

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik und Werkstoffkunde

Direktor: Prof. Dr. med. habil. H. von Schwanewede

der
Klinik und Polikliniken für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

„Hans Moral“

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. habil. H. von Schwanewede

**Quantitative Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten
von Speichelkomponenten in der Pellikel des
Prothesenbasiskunststoffes PMMA**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von

Falk Gerath

geb. am 01.09.1971 in Rostock

Rostock 2008

1. Gutachter: Prof. Dr. med. habil. H. von Schwanewede
2. Gutachter: Prof. Dr. med. dent. W. Niedermeier
3. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. habil. R. Göcke

Tag der mündlichen Verteidigung: 17. Dezember 2008

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Literaturüberblick	4
2.1.	Polymethylmethacrylat-Prothesenkunststoff	4
2.2.	Speichel und Speichelkomponenten	5
2.2.1.	Bildung und Sekretion des Speichels	5
2.2.2.	Speichelproteine	9
2.2.3.	Peroxidasesystem	11
2.2.4.	Lysozym	13
2.2.5.	α -Amylase	15
2.2.6.	Gesamtproteasen	16
2.2.7.	Protease-Inhibitoren	17
2.2.8.	Sekretorisches Immunglobulin A	19
2.2.9.	Immunglobulin G	23
2.2.10.	Kalzium	23
2.3.	Pellikel	25
3.	Material und Methodik	31
3.1.	Probanden	31
3.2.	Probengewinnung	
3.2.1.	Herstellung der Prüfkörper aus PMMA	31
3.2.2.	Speichelgewinnung	32
3.2.3.	Gewinnung und Verarbeitung der Prüfkörperproben	33
3.3.	Analysenmethoden	
3.3.1.	Bestimmung des Gesamtproteingehalts	34
3.3.2.	Bestimmung der Peroxidase	35
3.3.3.	Bestimmung des Thiocyanats	37
3.3.4.	Bestimmung des Lysozyms	38
3.3.5.	Bestimmung der α -Amylase	39
3.3.6.	Bestimmung der Gesamtprotease	39
3.3.7.	Bestimmung der Gesamtprotease-Inhibitoren	40
3.3.8.	Bestimmung des sekretorischen Immunglobulin A	41
3.3.9.	Bestimmung des Immunglobulin G	43
3.3.10.	Bestimmung von Kalium und Kalzium	43
3.4.	Umrechnung und Statistik	44
4.	Ergebnisse	47
4.1.	Speichelparameter im stimulierten Nüchterngesamtspichel	48
4.2.	Vom Prüfkörper desorbierte und am Prüfkörper verbliebene Mengen der Speichelparameter sowie ihre hypothetischen Konzentrationen	53
4.3.	Vergleich der Speichelkonzentrationen mit den hypothetischen Konzentrationen	65
4.4.	Korrelationen zwischen den Speichelsekretionsraten und den hypothetischen Konzentrationen bzw. Aktivitätskonzentrationen	68

II

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>Seite</u>
5. Diskussion	71
6. Zusammenfassung	93
7. Literaturverzeichnis	95
8. Anhang	Tab. A1 – Tab. A 12

III

<u>Tabellenverzeichnis</u>	<u>Seite</u>
----------------------------	--------------

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Statistische Angaben zur allgemeinen Charakterisierung des stimulierten Nüchterngesamtspichels	48
Tab. 2:	Statistische Angaben zu Thiozyanat sowie Proteasen und Protease-Inhibitoren im stimulierten Nüchterngesamtspichel	49
Tab. 3:	Statistische Angaben für Lysozym, α -Amylase und Peroxidasen im stimulierten Nüchterngesamtspichel	51
Tab. 4:	Statistische Maßzahlen für sekretorisches Immunglobulin A, Immunglobulin G, Gesamteiweiß und Kalzium im stimulierten Nüchterngesamtspichel	52
Tab. 5:	An den Prüfkörpern adsorbierte Eiweißmengen	54
Tab. 6:	Vom Prüfkörper desorbierte Mengen und am Prüfkörper verbliebene relative Mengen des sIgA	55
Tab. 7:	An den Prüfkörpern adsorbierte Mengen des Immunglobulin G	55
Tab. 8:	An den Prüfkörpern adsorbierte Mengen des Thyiozyanats	57
Tab. 9:	An den Prüfkörpern adsorbierte Mengen des Kalziums pro Flächeneinheit	58
Tab. 10:	An den Prüfkörpern adsorbierte Aktivitäten der Gesamtperoxidase	60
Tab. 10a:	Vergleich der von Prüfkörpern desorbierten mit den an Prüfkörpern verbliebenen Peroxidaseaktivitäten	60
Tab. 10b:	Korrelation der unterschiedlich bestimmten Peroxidaseaktivitäten	61
Tab. 11:	Vom Prüfkörper desorbierte Aktivitäten des Lysozyms	61
Tab. 12:	An den Prüfkörpern adsorbierte Aktivitäten der α -Amylase	62
Tab. 13:	An den Prüfkörpern adsorbierte Mengen der Proteasen	63
Tab. 14:	An den Prüfkörpern adsorbierte Mengen der Proteasen-Inhibitoren	64

IV

<u>Tabellenverzeichnis</u>	<u>Seite</u>
Tab. 14a: Vergleich desorbierter und verbliebener Protease-Inhibitor-Aktivitäten	64
Tab. 14b: Linearkorrelation der Proteaseaktivitäten mit den Aktivitäten der Protease-Inhibitoren	65
Tab. 15a: Vergleich der Konzentrationen im stimulierten Gesamtspeichel mit den berechneten hypothetischen Konzentrationen	66
Tab. 15b: Vergleich der Aktivitätskonzentrationen im stimulierten Gesamtspeichel mit den berechneten hypothetischen Aktivitätskonzentrationen	67
Tab. 16: Vergleich der Speichelkonzentrationen mit den berechneten hypothetischen Gesamtkonzentrationen	68
Tab. 17: Korrelationen der Speichelsekretionsraten mit den hypothetischen Konzentrationen	69
Tab. 18: Variationskoeffizienten im Speichel und in der Pellikel	70
Tab. 19a: Vergleich der Pellikelbildung an Polymethylmethacrylat mit Dentalkeramik Empress 2 und Reintitan Grad 2	88
Tab. 19b: Vergleich der Pellikelbildung an Polymethylmethacrylat mit Dentalkeramik Empress 2 und Reintitan Grad 2	89
Tab. 20: Testergebnisse beim Vergleich der Pellikelbildung an Polymethylmethacrylat mit Dentalkeramik Empress 2 und Reintitan Grad 2	91

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Allgemeine Charakterisierung des stimulierten Nüchtern- gesamtspichels	47
Abb. 2:	Konzentrationen des Thiozyanats sowie Aktivitäten von Proteasen und Protease-Inhibitoren im stimulierten Nüchtern- gesamtspichel	49
Abb. 3:	Aktivitäten von Lysozym, α -Amylase und Peroxidasen im stimulierten Nüchterngesamtspichel	50
Abb. 4:	Konzentrationen von sekretorischem Immunglobulin A, Immunglobulin G, Gesamteiweiß und Kalzium im stimu- lierten Nüchterngesamtspichel	52
Abb. 5:	Mittlere Konzentration von sekretorischem Immunglobulin A Immunglobulin G sowie Gesamteiweiß im Eluat der Prüf- körper	53
Abb. 6:	Konzentrationen von Thiozyanat und Kalzium im Eluat der Prüfkörper	56
Abb. 7:	Aktivitäten der gesamten Peroxidasen und des Lysozyms im Eluat der Prüfkörper	58
Abb. 8:	Aktivitäten der gesamten Proteasen, der Protease-Inhibitoren sowie der α -Amylase im Eluat der Prüfkörper	62

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

MW	Mittelwert
s	Standardabweichung
Min	Minimum
Max	Maximum
N	Zahl der Messwerte
r	(linearer) Korrelationskoeffizient (nach Pearson)
t	Prüfgröße im t-Test
p	Signifikanzniveau
VK	Variationskoeffizient
FL	Fließrate
PH	pH-Wert
CO ₂	Kohlendioxid
BIC	Bikarbonat
BE	Base Excess bzw. Basenabweichung
BB	Gesamtheit der Pufferbasen
TH	Thiozyanat
PRO	gesamte Proteasen
PRI	gesamte Protease-Inhibitoren
LYS	Lysozym
AMY	α -Amylase
PER	gesamte Peroxidasen, bestimmt mit Guajakol als Substrat
SPO	gesamte Peroxidasen, bestimmt mit NBS als Substrat
IGA, sIgA	sekretorisches Immunglobulin A
IGG, IgG	Immunglobulin G
EW	Gesamteiweiß
CA	Kalzium
...SP.	Komponente im Speichel
...E.	Pellikelkomponente im Eluat der Prüfkörper
...EF.	eluierte Pellikelkomponente pro Flächeneinheit [.../cm ²]
...PF.	am Prüfkörper verbliebene Pellikelkomponente pro Flächeneinheit [.../cm ²]
...PGF.	gesamte in der Pellikel adsorbierte Komponente pro Flächeneinheit [.../cm ²] ...PGF. = ...EF. + ...PF. für die Komponente
...PV.	eluierte Pellikelkomponente pro Volumeneinheit hypothetische Konzentration bzw. Aktivitätskonzentration [.../l] in einer 0,1 mm dicken Schicht auf dem Prüfkörper, berechnet aus den desorbierten Anteilen
...PGV.	gesamte Pellikelkomponente pro Volumeneinheit hypothetische Konzentration bzw. Aktivitätskonzentration [.../l] in einer 0,1 mm dicken Schicht auf dem Prüfkörper, berechnet aus den desorbierten plus den am Prüfkörper verbliebenen Anteilen

VII

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

SR...	Sekretionsrate (Ausscheidung pro Minute) einer Speichelkomponente
....1	Messreihe 1
....2	Messreihe 2
n.b.	nicht bestimmt

1. Einleitung

Speichel ist ein wichtiger Bestandteil des menschlichen Organismus, der eine Vielzahl von Aufgaben und Funktionen übernimmt. Die orale Gesundheit des Menschen ist wesentlich vom Speichel, d.h. dessen Zusammensetzung, Fließrate, pH-Wert, Pufferkapazität und weiteren Faktoren abhängig. Der Speichel hat einen entscheidenden Einfluss auf das Adsorptionsverhalten von Mikroorganismen in der Mundhöhle, an den Zähnen, an der Schleimhaut, aber auch an Restaurationen und beeinflusst deren Wechselwirkungen durch die Eigenschaften seiner Parameter.

Als Restaurationsmaterialien haben sich Metalle, Keramiken sowie Kunststoffe zur Herstellung von zahnärztlichen Konstruktionen für den Ersatz fehlender Zähne seit langem bewährt. Die Reaktionen der Mucosa auf herausnehmbarem Zahnersatz werden wesentlich von den biologischen Wechselwirkungen zwischen dem oralen Milieu und dem Prothesenkunststoff bestimmt.

Ist das natürliche Gleichgewicht der Mundhöhle gestört, kommt es zur Stomatitis prothetica, die ein Tragen von Zahnersatz unmöglich machen kann und sogar als karzinogener Co-Faktor betrachtet wird. Der Begriff Prothesenstomatitis umschreibt eine Reihe von pathologischen Veränderungen, die nur an den Mundschleimhäuten von Prothesenträgern auftreten. Dazu gehören Rötung und Schwellung der Schleimhäute, Trockenheit, Schleimhautbrennen und Hyperplasien. Es können auch Entzündungen an der Zunge, den Lippen und in den Mundwinkelbereichen auftreten. Als Ursache für die Prothesenstomatitis wird zwischen exogenen und endogenen Faktoren unterschieden. Zu den exogenen Faktoren zählen die qualitativen und quantitativen Veränderungen der Mundhöhlenflora, die sowohl durch bakterielle Stoffwechselprodukte als auch durch mechanisch-traumatische Einflüsse, wie z.B. mangelhafte Gestaltung von Prothesen, Oberflächenrauigkeiten, Wärmestauungen unter der Prothese sowie durch chemische Reize, wie Restmonomer, Farbstoffe oder Katalysatoren hervorgerufen werden können. Endogene Faktoren, die eine Prothesenstomatitis auslösen können, sind ein verminderter Speichelfluss, der häufig im höheren Alter auftritt, Psychopharmaka

1. Einleitung

oder Morbus Sjögren und Diabetes mellitus, sowie Eisen- und Vitaminmangel, besonders Mangel an Vitamin B-Komplex.

Eine weitere Ursache für pathogene Veränderungen in der Mundhöhle ist häufig Plaque. Die Prothesenplaque von gesunden Personen ist im Vergleich zur Plaque von Personen mit Prothesenstomatitis morphologisch verändert. Plaque besteht im Wesentlichen aus Kokken und Stäbchen. Es existieren jedoch erhebliche quantitative Unterschiede. Die Prothesenplaque, bei Personen mit Prothesenstomatitis, weist eine größere Schichtstärke und signifikant mehr Bakterien auf. Durch Plaque kann es zu bakteriell bedingten Stomatitiden kommen, indem grampositive Bakterien die Plaque besiedeln. Möglich ist aber auch die Bildung von Candidosen, wenn sich z. B. Mycel des Sproßpilzes *Candida albicans*, des Erregers von 90% der Candidosen, festsetzt. In solch einem Fall ist ebenfalls die Myceldichte in der Prothesenplaque bei Personen mit Prothesenstomatitis deutlich höher.

Aus organischen Bestandteilen des Speichels bildet sich an den Oberflächen der Mundhöhle in wenigen Minuten zunächst eine Pellikelschicht. Sie besteht aus Proteinen, welche die Wechselwirkungen zwischen Oberflächen und Mikroorganismen bestimmen und Voraussetzung für die Plaquebildung sind. Das Adsorptionsverhalten von Mikroorganismen gegenüber zahnmedizinischen Restaurationsmaterialien, wie beispielsweise dem Prothesenkunststoff, wird also wesentlich vom Speichel beeinflusst. Darüber hinaus haben aber auch die Oberflächenbeschaffenheit und die Eigenschaften des Prothesenkunststoffes eine wesentliche Bedeutung für das Adsorptionsverhalten der Mikroorganismen. Der Adsorptionsprozess ist selektiv. Kovalente Bindungen der Speichelpolymere sind die Ursache für die Adsorption an der Mucosa. Nicht-kovalente Bindungen sind für die Adsorption an der Pellikel von Polymethylmethacrylat (PMMA), dem am häufigsten verwendeten Prothesenbasiskunststoff, verantwortlich.

In zahlreichen Publikationen werden Untersuchungen an verschiedenen zahnärztlichen Restaurationsmaterialien beschrieben. Untersucht wurde das Adsorptionsverhalten von Speichelkomponenten und die Pellikelbildung an Dentalkeramiken in-vitro und in-vivo sowie Titan als Festkörper und in Pulverform in-vitro und in-

1. Einleitung

vivo. Bestimmungen dieser Art gab es auch am Hydroxylapatit des Zahnschmelzes. Untersuchungen an PMMA ergaben bisher nur Aussagen zur qualitativen Anlagerung der Speichelkomponenten. Beim Vergleich der Pellikelbildung an unterschiedlichen Restaurationsmaterialien wurde PMMA bisher vernachlässigt. Qualitative Untersuchungen über die Zahl und Art der adsorbierten Komponenten reichen für einen derartigen Vergleich nicht aus. Quantitative Untersuchungen sind also diesbezüglich erforderlich. Auch die Form der untersuchten Werkstoffe ist hierfür von Bedeutung. Untersuchungen in Pulver- oder Kugelform sind nur bedingt aussagekräftig, da eine wesentlich größere Oberfläche erzielt wird. Untersuchungen glatter Oberflächen von Festkörpern besitzen einen wesentlich bedeutenderen Stellenwert für die Praxis. Derartige quantitative Untersuchungen von Festkörpern aus PMMA, im Vergleich zur Pellikelbildung an unterschiedlichen Restaurationsmaterialien, liegen bisher nicht vor.

In der vorliegenden Arbeit soll daher das Adsorptionsverhalten von Speichelkomponenten in der Pellikel des Prothesenkunststoffes PMMA in vivo untersucht werden.

Ziel ist es:

- Quantitative Untersuchungen zum Adhäsionsverhaltens von Speichelkomponenten an Prüfkörpern aus PMMA durchzuführen, die eine definierte Zeit im Mund gehalten wurden
- und eine Analyse des Speichels im stimulierten Nüchterngesamtspichel vorzunehmen, um die Speichelzusammensetzung mit dem adhärennten Speichelkomponenten an den PMMA-Prüfkörpern vergleichen zu können.

Bei den zu analysierenden Speichelkomponenten handelt es sich um die Analyse von Gesamteiweiß, α -Amylase, Gesamtproteasen, Protease-Inhibitoren, sIgA, IgG, Peroxidase, Thiocyanat, Lysozym und Kalzium. Das sind die wichtigsten und häufigsten Speichelkomponenten, die wesentlich die biochemischen Prozesse in der Mundhöhle beeinflussen.

2. Literaturüberblick

2.1. Polymethylmethacrylat-Prothesenkunststoff

Seit der Synthese des Zelluloids im Jahre 1870 werden Kunststoffe in der Zahnmedizin verwendet. Zelluloid wurde zu der Zeit unter den Bezeichnungen Hecolite und Coralite zur Prothesenherstellung genutzt.

Die heute verwendeten Polymerisationskunststoffe sind in den 30er Jahren entstanden. Die wichtigsten Vertreter dieser Kunststoffe sind die Methacrylate. Sie zeichnen sich durch eine gute Form-, Farb- und Mundbeständigkeit aus, sind biologisch verträglich, geschmacksneutral, unempfindlich gegen Milieuwechsel und hygienesfähig. Die Polymethylmethacrylate sind somit besonders für die Prothesenbasen geeignet, werden aber auch zur industriellen Herstellung von Prothesenzähnen, in der Kieferorthopädie, für Epithesen in der Defektrekonstruktion und als klinische Hilfsmittel, z.B. für Abformlöffel, verwendet. Weltweit besteht der größte Teil der Prothesen aus Polymethylmethacrylat. Sie sind somit wesentlicher Bestandteil des zahnärztlichen Therapieschemas.

Unter Beachtung der steigenden Lebenserwartung und einer damit verbundenen Verschiebung der Zahnlosigkeit ins hohe Alter, der wachsenden gesundheitspolitischen Sparmaßnahmen, einer sinkenden Kaufkraft und nicht zuletzt des gewaltigen Nachholbedarfs der Entwicklungsländer auf zahnmedizinischem Gebiet werden Prothesenkunststoffe auch in Zukunft zu den wichtigsten Werkstoffen der Zahnmedizin gehören (Janda 1997).

Vorrangig verwendet man durch thermisch aktivierte Polymerisation härtende Methacrylate. Sie sind dimensionsstabil und weisen einen nur geringen Gehalt an Restmonomer auf (Austin und Basker 1984). Dabei wird der aus Monomer und Polymer gemischte Kunststoffteig in die Prothesenhohlform gepresst und dort unter gesteuerter Temperaturführung bis auf 100°C und einem Druck von 6 bar zur Polymerisation gebracht. Bewährt hat sich bei der Prothesenherstellung das SR-Ivocap-Verfahren der Firma Ivoclar. Hierbei handelt es sich um ein Injektionsverfahren mit Heißpolymerisat.

