutagenesis.
Microbes and Infection, 4: 1259-1264.
- Bode W, Meyer E, Powers JC. 1989.
Human Leukocyte and Porcine Pancreatic Elastase: X-ray Crystal Structures, Mechanism, Substrate Specificity and Mechanism- Based Inhibitors.
Biochemistry, 28: 1951-1963.
- Botran RF. 2000.
Advanced Methods in Cellular Immunology.
CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C.
- Brown EJ. 1991.
Complement receptors and phagocytosis.
Current Opinion in Immunology, 3: 76-82.
- Chang YC, Yang SF, Lai CC, Liu JY, Hsieh YS. 2002.
Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures.
J Periodont Res, 37: 196-203.

- Ciancio S. 2003.
Improving oral health: current considerations.
J Clin Periodontol, 30: 4-6.
- Dahlke I, Riedel S. 2000.
In Vitro- Untersuchungen zur Beeinflussung des Wachstums sowie der Adhärenz an und Internalisierung von Porphyromonas gingivalis in Epithelzellen durch weibliche Sexualhormone [Dissertation].
Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Diya Zhang, Lili Chen, Shenglai Li, Zhiyuan Gu, Jie Yan. 2008.
Lipopolysaccharide (LPS) of Porphyromonas gingivalis induces IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of Escherichia coli LPS.
Innate Immun, 14: 99-107.
- Doering G. 1994.
The role of neutrophil elastase in chronic inflammation.
American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine, 150: 117.
- Eick S, Rödel J, Einax JW, Pister W. 2002.
Interaction of Porphyromonas gingivalis with KB cells: comparison of different clinical isolates.
Oral Microbiol Immunol, 17: 201-208.
- Eick S, Pfister W. 2004.
Efficacy of antibiotics against periodontopathogenic bacteria within epithelial cells: an in vitro study.
J Periodontol, 75: 1327-1334.
- Faurschou M, Borregaard N. 2003.
Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation.
Microbes and Infections, 5: 1317-1327.
- Flores de Jacoby L. 1990.
Epidemiologie der Gingivitiden und Parodontitiden in der Bundesrepublik Deutschland.
1. Workshop Parodontalmikrobiologie, Berlin: Quintessenz Verlag GmbH, 13-23.
- Frederiksson MI, Gustafsson AK, Bergström KG, Asman BE. 2003.
Constitutionally Hyperreaktive Neutrophils in Periodontitis.
J Periodontol, Feb: 219-224.
- Fuhrmann F. 2006.
Nutzung kommerzieller mikrobiologischer und Interleukin-1-Polymorphismus-Tests für die Prävention und Therapiekontrolle der chronischen Parodontitis in einer zahnärztlichen Praxis [Dissertation].
Berlin: Humboldt-Universität.

- Fujishima S, Aikawa N. 1995.
Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation.
Intensive Care Med, 21: 277-285.
- Genco R, Kornman K, Williams R, Offenbacher S, Zambon JJ, Ishikawa I, Listgarten M, Michalowicz B, Page R, Schenkein H, Slots J, Socransky S, VanDyke T. 1996.
Consensus report periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. Ann Periodontol, 1: 926-932.
- Giannopoulou C, Demeurisse C, Cimasoni G. 1994.
Elastase release from gingival crevicular and peripheral neutrophils in periodontitis and health.
Arch Oral Biol, 39: 741-745.
- Greenberg S, Silverstein SC. 1993.
Phagocytosis.
Fundamental Immunology, 3: 941-64.
- Griffin FM Jr, Griffin JA, Leider JE, Silverstein SC. 1975.
Studies of the mechanism of the phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of partial-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane.
Journal of Experimental medicine, 142: 1263-82.
- Griffin FM Jr, Griffin JA, Silverstein SC. 1976.
Studies on the mechanism of phagocytosis. II. The interaction of macrophages with anti-immunoglobulin IgG-coated bone marrow-derived lymphocytes.
Journal of Experimental Medicine, 144: 788-809.
- Gutiérrez-Venegas G, Kawasaki-Cárdenas P, Garcés CP, Román-Alvárez P, Barajas-Torres C, Contreras-Marmolejo LA. 2007.
Actinobacillus actinomycetemcomitans adheres to human gingival fibroblasts and modifies cytoskeletal organization.
Cell biology international, 31: 1063-1068.
- Halliwell B. 2000.
Oral inflammation and reactive species: a missed opportunity?
Oral Dis, 6: 136-137.
- Haubek D, Poulsen K, Kilian M. 2007.
Microevolution and patterns of dissemination of the JP2 clone of Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans.
Infect Immun, 75: 3080-3088.
- Hellwig E, Klimek J, Attin T. 2003.
Einführung in die Zahnerhaltung, 3. Aufl. München, Jena: U&F Verlag, 351-406.