2.2. Speichel und Speichelkomponenten

2.2.1. Bildung und Sekretion des Speichels

Speichel ist eine sehr verdünnte, klare, leicht saure Flüssigkeit und besteht zu mehr als 99 % aus Wasser (Humphreys und Williamson 2001). Seine festen Bestandteile setzen sich zu zwei Drittel aus organischen und zu einem Drittel aus anorganischen Substanzen zusammen. Zu den anorganischen Bestandteilen zählen Elektrolyte wie Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^- und Phosphat sowie Spurenelemente wie, Br^- , J^- , F^- , Cu^{2+} , Ni^{2+} (Edgar 1992). Organische Bestandteile des Speichels sind Proteine, Kohlenhydrate, Lipide, Enzyme, Immunglobuline, Harnstoff und Ammoniak (Humphreys und Williamson 2001). Hinzu kommen aglanduläre Bestandteile wie Blut, Gingivafluid, Leukozyten, desquamierte Epithelzellen, Bakterien, dentale Plaque, Viren und Nahrungsreste (Dawes 1993, Fox 1989). Speichel wird als seröses, sero-muköses oder muköses Sekret in den Drüsen der paarigen großen Speicheldrüsen, den Glandulae parotidae, Glandulae linguales und Glandulae submandibulares sowie in einer Vielzahl kleiner Speicheldrüsen in der Mundschleimhaut von Unterlippe, Zunge, Wangen und Gaumen gebildet. Der größte Teil des Speichelvolumens wird von den großen Speicheldrüsen erzeugt. Wegen ihres Gehalts an Komponenten mit Schutzwirkung sind die kleinen Speicheldrüsen in vieler Hinsicht aber wichtiger (Humphreys und Williamson 2001). Die Bedeutung des Speichels für die orale Gesundheit wird häufig erst beachtet, wenn seine Quantität oder Qualität bei einer Dysfunktion verringert ist.

Die Sekretion des Gesamtspeichels beträgt etwa 0,5 - 1,5 Liter täglich. In Ruhe werden 0,3 ml/min und bei Stimulation bis zu 0,7 ml/min sezerniert (Humphreys und Williamson 2001). Diese Angaben sind jedoch individuell sehr unterschiedlich und von Alter, Geschlecht, Jahreszeit, Tageszeit, Ernährung, Gesundheitszustand und Pharmaka abhängig. Vor allem Säuren können durch Reizung der Geschmacksknospen die Sekretion des Speichels deutlich erhöhen. Nachts und unter Stresssituationen sinkt die Fließrate stark ab (Edgar 1992). Sie ist neben der Pufferwirkung entscheidend für die Homöostase des pH-Wertes in der Mundhöhle, der im Gesamtspeichel zwischen 6 und 7 liegt.

2. Literaturüberblick

Die Gll. submandibulares liefern bis zu 65 % des Ruhespeichels, gefolgt von den Gll. parotideae mit 10 - 20 %. Bei Stimulation des Speichelflusses tragen die Gll. parotideae mehr als 50 % zum Volumen bei (Niedermeier et al. 2000). Der Stimulationszustand bestimmt also wesentlich die prozentuale Herkunft des Speichels. Zusammensetzung und biologische Aktivitäten einzelner Komponenten aus den großen Speicheldrüsen sind ebenfalls unterschiedlich (Veerman et al. 1996).

Die Aufgaben und Funktionen des Speichels sind sehr vielfältig. Hauptfunktionen nach Humphreys und Williamson (2001) sind: Modulation von pH-Wert und Pufferkapazität des Speichels durch Bikarbonat, Phosphat und Harnstoff; Reinigung; Aggregieren und/oder Attachment von Mikroorganismen sowie der Beitrag zum Plaquestoffwechsel durch makromolekulare Proteine und Muzine; Modulation von Demineralisation und Remineralisation der Zähne durch Kalzium und Phosphat in Verbindung mit prolinreichen Proteinen und Statherin; antibakterielle Wirkung durch Immunglobuline, Proteine mit unspezifischer Abwehrfunktion und Enzyme. Muköser Speichel hält die Mundschleimhaut geschmeidig und schützt sie durch seinen großen Anteil an Muzinen, er macht die Nahrung und die Zunge gleitfähig, ist notwendig für das mikrobiologische Gleichgewicht in der Mundhöhle und für die Funktion der Geschmacksknospen (Niedermeier et al. 2000). Ein Film aus Speichelmuzinen und prolinreichen Glykoproteinen liefert Schutz vor der mechanischen Abnutzung der Zähne. Neben den Hauptglykoproteinen des Speichels, den Muzinen, prolinreichen Glykoproteinen und Immunglobulinen ist auch eine Anzahl an Proteinen und Glykoproteinen mit geringerer Menge wie Agglutinin, Lactoferrin, Cystatine und Lysozym an der ersten Abwehrlinie im Mund beteiligt. Daneben sind kleine kationische Peptide wie die Defensine, Histatine und die Cathelicidine in den Blickpunkt gerückt. Sie weisen eine bakterienabtötende Wirkung auf (Nieuw Amerongen et al. 2004).

Viele Speichelproteine sind multifunktional, d. h. sie üben mehr als eine Funktion aus, und sind redundant, weil mehrere Proteine in unterschiedlichem Ausmaß gleichartige Funktionen ausüben. Außerdem sind sie amphifunktional, d. h. sie können sowohl für als auch gegen den Wirtsorganismus wirken (Humphreys und Williamson 2001). Dadurch fällt es häufig schwer, eine orale Erkrankung mit der

2. Literaturüberblick

Konzentration bzw. Aktivität einer Einzelkomponente in Beziehung zu setzen (Niedermeier et al. 2000). Andererseits ist eine breitgefächerte „Bewaffnung“ des Speichels erforderlich, damit es nicht zu einer unkontrollierten Besiedlung durch die Vielzahl der Mikroorganismen, die in die Mundhöhle gelangen, kommt, zumal die Bedingungen in der Mundhöhle für einzelne Abwehrsysteme nur suboptimal sind (Nieuw Amerongen et al. 2004).

Eine erhöhte Speichelproduktion kann mastikatorisch und gustatorisch mit Säure sehr stark und mit Zuckerstoffen schwach stimuliert werden. Olfaktorisch ist die Stimulation der Speicheldrüsen am geringsten. Dazu kommen psychische Faktoren wie Schmerzen, verschiedene Medikationen und lokale oder systemische Erkrankungen mit Beteiligung der Speicheldrüsen (Humphreys und Williamson 2001). Es besteht eine große individuelle Variabilität in der Stimulation und Sekretion der unterschiedlichen Zelltypen für die Speichelproduktion, wodurch der Gehalt des Speichels sowohl regional als auch insgesamt beeinflusst wird. Wegen zirkadianer Schwankungen der Fließrate zeigen auch die Konzentrationen von Speichelkomponenten Tagesschwankungen. Innerhalb des Mundes ist der höchste Speichelfluss mandibulär lingual und der geringste Speichelfluss maxillär anterior und interproximal (Humphreys und Williamson 2001). Diese Unterschiede beeinflussen die Clearance von Säuren und Bakterien und allgemein den Schutz an verschiedenen Stellen im Mund.

Einen breiten Raum nimmt in der Literatur die Diskussion über ein Nachlassen der Speichelproduktion mit dem Alter ein. Die sekretorische Reservekapazität der Speicheldrüsen nimmt bereits bei normalem Altern durch Zellverlust ab (Baum et al. 1992). Dadurch wird bei Belastung die Speichelproduktion zusätzlich reduziert. Durch Medikamente wurde nach Ghezzi und Ship (2003) die Speichelsekretion bei gesunden älteren Probanden stärker nachteilig beeinflusst als bei gesunden jüngeren Probanden. Dieser Befund ist wichtig für Prothesenträger, da sie meistens der älteren Bevölkerung angehören und häufig mehr Medikamente einnehmen.

Jede Hypofunktion des Speichelflusses führt zu erhöhter Anfälligkeit oraler Strukturen. Auch das Tragen herausnehmbarer Prothesen wird durch eine erniedrigte

2. Literaturüberblick

Fließrate des Speichels negativ beeinflusst. So wiesen Patienten mit akuter Stomatitis prothetica die niedrigsten Mittelwerte für Fließrate, pH-Wert und Pufferwirkung im unstimulierten Gesamtspeichel auf (Göcke et al. 1997). Unterschiedliche Kombinationen aus Fließrate, pH-Wert, sIgA-Konzentration und Peroxidaseaktivität trennten die Patienten hoch signifikant von gesunden Kontrollprobanden bzw. von Patienten nach erfolgreicher Behandlung.

Der pH-Wert-Abfall im unstimulierten Speichel erhält bei akuter Stomatitis prothetica eine besondere Bedeutung, da saure Proteasen von *C. albicans* als wesentliche Virulenzfaktoren angesehen werden (Wagner et al. 1995). Sie ermöglichen das Eindringen von Mikroorganismen in die Mundschleimhaut (Morschhäuser et al. 1996) und sind gleichzeitig zum Abbau verschiedener Abwehrfaktoren des Speichels in der Lage (Ruechel 1990). Schon der physiologische pH-Wert des Speichels führt zur Inhibierung und irreversiblen Denaturierung von Proteasen (Ruechel 1990, Wagner et al. 1995).

Nach Tanida et al. (2003) waren die Fließrate sowie die Sekretionsraten für Transferrin, Lactoferrin, sIgA, freie sekretorische Komponente, α -Defensin-1, β -Defensin-1 und β -Defensin-2 im unstimulierten Gesamtspeichel bei einer oralen Candidiasis signifikant erniedrigt. Die für die Vermehrung der Candida-Zellen erforderliche Adhäsion an Epithelflächen war bei diesen Patienten erleichtert. Die niedrigeren Spiegel für β -Defensin-1 und β -Defensin-2 sowie die verringerte Fließrate wiesen auf eine Hypofunktion der Speicheldrüsen hin, denn β -Defensin-1 ist in Epithelzellen konstitutionell exprimiert und β -Defensin-2 wird durch Bakterien und inflammatorische Zytokine induziert.

Márton et al. (2004) konnten sieben Tage nach dem Eingliedern einer Prothese weder für den unstimulierten Gesamtspeichel noch bei den palatinalen Speicheldrüsen eine signifikante Veränderung der Fließrate beobachten. Niedermeier et al. (1989) fanden dagegen, dass die Sekretion der Gll. palatinae bei Prothesenträgern mit Stomatodynesymptomen verringert war. Die Befunde für die Gll. palatinae sind von Bedeutung für Prothesenträger, denn die Retention von Vollprothesen des Oberkiefers zeigte eine signifikant positive Korrelation zur Fließrate der kleinen Speicheldrüsen (Niedermeier und Krämer 1992). Für Prothesen im Unterkie-

2. Literaturüberblick

fer war diese Beziehung schwächer signifikant (Niedermeier et al. 2000). Weiterhin bestand ein eindeutiger Zusammenhang zwischen einer Hyposekretion der Gll. palatinae und dem Beschwerdebild der Prothesenunverträglichkeit, denn Patienten mit dieser Diagnose unterschritten hoch signifikant den Grenzwert von $3 \mu\text{l}/\text{cm}^2/\text{min}$ für das Auftreten von Mundtrockenheit (Niedermeier 1996). Zu beachten ist die Alters- und Geschlechtsabhängigkeit in der Sekretionsleistung der Gll. palatinae. Bei männlichen Probanden ergab sich eine signifikant positive Korrelation zum Alter, während bei weiblichen Probanden eine signifikant negative Korrelation zum Alter vorhanden war (Niedermeier et al. 2000). Die Sekretion der Gll. parotidae nahm bei beiden Geschlechtern mit dem Alter signifikant ab. Große und kleine Speicheldrüsen unterscheiden sich somit auch funktionell. Unter prothetischen Gesichtspunkten ist die Sekretion der kleinen Speicheldrüsen des Gaumens von größerer Bedeutung als die Sekretion der großen Speicheldrüsen. Bei Prothesenträgern mit Fließraten unter $6 \mu\text{l}/\text{cm}^2/\text{min}$ für die Gll. palatinae wurde eine starke Assoziation mit dem häufigeren Auftreten chronischer Läsionen oder Erkrankungen der oralen Mukosa wie Leukoplakie, Candidiasis usw. beobachtet (Niedermeier et al. 2000).

2.2.2. Speichelproteine

Die Speichelproteine umfassen einfache Proteine und Glykoproteine wie Peroxidase, Lysozym, α -Amylase, Immunglobuline, Laktoferrin, Phosphoproteine und Peptide sowie die prolinreichen Proteine und die Muzine. Durch die hochmolekularen Muzine MG1 wird der Speichel viskös und durch die niedermolekularen Muzine MG2 wird er eher serös. Diese Speichelkonsistenz beeinflusst auch die Effizienz der Proteine (Tabak et al. 1985). Muzine sind für den Schutz der Schleimhäute vor Proteasen verantwortlich (Mandel 1987). MG1 und MG2 werden von allen mukösen Speicheldrüsen produziert und machen 20 - 30 % der Speichelproteine aus. Es sind multifunktionale Moleküle, die am Schutz oraler Flächen gegen Austrocknung, an der Lubrikation der Hart- und Weichgewebe zur Minimierung von Schäden beim Kauen und anderen mechanischen Beschädigun-

2. Literaturüberblick

gen sowie am Sprechen und der Bildung einer Diffusionsbarriere zwischen darunter liegendem Gewebe und äußerer Umgebung beteiligt sind.

Das hochmolekulare MG1 ist nach längerer Inkubation von Schmelz in Speichel ein Bestandteil der Pellikel (Niedermeier et al. 2000). Für die Barrierefunktion der Pellikel gegen Protonen ist es unverzichtbar. Eine Bakterienbindung erfolgt vor allem durch das niedermolekulare Muzin MG2, das auch mit MUC7 bezeichnet wird (Liu et al. 2000). Es weist im physiologischen Konzentrationsbereich des Gesamtspeichels auch eine candidacide Aktivität auf, die mit der Wirkung von Histatin 5 vergleichbar ist und gehört somit zum angeborenen, unspezifischen Abwehrsystem des Speichels.

Histatine sind histidinreiche Peptide. Sie stellen eine eigene Familie der antimikrobiellen Peptide im menschlichen Speichel dar. Unter ihnen sind die Histatine 1, 3 und 5 am häufigsten vertreten. Ihre Bedeutung für die orale Gesundheit ergibt sich aus ihrer starken fungiziden und fungistatischen Wirkung und aus ihrem inhibierenden Einfluss auf die Aktivitäten von Cysteinproteinasen aus Bakterien sowie die Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 in entzündlichen Exsudaten (Gusman et al. 2001). Sie kommen im Submandibularisspeichel in höherer Konzentration vor als im Parotisspeichel (Gusman et al. 2004). Obwohl sie nur 3-10 % des Gesamtproteins in den Parotis- und Submandibularissekreten ausmachen, zeigen die gesamten Histatine in ihrem Tagesrhythmus eine nahezu perfekte Übereinstimmung mit dem Gesamtproteingehalt der jeweiligen Sekrete. Der Gesamtproteingehalt kann somit als grobes Maß für den gesamten Histatingehalt dienen. Gemäß Iontcheva et al. (1997) bildet das Muzin MG1 heterotype Komplexe mit α -Amylase, Histatinen, prolinreichen Proteinen und Statherin. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese Speichelkomponenten gemeinsam in die Pellikel eingebaut werden. Histatine sind wichtige Abwehrkomponenten bei einer oralen Candidiasis. So hatten Träger einer Vollprothese an allen untersuchten Flächen der Mundschleimhaut eine signifikant höhere Prävalenz der Hefepilze als bezahnte Probanden (Jainkittivong et al. 1998). An den Prothesen konnte die größte Besiedlung festgestellt werden. Gleichzeitig wiesen Probanden mit positivem Test auf Hefepilze eine signifikant geringere Konzentration der gesamten

2. Literaturüberblick

Histatine im stimulierten Submandibularis- und Sublingualisspeichel auf als Probanden mit negativem Test. Für Gaumen und Zunge zeigte die Anzahl der Hefekolonien eine signifikante Korrelation mit der Sekretionsrate der gesamten Histatine.

Bei Prothesenstomatitis erhöhte sich der Proteingehalt im Speichel (Göcke et al. 1997). Auch das bloße Eingliedern einer Prothese führte schon zu Speichelveränderungen (Göcke et al. 1997, Groß 2002, Göcke et al. 2005). Bei kaum veränderter Fließrate wurden signifikante Verschiebungen der Konzentrationen des Gesamtproteins und des sekretorischen IgA sowie Aktivität von Protease-Inhibitoren im unstimulierten Nüchterngesamtspichel beobachtet. Weiterhin wurden Veränderungen der Konzentrationen von Gesamteiweiß und sIgA sowie der Aktivitäten der Protease-Inhibitoren und der gesamten Proteasen im stimulierten Nüchterngesamtspichel festgestellt. Die Gesamteiweißkonzentration fiel innerhalb von vier Wochen ab, stieg dann aber innerhalb von sechs Monaten über den Ausgangswert an, was als zeitlich begrenzte Reaktion auf prothesenbedingte entzündliche Veränderungen interpretiert werden kann.

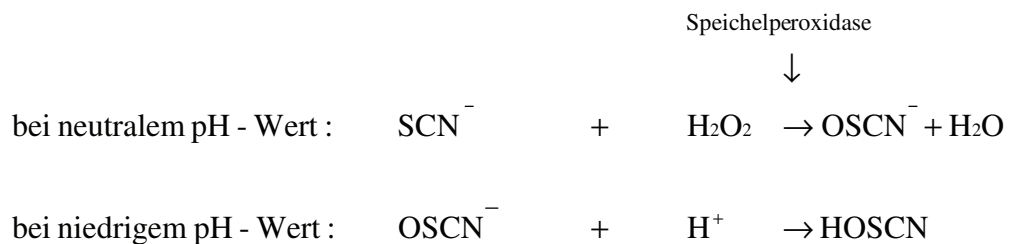
2.2.3. Peroxidasesystem

Das aus den Enzymen Sialoperoxidase (Speichelperoxidase) sowie Myeloperoxidase in Kombination mit Wasserstoffperoxid und Thiozyanat gebildete Peroxidase-System des Speichels stellt einen angeborenen Abwehrmechanismus der Mundhöhle dar. Die Sialoperoxidase, häufig auch als Lactoperoxidase bezeichnet, wird in den Azinuszellen der großen Speicheldrüsen gebildet. Sie beeinflusst im Zusammenwirken mit Wasserstoffperoxid und Thiozyanat entscheidend die Art und Anzahl der oralen Mikroorganismen (Tenovuo 1989). Thiocyanat wird in den Speicheldrüsen ausgeschieden. Das Wasserstoffperoxid im Speichel stammt vorwiegend aus dem Bakterienstoffwechsel, kann aber auch im reinen Drüsenspeichel aus reaktiven Vorstufen des Sauerstoffs gebildet werden (Tenovuo 1989). Bei entzündlichen Prozessen in den oralen Geweben tritt Myeloperoxidase aus polymorphkernigen Leukozyten aus. Sie wird aber auch über den Gingivasulcus

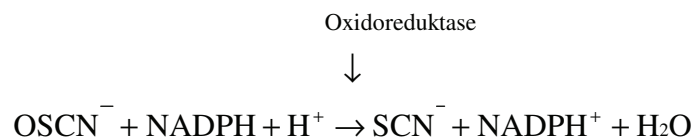
2. Literaturüberblick

in den Speichel gebracht (Rosin et al. 1999). Sind Myeloperoxidase und Speichelperoxidase gemeinsam im Speichel vorhanden, wird ihre Reaktion mit Thiozyanat bevorzugt. Steht Thiozyanat als Reaktionspartner nicht zur Verfügung, kann die Myeloperoxidase auch mit Chlorid als Substrat reagieren, was der Speichelperoxidase nicht möglich ist. Speichelperoxidase kann an Oberflächen der Mundhöhle gebunden werden und liefert 80 % der Peroxidaseaktivität in der Mundhöhle (Tenovuo 1989). Auch Bakterien sind in der Lage, den Enzymkomplex zu binden, wodurch sich seine antibakterielle Wirkung erhöht.

Bei neutralem pH-Wert katalysiert die Peroxidase des Speichels mit Wasserstoffperoxid die Oxidationsreaktion von Thiocyanat zu Hypothiocyanit. Hypothiocyanit oxidiert die Sulfhydrylgruppen oraler Bakterien und hemmt dadurch deren Stoffwechsel. Ist der pH-Wert gering, entsteht Hypothiocyansäure, die besonders leicht in Bakterienzellen eindringen kann und diese durch Oxidationsprozesse zerstört (Tenovuo 1984):



Einige Bakterien, wie z. B. *S. sanguis* und *S. mitis* zeigen eine Resistenz gegen Hypothiocyanit. Sie basiert auf ihrer Oxidoreduktase (Dowd 1999):



Für den menschlichen Organismus stellen Hypothiocyanit und seine protonierte Form keine toxische Gefahr dar (Tenovuo 1991).

Die Peroxidaseaktivität im Nüchternspeichel ist bei Stomatitis prothetica signifikant erhöht (Simm et al. 1990, Göcke et al. 1997). Auch bei multivariater Analyse der Daten erwies sie sich als wichtiger Trennfaktor zwischen Prothesen-

2. Literaturüberblick

trägern ohne Symptome, Patienten nach erfolgreicher Behandlung einer Stomatitis prothetica und gesunden Patienten ohne herausnehmbaren Zahnersatz.

Peroxidase aus Speichel bindet sich irreversibel an Schmelzpulver (Tenovuo et al. 1977) und behält dabei 75 % ihrer Aktivität (Pruitt und Adamson 1977). Daten über Peroxidaseaktivität der in situ gebildeten Pellikel gibt es bisher nicht (Hannig et al. 2005). Peroxidase und Lysozym zeigten additive Effekte bei der Inhibition der Adhärenz von *S. mutans* an Hydroxylapatit (Roger et al. 1994). Nach Pruitt und Adamson (1977) erfolgte die Adsorption von Lactoperoxidase aus dem Speichel proportional zur Oberfläche des Schmelzpulvers. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass Lactoperoxidase in vivo als aktives, oberflächengebundenes Agens gegen Bakterien wirkt. Roger et al. (1994) konnten zeigen, dass Peroxidase in der Pellikel die Adhärenz von *S. mutans* auf Hydroxylapatitscheiben deutlich reduzierte. Rudney et al (1999) bestätigten diese Erkenntnisse anhand der Adhärenz von Viridans-Streptokokken an Zahnschmelz.

2.2.4. Lysozym

Lysozym wurde erstmals durch Flemming (1922) in Tränenflüssigkeit und Nasensekret nachgewiesen und kommt in allen Körperflüssigkeiten vor. Durch seine positive Ladung kann es Anionen des Speichels wie z. B. Fluorid binden. Seine Konzentration in stimuliertem Speichel liegt bei 5 - 50 mg/l (Tenovuo 1991). Es wird in den Gangzellen der Gll. submandibulares und Gll. sublinguales, aber auch in den kleinen Speicheldrüsen der Mundschleimhaut gebildet. Ein Teil des Speichellysozyms gelangt durch polymorphkernige neutrophile Leukozyten über den Gingivasulcus in die Mundhöhle. Auch phagozytierende Zellen kommen als Ursache in Betracht (Tenovuo 1991). Lysozym trägt im Speichel zur unspezifischen Abwehr bei (Rosin 1999; Noble 2000).

Lysozym ist ein kationisches Protein mit einem weiten Bereich antimikrobieller Aktivitäten. Mit seiner Enzymfunktion als Muramidase bewirkt es die Spaltung der β -(1,4)-glykosidischen Bindungen zwischen den Resten der Muraminsäure und des N-Azetylglukosamins in der Peptidoglycanschicht der Zellwände von

2. Literaturüberblick

Mikroorganismen (Yeh et al. 1997). Dabei reagieren grampositive Bakterien empfindlicher als gramnegative, die eine zusätzliche Polysaccharidschicht als Membran besitzen. Diese Membran kann als ein Diffusionshindernis für Lysozym betrachtet werden (Witholt et al. 1976). Daneben wirkt Lysozym auch durch seine starken kationischen Eigenschaften bakterizid und fungizid infolge einer physikalisch-chemischen Zerstörung der Zellmembran (Nieuw Amerongen et al. 2004). Weitere antimikrobielle Aktivitäten des Lysozyms sind die Inhibition von Wachstum und Stoffwechsel der Bakterien sowie die Auflösung ihrer Ketten (Schenkels et al. 1995). Zusätzlich vermindert es die Säureproduktion der Bakterien, da die Glukoseaufnahme der Streptokokken beeinträchtigt wird (Twetman 1986). Auch ein positiver Einfluss auf die Mucosa wurde festgestellt (Grahn et al. 1988). Da die Konzentration von sIgA und Lysozym im unstimulierten Nüchternspeichel durch Stresssituationen gesenkt wird (Yang et al. 2002), hat Stress ebenfalls Einfluss auf die Immunität der Mukosa.

Gesunde Probanden im Alter von 79 - 89 Jahren wiesen im Vergleich zu jüngeren Probanden mit Alter von 21 - 51 Jahren einen erniedrigten Spiegel von Lysozym im unstimulierten Nüchternspeichel auf (Shugars et al. 2001). Diese Unterschiede blieben auch bei Normierung auf den Gesamtproteingehalt bestehen, d. h. die Produktion von Lysozym in den Speicheldrüsen nahm mit dem Alter ab. Ein erhöhter Anteil an Lysozym in unstimuliertem Speichel konnte bei Patienten mit Prothesenstomatitis nachgewiesen werden (Simm et al. 1990, Szymanska et al. 1995). Lysozym erwies sich als wichtiger Bestandteil von Trennfunktionen zur Diskrimination von Patienten mit Stomatitis prothetica, von Prothesenträgern ohne Entzündung der Mundschleimhaut und von gesunden Probanden ohne herausnehmbaren Zahnersatz (Göcke et al. 1997).

Lysozym ist am Schutz der Zähne beteiligt und gehört zur ersten Abwehrlinie im Mund (Humphreys und Williamson 2001). In den Mizellen des Speichels ließ sich Lysozym elektrophoretisch nachweisen (Soares et al. 2004). Unter Mitwirken von anderen Speichelproteinen ist Lysozym dadurch in der Lage, sich an Hydroxylapatit des Zahnschmelzes zu binden. Lysozym ist schon seit längerem als Bestandteil der Pellikel bekannt (Eggen und Rölla 1982, Eggen 1984, Edgerton et al.

2. Literaturüberblick

1987, Yao et al. 2003, Hannig et al. 2005a). Es gehört zu den am häufigsten identifizierten Bestandteilen der Pellikel (Lendenmann et al. 2000). Nach Wood et al. (2000) ist das an Schmelz gebundene Lysozym enzymatisch aktiv. Lysozym inhibiert das Wachstum von Candida-Pilzen in-vitro (Pollock et al. 1984a, b) und in-vivo (Cannon et al. 1995). Es beeinflusst die Ultrastruktur von *C. albicans*, indem es eine Unterbrechung in der Permeabilität der Zellmembran, eine Ansammlung von zellwandartigem Material, das in das Zytoplasma eindringt, und andere Veränderungen in Verbindung mit Abwandlungen der Zellwand hervorruft (Marquis et al. 1982). Es kann daher auch ein inhibierender Einfluss des Wachstums von *C. albicans* auf der Prothesenbasis vermutet werden.

2.2.5. α -Amylase

Die im Speichel vorkommende α -Amylase zählt zu den mengenmäßig wichtigsten Bestandteilen der Speichelproteine. Sie nimmt etwa 40% des Gesamtproteins ein. Der Hauptanteil der α -Amylase im Mischspeichel stammt aus den Azinuszellen der Gll. parotidea und den serösen Anteilen der Gll. submandibulares und Gll. sublinguales (Noble 2000, Tenovuo 1989). Das Enzym ist in der Lage, Stärke und andere Polysaccharide zu spalten. Dieser Prozess findet auch in der Plaque statt (Dowd 1999). Die α -Amylase benötigt einen pH-Wert von 6,7 für ihre optimale Wirksamkeit. Sinkt der pH-Wert unter 4 ab, wird sie inaktiv. Sie verliert im sauren Milieu des Magens daher ihre Funktion. Ihre Sekretion aus den Azinuszellen wird durch Mastikation signifikant erhöht (Proctor und Carpenter 2001).

Durch α -Amylase hat der Speichel eine Funktion bei der beginnenden Verdauung der Stärke. Ihre Wirkung ist wegen der geringen Verweildauer im Mund jedoch begrenzt. Das Enzym besitzt auch die Fähigkeit, die Anlagerung von Streptokokken an Hydroxylapatit der Zahnoberflächen zu fördern. Neben Mutans-Streptokokken sind *S. gordonii* und *S. mitis* am häufigsten beteiligt (Scannapieco et al. 1995, Bergmann 1995). Weiterhin begünstigt α -Amylase die Bindung von Bakterien an die Zahnoberflächen durch Amylase bindende Proteine (Carlén et al. 2004). Es konnten jedoch keine eindeutigen Zusammenhänge zwischen Amyla-

2. Literaturüberblick

seaktivität im Speichel und Kariesaktivität hergestellt werden (Geller und Rovelstad 1995, Newburn 1989). Vermutlich ist die Verweildauer im Mund zu kurz. Die α -Amylase ist auch Bestandteil der Mizellen des Speichels (Soares et al. 2004). Dadurch wird sie gemeinsam mit anderen Speichelproteinen in der Pellikel abgelagert (Iontcheva et al. 1997). Die Anwesenheit von α -Amylase in der Pellikel könnte auch die Anlagerung von Streptokokken fördern. So wurde eine vermehrte Anlagerung von *Streptococcus gordonii* an Hydroxylapatit durch α -Amylase beobachtet (Scannapieco et al. 1995).

2.2.6. Gesamtproteasen

Proteasen sind Enzyme, die in der Lage sind, Proteine zu spalten. Sie sind entscheidend an der Lyse von Bakterien und dem Abbau von Bindegewebe beteiligt (Sandholm 1986). Eine entscheidende Rolle spielen sie bei der Entstehung von parodontalen Erkrankungen. In der Mundhöhle wirkt eine Vielzahl von Proteasen: Kollagenasen, Elastasen, Serinproteasen und Metalloproteasen. Proteolytische Enzyme können sowohl aus Entzündungszellen wie den polymorphkernigen Granulozyten als auch von Mikroorganismen der Mundhöhle abgegeben werden. Durch Proteasen der Mikroorganismen werden wiederum Peptidasen, Proteinasen, Kollagenasen und Ureasen freigesetzt (Kennedy et al. 1998). Sie sind im Speichel und der Plaque, aber auch in entzündetem Gingivagewebe und im Sulcusfluid nachweisbar (Gazi et al. 1996).

In der Mundhöhle finden sich weiterhin bakterielle Proteasen, die in der Lage sind, Immunglobuline zu spalten (Marcotte 1998). Bei der Plaqueanlagerung an Zahnoberflächen konnte festgestellt werden, dass die Proteaseaktivität gesteigert war (Sandholm 1986). Von *C. albicans* sezernierte saure Proteasen (Wagner et al. 1995) müssen als wichtige Virulenzfaktoren angesehen werden, da sie das Eindringen in die Mundschleimhaut ermöglichen (Morschhäuser et al. 1996).

Im Speichel der Gll. submandibulares konnte eine Steigerung der proteolytischen Aktivität bei kariesfreien Probanden im Vergleich zu Probanden mit einem hohen Kariesrisiko festgestellt werden (Piotrowski et al. 1992). Daraus lässt sich eine

2. Literaturüberblick

protektive Wirkung der Proteasen ableiten, denn die Protease aus dem Submandibularispeichel war in der Lage, hochmolekulares Muzin MG1 in niedermolekulares Muzin MG2 umzuwandeln. Dadurch dominiert MG2 im Speichel kariesresistenter Probanden gegenüber MG1. Die Protease zeigte Eigenschaften einer Serin-Protease mit einem pH-Optimum bei pH 7,0 – 7,4 und wurde durch α_1 -Antitrypsin und weitere Serinprotease-Inhibitoren inhibiert. Das Eingliedern einer Prothese führte zu einem signifikanten Anstieg der gesamten Proteaseaktivität im stimulierten Nüchternspeichel. Nach sechs Monaten trat ein signifikanter Abfall ein, der mit dem gleichzeitig beobachteten Anstieg der Protease-Inhibitoren zusammen hängen könnte (Groß 2002, Göcke et al. 2005).

Aktivitäten von Proteasen wurden in der Pellikel bisher nicht untersucht (Hannig et al. 2005a). Für Untersuchungen an Biofilmen wird häufig sogar empfohlen, Protease-Aktivitäten zu unterdrücken (Amano et al. 1999, Jensen et al. 1992). Proteasen sollen zum Abbau der Pellikelschicht beitragen (Hahn Berg et al. 2001). IgA-Proteasen von *S. sanguis* können sIgA abbauen und dadurch seine antibakterielle Aktivität stören (Hannig et al. 2005), wodurch die schützende Rolle von sIgA bei der Modulation der Mundflora negativ beeinflusst würde.

2.2.7. Protease-Inhibitoren

Protease-Inhibitoren helfen Gewebe vor übermäßiger Proteaseaktivität zu schützen. Hauptvertreter der Protease-Inhibitoren im Serum sind das α -1-Antitrypsin und α -2-Makroglobulin. Diese Protease-Inhibitoren werden aus dem Blutserum über den gingivalen Sulcus in die Mundhöhle transportiert (Sandholm 1986). Auch über den Speichel werden Protease-Inhibitoren in die Mundhöhle abgegeben. Den größten Anteil leisten dabei die Gll. submandibulares. Sie sezernieren Cystein-Proteinase-Inhibitoren, die auch als Cystatine bezeichnet werden (Nieuw Amerongen et al. 2004). Geringere Mengen stammen aus den Gll. sublinguales und Gll. labiales (Rathmann et al. 1990). Durch die Inhibition der Proteasen werden Protease-Inhibitoren auch zu Gegenspielern der Besiedlung mit *C. albicans*,

2. Literaturüberblick

da dieser Keim mit Hilfe einer von ihm ausgeschiedenen sauren Protease in die Mundschleimhaut eindringt (Wagner et al. 1995, Morschhäuser et al. 1996).

Bei Entzündungen erhöht sich sowohl die Proteaseaktivität als auch die Aktivität der Protease-Inhibitoren im Speichel. Dies trifft für Parodontalerkrankungen und für Karies gleichermaßen zu (Mandel 1987; Makinen 1989): Bei Abnahme der Entzündung sinken auch die Aktivitäten dieser Gegenspieler (Junker et al. 2000; Nakamura-Minami et al. 2003; Sikorska et al. 2002). Nikotin senkt die Protease-Inhibitoren-Aktivität im Speichel, was Ursache für die häufigeren Entzündungen bei Rauchern sein könnte (Danilekii et al. 2000). Das Eingliedern einer Prothese bewirkte einen kontinuierlichen Anstieg der Protease-Inhibitoren im Speichel, der aber erst nach sechs Monaten das Signifikanzniveau erreichte. Gleichzeitig kam es zu einem Abfall der Protease-Aktivität (Groß 2002, Göcke et al. 2005).

Epithelzellen der Mundschleimhaut sezernieren den sekretorischen Leukozyten-Proteaseinhibitor (SLPI), auch Antileukoprotease oder Mukusproteinase-Inhibitor genannt. Er inaktiviert Serinproteasen wie die Elastase aus Neutrophilen während einer Entzündung, besitzt aber auch antimikrobielle Aktivität und wirkt gegen kommensale Pilze, Bakterien und Viren sowie bei der Wundheilung der Haut (Shugars et al. 2001). Gesunde Probanden im Alter von 79 - 89 Jahren wiesen im Vergleich zu Probanden im Alter von 21 - 51 Jahren einen erniedrigten Spiegel von SLPI im unstimulierten Nüchterngesamtspichel auf. Diese Unterschiede blieben auch bei Normierung auf den Gesamtproteingehalt bestehen, d. h. die Produktion von SLPI in den Speicheldrüsen nahm mit dem Alter ab. Außerdem bestand ein Geschlechtsunterschied, denn Männer hatten einen signifikant niedrigeren Spiegel an SLPI. Ältere Menschen und vor allem ältere Männer besitzen somit ein erhöhtes Risiko für Erkrankungen der Mundschleimhaut.

Die bekanntesten Protease-Inhibitoren des Speichels und der Pellikel sind die Cystatine (Schenkels et al. 1995 Edgerton und Levine 1993, Lendenmann et al. 2000, Hannig et al. 2005, Yao et al. 2001, 2003). Sie sind endogene Inhibitoren von Cystein-Proteinasen, treten in allen Mukosasekreten auf und bilden eine Superfamilie. Im Speichel dominieren die Cystatine S, SA und SN. Cystatine inhibieren vor allem Kathepsin B, eine Cysteinproteinase, die häufig bei Entzündun-

2. Literaturüberblick

gen auftritt, u. a. auch bei Gingivitis und Parodontitis. Cystatine sind cysteinhaltige Phosphoproteine und binden im Rahmen der Pellikelbildung an Hydroxylapatit und inhibieren das Wachstum von Hydroxylapatit-Kristallen (Edgerton und Levine 1993). Sie sind mit 11,9 % nach den prolinreichen Proteinen mit 41,6 % und Amylasen mit 23,3 % des Gesamtproteins das mengenmäßig dritthäufigste Protein in der Pellikel auf Hydroxylapatitpulver (Yao et al. 2001). Bradway et al. (1992) wiesen Cystatine in der Pellikel auf Mukosaflächen nach, wo sie durch eine Transglutaminase aus Epithelzellen mit anderen Proteinen vernetzt waren (Iontchewa et al. 1997, Yao et al. 1999, 2000). Es wurden viele Komplexe zwischen Muzinen des Speichels und anderen Speichelproteinen wie α -Amylase, prolinreiche Proteine, Histatin, Statherin, Cystatin und Lysozym gefunden, die nicht-kovalent an MG1 gebunden sind (Iontchewa et al. 1997). Die Pellikel könnte also eher durch Adsorption dieser Komplexe statt nur durch Adsorption von einzelnen Komponenten gebildet worden sein (Hannig und Joiner 2006). In diesen Komplexen sind die Proteine offensichtlich besser vor proteolytischem Abbau geschützt. Außerdem wirken diese Komplexe konzentrierend für die Proteine auf der Oberfläche.

2.2.8. Sekretorisches Immunglobulin A

Das sekretorische Immunglobulin A ist die Hauptklasse der Immunglobuline im Speichel. Es trägt wesentlich zur spezifischen Abwehr des Speichels bei, kommt aber auch in anderen Körpersekreten vor. Es ist in der Lage, Bakterien zu aggregieren, sodass die Anlagerung der Bakterien an orale Gewebe nicht möglich ist. Auch das Eindringen von Antikörpern in die Mucosa kann durch sIgA verhindert werden (Marcotte und Lavoie 1998).