- Holm A, Kalfas S. 1993.
Polymorphonuclear leukocyte chemiluminescence induced by Actinobacillus actinomycetemcomitans and Haemophilus aphrophilus in serum and saliva.
Scand J Dent Res, 101: 350-356.
- International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions, Oak Brook, Illinois. 30.11.1999.
Classification of Periodontal Diseases and Conditions.
Ann Periodontol, 4: 1-112.
- Katsuragi H, Ohtake M, Kurasawa I, Saito K. 2003.
Intracellular production and extracellular release of oxygen radicals by PMNs and oxidative stress on PMNs during phagocytosis of periodontopathic bacteria.
Odontology, 91: 13-18.
- Kesavalu L, Chandrasekar B, Ebersole JL. 2002.
In vivo induction of proinflammatory cytokines in mouse tissue by Porphyromonas gingivalis and Actinobacillus actinomycetemcomitans.
Oral Microbiol Immunol, 17: 177-180.
- Kleber BM. 1998.
Parodontologie. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag.
- Kohal RJ, Dennison DK. 2000.
Neue Paradigmen in der Pathogenese parodontaler Erkrankungen.
Dtsch Zahnärztl Z 55, 10: 660-666.
- Kornman KS, Loesche WJ. 1980.
The subgingival microbial flora during pregnancy.
J Periodontal Res, 15: 111-122.
- Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson Jr TG, Higginbottom FL, Duff GW. 1997.
The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease.
J Clin Periodontol, 24: 72-77.
- Kuramitsu HK, Chen W, Ikegami A. 2005.
Biofilm formation by the periodontopathic bacteria Treponema denticola and Porphyromonas gingivalis.
Journal of periodontology, 76: 2047-2051.
- Lantz MS. 1996.
New insights into mechanisms of bacterial pathogenesis in periodontitis.
Cur Opin Periodontol, 3: 10-18.
- Lee JC, Kumar S, Griswold DE, Underwood DC, Votta BJ, Adams JL. 2000.
Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy.
Immunopharmacology, 47: 185-201.

- Levente B. 2000.
Einfluß von Streptococcus pneumoniae auf den oxidative burst und den Zelltod von Neutrophilen Granulozyten [Dissertation].
Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität.
- Löe H, Theilade E, Jensen SB. 1965.
Experimental gingivitis in man.
J Periodontol, 36: 177-187.
- Löe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. 1986.
Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age.
J Clin Periodontol, 13: 431-440.
- Loesche WJ. 1988.
Oral Microbiology and Immunology, 1. Aufl. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: W.B. Saunders Company, 351-366.
- Lopez N. 2000.
Occurrence of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, and Prevotella intermedia in progressive adult periodontitis.
J Periodontol, 71: 948-954.
- Lopez-Boado Y, Espinola M, Bahr S, Belaaouaj A. 2004.
Neutrophil serine proteinase cleave bacterial flagellin, abrogating, in host response-inducing activity.
J Immunol, 172: 509-515.
- Marsh P, Martin MV. 2003.
Orale Mikrobiologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Matthews JB, Wright H, Roberts A, Cooper P, Chapple IL. 2007a.
Hyperactivity and reactivity of peripheral blood neutrophils in chronic periodontitis.
Clinical and Experimental Immunology, 147: 255-264.
- Matthews JB, Wright H, Roberts A, Ling-Mountford N, Cooper P, Chapple IL. 2007b.
Neutrophil hyper-responsiveness in periodontitis.
J Dent Res, 86: 718-722.
- McDevitt MJ, Wang HY, Knobelman C, Newman MG, di Giovine FS, Timms J, Duff GW, Kornman KS. 2000.
Interleukin-1 genetic association with periodontitis in clinical practice.
J Periodontol 71, 2: 156-163.
- Meisel P, Kocher T. 2004.
Genetische Faktoren für die Pathogenese und den Verlauf parodontaler Erkrankungen.
Quintessenz 55, 4: 407-416.