Die Bildung von IgA-Monomer erfolgt im Drüsenepithel durch Immunozyten, die sich dort als aktive Plasmazellen eingelagert haben. Zwei Moleküle des IgA werden dann in den Plasmazellen durch die J-Kette zu einem Dimer verbunden. In den Epithelzellen von serösen und mukösen Drüsen wird das IgA dann an einem Polyimmunglobulin-Rezeptor gebunden. Dieser Komplex wird durch die Zelle

2. Literaturüberblick

zur Oberfläche der luminalen Membran geschleust. Dort wird das Rezeptormolekül nach der Fusion mit der Zellmembran proteolytisch gespalten. Der am IgA verbliebene Teil dieses Rezeptors bildet dann die sekretorische Komponente. Dadurch entsteht das sekretorische IgA oder kurz sIgA, das 95 % des im Speichel vorkommenden IgA ausmacht und häufigster Isotyp der Immunglobuline ist. Das Anlagern der sekretorischen Komponente ist also Voraussetzung für das Ausschleusen von sIgA aus der Zelle. Durch die Anlagerung der sekretorischen Komponente ist das sIgA gleichzeitig besser vor den Einflüssen proteolytischer Enzyme geschützt (Tenovuo 1991).

Die Konzentration des sIgA im Gesamtspeichel unterliegt großen Schwankungen (Brandtzaeg 1989). Patienten mit Prothesenstomatitis wiesen gegenüber gesunden Probanden signifikant erhöhte Werte von sIgA im Speichel auf (Szymanska et al. 1995, Göcke et al. 1997). Als Ursache wird der entzündliche Reiz angenommen. Die Konzentration des sIgA hängt auch von der Fließrate des Speichels ab, denn bei zunehmender Fließrate nimmt seine Konzentration ab (Tenovuo 1989, Brandtzaeg 1998). Die biologische Funktion des sIgA, das Verhindern der Adhärenz von Bakterien und die Neutralisation von Toxinen, konnte in Tierversuchen belegt werden (Russel et al. 1998). Die Fähigkeit, Bakterien zu agglutinieren, ist bei sIgA höher einzuschätzen als bei monomerem IgA (Tenovuo 1998).

Das sIgA ist auf Oberflächen der Mukosa aktiv und neutralisiert Viren, wirkt als Antikörper gegen Bakterien-Antigene und aggregiert oder verklumpt Bakterien, wodurch es ihre Anheftung an Wirtsgewebe inhibiert (Humphreys und Williamson 2001). Auch die Entfernung von Bakterien aus der Mundhöhle kann somit beschleunigt werden. Nach Mestecky (1993) ist sIgA im Speichel repräsentativ für den Funktionszustand des gemeinsamen mukosalen Immunsystems, das für alle Schleimhautflächen im Körper wirksam ist. Stress hat Einfluss auf die Immunität der Mukosa, denn die Konzentration von sIgA im unstimulierten Nüchternspeichel wird durch Stresssituationen gesenkt (Yang et al. 2002). Das niedermolekulare Muzin MG2 und sIgA bilden Komplexe und binden dadurch Pathogene auf der Mukosa mit größerer Affinität als jede Komponente für sich. Die Anhaftung von *S. mutans* an Hydroxylapatit wird durch sekretorisches IgA gestört

2. Literaturüberblick

(Gahnberg et al. 1982). Auch gegen parodontopathogene Keime wie *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* konnten sIgA-Antikörper nachgewiesen werden (Marcotte 1998).

Eine positive Korrelation zwischen sIgA und der Prävention von Karies bzw. Parodontalerkrankungen ist umfangreich aufgezeigt worden (De Farias 2003, Sikorska et al. 2002, Hägewald et al. 2003). Eine Behandlung der Parodontitis wurde nach 4 Wochen von einem signifikanten Abfall des sIgA in beiden Speichelarten begleitet, während sich die Konzentration der mit *P. gingivalis* reaktiven Antikörper im Speichel bei gleichzeitig hoher interindividueller Variabilität nicht signifikant veränderte. Dadurch stieg die spezifische IgA-Aktivität, d. h. der relative Anteil der spezifischen Antikörper am gesamten IgA, signifikant an. Es lag somit eine sekretorische Immunantwort gegen Antigene parodontalpathogener Keime vor. Das gesamte sekretorische IgA reflektiert dagegen die Exposition des Wirts mit oralen Bakterien insgesamt, die im Rahmen der Therapie zurück ging. Höhere Spiegel an sIgA im Speichel als Antwort auf eine höhere antigene Belastung durch Plaquebakterien wurden auch von Jentsch et al. (1992) belegt, die über zwei Jahre im unstimulierten und im stimulierten Speichel von kariesaktiven Probanden einen höheren Mittelwert als bei kariesfreien Probanden fanden. Die Neutralisation von Viren und Toxinen und damit die Inhibition von Enzymen werden ebenfalls dem sIgA zugesprochen (Marcotte 1998).

Patienten mit Stomatitis prothetica wiesen beim Vergleich mit Prothesenträgern ohne Erkrankung der Mundschleimhaut signifikant erhöhte Konzentrationen von sIgA auf (Simm et al. 1990). Eine lokale Abwehrreaktion war bei diesen Patienten offensichtlich, denn der Anstieg von sIgA und Lysozym war größer, als es durch das Absinken der Fließrate erklärbar war. Die Fraktion des sIgA im menschlichen Speichel enthält auch spezifische Antikörper gegen *C. albicans* (Seyfarth et al. 1994). Ihre Konzentration war bei Vorliegen einer Stomatitis prothetica im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht und ging bei symptomatischer Behandlung der Erkrankung nur geringfügig zurück. Bereits gesunde Prothesenträger wiesen eine nicht signifikante Erhöhung der Antikörperkonzentration gegen *C. albicans* im Speichel auf. Bei Vorliegen einer Stomatitis prothetica kam es im

2. Literaturüberblick

Vergleich mit Prothesenträgern ohne Symptome, gesunden Kontrollprobanden ohne herausnehmbaren Zahnersatz und Stomatitis-Patienten nach erfolgreicher Behandlung zu signifikanten Erhöhungen der Konzentration von sIgA (Göcke et al. 1997). Bei multivariater Varianz- und Diskriminanzanalyse war sIgA stets Bestandteil der Trennfunktionen, mit denen akut erkrankte Patienten höchst signifikant von den anderen Untersuchungsgruppen abgetrennt wurden. Es muss also immer das Zusammenspiel mehrerer Speichelfaktoren berücksichtigt werden, um das Auftreten einer Stomatitis prothetica ausreichend zu erklären. Eine ungenügende Immunabwehr im Speichel kann nicht als Ursache der Stomatitis angenommen werden, denn sIgA fiel nach der Behandlung auf das Niveau von Prothesenträgern ohne Entzündung bzw. von gesunden Patienten ohne herausnehmbaren Zahnersatz zurück. Eher könnte von einer Antwort der funktionierenden Immunabwehr auf die erhöhte immunogene Belastung ausgegangen werden. Schon nach Eingliederung einer Prothese nahm die Konzentration des sIgA in beiden Speichelarten innerhalb einer vierwöchigen Funktionsperiode signifikant zu und blieb auch nach sechs Monaten noch erhöht, obwohl in keinem Fall eine Infektion mit Hefepilzen sicher nachgewiesen werden konnte (Groß 2002, Göcke et al. 2005).

Sekretorisches Immunglobulin A spielt eine wichtige Rolle bei der adaptiven Immunität der Mundschleimhaut. Seine Sekretion wurde parallel zur Sekretion von Gesamtprotein und α -Amylase aus den Azinuszellen durch Mastikation signifikant auf nahezu die zehnfache Menge erhöht (Proctor und Carpenter 2001). Wegen der erhöhten Fließrate war ein Anstieg der Konzentration des sIgA aber nicht erkennbar. Bei längerem Kauen ging die Abgabe von sIgA zurück, blieb aber immer noch etwa vierfach erhöht. Offensichtlich förderte Mastikation auch die Transcytose des in den Plasmazellen synthetisierten IgA durch die Epithelzellen der Basalmembran. Es muss angenommen werden, dass IgA in den Plasmazellen im Überschuss produziert wird. Somit führt verstärktes Kauen auch zur Prävention oraler Erkrankungen.

Die Mizellen des Speichels enthalten auch sIgA (Soares et al. 2004), das zusammen mit anderen Speichelproteinen in die Pellikel überführt wird. Die Adsorption von sIgA an verschiedensten Dentalmaterialien wurde mehrfach belegt (Ahn et al.

2. Literaturüberblick

2002, 2003, Busscher et al. 1997, Cantarero et al. 1980, Lee et al. 2001). Hannig und Joiner (2006) führen es in ihrer Liste der Speichelkomponenten der in vivo gebildeten Pellikel auf und nach Lendenmann et al. (2000) ist es ein Hauptprotein der Pellikel. Die Adhäsion von *C. albicans* an Epithelzellen wurde nach Umazume et al. (1995) durch Vorinkubation mit Speichel von gesunden Probanden um 60 % gesenkt. Ein gleicher Effekt ist für Hydroxylapatit diskutiert worden (Cannon et al. 1995). SIgA wurde auch in der Pellikel und Plaque auf Prothesen sowie in der Pellikel auf Bakterien und in der Zahnplaque gefunden (Edgerton et al. 1987). Allerdings könnten IgA-Proteasen von *S. sanguis* das sIgA abbauen und seine antibakterielle Aktivität zerstören (Hannig et al. 2005).

2.2.9. Immunglobulin G

Der Hauptbestandteil aller im Blutplasma vorkommenden Immunglobuline ist Immunglobulin G. Es ermöglicht die Phagozytose, indem es Oberflächenantigene bindet (Schmidt und Thews 1995). Über das Sulcusfluid gelangt IgG aus dem Plasma in den Speichel (Tenovuo 1998). Dort kommt es nur in geringer Menge vor. Die Konzentration des IgG im Speichel steigt bei Entzündungen der Gingiva an (Grahn et al. 1988). Bei Totalprothesenträgern konnte eine vergleichsweise niedrigere Konzentration von IgG im Speichel festgestellt werden. Der Grund ist wahrscheinlich der fehlenden Gingivasulcus (Narhi et al. 1994).

Immunglobulin G wurde mehrfach als Pellikelbestandteil nachgewiesen (Hannig und Joiner 2006). Es ist in der Lage, sich sowohl an Bakterien als auch an Hydroxylapatit anzulagern. Zu beachten ist aber, dass es leichter als sIgA von Proteasen abgebaut wird (Taubman und Smith 1976).

2.2.10. Kalzium

Aktiver Transport und Bindung an Proteine während der Exocytose ermöglichen es dem Kalzium, in den Primärspeichel der Acinuszellen zu gelangen. Im Speichel kommt Kalzium nur zu 45 % in freier Form vor, 10 % sind an Proteine ge-

2. Literaturüberblick

bunden und 40 % an Phosphate, Ziträt und Laktat. Als Hydrogencarbonat ist Kalzium zu 5 % gebunden (Meckel et al. 1979). Die Konzentration im Speichel schwankt im Tagesverlauf und korreliert mit der Blutkonzentration (Ferguson 1989). Die Konzentration im unstimulierten Gesamtspeichel beträgt $1,35 \pm 0,45$ mmol/l und bei Stimulation $1,7 \pm 1,0$ mmol/l (Ferguson 1989).

Kalzium ist im Zusammenwirken mit Phosphat und einigen Speichelproteinen an der Modulation von Demineralisation und Remineralisation der Zähne beteiligt (Humphreys und Williamson 2001). Hierzu trägt auch das Statherin bei, indem es übersättigte Lösung von Kalzium- und Phosphatsalzen stabilisiert. Durch seine Bindung an Hydroxylapatit könnte Statherin zur Bildung der Pellikel als Schutzschicht für den Schmelz beitragen. Zusammen mit Histatinen, Cystatinen und prolinreichen Proteinen kontrolliert es das Kristallwachstum, indem es das Eindringen von Mineralsalzen ermöglicht und das Austreten von Mineralien verhindert. Kalziumionen werden durch saure prolinreiche Proteine des Speichels gebunden und können so in die Pellikel gelangen. Von dort aus ist Kalzium bei hohen Konzentrationen an der Remineralisation des Zahnschmelzes beteiligt (Nieuw Amerongen et al. 2004). Bei Patienten mit parodontalen Erkrankungen war die Konzentration an Kalzium im Speichel erhöht (Sewon et al. 1998). Der stimulierte Speichel von Rauchern weist in Verbindung mit Parodontalerkrankungen jedoch eine geringere Konzentration an Kalzium auf (Zuabi et al. 1999).

Durch Kalziumionen kann die Anhaftung von Speichelproteinen an Oberflächen wie PMMA beeinflusst werden, denn die positiv geladenen Kalziumionen lagern sich durch elektrostatische Wechselwirkungen an die negativ geladene Oberfläche von Festkörpern an. Dadurch wird die Ladung der Oberfläche geändert, und es wird sauren Proteinen ermöglicht, dort anzuhafte (Steinberg et al. 1995).

Kalziumionen können aber unter gewissen Bedingungen auch einen gegenteiligen Einfluss auf die Mundgesundheit ausüben. Die zytotoxische Aktivität von Histatin 5 gegen *Candida*-Pilze wurde zum Teil durch Kalziumionen ab einer physiologischen Konzentration von 1 mmol/l in vitro inhibiert (Dong et al. 2003). Der Haupteffekt des extrazellulären Kalziums liegt nach diesen Autoren darin, dass Kalzium die Bindung von Histatin 5 an Zellen von *C. albicans* bzw. seine Auf-

2. Literaturüberblick

nahme in die Zelle inhibiert. Dadurch geht dann der letztlich für den Zelltod verantwortliche Ausfluss von ATP zurück.

2.3. Pellikel

Pellikel ist eine Biopolymerschicht aus Proteinen und Glykoproteinen des Speichels, die sich über verschiedene Bindungsformen auf allen Oberflächen der Mundhöhle bildet, die mit Speichel in Kontakt kommen (Hannig 1994, 1999). Sie entsteht durch selektive Adsorption von Speichelproteinen und begünstigt die Plaqueentstehung durch ihre Fähigkeit zur bakteriellen Adhärenz. Die Bildung einer Pellikel steht somit am Beginn von Karies und Parodontopathien. Die Pellikel ist erworben, azellulär und bakterienfrei (Dawes et al. 1963; Armstrong 1967; Leach 1967; Mayhall 1970; Sönju und Rölla 1973; Mayhall 1975; Sönju und Glantz 1975; Kousvelari et al. 1980; Bennick et al. 1983; Rykke et al. 1990). Die Herausbildung einer Pellikel gilt als Voraussetzung für alle Interaktionen an der Grenzfläche zwischen Speichel und Zahn bzw. Zahnersatz.

Pellikel besitzt aber nicht nur die unerwünschte Eigenschaft zur Plaquebildung, sondern ihr werden auch protektive Eigenschaften zum Schutz des Zahnschmelzes vor Säuren und somit vor Karies zugesprochen (Lendenmann et al. 2000, Slomiany et al. 1990, Meurman und Frank 1991, Moss 1998, Amaechi et al. 1999, Hannig und Balz 1999). Dieser Schutz ist jedoch an eine mehrtägige Verweildauer der Pellikelschicht an der Zahnoberfläche gebunden (Featherstone et al. 1993). Des Weiteren wird durch die Pellikel die Friktion zwischen antagonistischen Zähnen sowie zwischen Zähnen und der oralen Mucosa herabgesetzt. Diese Eigenschaften reduzieren die Abrasion während der Mastikation und bei parafunktionellen Prozessen wie dem Bruxismus (Lendenmann et al. 2000; Nikiforuk 1985). Die Pellikel stellt eine semipermeable Membran dar, die durch ihre selektive Permeabilität den Mineralisierungszustand des Zahnschmelzes beeinflusst (Moreno und Zahradnik 1979; Zahradnik et al. 1977, 1978).

Da die Sekretion des Speichels aus den verschiedenen Drüsen ungleichmäßig erfolgt (Dawes und MacPherson 1993; Sas und Dawes 1997), sind die Biopolymere

2. Literaturüberblick

des Speichels für die Pellikelbildung lokal differenziert (Hannig 1997, 1999; Carlén et al. 1998). Eine Vielzahl an Untersuchungen über die Pellikel bezieht sich auf die Betrachtung der Affinität zum Zahnschmelz. Unter den Bedingungen des Mundhöhlenmilieus ist die Schmelzoberfläche mit einem Kristallgitter aus Hydroxylapatit vergleichbar. Sie wird von elektrolythaltigem Speichel umspült. Dadurch bildet sich an der Schmelzoberfläche eine elektrostatische Doppelschicht aus, die überwiegend aus negativ geladenen Phosphatgruppen und in Lösung gegangenen, positiv geladenen Kalziumionen des Schmelzes besteht. An der Zahnoberfläche entsteht somit eine elektrisch neutrale Schicht (König 1987).

Makromoleküle adsorbieren an der Grenzfläche zwischen Zahnschmelz und Speichel vorwiegend durch elektrostatische Bindungen. Diese entstehen durch die Phosphatgruppen des Hydroxylapatits sowie den in Lösung gegangenen Kalziumionen der Schmelzoberfläche und den entgegengesetzt geladenen Makromolekülen (Rölla 1982, Moreno et al. 1982, Kousvelari et al. 1988). Die Pellikelschicht besteht vorwiegend aus Phosphoproteinen (Embery et al. 1986; Juriaanse et al. 1981; Juriaanse und Booiy 1979) und sauren prolinreichen Proteinen mit einer hohen Affinität zur Oberfläche des Hydroxylapatits (Bennick et al. 1983, Kousvelari et al. 1988). Daneben kann die Bindung auch auf Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophoben Wechselwirkungen, kovalenten Bindungen, Dispersionskräften und van der Waals'schen Kräften beruhen (Hannig 1994). Auch Proteine aus Sulcusfluid sowie bakterielle Proteine können an der Bildung der Pellikel beteiligt sein (Sönju 1986). Diese Biopolymerschicht kann sich auf allen organischen und anorganischen Oberflächen ausbilden, die mit Speichel in Kontakt kommen (Lendenmann et al. 2000; Hannig 1994, 1997, 1999).

Die unterschiedlichen Mengenanteile der Proteine in der Pellikel im Vergleich zum Speichel sind ein Beleg für die selektive Adsorption von Speichelkomponenten an oralen Oberflächen (Johnsson et al. 1993; Rykke et al. 1990). An der Schmelzoberfläche adsorbieren überwiegend saure, prolinreiche Proteine. Das lässt den Schluss zu, dass saure Speichelproteine auch am Aufbau der Pellikel beteiligt sind (Lendenmann et al. 2000; Al-Hashimi und Levine 1989; Rykke et al. 1989; Kuboki et al. 1987; Eggen und Rölla 1983, 1982). Saure prolinreiche Prote-

2. Literaturüberblick

ine der Pellikel begünstigen auch die Anhaftung von Bakterien an der Zahnoberfläche (Gibbons et al. 1990, Gibbons 1989; Gibbons und Hay 1989, 1988).

Die Bildung der Pellikel auf Oberflächen mit Speichelkontakt verläuft sehr schnell. Eine initiale Adsorption von Speichelproteinen beginnt schon nach wenigen Sekunden (Hannig 1999). Auch die Zunahme der Schichtstärke der Pellikel verläuft anfangs rasch und danach langsam und kontinuierlich (Ericson et al. 1982). Nach 30 - 60 Minuten hat sich eine locker formierte, globuläre oder globulär strukturierte Schicht herausgebildet, die sich später verdichtet (Nyvad und Fejerskov 1987; Skjörland et al. 1995; Sönju Clasen et al. 1997; Hannig 1999). Nach 45 Minuten (Skjörland et al. 1995) bzw. 90 Minuten (Kuboki et al. 1987; Sönju und Rölla 1973) kommt es zu keiner weiteren Zunahme des Volumens oder Änderung der Zusammensetzung der Pellikel. Nach zwei Stunden werden die Lingualflächen der Zähne mit einer 20 - 80 nm starken, homogenen, vorwiegend granulär strukturierten Pellikel bedeckt (Hannig 1999).

An der Bildung der Pellikel sind außer den Proteinen und Glykoproteinen des Speichels auch Plasmaproteine, Enzyme, Immunglobuline, Blutgruppensubstanzen und Enzyme bakteriellen Ursprungs beteiligt. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnten IgG, IgM, IgA, Lysozym, α -Amylase, Laktoperoxidase, Transferrin, Lactoferrin, Albumin und Fibrinogen nachgewiesen werden (Lendenmann et al. 2000). Weiterhin wurde Glykosyltransferase gefunden (Al-Hashimi und Levine 1989; Rölla et al. 1983). Die Bindungen an Schmelz sind z. T. sehr fest, denn nach einer Desorption konnten noch enzymatische Aktivitäten für Amylase, Lysozym, Glykosyltransferase und Laktoperoxidase an der Schmelzoberfläche nachgewiesen werden (Rölla et al. 1983; Rölla und Embery 1977). Obwohl die Grundlagen für die spezifische Bindung der Proteine an die Schmelzoberfläche bis heute nicht gänzlich geklärt sind (Lendenmann et al. 2000), ist bekannt, dass das Affinitätsverhalten der Speichelproteine unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Die Phosphoserine gehen die stärkste Bindung zu Hydroxylapatit ein (Hay 1967).

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich die Aminosäurezusammensetzung in der Pellikel mit differenzierten Bildungszeiten (Rykke und Sönju 1991) oder bei verschiedenen Probanden (Rykke et al. 1990) und für ver-

2. Literaturüberblick

schiedene Regionen der Mundhöhle (Sönju 1975) kaum unterscheidet, obwohl der Speichel aus den verschiedenen Speicheldrüsen in seiner Aminosäurezusammensetzung variierte. Lediglich die Pellikel von Milchzähnen zeigte gegenüber bleibenden Zähnen einen abweichenden Aminosäuregehalt (Sonju Clasen et al. 1997). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die meisten Festkörperoberflächen der Mundhöhle von einer Pellikelschicht überzogen sind, die in ihrer Aminosäurezusammensetzung annähernd gleich ist (Lendenmann et al. 2000).

Die Pellikel enthält auch 20 % Lipide. Slomiany et al. (1986, 1990) entdeckten in der Pellikel freie Fettsäuren, Cholestrin, Cholesterinester, Triglyceride, Phospholipide und eine große Anzahl an Glykolipiden. Die Lipidzusammensetzung der Pellikelschicht variierte individuell stark in Abhängigkeit von der Kariesaktivität, während die Aminosäurezusammensetzung der Pellikel unverändert blieb.

In vitro konnten in der Pellikel auch Kohlenhydrate wie Glukose, Fruktose, Galaktose, Mannose, Glukosamine, Galactosamine und verschiedene Sialinsäuren festgestellt werden (Mayhall 1977, 1970; Mayhall et al. 1976; Sönju et al. 1974; Hay 1969). Da im Speichel nur geringe Mengen an Glykoproteinen bekannt waren (Hay 1969), wurde geschlussfolgert, dass der Hauptteil der Glukose in der Pellikel von bakteriell gebildeten Polysacchariden stammt (Sönju et al. 1974) oder auf Glycolipide zurückzuführen ist (Slomiany et al. 1986). Nach heutigem Kenntnisstand gehören die Speichelmuzine zu den Hauptglykoproteinen des Speichels. Die Muzine MG1 und MG2 werden von allen mukösen Speicheldrüsen produziert und liegen bei 20 - 30 % der Speichelproteine (Niedermeier et al. 2000). Hochmolekulares MG1 ist nach längerer Inkubation von Schmelz in Speichel ein Bestandteil der Pellikel. Für die Barrierefunktion gegen Protonen ist es unverzichtbar. Durch die hydrophilen Eigenschaften von MG1, die durch seine Kohlenhydrat-Seitenketten bedingt sind, bewirkt die Pellikel auch eine Lubrikation der Zahnflächen. Sialinsäuren als Bestandteil spezifischer Rezeptormoleküle ermöglichen es den Bakterien, an der Pellikelschicht zu adsorbieren (Hannig 1994).

Erst durch rasterelektronenmikroskopische und transmissionselektronische Untersuchungen an in-vivo gewonnener Pellikel konnten komplexere Ultrastrukturen aufgeklärt werden (Hannig 1999; Nyvad und Fejerskov 1987). Durch Transmissi-

2. Literaturüberblick

onsmikroskopie konnte auch die Penetration von fibrillären Fortsätzen der Pellikel in den Zahnschmelz nachgewiesen werden (Hannig 1989).

Die Angaben zur Schichtstärke der Pellikel variieren von wenigen Nanometern bis zu mehreren Mikrometern, wobei die Untersuchungsmethoden, die Pellikelbildungszeit und die Lokalisation am Zahn entscheidend sind (Hannig und Bössmann 1989). Generell wird die Pellikelschichtstärke dort, wo eine gute Selbstreinigung der Zähne möglich ist, mit 30 bis 100 nm angegeben. In schwer zugänglichen Bereichen wie dem Approximalraum kann die Pellikel dagegen bis auf 2 μm anwachsen und deshalb schon als Plaque betrachtet werden. Hannig (1999) konnte die Ultrastruktur einer sich in-vivo bildenden Pellikel über einen Zeitraum von 24 Stunden dokumentieren. Bereits nach einer Minute hatte sich an den bukkalen Flächen der Zähne eine Pellikel mit einer homogenen, fein granulären und elektronendichten Proteinbasis in einer Stärke von 10 - 20 nm ausgebildet. Nach 10 Minuten und noch stärker nach 30 Minuten zeigte sich eine heterogene, globuläre Schicht, die einen losen Kontakt zur elektronendichten Basis aufwies. Nach 45 Minuten ist die Pellikelbildung abgeschlossen. Innerhalb von 10 Stunden war kein Anstieg der Adsorption von Proteinen mehr nachweisbar (Skjorland et al. 1995). Hannig (1999) spricht von einem dynamischen Prozess, in dem sich Proteinbindung und -freisetzung abwechseln, so dass die Schichtstärke und die Geschwindigkeit der Pellikelbildung nicht exakt angegeben werden können.

Die Struktur der Pellikel ist stark heterogen, mit granulären und globulären Anhäufungen von adsorbierten Makromolekülen. Nach 24 Stunden besteht eine dichte, homogene, granuläre Struktur mit einer Stärke von 1000 - 1300 nm. Die anfänglich elektronendichte Pellikelbasisschicht konnte stets beobachtet werden. Sie wird durch initial adsorbierte Speichelproteine, insbesondere die Phosphoproteine, die innerhalb von Sekunden eine starke Bindung zum Hydroxylapatit eingehen, gebildet. Die auf lingualen Zahnflächen gebildete Pellikelschicht ist mit einer Schichtstärke von 30 - 200 nm erheblich schwächer und auch die Komplexität der Ultrastruktur ist deutlich geringer. Das ist durch die Aktivität der Zunge an diesen Flächen zu erklären. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten eine variabel strukturierte äußere Pellikelschicht, welche auf einer elek-

2. Literaturüberblick

tronendichten Pellikelbasis aufgelagert ist. Diese zweischichtige Pellikelbildung wurde von mehreren Autoren beschrieben (Rölla und Rykke 1994; Hannig und Bössmann 1989; Lie 1977). Der Beginn der Pellikelbildung ist durch eine schnelle Adsorption von Speichelproteinen auf der Schmelzoberfläche gekennzeichnet. Im zweiten Schritt adsorbieren globuläre Proteinaggregate und führen somit zu einer schnellen Zunahme der Pellikelschicht. Dabei lagern sich die meisten Speichelproteine der Gll. parotidea in Proteinaggregaten mit einem Durchmesser von 100 - 200 nm zusammen. Die Speichelproteinaggregate auf den lingualen Zahnflächen ähneln der globulär gebildeten Struktur auf den Bukkalflächen (Rykke et al. 1996). Es wird vermutet, dass die globulären Proteinstrukturen einen mizellartigen Aufbau mit hydrophobem Kern und hydrophiler Oberfläche besitzen (Rykke et al. 1995).

3. Material und Methodik

3.1 Probanden

Als Probanden stellten sich freiwillig 25 gesunde Studenten und Mitarbeiter der Klinik und Polikliniken für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universität Rostock zur Verfügung. Es handelte sich um 19 weibliche und 6 männliche gesunde Probanden im Alter zwischen 17 und 52 Jahren bei einem mittleren Alter von $28,1 \pm 11,7$ Jahren.

Die Studie war vor Beginn der Untersuchungen der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock vorgelegt und von ihr für ethisch unbedenklich erklärt worden. Alle an der Studie beteiligten Probanden wurden vor Beginn der Untersuchungen über Zielstellung und Umfang der Studie informiert.

3.2. Probengewinnung

3.2.1. Herstellung der Prüfkörper aus PMMA

Es wurden 600 zylindrische Probekörper aus Polymethylmethacrylat-Heißpolymerisat nach dem Verfahren SR-Ivocap „Plus“ high impact (Ivoclar-Vivadent, Ellwangen, Deutschland) hergestellt. Dazu wurden modellierte Wachsstangen in Küvetten mit Gips eingebettet, ausgebrüht und in Kunststoff überführt. Anschließend wurden die Probekörper ausgearbeitet und, wie für Prothesen üblich, an der Poliermaschine auf Hochglanz poliert. Da eine Sterilisation nicht möglich war, wurde jeder Probekörper nur ein Mal verwendet. Die Probekörper hatten eine Höhe von 4,10 cm und einen Durchmesser von 0,79 cm. Daraus ergab sich eine Gesamtoberfläche von 11,16 cm². Die Abmessungen wurden so gewählt, damit die Probekörper genau in die verwendeten Reaktionsgefäße passten und demzufolge nur wenig Eluatlösung zur vollständigen Benetzung der Oberfläche nötig war. Hierdurch konnte die Konzentration der Speichelparameter im Eluat möglichst hoch gehalten werden. Aus hygienischen Gründen sind die Prüfkörper nach ihrer Fertigstellung in Folie eingeschweißt worden.

3.2.2. Speichelgewinnung

Für die Bestimmung der Speichelparameter wurde mastikatorisch stimulierter Gesamtspeichel genutzt. Auf die Gewinnung von unstimuliertem Speichel ist verzichtet worden, weil davon ausgegangen werden kann, dass die zu untersuchenden Prüfkörper bei der Lagerung und Bewegung im Mund einen stimulierenden Reiz auf den Speichelfluß ausgeübt haben.

Die Gewinnung der Speichelproben erfolgte immer am Vormittag zwischen 8.00 Uhr und 12.00 Uhr. Die Probanden verpflichteten sich, eine zweistündige Nahrungskarenz vor Beginn der Untersuchungen einzuhalten. Außerdem ist darauf geachtet worden, dass die morgendliche Zahnpflege mehr als zwei Stunden zurück lag. Auf eine Mundspüllösung sollte verzichtet werden. Es bestand ein Rauchverbot für den Zeitraum der Untersuchungen.

Der stimulierte Speichel wurde nach der Fließmethode von Navazesh et al. (1982) gewonnen. Die Probanden mussten 5 Minuten auf einem 6 x 12 mm großen Parafinzyylinder kauen, um die Speicheldrüsen zu aktivieren. Der so gewonnene Speichel ist kontinuierlich aktiv ausgespien und in ein gekühltes Zentrifugenglas gegeben worden, dessen Leergewicht im Vorfeld bestimmt wurde. Nach der Probenentnahme wurden die Zentrifugengläser sofort mit einem Gummistopfen verschlossen und bis zur Analyse kontinuierlich weiter gekühlt.

Um das Volumen des gewonnenen Speichels zu erhalten, ist das Netto-Speichelgewicht bestimmt und daraus unter Annahme einer Speicheldichte von 1g/ml Speichel auf das Volumen geschlossen worden. Von den gewonnenen Speichelproben wurde 1 ml entnommen und mit 1 mol/l NaCl im Verhältnis 1:1 versetzt. Dadurch wurden vergleichbare Vorraussetzungen bezüglich der Desorptionlösungen mit 0,5 mol/l NaCl geschaffen. Die so vorbehandelten Speichelproben sind zwei Stunden lang im Kühlschrank bei 8 °C inkubiert und anschließend 15 Minuten lang in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C und 3000 U/min zentrifugiert worden. Der Speichelüberstand wurde dann in Reaktionsgefäßen aus Polyethylen portioniert und für spätere Untersuchungen sofort bei -20 °C eingefroren. Vor der Analyse wurden die Speichelproben in einem Zeitraum von

3. Material und Methodik

12 Stunden bei 8 °C aufgetaut und mit einem Vortexmischer durchmischt. Für die Berechnung der Ergebnisse ist der Verdünnungsfaktor 2 berücksichtigt worden, der sich aus der Vorbehandlung des Speichels ergab.

Die Bestimmung der Peroxidase-Aktivität erfolgte sofort im unbehandelten stimulierten Speichel. Dafür wurde der restliche Speichel, der bei der Vorbehandlung übrig geblieben war, in der Kühlzentrifuge bei 4 °C und 3000 U/min für 15 Minuten zentrifugiert. Die Analyse der Speichelperoxidase-Aktivität erfolgte am Überstand.

Eine Wiederholung der Untersuchungen ist bei den selben Probanden nach vier Wochen in einer zweiten Serie durchgeführt worden.

3.2.3. Gewinnung und Verarbeitung der Prüfkörperproben

Nach der Gewinnung der Gesamtspeichelproben erfolgte die Gewinnung der Prüfkörperproben. Hierzu wurden die Prüfkörper zur Pellikelbildung im Mund des Probanden belassen und lutschend bewegt. Nach 30 Minuten sind die Prüfkörper mit einer gummierten zahnärztlichen Pinzette entnommen und der anhaftende Speichel mit bidestilliertem Wasser abgespült worden. Die Prüfkörper kamen zum Abtrocknen auf Fließpapier und anschließend in Reaktionsgefäße aus Polyethylen, die zur Desorption mit je 500µl 0,5 mol/l NaCl gefüllt waren. Der innere Durchmesser der Reaktionsgefäße war ca. 1 mm größer als jener der Probekörper. Die verschlossenen Reaktionsgefäße wurden zur Desorption der adhärennten Speichelkomponenten im Kühlschrank zwei Stunden bei 8 °C inkubiert. Anschließend wurde das Desorbat jedes Prüfkörpers mit Pipetten in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C eingefroren. Für die Untersuchungen wurden die Proben über einen Zeitraum von 12 Stunden bei 8 °C aufgetaut. Das aufgetaute Desorbat wurde mit dem Vortexmischer durchmischt und mit Pipetten in Microcon-Zentrifugenröhrchen der Firma Millipore (Schwalbach, Deutschland) mit einer Ausschlussgrenze von 3000 Dalton überführt. Die darüber liegenden Lösungsbestandteile wurden durch Zentrifugation mit der Hochgeschwindigkeitszentrifuge Biofuge 13 der Firma Heraeus (Hanau, Deutschland) 20 Minuten lang bei

3. Material und Methodik

12000 U/min und Raumtemperatur zurückgehalten. Eiweißhaltige Lösungen können auf diese Weise konzentriert werden. Das oberhalb der Membran verbliebene Retentat ist dadurch um den Faktor zwei konzentriert worden. Der Konzentrierungsfaktor konnte durch Wiegen vor und nach der Zentrifugation ermittelt werden und ist bei der Berechnung der Ergebnisse berücksichtigt worden. Das Retentat, das aus etwa 350 µl Desorbat gewonnen wurde, konnte für die weiteren Untersuchungen verwendet werden. Dieser Arbeitsschritt war bei allen Proben gleich, da bei Voruntersuchungen festgestellt worden war, dass mit einer sehr geringen Konzentration bzw. Aktivität der Speichelkomponenten in der Desorptionslösung zu rechnen ist.

Die Analyse der Speichelkomponenten Gesamteiweiß, Peroxidase, Lysozym, gesamte Proteasen, Protease-Inhibitoren, α -Amylase, sIgA, und IgG erfolgte in dem Retentat, das durch Zentrifugation gewonnen wurde. In dem Zentrifugat, in dem sich die Bestandteile befanden, die nicht durch die Membran zurückgehalten wurden, konnten die Nachweise von Thiozyanat Calcium und Kalium durchgeführt werden.

Zur Überprüfung des Desorbats der Prüfkörper auf Restspeichel wurde Kalium bestimmt. Kalium, als anorganischer Bestandteil des Speichels, reichert sich nicht in der Pellikel an. Da kein Kalium im Desorbat nachweisbar war, konnte sichergestellt werden, dass kein Restspeichel bei der Analyse mit erfasst wurde. Die Analysen erfolgten im Analyseautomaten der Firma Beckmann Synchron LX-System des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Universität Rostock.

3.3. Analysenmethoden

3.3.1. Bestimmung des Gesamtproteingehalts

Die Bestimmung von Gesamteiweiß erfolgte mit dem Protein Assay ESL (Exact, Sensitive, Low interference) der Firma Roche (Mannheim, Deutschland). Das Prinzip der Untersuchungsmethode basiert auf einer Biuret-ähnlichen Reaktion, bei der Cu^{2+} -Ionen zunächst mit Proteinen im alkalischen Medium komplexieren.

3. Material und Methodik

Der Überschuss an Cu^{2+} wird durch Ascorbinsäure zu Cu^+ reduziert und bildet dann mit Bathocuprin einen farbigen Komplex. Dieser Komplex kann photometrisch erfasst werden. Die Extinktion wurde gegen einen Probenleerwert bei einer Wellenlänge von 485 nm am Spekol 221 der Firma Zeiss (Jena, Deutschland) bestimmt. Die Messgröße ist dabei negativ proportional zur Anzahl der Peptidbindungen. Die Analyse der Proben und der Standardreihe erfolgte in Doppelbestimmung. Die Ergebnisse wurden gemittelt. An Hand einer Standardkurve konnte aus der Extinktion die Eiweißkonzentration ermittelt werden. Als Standard diente Rinderserum-Protein der Firma Roche. Bei der Berechnung der Eiweißkonzentration im Speichel musste der Verdünnungsfaktor und bei der Berechnung der Eiweißkonzentration im Eluat der Prüfkörper der Konzentrationsfaktor berücksichtigt werden. Die Eiweißmenge wurde in mg/l angegeben.

Zur Bestimmung von nicht desorbiertem Gesamteiweiß wurden die Probekörper nach dem Desorptionsschritt mit bidestilliertem Wasser abgespült, durch vorsichtiges Abtupfen getrocknet und in ein Reaktionsgefäß mit 600 μl des Reagenzes A (alkalische Kupfertartrat-Lösung) gelegt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Prüfkörper wieder entfernt und 150 μl der verbliebenen Lösung mit Reagenz B versetzt. Nach kurzem Mischen wurde hiervon ein Aliquot in eine Halbmikroküvette überführt und die Extinktion sofort bestimmt.

3.3.2. Bestimmung der Peroxidase

Die Peroxidaseaktivität wurde zunächst nach der Methode von Mansson-Rahemtulla et al. (1986) bestimmt. Grundsätzlich wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und anschließend der Mittelwert gebildet. Die Untersuchung erfolgte mit Thionitrobenzoesäure (NBS) als Substrat. Der NBS-Nachweispuffer bestand aus 5,5-Dithiobis(-2-nitrobenzoesäure), Mercapthoethanol und 0,1 mol/l Phosphatpuffer pH 5,6. Von dem NBS-Nachweispuffer wurden 1500 μl mit 50 μl KSCN-Stammlösung (3,0 mmol/l in 0,1 mol/l Phosphatpuffer pH 7,6) und 50 μl Testlösung versetzt und in einer Meßküvette gemischt. Vor dem Start wurde die Extinktion dieser Lösung bestimmt. Sie musste einen Mindestwert von

3. Material und Methodik

$E(470)=0,800$ überschreiten. Dadurch war sichergestellt, dass NBS als Substrat im Überschuss vorlag. Durch Zugabe von 75 μl Wasserstoffperoxid-Arbeitslösung (100 $\mu\text{mol/l}$) wurde dann die Reaktion gestartet. Die Extinktionsdifferenz pro Minute wurde bei einer Wellenlänge von 412 nm am Spekol 221 aus der Extinktion nach 20 Sekunden und nach 80 Sekunden ermittelt. Nach der Formel $(E(20)-E(80)) \times 2617,6$ konnte hieraus die Aktivität der Peroxidase berechnet werden. Sie wird in Unit pro Liter angegeben. Die Peroxidaseaktivität des vorbehandelten Speichels wurde zusätzlich mit dem Faktor zwei multipliziert. Die Aktivität der Peroxidase im Desorbat der Prüfkörper wurde durch den Konzentrationsfaktor dividiert.