- Micheelis W, Reich E. 1999.
Dritte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS III).
Deutscher Zahnärzte Verlag.
- Moraes TJ, Chow CW, Downey GP. 2003.
Proteases and lung injury.
Critical Care Medicine, 31: 189-194.
- Mutschelknauss RE. 2000.
Lehrbuch der klinischen Parodontologie. Berlin: Quintessenz Verlags-GmbH.
- Nakagawa S, Fujii H, Machida Y, Okuda K. 1994.
A longitudinal study from prepuberty to puberty of gingivitis.
J Clin Periodontol, 21: 658-665.
- Nassar H, Chou HH, Khlgatian M, Gibson III FC, Van Dyke TE, Genco CA. 2002.
Role for fimbriae and lysine-specific cysteine proteinase gingipain K in expression of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein in Porphyromonas gingivalis-infected endothelial cells.
Infect Immun, 70: 268-276.
- Nauseef WM. 2007.
How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view.
Immunol Rev, 219: 88-102.
- Nicu E, Van der Velden U, Everts V, Van Winkelhoff A, Roos D, Loos B. 2007.
Hyper-reactive PMNs in FcγRIIIa 131 H/H genotype periodontitis patients.
J Clin Periodontol, 34: 938-945.
- Nisengard RJ, Newman MG, Zambon JJ. 1988.
Oral Microbiology and Immunology, 1. Aufl. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: W. B. Saunders Company, 411-437.
- Ohbayashi H. 2002.
Current synthetic inhibitors of human neutrophil elastase.
Expert Opinion on Therapeutic Patents, 12: 65-84.
- Offenbacher S. 1996.
Periodontal diseases: pathogenesis.
Ann Periodontol 1, 1: 821-878.
- Okada H, Murakami S. 1998.
Cytokine expression in periodontal health and disease.
Crit Rev Oral Biol Med, 9: 248-266.
- Oliver RC, Brown LJ, Loe H. 1998.
Periodontal diseases in the United States population.
J Periodontol, 69: 269-278.

- Page RC, Kornman KS. 1997.
The pathogenesis of human periodontitis: an introduction.
Periodontol 2000, 14: 9-11.
- Page RC. 1998.
The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm.
Ann Periodontol, 3: 108-120.
- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE 2001.
Bacterial diversity in human subgingival plaque.
J Bacteriol, 183: 3770-3783.
- Passarge E. 1994.
Taschenatlas der Genetik. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Permpanich P, Kowolik MJ, Galli DM. 2006.
Resistance of fluorescent-labelled Actinobacillus actinomycetemcomitans strains to phagocytosis and killing by human neutrophils.
Cell Microbiol, 8: 72-84.
- Pfister W, Eick S. 2005.
Pathogenese der Parodontitis.
Vorlesungsskript Medizinische Mikrobiologie, Jena.
- Pischon N, Kaner D. 2008.
Parodontitis, ein multifaktorielles Geschehen.
ZM 98, 18: 52.
- Potempa J, Pike R, Travis J. 1997.
Titration and mapping of the active site of cysteine proteinases from Porphyromonas gingivalis (gingipains) using peptidyl chloromethanes.
Biol Chem, 378: 223-30.
- Poulsen K, Ennibi OK, Haubek D. 2003.
Improved PCR for detection of the highly leukotoxic JP2 clone of Actinobacillus actinomycetemcomitans in subgingival plaque samples.
J Clin Microbiol, 41: 4829-4832.
- Puschmann C. 2003.
Untersuchungen zur Wirksamkeit verschiedener Antibiotika auf Porphyromonas gingivalis in oralen Epithelzellen [Dissertation].
Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Ravetch JV. 1994.
Fc receptors: rubor redox.
Cell, 78: 553-60.

- Rönnebeck M. 2006.
Einfluss von Serum auf die Freisetzung von Interleukinen nach Infektion von Fibroblasten und Epithelzellen mit parodontopathogenen Keimen [Dissertation].
Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Roitt IM, Brostoff J, Male DK. 1995.
Kurzes Lehrbuch der Immunologie. 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 204-208.
- Salvi GE, Lawrence HP, Offenbacher S, Beck JD. 1997.
Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis.
Periodontol 2000, 14: 173-201.
- Sanderink RBA, Bernhardt H, Knoke M, Meyer J, Weber C, Weiger R. 2004.
Curriculum Orale Mikrobiologie und Immunologie. Berlin: Quintessenz Verlags-GmbH.
- Sandros J, Karlsson C, Lappin DF, Madianos PN, Kinane DF, Papanou PN. 2000.
Cytokine responses of oral epithelial cells to Porphyromonas gingivalis infection.
J Dent Res, 79: 1808-1814.
- Schacher B, Baron F, Roßberg M, Wohlfeil M, Arndt R, Eickholz P. 2007.
Aggregatibacter actinomycetemcomitans as indicator for aggressive periodontitis by two analysing strategies.
J Clin Periodontol, 34: 566-573.
- Schauerte NA. 2004.
Abhängigkeit der Phagozytose, des Oxidativen Bursts und des Killings durch neutrophile Granulozyten von Melanin und Carotenoiden bei Exophiala dermatitidis [Dissertation].
Aachen: Rheinisch-Westphälische-Technische-Universität.
- Shapira L, Borinski R, Sela MN, Soskolne A. 1991.
Superoxide formation and chemiluminescence of peripheral polymorphonuclear leukocytes in rapidly progressive periodontitis patients.
J Clin Periodontol, 18: 44-48.
- Sheikhi M, Bouhafis RK, Hammarstrom KJ, Jarstrand C. 2001.
Lipid peroxidation caused by oxygen radicals from Fusobacterium-stimulated neutrophils as a possible model for the emergence of periodontitis.
Oral Dis, 7: 41-46.
- Siedle B. 2003.
Phytochemische und pharmakologisch-biologische Untersuchungen von traditionellen Heilpflanzen aus Costa Rica sowie von Sesquiterpenlactonen und Bindungs- und QSAR-Studien mit der Humanen Neutrophilen Elastase und dem Transkriptionsfaktor NF- κ B als molekularen Targets [Dissertation].
Freiburg: Albert-Ludwigs-Universität.

- Smith JA. 1994.
Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword.
J Leukoc Biol, 56: 672-686.
- Sopori ML, Kozak W. 1998.
Immunomodulatory effects of cigarette smoke.
J Neuroimmunol, 83: 148-156.
- Stevens RH, Lillard SE, Hammond BF. 1987.
Purification and biochemical properties of a bacteriocin from Actinobacillus actinomycetemcomitans.
Infect Immun, 55: 692-697.
- Taubmann M, Haffajee A, Socransky S, Smith D, Ebersole J. 1992.
Longitudinal monitoring of humoral antibody in subjects with destructive periodontal diseases.
J Periodontal Res, 27: 511-521.
- Theron A, Anderson R. 1985.
Investigation of the protective effects of the antioxidants ascorbate, cysteine, and dapsone on the phagocyte-mediated oxidative inactivation of human α -1-protease inhibitor in vitro.
American Review of Respiratory Diseases. 132: 1049-1054.
- Travis J, Fritz H. 1991.
Potential problems in designing elastase inhibitors for therapy.
American Review of Respiratory Diseases, 143: 1412-1415.
- Tsai CC, Chen HS, Chen SL, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. 2005.
Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis.
J Periodont Res.
- VanDyke TE, Hoop G. 1990.
Neutrophil function and oral diseases.
Crit Rev Oral Biol Med, 1: 117-133.
- Wachter P. 2005.
Einfluss verschiedener Tetracycline auf parodontopathogene Spezies und Interleukinfreisetzung im Zusammenhang mit KB-Zellen [Dissertation].
Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Wang PL, Shirasu S, Shinohara M, Daito M, Fujii T, Kowashi Y, Ohura K. 1999.
Purification and characterization of a trypsin-like protease from the culture supernatant of Actinobacillus actinomycetemcomitans Y4.
Eur J Oral Sci, 107: 147-153.

Wang PL, Azuma Y, Shinohara M, Ohura K. 2001.
Effect of Actinobacillus actinomycetemcomitans protease on the proliferation of gingival epithelial cells.
Oral Diseases, 7: 233-237.

Weinrauch Y, Drujan D, Shapiro S, Weiss J, Zychlinsky A. 2002.
Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria.
Nature, 417: 91-94.