Für die Bestimmung der am Prüfkörper verbliebenen Restaktivität der Peroxidasen wurden wie beschrieben 1500 μl NBS-Nachweispuffer mit 50 μl KSCN-Stammlösung und 75 μl Wasserstoffperoxid-Arbeitslösung vermischt und die Extinktion dieser Lösung sofort bestimmt. Unmittelbar danach wurden 600 μl dieser Reaktionsmischung auf den nach Desorption abgespülten und trocken getupften Prüfkörper in ein Polyethylenröhrchen gegeben. Nach einer Minute wurde der Probekörper entfernt und die Extinktion der Lösung erneut bestimmt. Die Differenz zur Extinktion der Reaktionsmischung vor Kontakt mit dem Prüfkörper ergab dann die Extinktionsänderung pro Minute, aus der sich wieder die Aktivität der Peroxidase berechnen ließ.

Eine weitere Bestimmung der Peroxidase erfolgte mit Guajakol. Diese Methode schließt die durch Bakterien gebildete Peroxidase aus. Somit ist eine Aussage über die in den Speicheldrüsen gebildete Peroxidase möglich. Für die Bestimmung wurden 500 μl Phosphatpuffer (10 mmol/l; pH 7,0), 1 ml Guajakol-Stammlösung (20 mmol/l) und 50 μl Testlösung in eine Küvette gegeben. Am Spekol wurde nun die Extinktion bei einer Wellenlänge von 470 nm auf Null gestellt. Nach Zugabe von 10 μl Wasserstoffperoxid-Lösung (10 mmol/l) wurde die Reaktion gestartet und mit einer Stoppuhr die Zeit bestimmt, die benötigt wurde, um eine Extinktionsänderung von $\Delta E = 0,050$ zu erreichen. Guajakol wird nicht stöchiometrisch umgesetzt. Für die Auswertung musste deshalb die Einheit durch Normierung

3. Material und Methodik

festgelegt werden. Eine normierte Einheit U der Peroxidase entspricht einer Extinktionsänderung von $\Delta E = 1,000$ pro Minute (Chance und Maehly 1955).

Für die Bestimmung der am Prüfkörper verbliebenen Restaktivität der Guajakol-Peroxidase wurden wieder 500 μl Phosphatpuffer mit 1ml Guajakol-Stammlösung sowie 50 μl aqua dest. plus 10 μl Wasserstoffperoxid gemischt und die Extinction bei 470 nm bestimmt. Sofort danach wurden 600 μl dieser Reaktionsmischung in ein Polyethylenröhrchen mit dem Prüfkörper nach Desorption gegeben. Nach genau einer Minute wurde der Prüfkörper entfernt, die Lösung sofort in eine Halbmikroküvette überführt und die Extinktion bei 470 nm bestimmt. Aus der Differenz zur Extinction vor dem Prüfkörperkontakt wurde unter Annahme eines linearen Reaktionsverlaufs die Zeit berechnet, die für ein $\Delta E = 0,050$ benötigt worden wäre. Hieraus ist wiederum die normierte Peroxidase-Aktivität berechnet worden.

3.3.3. Bestimmung des Thiocyanats

Der Nachweis von Thiocyanat erfolgte mit Hilfe der Methode von Betts und Dainton (1953). Alle Analysen wurden in Mehrfachbestimmung durchgeführt. Dafür sind 75 μl Probe mit 1000 μl 0,9 %iger Natriumchloridlösung gemischt worden. Von diesem Gemisch wurden 500 μl entnommen und mit 1000 μl Reagenzlösung [50 g $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ in 25 ml 4HNO_3 gelöst und auf 1 Liter aufgefüllt] vermischt. Der entstandene Farbkomplex wurde nach 10 Minuten photometrisch gegen einen Reagenzleerwert bei 460 nm am Spekol 221 gemessen. Für die Eichkurve ist eine Stammlösung aus Kaliumthiocyanat in Humanserumalbumin-Lösung verwendet worden. Auf diese Weise konnte die Konzentration von Thiocyanat unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors in mmol/l ermittelt werden. Für die mit NaCl vorbehandelten Speichelproben wurde der Faktor zwei als Multiplikator berücksichtigt. Bei der Bestimmung im Desorbat wurde durch den Konzentrationsfaktor dividiert.

Für die Bestimmung der Restmenge Thiozyanat am mit 0,5 mol/l NaCl desorbieren Prüfkörper wurden 500 μl 0,9 %iger Natriumchloridlösung mit 1000 μl Eisen-Reagenzlösung vermischt und davon 600 μl auf den Prüfkörper gegeben. Nach

3. Material und Methodik

10 Minuten wurde der Prüfkörper entnommen und die Reaktionslösung in eine Halbmikro-Küvette überführt. Aus der Extinktion bei 460 nm ergab sich dann die Thiozyanatmenge am Prüfkörper.

3.3.4. Bestimmung des Lysozyms

Der Nachweis von Lysozym ist jeweils in Mehrfachbestimmung durchgeführt worden. Die Bestimmung der Lysozymaktivität erfolgte durch die Geldiffusionstechnik nach der Methode von Ossermann und Lawlor (1966). Als Substrat wurde der lyophilisierte Bakterienstamm *Micrococcus lysodeikticus* verwendet. Vom Testkeimpulver des Bakterienstammes wurden 20mg mit 2 ml Phosphatpuffer nach Sørensen (pH 7,2) und 20 ml 1%-iger Agaroselösung gemischt. Die Suspension wurde auf völlig ebenen Glasplatten ausgegossen. Nach dem Erstarren der Gelplatten wurden definierte Löcher in das Gel gestanzt, in welche 20 µl Testlösung bzw. Eichlösung kamen. Für jeden Testansatz ist eine Eichreihe mitgeführt worden. Die Stammlösung wurde aus 10 mg Hühnereiweiß-Lysozym (Boehringer, Mannheim) in 20 ml Phosphatpuffer hergestellt. Die durch Verdünnung erhaltene Eichlösungen unterschiedlicher Konzentration (100, 50, 10, 5, 1 µg/ml) wurden in ausgestanzte Löcher in den Gelplatten gegeben und bei jeder Testreihe mitgeführt. Die befüllten Testplatten wurden bei 37 °C über einen Zeitraum von 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Dann wurden die Durchmesser d der entstandenen Lysishöfe dreifach vermessen und daraus der Mittelwert pro Stanloch gebildet. Aus der mitgeführten Eichreihe wurde die Eichgerade auf halblogarithmischem Papier mit $\log c$ gegen d aufgetragen. Die aus dem mittleren Durchmesser erhaltenen Aktivitäten des Lysozyms in mg/l sind demnach relative Aktivitäten, die auf die Aktivität von Hühnereiweiß-Lysozym der angegebenen Konzentrationen bezogen sind. Durch die Vorbehandlung des Speichels mit 1 mmol/l NaCl musste die gemessene Aktivität mit dem Faktor zwei multipliziert werden.

Durch die Vorbehandlung des Speichels wird die Komplexbildung von Lysozym an Speichelkomponenten aufgelöst. Aus diesem Grund beziehen sich alle errech-

3. Material und Methodik

neten Werte auf die Aktivität des gesamten Lysozyms und nicht nur auf das in freier Form vorliegende Enzym. Nach der Multiplikation mit dem vorgegebenen Faktor konnte die Lysozymkonzentration in $\mu\text{g/ml}$ angegeben werden.

3.3.5. Bestimmung der α -Amylase

Die Ermittlung von α -Amylase erfolgte jeweils in Doppelbestimmungen. Die Untersuchungen sind im Institut für Klinische Chemie und Pathochemie der Universität Rostock durchgeführt worden. Die Aktivität der α -Amylase wurde mit dem enzymatischen Farbttest „ α -Amylase EPS Flüssig (5+1)“ der Firma NODIA / Dr. Norbert Frische (Kirchhain, Deutschland) erfasst. Photometrisch wurden die optische Dichte bei 405 nm am Beckmann-Autoanalyser Synchron LX (München, Deutschland) ermittelt.

Der Messbereich dieses Gerätes ist für den Serumbereich ausgelegt. Um in den Messbereich des Gerätes zu kommen, wurden die Speichelproben nochmals mit 0,9 %iger NaCl-Lösung im Verhältnis 1:500 verdünnt. In Vorversuchen an Probekörpern war ermittelt worden, dass das Retentat nicht verdünnt werden musste. Die Speichelwerte wurden mit den Verdünnungsfaktoren multipliziert. Die Werte der Prüfkörper wurden durch den Konzentrierungsfaktor dividiert. Die Aktivität der α -Amylase wurde in der internationalen Einheit U/l angegeben.

3.3.6 Bestimmung der Gesamtprotease

Die Analysen der Gesamtprotease erfolgten im stimulierten Gesamtspeichel und im konzentrierten Retentat des Prüfkörperdesorbats in Einfachbestimmung. Der Nachweis der Aktivität der Gesamtprotease wurde auf der Grundlage des Anwenderbeispiels „Universelles Protease-Substrat“ der Firma Boehringer (Mannheim, Deutschland) mit Resorufin-markiertem Kasein als Substrat erbracht. Durch die Einwirkung der Protease auf das Kasein werden Resorufin-markierte Peptide freigesetzt, die nicht mit Trichloressigsäure fällbar sind. Sie werden als Messgröße für die gesamte proteolytische Aktivität benutzt und sind nach Angaben des Her-

3. Material und Methodik

stellers besonders gut zum Nachweis geringer Protease-Aktivitäten geeignet. Für die Bestimmung der proteolytischen Aktivität wurden 50 µl des Substrates (Resorufin-markiertes Kasein 0,4 % in aqua bidest.), 50 µl Inkubationspuffer (0,2 mol/l TRIS/HCl pH 7,8 mit Zusatz von 0,02 mol/l CaCl_2) und 100 µl der Probe verwendet. Jeweils dreimal 50 µl Substrat, 50 µl Inkubationspuffer und 100 µl aqua bidest. wurden zusätzlich zur Herstellung des Leerwertes gemischt. Im Brutschrank wurden die Proben für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 480 µl Stopp-Reagenz (5 % Trichloressigsäure in aqua bidest.) gestoppt. Danach wurde für weitere 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Proben in der Hochgeschwindigkeitszentrifuge Biofuge 13 (Heraeus, Hanau, Deutschland) 5 Minuten bei 12000 U/min zentrifugiert. Vom Überstand wurden 400 µl mit 600 µl Testpuffer (0,5 mol/l TRIS/HCl, pH 8,8) versetzt und gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 574 nm photometrisch am Spekol 221 gegen einen Leerwert bestimmt. Die Multiplikation der Extinktionsdifferenz mit dem Umrechnungsfaktor 143,1 ergibt die gesamte proteolytische Aktivität in Units pro Liter.

Zur Bestimmung der nicht-desorbierten Restaktivität der Proteasen wurden die Prüfkörper in einem Polyethylenröhrchen mit 600 µl Reaktionsmischung (150 µl Substrat-Lösung + 150 µl Inkubationspuffer + 300 µl aqua bidest.) 60 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Prüfkörper wieder entfernt und 200 µl der Reaktionsmischung mit 480 µl Trichloressigsäure-Lösung als Stopp-Reagenz versetzt. Die weitere Verarbeitung bis zur Aktivitätsbestimmung erfolgte dann wie bei den Flüssigkeitsproben.

3.3.7. Bestimmung der Gesamtprotease-Inhibitoren

Die Untersuchungen der Gesamtprotease-Inhibitoren erfolgten am vorbehandelten stimulierten Speichel und im Retentat des Prüfkörper-Desorbats in Einfachbestimmung. Die Aktivität der Gesamtprotease-Inhibitoren wurde nach dem selben Prinzip wie die Bestimmung der Gesamtprotease durchgeführt, nachdem der Spei-

3. Material und Methodik

Speichel bzw. das Retentat zuvor mit Papainlösung im Verhältnis 1:1 versetzt und inkubiert worden war. Papain diente als Testprotease, die im Überschuss vorlag. Ihre Aktivität wurde in Abhängigkeit von der Menge des in der Probe vorhandenen Inhibitors verringert. Nach dieser Vorinkubation erfolgte die Bestimmung der Gesamtprotease-Aktivität sowohl in der Papain-Probe-Mischung als auch in der reinen Papainlösung. Als Messansatz für den Papainwert wurde 60 µl Papainlösung und 60 µl aqua bidest. gemischt. Das abgespaltene Resorufin ist auch hier die photometrisch messbare Größe. Die Extinktion wurde wieder bei 574 nm am Spekol 221 gegen einen Leerwert gemessen und von der Extinktion der reinen Papainlösung substrahiert.

Durch Multiplikation mit dem Faktor 143,1 konnte die Aktivität der Protease-Inhibitoren als Aktivitätsabfall des Papains errechnet und in der standardisierten internationalen Einheit U/l angegeben werden. Die vorbehandelten Speichelproben wurden mit dem Faktor zwei berücksichtigt. Die Werte des Retentats der Prüfkörper wurden durch den Konzentrationsfaktor dividiert.

Für die Bestimmung der Restaktivität der Protease-Inhibitoren am Prüfkörper, der zuvor mit NaCl-Lösung desorbiert worden war, wurde der Prüfkörper in einem Polyethylengefäß mit 600 µl Papain-Arbeitslösung (Papain-Stammlösung 1:1 mit aqua bidest.) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgten an dieser Lösung und an der reinen Papain-Arbeitslösung Bestimmungen der Protease-Aktivität nach dem beschriebenen Verfahren. Die Aktivität der Protease-Inhibitoren ergab sich wieder als Differenz der Protease-Aktivitäten in U/l.

3.3.8. Bestimmung des sekretorischen Immunglobulin A

Die Bestimmungen des sekretorischen Immunglobulin A ist in stimuliertem Speichel und im konzentrierten Retentat des Desorbarts in Einfachbestimmungen durchgeführt worden. Die Untersuchungen erfolgten mit dem Enzymimmunoassay „Monoclonales sekretorisches IgA-Plus“ der Firma Immuno Pharmacology Resarch (Catania, Italien). Das sekretorische Immunglobulin A konkurriert dabei mit einem sIgA, das an der Festplatte fixiert ist, um die Bindungsstellen einer mo-

3. Material und Methodik

noklonalen antisekretorischen Komponente einer Maus. Die Menge des monoklonalen Antiserums, die an den Polystyrolwänden festgehalten wird, ist umgekehrt proportional zur Menge der Probe. Nach einem Waschvorgang wird durch ein mit Peroxidase markiertes Anti-IgA-Serum ein zweiter polyklonaler Antikörper auf die Festplatte aufgebracht. Nach einem weiteren Waschvorgang erfolgt die Bestimmung der gebundenen Peroxidaseaktivität. Die an den Wänden fixierte Enzymaktivität ist umgekehrt proportional zur Menge an sIgA der Proben. Sie wird durch eine Farbreaktion bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 405 nm wird die Extinktion gemessen und gegen einen Leerwert abgelesen. Anhand einer Standarddeichkurve, die mit humanen konzentrierten sIgA erstellt wurde, erfolgte die Auswertung. Durch die Multiplikation mit einem in der Arbeitsanweisung vorgeschriebenen Faktor konnte die Konzentration in µg/ml angegeben werden.

Für die Bestimmung der Restmenge des sIgA an den desorbierten Prüfkörpern wurden diese wieder in Kryogefäße aus Polyethylen gelegt und mit 300 µl des monoklonalen Anti-SC-Antiserums bedeckt. Die Gefäße wurden verschlossen und 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Röhrchen entleert und dreimal mit Waschlösung gewaschen. Nach vollständiger Entfernung der letzten Waschlösung wurden 300 µl verdünntes Konjugat aus IgG-Antiserum von der Maus, konjugiert mit alkalischer Phosphatase, hinzugegeben, das Gefäß verschlossen und wieder bei 37 °C inkubiert. Die Kryogefäße wurden verschlossen und während der Inkubationsperiode kontrolliert, damit nicht eine zu intensive Gelbfärbung entstand. Diese Zeit wurde notiert, die Reaktion durch Stoppreagenz abgebrochen und die Extinktion bei 405 nm bestimmt. Da die Methode nicht durch Vergleich mit einer Standardlösung quantifizierbar war, wurde die Menge des gebundenen sIgA nur als relative sIgA-Aktivität angegeben:

$$\text{sIgA-Aktivität [\%]} = (\text{Extinktion bei 405 nm}) * 100/t$$

mit t = Zeit für die Farbentwicklung in Minuten.

3.3.9. Bestimmung des Immunglobulin G

Der Nachweis von Immunglobulin G im vorbehandelten stimulierten Speichel erfolgte wie die Bestimmung des konzentrierten Retentats des Desorbats der Prüfkörper nur in einer Messreihe. Eine Bestimmung von IgG direkt am Prüfkörper war aus technischen Gründen nicht möglich. Die Untersuchung wurde nach der Methode der radialen Immundiffusion mit dem Testkit „Humanes IgG-UL Nano-rid“ der Firma „The Binding Site“ (Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. In die vorgefertigten Stanzlöcher der vorgefertigten Agarosegel-Platten wurden 20 µl Probe gegeben. Das IgG als Antigen diffundiert radial aus dem zylindrischen Stanzloch und reagiert mit einem passenden monospezifischen Antikörper im Gel. Bei der Bildung der Antigen-Antikörper-Komplexe entsteht ein Ring im Agarosegel. Die Ringgröße nimmt so lange zu, bis ein Gleichgewicht von Bildung und Abbau des Komplexes eingetreten ist. Dabei besteht eine lineare Beziehung zwischen dem Quadrat des Ringdurchmessers und der Konzentration des Antigens. Bei jedem Ansatz wurden ein Kontrollserum und ein Kalibrator doppelt mitgeführt. Eine Eichgerade konnte aus den ermittelten Ringdurchmessern erstellt werden. An Hand der Ringdurchmesser der Probe konnte anschließend die Konzentration des IgG bestimmt werden. Die Platten wurden in einer feuchten Kammer gelagert und die Ringdurchmesser nach 96 Stunden dreifach gemessen und danach die Messwerte gemittelt. Bei den Prüfkörperproben musste nach jeweils 30 Minuten drei mal nachpipettiert werden, da die Konzentration sehr gering war. Diese Verstärkung der eingesetzten Menge wurde anschließend durch Division mit 4 berücksichtigt. Die Ergebnisse wurden in µg/ml angegeben.

3.3.10. Bestimmung von Kalium und Kalzium

Die Untersuchungen von Kalium und Kalzium erfolgten sowohl im stimulierten Speichel als auch im Zentrifugat des Desorbates der Prüfkörper nach der Konzentrierung mit den Microcon-Zentrifugenröhrchen in Einfachbestimmungen. Die Bestimmungen der Konzentrationen erfolgten mit einem Beckmann-Autoanalyser

3. Material und Methodik

am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Universität Rostock. Das Synchron LX-System bestimmt die Konzentration durch direkte Potenziometrie mit Hilfe einer kaliumselektiven bzw. kalziumselektiven Elektrode und einer Natriumreferenzelektrode. Durch die Multiplikation eines vorgegebenen Faktors konnten die Konzentrationen von Kalium und Kalzium in mmol/l angegeben werden.

3.4. Umrechnung und Statistik

Damit die Adsorption von Speichelkomponenten an unterschiedlichen Werkstoffen verglichen werden kann, muss die Adsorption pro Flächeneinheit berechnet werden. Die Untersuchungen ergaben primär sowohl für Speichel als auch für das Desorbat der Prüfkörper die Konzentrationen (als mg/l bzw. mmol/l) oder die Aktivitätskonzentrationen (U/l) der Komponenten. Konnten keine Speichelkomponenten nachgewiesen werden, wurde die Messung als Ausfall gewertet. Um nun die Adsorption pro Flächeneinheit berechnen zu können, wurde aus der Konzentration im Desorbat und dessen Volumen die absolute Menge bzw. Aktivität der von den Prüfkörpern desorbierten Speichelkomponenten berechnet:

$$M_{\text{ABS}} = C_{\text{Desorbat}} * V_{\text{Probe}}$$

(C_{Desorbat} = Konzentration bzw. Aktivitätskonzentration in der Desorptionslösung [.../μl], V_{Probe} = Desorptionsvolumen [μl]). Durch die Division von M_{ABS} mit der Prüfkörper-Oberfläche konnte dann die Menge bzw. die Aktivität pro cm² Fläche ermittelt werden, die durchgehend mit dem Symbol ...EF bezeichnet wurde:

$$\text{...EF [Menge/cm}^2\text{]} = M_{\text{ABS}} / A$$

(A = Prüfkörperfläche = 11,14 cm²).

Auf analoge Weise wurde auch die Menge der am Prüfkörper verbliebenen, nicht desorbierten Anteile berechnet:

$$M_{\text{PK}} = C_{\text{PK}} * V_{\text{PK}}$$

Hierbei bezeichnet M_{PK} die am Prüfkörper verbliebene Menge, V_{PK} [in μl] das Volumen der Reaktionslösung über dem Prüfkörper und C_{PK} [in .../μl] die

3. Material und Methodik

scheinbare Konzentration der untersuchten Komponente, die sich aus der Nachweisreaktion am Prüfkörper errechnen ließ. Durch die Division von M_{PK} mit der Prüfkörper-Oberfläche konnte dann die Menge bzw. die Aktivität pro cm^2 Fläche ermittelt werden, die durchgehend mit dem Symbol ...PF bezeichnet wurde:

$$\text{...PF [Menge/cm}^2\text{]} = M_{PK} / A$$

($A = \text{Prüfkörperfläche} = 11,14 \text{ cm}^2$).

Aus diesen beiden Angaben ergab sich dann die insgesamt am Prüfkörper nachgewiesene Menge der jeweiligen Speichelkomponente:

$$\text{...PGF [Menge/cm}^2\text{]} = \text{...EF} + \text{...PF.}$$

Um die adsorbierten Speichelkomponenten an den Prüfkörpern mit den Konzentrationen im Speichel vergleichen zu können, wurde eine hypothetische Konzentration C_H an den Prüfkörpern errechnet. Bei ihrer Berechnung wurde von der Hypothese ausgegangen, dass die nachgewiesene absolute Menge (M_{ABS}) eines Stoffes, der in einem bestimmten Volumen des Desorbats nachgewiesen wird, aus einer 0,1 mm starken Speichelschicht D_H , die auf den Probekörpern haftet, entstammt (Collins und Dawes 1987). Das hypothetische Volumen V_H der „Speichelschicht“, die dem Prüfkörper aufliegt, errechnet sich durch Multiplikation der Prüfkörperoberfläche A mit der hypothetischen Schichtstärke $D_H = 0,1 \text{ mm} = 0,01 \text{ cm}$ und ergibt ein hypothetisches Volumen (V_H) von $0,1114 \text{ cm}^3$ oder $111,4 \mu\text{l}$. Die hypothetische Konzentration (C_H) eines Stoffes in der Speichelschicht mit dem Volumen (V_H) berechnet sich dann wie folgt:

$$C_H = C_{\text{Desorbat}} * V_{\text{Desorbat}} / V_H$$

$$C_H = M_{ABS} / V_H$$

Wegen der Beziehung $\text{Volumen} = \text{Fläche} * \text{Höhe}$ ergibt sich die hypothetische Konzentration vereinfacht auch bei Division der Größe ...EF [Menge pro cm^2] durch die Schichtdicke 0,01 cm. Diese hypothetischen Konzentrationen bzw. Aktivitätskonzentrationen wurden durchgehend mit ...PV bezeichnet.

3. Material und Methodik

Alle Daten wurden zunächst mit einem Ausreißertest nach Sachs (1992) auf Plausibilität getestet. Hiernach wurden alle Messwerte, die außerhalb des Bereichs $MW \pm 4*s$ [mit MW = Mittelwert und s = Standardabweichung, berechnet ohne den/die fraglichen Wert(e)] lagen als Ausreißer gewertet und für die weitere Datenverarbeitung entfernt, d.h. sie wurden zu einem Ausfallwert.

Alle Auswertungen und statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Programmpaket „SPSS 12.0.1. für Windows“ der Firma SPSS GmbH Software (München, Deutschland). Die angewandten Testverfahren gehen von einer Normalverteilung der untersuchten Variablen aus, die durch den Kolmogorov-Smirnov-Test bestätigt wurde. Die Beschreibung der Daten erfolgte durch das arithmetische Mittel und die Standardabweichung sowie durch die Angabe von Minimum und Maximum.

Der Vergleich von zwei Messreihen erfolgte in der Regel mit dem t-Test für abhängige Stichproben („gepaarter t-Test“). Lagen in Einzelfällen zu wenig Messwertepaare vor, wurden die Messreihen wie unabhängige Stichproben behandelt und durch den einfachen t-Test auf signifikante Unterschiede getestet. Beim einfachen t-Test und beim gepaarten t-Test wurde das Signifikanzniveau im zweiseitigen Test zugrunde gelegt.

Zusammenhänge zwischen zwei Variablen, z. B. beim Vergleich zweier Messreihen oder beim Vergleich der Speichelkonzentration mit der hypothetischen Konzentration, wurden durch die Linearkorrelation nach Pearson untersucht. Das Signifikanzniveau der Korrelation wurde im einseitigen Test bestimmt.

Um die Streuung der Messwerte miteinander zu vergleichen, wurde der Variationskoeffizient herangezogen. Er berechnet sich nach der Formel:

$$VK [\%] = (s/MW)*100.$$

Bei allen Tests wurde ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,050$ für die statistische Signifikanz gewählt.

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Analysen werden anhand der Mittelwerte (MW) und der dazugehörigen Standardabweichung beschrieben und der Bereich der Messergebnisse durch Minimum (Min) und Maximum (Max) angegeben.

Ausgangspunkt für die Untersuchungen war die Bestimmung der Konzentrationen bzw. der Aktivitäten der analysierten Speichelkomponenten. Zunächst erfolgte eine allgemeine Charakterisierung des gesammelten stimulierten Nüchterngesamtspichels. Die durchschnittliche Fließrate betrug hierbei $1,711 \pm 0,955$ ml/min. Der pH-Wert lag bei durchschnittlich $7,142 \pm 0,198$. Der CO_2 -Partialdruck hatte einen durchschnittlichen Wert von $3,273 \pm 0,728$ kPa, der Gehalt an Bicarbonat betrug im Mittel $9,006 \pm 3,668$ mmol/l und die mittlere Basenabweichung lag bei $-17,816 \pm 6,913$ mmol/l. Abbildung 1 illustriert diese Ergebnisse, Tabelle 1 enthält die statistischen Maßzahlen.

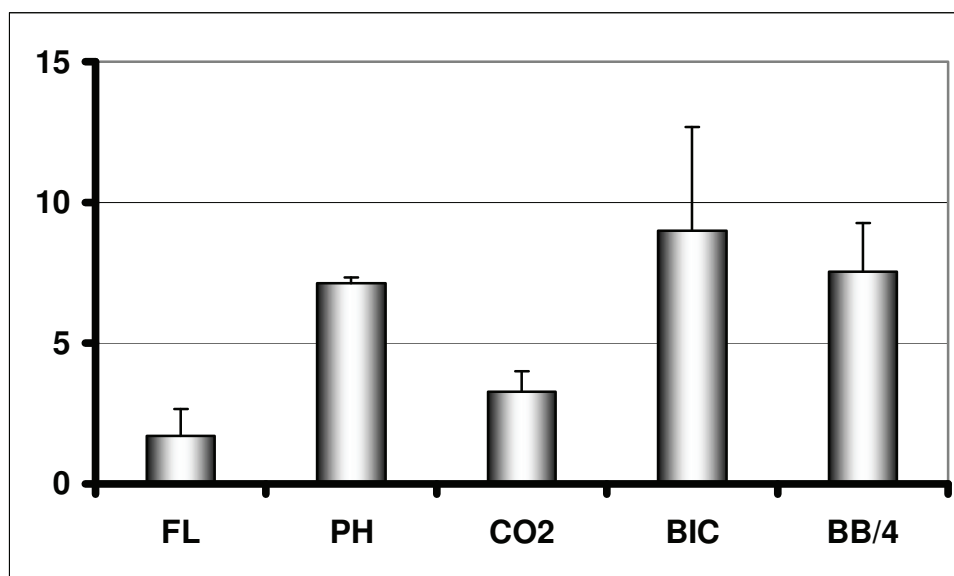


Abb. 1: Allgemeine Charakterisierung des stimulierten Nüchterngesamtspichels (FL = Fließrate [ml/min], PH = pH-Wert, CO2 = Kohlendioxid-Partialdruck [kPa], BIC = Bikarbonat-Konzentration [mmol/l], BB = gesamte Pufferbasen [mmol/l] {BB = BE + 48})

4. Ergebnisse

Tab. 1: Statistische Angaben zur allgemeinen Charakterisierung des stimulierten Nüchterngesamtspichels

Variable	MW	s	n	Min	Max
Fließrate [ml/min]	1,711	0,955	25	0,71	3,87
pH	7,142	0,198	25	6,79	7,42
Partialdruck CO ₂ [kPa]	3,273	0,728	25	1,98	4,93
Bikarbonat [mmol/l]	9,006	3,668	25	3,40	17,85
Basenabweichung [mmol/l]	-17,816	6,913	25	-30,10	-4,60

Alle in dieser Arbeit untersuchten Speichelkomponenten konnten in den Speichelproben eindeutig nachgewiesen werden. Sie bewegen sich in einem Bereich, der für gesunde Personen als normal betrachtet werden kann.

Die Daten der untersuchten Variablen wurden alle im Vorab mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung untersucht. Es ergaben sich nur wenige signifikante Abweichungen von der Normalverteilung. Deshalb wurden die statistischen Auswertungen durchgehend mit Hilfe der entsprechenden parametrischen Tests vorgenommen.

Wie aus den jeweiligen Tabellen der Messwerte zu ersehen ist, wurden bei den Angaben zu den Desorptionslösungen nur diejenigen Angaben in die Berechnung einbezogen, bei denen der Messwert größer als Null bzw. größer als die Messgenauigkeit war.

4.1. Speichelparameter im stimulierten Nüchterngesamtspichel

Abbildung 2 illustriert zunächst die Befunde für Thiozyanat, Proteasen und Protease-Inhibitoren, die in zwei Messreihen bestimmt wurden. Thiozyanat konnte in allen Proben und Proteaseaktivität in fast allen Proben gefunden werden, wie aus Tabelle 2 hervorgeht. Protease-Inhibitoren waren bei der ersten Messreihe nur in 15 Proben nachweisbar, konnten bei der zweiten Messreihe aber

4. Ergebnisse

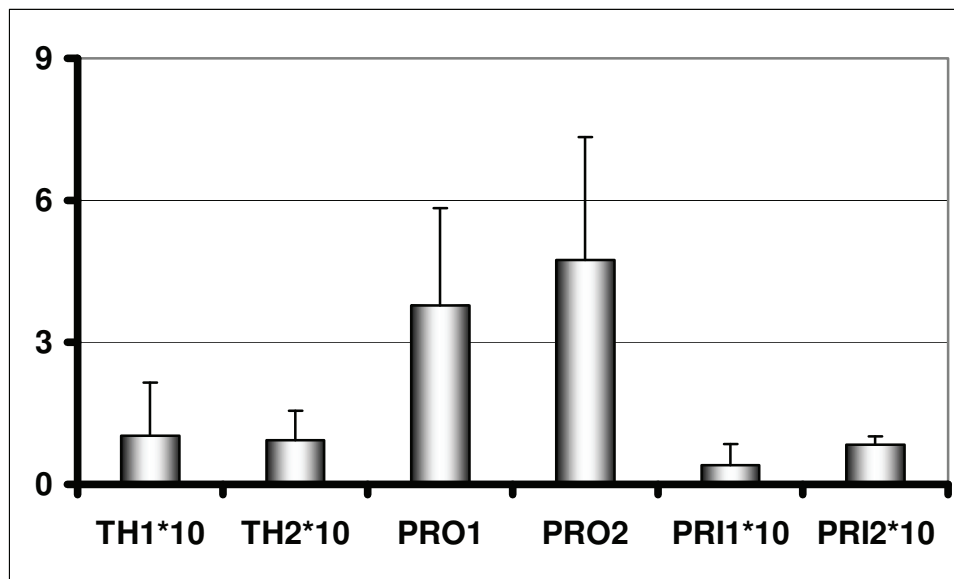


Abb. 2: Konzentrationen des Thiozyanats sowie Aktivitäten von Proteasen und Protease-Inhibitoren im stimulierten Nüchternspeichel (TH = Thiozyanat [mmol/l], PRO = Proteasen [U/l], PRI = Protease-Inhibitoren [U/l])

Tab. 2: Statistische Angaben zu Thiozyanat sowie Proteasen und Protease-Inhibitoren im stimulierten Nüchternspeichel

Variable	Reihe	MW	s	n	Min	Max	Vergleich der Reihen
Thiozyanat [mmol/l]	1	0,103	0,111	25	0,015	0,419	r= -0,067 / p=0,750 t= 0,376 / p=0,711
	2	0,093	0,062	25	0,022	0,276	
Proteasen [U/l]	1	3,778	2,064	23	1,059	7,899	r= -0,151 / p=0,493 t= -1,160 / p=0,259
	2	4,741	2,592	25	0,100	9,702	
Protease-Inhibitoren [U/l]	1	0,041	0,044	15	0	0,128	r= -0,075 / p=0,789 t= -3,118 / p=0,008
	2	0,083	0,018	25	0,051	0,117	

auch in allen Proben ermittelt werden. Dabei konnten für die Bestimmungen von Thiozyanat und Proteasen keine signifikanten Korrelationen und gleichzeitig keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messreihen festgestellt werden. Die Untersuchungen der Protease-Inhibitoren ergaben signifikant höhere Werte bei

4. Ergebnisse

der zweiten Messreihe. Eine Korrelation zwischen beiden Messreihen konnte aber auch hier nicht festgestellt werden. Insgesamt war die Aktivität der Proteasen wesentlich höher als die Aktivität der Protease-Inhibitoren.

Abbildung 3 illustriert die Aktivitäten von Lysozym, α -Amylase und Peroxidase im stimulierten Nüchternspeichel. Wie aus Tabelle 3 mit den statistischen Maßzahlen zu ersehen ist, konnten für diese Komponenten in allen Speichelproben Aktivitäten nachgewiesen werden.

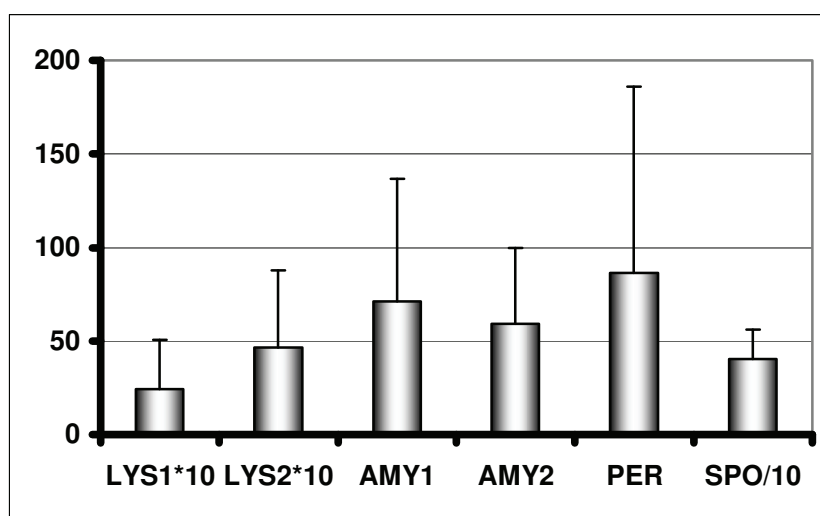


Abb. 3: Aktivitäten von Lysozym, α -Amylase und Peroxidasen im stimulierten Nüchternspeichel (LYS = Lysozym [mg/l], AMY = α -Amylase [kU/l], PER = Peroxidase mit Guajakol als Substrat [mU*/l], SPO = Peroxidase mit NBS als Substrat [U/l])

Die Bestimmung der Aktivität von Lysozym ergab für die zweite Messreihe etwa doppelt so hohe Aktivitäten wie bei der ersten Messreihe. Dieser Unterschied war signifikant. Eine Korrelation konnte zwischen den Messreihen nicht festgestellt werden. Die Untersuchungen von α -Amylase ergaben eine Tendenz für einen Zusammenhang zwischen den Messreihen. Darüber hinaus konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Messreihen ermittelt werden. Die Untersuchungen zum Gehalt der gesamten Peroxidasen erfolgten mit zwei Methoden. Jede Methode wurde nur in einer Messreihe angewandt. Die mit Guajakol als Substrat bestimm-

4. Ergebnisse

ten Gesamtperoxidasen unter Ausschluss der bakteriell gebildeten Peroxidasen korrelierten dabei signifikant mit den Aktivitäten, die mit Nitrobenzoesäure als Substrat ermittelt wurden. Ein Vergleich der Mittelwerte ist hier wegen der unterschiedlichen Definitionen für die Aktivitäten nicht möglich. Es fällt jedoch auf, dass die mit Guajakol als Substrat ermittelten Aktivitäten eine deutlich größere Streuung der Messwerte aufwiesen.

Tab. 3: Statistische Angaben für Lysozym, α -Amylase und Peroxidasen im stimulierten Nüchterngesamtspichel (PER = Peroxidase mit Guajakol als Substrat, SPO = Peroxidase mit NBS als Substrat)

Variable	Reihe	MW	s	n	Min	Max	Vergleich der Reihen
Lysozym [mg/l]	1	2,421	2,628	25	0,079	8,60	r= -0,019 / p=0,928
	2	4,634	4,155	25	0,614	19,93	t= -2,232 / p=0,035
α -Amylase [kU/l]	1	71,161	65,425	25	6,030	222,2	r= 0,378 / p=0,063
	2	59,273	40,447	25	6,030	143,1	t= 0,950 / p=0,352
PER [mU*/l]	1	86,5	99,4	25	10,0	461,5	PER mit SPO: r= 0,361 / p=0,038
SPO [U/l]	1	403,4	156,0	25	144,7	756,8	

Die Untersuchungen zu den Konzentrationen von sekretorischem Immunglobulin A, Immunglobulin G, Gesamteiweiß und von Kalzium werden in Abbildung 4 zusammengefasst. Sie zeigten für sekretorisches IgA und für Kalzium keinen signifikanten Zusammenhang und keinen signifikanten Unterschied zwischen den Messreihen, wie sich aus Tabelle 4 ergibt. Die Bestimmungen von IgG konnten nur in einer Messreihe durchgeführt werden. Die Untersuchungen des Gesamteiweißes ergaben in der zweiten Messreihe einen deutlich höheren Mittelwert, jedoch keine lineare Korrelation mit der ersten Messreihe.