Internetquellen:

- [1] <http://de.wikipedia.org/wiki/Mundh%C3%B6hle>
- [2] http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/gesundheitsdeterminanten/
- [3] <http://de.wikipedia.org/wiki/Phagozytose>
- [4] <http://www.docteam.de/downloads/phagozytose.pdf>
- [5] http://en.wikipedia.org/wiki/Respiratory_burst
- [6] http://de.wikipedia.org/wiki/Legionella_pneumophila
- [7] <http://de.wikipedia.org/wiki/Lipidperoxidation> , Sept. 2008
- [8] <http://de.wikipedia.org/wiki/Skorbut>
- [9] http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/16/im/antioxsys/antioxsys.vlu/Page/vsc/de/ch/16/im/antioxsys/ros_immun.vscml.html

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Neutrophiler Granulozyt mit aufgenommenen <i>Porphyromonas gingivalis</i>	21
Abbildung 2: Struktur der Humanen Neutrophilen Elastase in der Banddarstellung	24
Abbildung 3: Mikrotiterplatte mit Pipettierschema zur Bestimmung der Gesamt-ROS-Produktion sowie der extrazellulären ROS-Freisetzung	38
Abbildung 4: HNE-Aktivität der neutrophilen Granulozyten ohne bakterielle Stimulation bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe zu den verschiedenen Zeitpunkten	42
Abbildung 5: HNE-Aktivität der neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe zu den verschiedenen Zeitpunkten.....	43
Abbildung 6: HNE-Aktivität der neutrophilen Granulozyten nach Stimulation durch <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> Y4 bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe zu den verschiedenen Zeitpunkten.....	45
Abbildung 7: HNE-Aktivität der neutrophilen Granulozyten ohne bakterielle Stimulation und nach Einfluss durch <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 sowie <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> Y4 bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe nach einem Zeitraum von 30 Minuten	47
Abbildung 8: Gesamte ROS-Produktion der neutrophilen Granulozyten ohne bakterielle Stimulation bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe.....	49
Abbildung 9: Gesamte ROS-Produktion der neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit PMA bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe.....	50
Abbildung 10: Gesamte ROS-Produktion der neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 bei Patienten mit	

aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe	51
Abbildung 11: Gesamte ROS-Produktion der neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> Y4 bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe	52
Abbildung 12: Gesamte ROS-Produktion der neutrophilen Granulozyten ohne bakterielle Stimulation und nach Einfluss durch <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 sowie <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> Y4 bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe.....	54
Abbildung 13: Extrazelluläre ROS-Freisetzung der neutrophilen Granulozyten ohne bakterielle Stimulation bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe.....	55
Abbildung 14: Extrazelluläre ROS-Freisetzung der neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit PMA bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe.....	56
Abbildung 15: Extrazelluläre ROS-Freisetzung der neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe	57
Abbildung 16: Extrazelluläre ROS-Freisetzung der neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> Y4 bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe.....	58
Abbildung 17: Extrazelluläre ROS-Freisetzung der neutrophilen Granulozyten ohne bakterielle Stimulation und nach Einfluss durch <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 sowie <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> Y4 bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe.....	60
Abbildung 18: HNE-Aktivität der neutrophilen Granulozyten ohne bakterielle Stimulation und nach Einfluss durch <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277 sowie <i>A. actinomycetemcomitans</i> Y4 bei Patienten mit aggressiver und chronischer	

Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe nach einem Zeitraum von 60 Minuten.....	92
Abbildung 19: HNE-Aktivität der neutrophilen Granulozyten ohne bakterielle Stimulation und nach Einfluss durch <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277 sowie <i>A. actinomycetemcomitans</i> Y4 bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe nach einem Zeitraum von 120 Minuten.....	93
Tabelle 1: Demographische und klinische Daten der in die Studie eingeschlossenen Probanden	40

10 Anhang

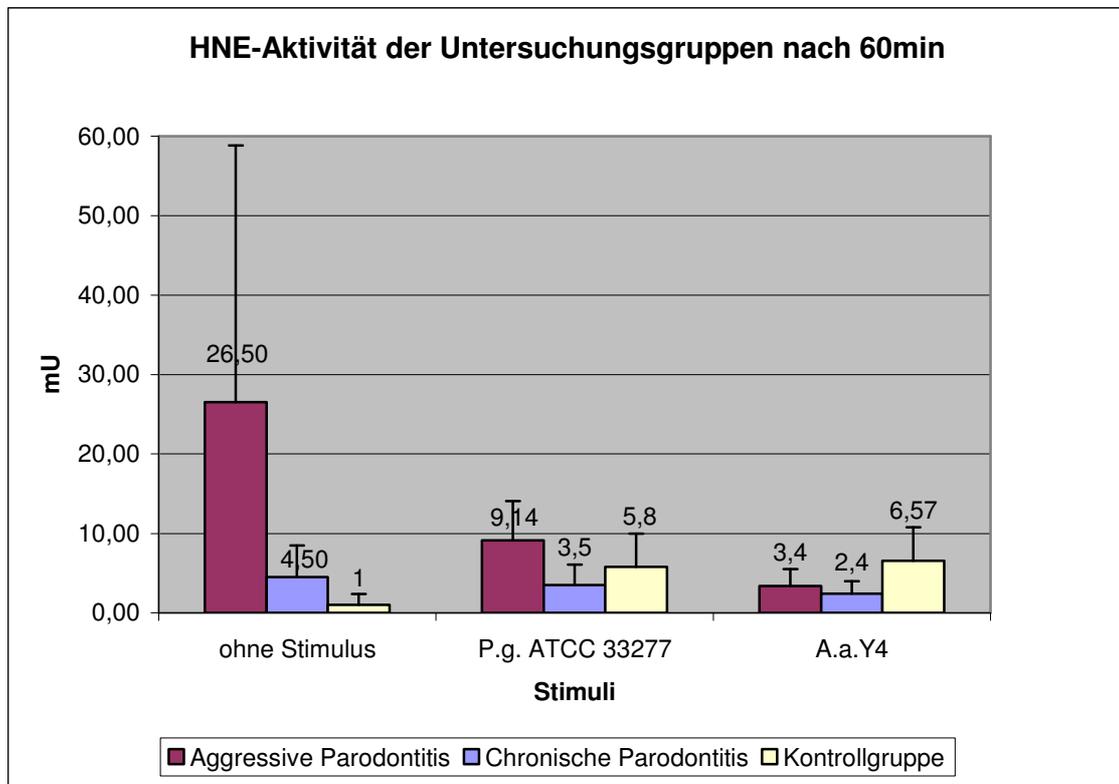


Abbildung 18: HNE-Aktivität der neutrophilen Granulozyten ohne bakterielle Stimulation und nach Einfluss durch *P. gingivalis* ATCC 33277 sowie *A. actinomycetemcomitans* Y4 bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe nach einem Zeitraum von 60 Minuten

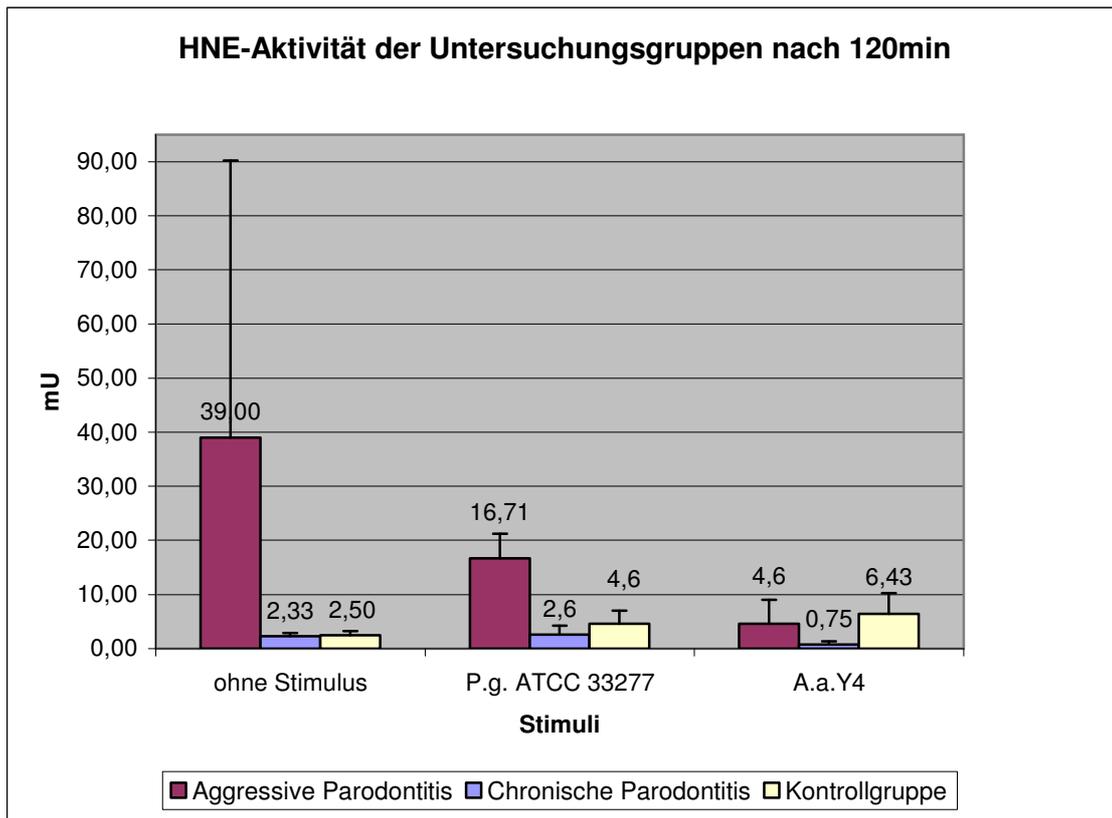


Abbildung 19: HNE-Aktivität der neutrophilen Granulozyten ohne bakterielle Stimulation und nach Einfluss durch *P. gingivalis* ATCC 33277 sowie *A. actinomycetemcomitans* Y4 bei Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe nach einem Zeitraum von 120 Minuten

Lebenslauf

Name: Schenk
Vorname: Rolf - Martin
Geburtsdatum: 29.05.1982
Geburtsort: Weimar
Familienstand: ledig
Schulbildung: 1989–1993 Grundschule Parkschule Ehringsdorf
1993–2001 Friedrich-Schiller-Gymnasium Weimar
Studiengang: 2001–2007 Zahnmedizinstudium
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Staatsexamen: August 2006 bis
4. Januar 2007
Berufliche
Tätigkeit: Assistenz Zahnarzt Praxis Dr. med. Thomas. Schenk
seit 01.05.2007 Rudolf-Breitscheid-Straße 33
99423 Weimar
Promotionsarbeit: Beginn: Juli 2005
Betreuer: PD Dr. med. habil. S. Eick
Prof. Dr. med. habil. W. Pfister
Thema: Untersuchungen zur Produktion reaktiver
Sauerstoffspezies und Freisetzung neutrophiler
Elastase durch polymorphkernige Granulozyten
nach Stimulierung mit parodontopathogenen
Spezies

Weimar, den _____

Dankagung

Hiermit möchte ich dem Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Herrn Prof. Dr. med. habil. E. Straube, für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Gerätschaften und die Möglichkeit meine wissenschaftlichen Studien durchführen zu können, danken.

Herrn Prof. Dr. med. habil. W. Pfister und Frau PD Dr. med. habil. S. Eick danke ich für die Überlassung des Themas. In Bezug auf die umfassende Unterstützung bei der Konzeption, Durchführung und Auswertung der Studie sowie für die Beratung und wissenschaftliche Betreuung möchte ich an dieser Stelle Frau PD Dr. med. habil. S. Eick meinen besonderen Dank aussprechen.

Herrn Dr. med. A. Güntsch und Frau Dr. med. Seltmann von der Poliklinik für Konservierende Zahnheilkunde danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Gewinnung des Patientenmaterials.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, allen voran bei Frau Rahnke, für deren freundliche Unterstützung bei den Vorbereitungen der Versuche und die Hilfsbereitschaft bedanken.

Meiner Familie danke ich für den Rückhalt, die Unterstützung und ständige Motivation, die ich in den vergangenen 27 Jahren und speziell während meines Studiums erfahren habe. Besonderer Dank gilt dabei meinem Vater für seine Vorbildwirkung bezüglich meiner Berufswahl und die Schaffung von Freiräumen zur Fertigstellung dieser Dissertation. Ebenfalls sei an dieser Stelle meiner zweiten Hälfte Nicole für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Liebe gedankt.

Meinem besten Freund Johannes Jobst danke ich für die Beratung in formellen Fragen. Auch meinem Freundeskreis der DFC möchte ich danken, da er einen elementaren Bestandteil meines bisherigen Lebens und zugleich wichtigen Ausgleich zum Alltag darstellt.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität 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 Person bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. habil. S. Eick und Prof. Dr. med. habil. W. Pfister,

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 andere 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.

Weimar, den _____