4. Ergebnisse

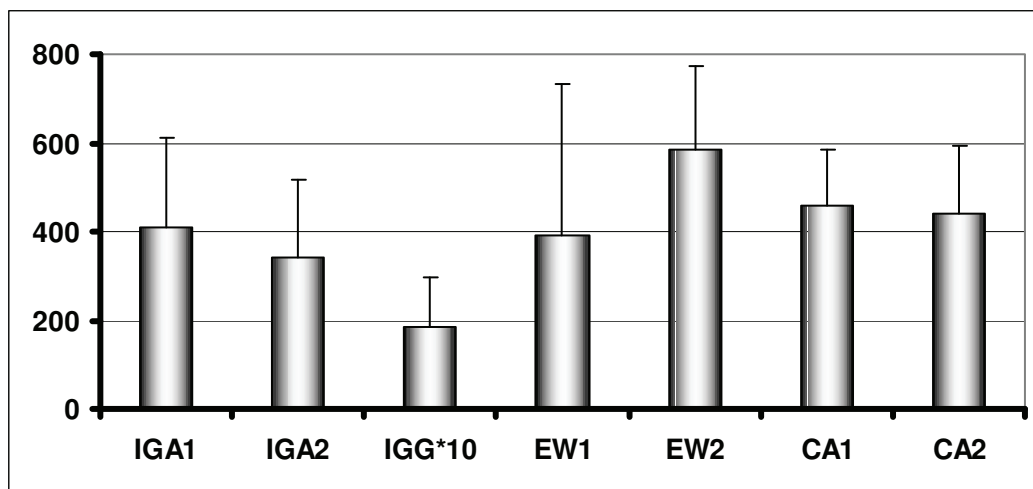


Abb. 4: Konzentrationen von sekretorischem Immunglobulin A, Immunglobulin G, Gesamteiweiß und Kalzium im stimulierten Nüchternspeichel (IGA = sekretorisches Immunglobulin A [mg/l], IGG = Immunglobulin G [mg/l], EW = Gesamteiweiß [mg/l], CA = Kalzium [mmol/l])

Tab. 4: Statistische Maßzahlen für sekretorisches Immunglobulin A, Immunglobulin G, Gesamteiweiß und Kalzium im stimulierten Nüchternspeichel

Variable	Reihe	MW	s	n	Min	Max	Vergleich der Reihen
sIgA [mg/l]	1	411,1	199,8	21	61,5	740,1	r= 0,111 / p=0,652 t= 1,455 / p=0,163
	2	343,3	173,8	19	26,0	713,3	
IgG [mg/l]	1	18,3	11,2	25	3,5	37,8	
Gesamteiweiß [mg/l]	1	391,4	342,0	25	12,5	1449,3	r= -0,109 / p=0,604 t= -2,357 / p=0,035
	2	584,1	189,4	25	225,8	881,4	
Kalzium [mmol/l]	1	0,459	0,125	25	0,250	0,760	r= -0,259 / p=0,212 t= 0,447 / p=0,659
	2	0,439	0,156	25	0,120	0,760	

4. Ergebnisse

4.2. Vom Prüfkörper desorbierte und am Prüfkörper verbliebene Mengen der Speichelparameter sowie deren hypothetische Konzentrationen

Die Mittelwerte der direkt gemessenen Konzentrationen der Speichelparameter im Eluat der Prüfkörper sind in den Abbildungen 5 bis 8 grafisch dargestellt. Die Maßeinheiten für die Konzentrationen entsprechen den Angaben für den Speichel (siehe Abschnitt 4.1). Diese Konzentrationen bzw. Aktivitätskonzentrationen waren Ausgangspunkt für die weiteren Berechnungen. Die vom Prüfkörper desorbierten bzw. am Prüfkörper verbliebenen Mengen der Speichelparameter werden in Menge pro Flächeneinheit (cm²) angegeben.

Abbildung 5 gibt zunächst einen Überblick über die Resultate für Gesamteiweiß, sekretorisches Immunglobulin A und Immunglobulin G. Es ist zu erkennen, dass bei der zweiten Untersuchung wesentlich mehr Gesamteiweiß und sekretorisches Immunglobulin A von den Prüfkörpern desorbiert wurde als bei der ersten Untersuchung.

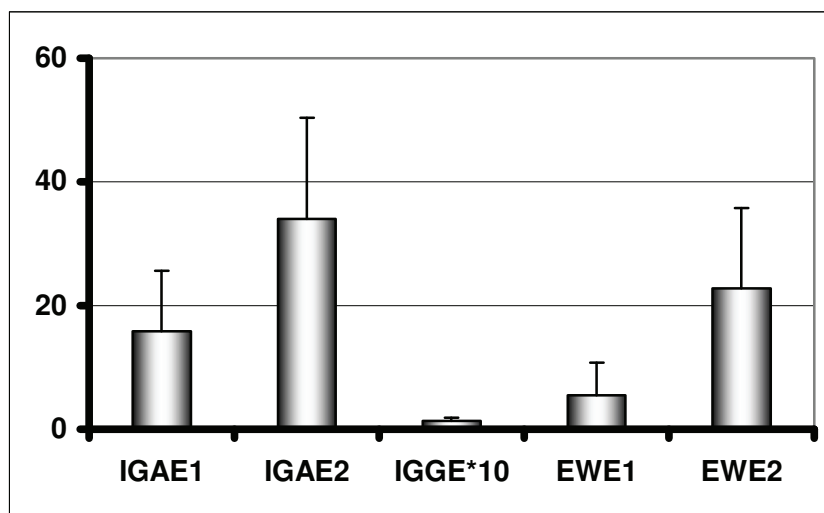


Abb. 5: Mittlere Konzentrationen von sekretorischem Immunglobulin A, Immunglobulin G sowie Gesamteiweiß im Eluat der Prüfkörper (in [mg/l])

4. Ergebnisse

Tabelle 5 fasst die Ergebnisse der Berechnungen für Gesamteiweiß zusammen. Ein Teil der Messwerte bei Messreihe 1 lag unter der Nachweisgrenze und konnte somit nicht in die Berechnungen einbezogen werden. Ein Nachweis gelang nur im Eluat von 10 Prüfkörpern. Der t-Test (gepaart und ungepaart) wies bei der zweiten Messreihe einen signifikant höheren Anteil an desorbiertem Gesamteiweiß aus. Ein Zusammenhang der eluierten Mengen bestand zwischen den beiden Messreihen nicht, wie sich aus der Korrelationsanalyse ergab.

Tab. 5: An den Prüfkörpern adsorbierte Eiweißmengen

Variable	Reihe	MW	s	n	Min	Max	Vergleich der Reihen:
EWEF [ng/cm ²]	1	97,87	94,37	10	2,36	312,9	*) r= 0,237 / p=0,509 t= -5,839 / p<0,001 ⁺⁾
	2	407,83	233,13	25	100,9	737,8	
EWPF [ng/cm ²]	2	0,803	0,257	9	0,444	1,215	**)r= -0,245 / p=0,525
EWPGF [ng/cm ²]	2	157,0	40,1	9	102,9	232,2	t=11,594 / p<0,001

*) Reihe 1 mit Reihe 2; n=10 Paare ⁺⁾ ungepaarter t-Test (n₁=10/n₂=25) :
t = -5,599 / **p < 0,001** (ungleiche Varianzen)

**) EWEF mit EWPF: Reihe 2: n=9 Paare / Menge im Eluat > Menge auf dem Prüfkörper

Bei der zweiten Messreihe wurde auch direkt an den Prüfkörpern ein Nachweis von Eiweiß vorgenommen. Er gelang bei 9 Probanden. Für diese 9 Prüfkörper betrug die im Eluat nachgewiesene, abgelöste Eiweißmenge 156,2±40,1 ng/cm². Der am Prüfkörper verbliebene Anteil von 0,803±0,257 ng/cm² war somit hochsignifikant geringer. Das belegt auch der gepaarte t-Test. Es ist anzunehmen, dass dieses Eiweiß sehr fest am Prüfkörper gebunden war. Ein Zusammenhang zu der desorbierten Gesamteiweißmenge bestand nicht, wie sich aus dem nicht signifikanten Wert für den linearen Korrelationskoeffizienten ableiten lässt.

Tabelle 6 enthält die Zusammenfassung der Berechnungen für sekretorisches Immunglobulin A. Ein Nachweis von sIgA gelang in der ersten Messreihe im Eluat von 21 Prüfkörpern und in der zweiten Messreihe an 15 Prüfkörpern. Bei der zweiten Untersuchung wurde signifikant mehr sIgA von den Prüfkörpern abgelöst, wie der gepaarte und der ungepaarte t-Test übereinstimmend ergaben. Eine

4. Ergebnisse

Korrelation bestand zwischen den beiden Messreihen nicht. Am Prüfkörper direkt konnte sIgA in der ersten Messreihe an 24 und in der zweiten Messreihe an 21 Prüfkörpern nachgewiesen werden. Diese Angaben sind aber nur relativ, da die Bestimmungen direkt am Prüfkörper nicht normiert werden konnten. Es kann davon ausgegangen werden, dass sIgA größtenteils vom Prüfkörper abgelöst wurde. Die Korrelationsanalyse ergab, dass zwischen dem abgelösten sIgA und dem am Prüfkörper verbliebenen sIgA keine oder – bei der zweiten Messreihe - nur eine sehr schwache Wechselbeziehung bestand.

Tab. 6: Vom Prüfkörper desorbierte Mengen und am Prüfkörper verbliebene relative Mengen des sIgA

Variable	Reihe	MW	s	n	Min	Max	Vergleich der Reihen:
IGAEF [ng/cm ²]	1	284,66	175,86	21	3,97	842,76	*) r= 0,210 / p=0,512 t = -3,281 / p=0,007 ⁺⁾
	2	610,69	293,19	15	292,96	1150,7	
IGAPF [%]	1	0,124	0,074	24	0,02	0,24	**) r = 0,134 / p = 0,562 t = -0,214 / p = 0,833
	2	0,130	0,054	21	0,04	0,23	
Korrelation IGAEF mit IGAPF:				Reihe 1 (n=21 Paare) r=0,199 / p=0,193; Reihe 2(n=14 Paare): r= 0,373 / p=0,095			

*) n=12 Paare ⁺⁾ ungepaarter t-Test (n₁=21/n₂=15): t = -3,841 / **p = 0,001**
(ungleiche Varianzen)

**) n=21 Paare

Die Ergebnisse für die Desorption von Immunglobulin G sind in der Tabelle 7 dargestellt. Im Eluat von 18 Prüfkörpern konnte IgG nachgewiesen werden. Die Bestimmung von Immunglobulin G am Prüfkörper direkt sowie eine Wiederholung der Messreihe waren aus technischen Gründen nicht möglich.

Tab. 7: An den Prüfkörpern adsorbierte Mengen des Immunglobulin G

Variable	Reihe	MW	s	n	Min	Max
IGGEF [ng/cm ²]	1	2,499	0,917	18	1,07	4,29

4. Ergebnisse

Im Vergleich zu den mittleren Werten für sekretorisches Immunglobulin A (Tabelle 6) lag die desorbierte Menge an IgG deutlich niedriger.

Abbildung 6 illustriert die mittleren Konzentrationen von Thiozyanat und Kalzium im Eluat der Prüfkörper. Für beide Komponenten lagen Ergebnisse aus je zwei Messreihen vor. Zwischen den Messreihen gab es bei beiden Komponenten keine wesentlichen Unterschiede.

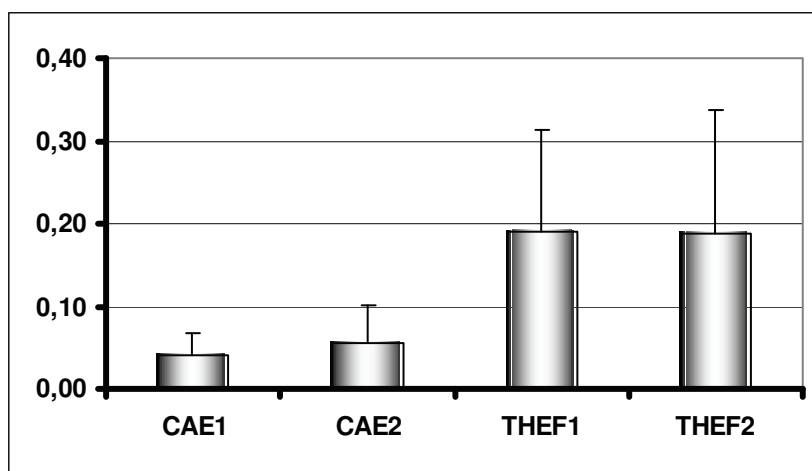


Abb. 6: Konzentrationen von Thiozyanat und Kalzium im Eluat der Prüfkörper (jeweils in mmol/l)

Tabelle 8 enthält die statistischen Angaben zu den Mengen des Thiozyanats, die von den Prüfkörpern desorbiert wurden bzw. an ihnen verblieben waren. Im Eluat konnte Thiozyanat in der ersten Messreihe an 21 Prüfkörpern und in der zweiten Messreihe bei allen 25 Probanden nachgewiesen werden. Direkt am Prüfkörper gelang der Nachweis in der ersten Messreihe bei 21 und in der zweiten Messreihe an 8 Probanden. Für 18 Probanden in der ersten Messreihe und 8 Probanden in der zweiten Messreihe ließ sich daraus eine Gesamtmenge des am Prüfkörper adsorbierten Thiozyanats berechnen. Der Vergleich zwischen den Messreihen 1 und 2 für die desorbierten Mengen ergab keinen signifikanten Unterschied. Gleichzeitig bestand auch keine Korrelation zwischen den Ergebnissen beider Messreihen. Dagegen deutete der gepaarte t-Test für die am Prüfkörper verbliebenen Mengen des Thiozyanat in der Tendenz auf einen Unterschied zwischen den Messreihen

4. Ergebnisse

hin. Der ungepaarte t-Test wies sogar auf eine signifikante Differenz zwischen den Messreihen aus. Eine Korrelation konnte aber auch hier nicht nachgewiesen werden. Der Vergleich der vom Prüfkörper desorbierten Mengen mit den am Prüfkörper verbliebenen Mengen ergab für beide Messreihen, dass zwischen ihnen kein signifikanter Unterschied, aber auch keine Korrelation bestand. Für die Gesamtmenge des am Prüfkörper adsorbierten Thiozyanats ergab sich durch den gepaarten t-Test, dass bei der zweiten Messreihe mit relativ starker Tendenz weniger Thiozyanat adsorbiert wurde, während der ungepaarte t-Test diese Differenz als signifikant auswies. Gleichzeitig bestand auch hier keine Korrelation zwischen den Werten beider Messreihen.

Tab. 8: An den Prüfkörpern adsorbierte Mengen des Thiozyanats

Variable	Reihe	MW	s	n	Min	Max	Vergleich der Reihen:
THEF	1	0,1906	0,1235	21	0,051	0,506	*) $r = 0,306 / p = 0,178$ $t = 0,306 / p = 0,763$
[nmol/cm ²]	2	0,1886	0,1487	25	0,035	0,435	
THPF	1	0,1922	0,1142	21	0,022	0,557	**) $r = 0,579 / p = 0,173$ $t = 2,080 / p = \mathbf{0,083}^{+)}$
[nmol/cm ²]	2	0,0925	0,0839	8	0,026	0,283	
THPGF	1	0,3956	0,1839	19	0,120	0,750	***) 1: $r = 0,140 / p = 0,568$ $t = -0,175 / p = 0,863$ 2: $r = -0,302 / p = 0,467$ $t = 0,437 / p = 0,675$
[nmol/cm ²]	2	0,2119	0,1312	8	0,080	0,470	
THPGF: Reihe 1 mit Reihe 2; n=6 Paare $r = 0,060 / p = 0,910$ - $t = 2,349 / p = \mathbf{0,066}^{++)}$							

*) THEF: Reihe 1 mit Reihe 2; n=21 Paare

) THPF: Reihe 1 mit Reihe 2; n=7 Paare ^{+) ungepaarter t-Test ($n_1=21/n_2=8$): $t = 2,239 / p = \mathbf{0,034}$ (gleiche Varianzen) ^{++) ungepaarter t-Test ($n_1=19/n_2=8$): $t = 2,552 / p = \mathbf{0,017}$ (gleiche Varianzen) ^{*)) Vergleich THEF mit THPF: Reihe 1: n=19 Paare; Reihe 2: n=8 Paare}}}

Tabelle 9 enthält die Angaben für das an den Prüfkörpern adsorbierte Kalzium. Es konnte eine signifikante Korrelation der Messwerte beider Messreihen ermittelt werden. Eine Differenz zwischen den Messreihen bestand nicht.

4. Ergebnisse

Tab. 9: An den Prüfkörpern adsorbierte Mengen des Kalziums pro Flächeneinheit

Variable	Reihe	MW	s	n	Min	Max	Vergleich der Reihen:
CAEF [nmol/cm ²]	1	0,713	0,514	24	0,45	2,72	*) r= 0,482 / p=0,017 t= -1,335 / p=0,195
	2	0,973	0,797	25	0,45	3,22	

*)Reihe 1 mit Reihe 2; n=24 Paare

Abbildung 7 gibt einen Überblick über die Aktivitäten der Peroxidasen und des Lysozims im Eluat der Prüfkörper. Bei den Peroxidasen wurde mit beiden Bestimmungsmethoden in der ersten Messreihe eine wesentlich höhere Aktivität im Eluat ermittelt als bei der zweiten Messreihe; dieser Unterschied war mit Nitrobenzoesäure als Substrat noch auffälliger als mit Guajakol als Substrat.

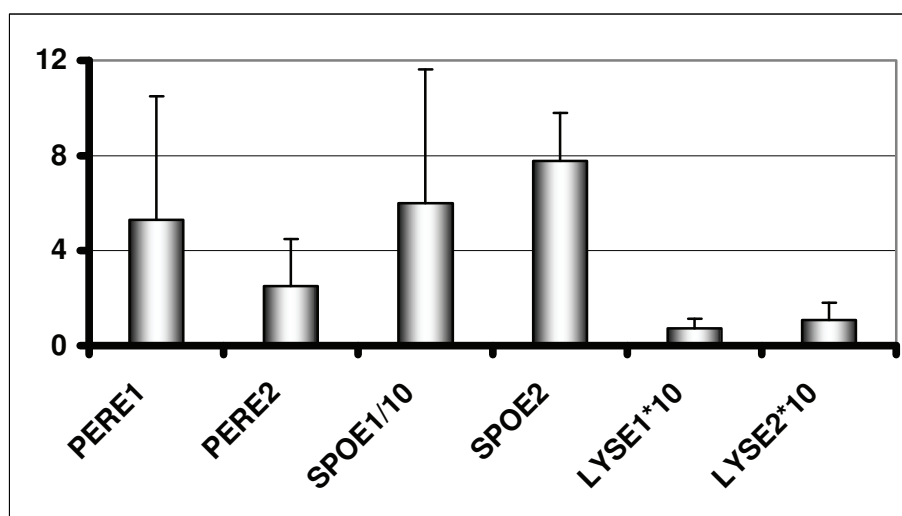


Abb. 7: Aktivitäten der gesamten Peroxidasen und des Lysozims im Eluat der Prüfkörper (PER mit Guajakol als Substrat [U*/l], SPO mit NBS als Substrat [U/l]; LYS [mg/l])

Tabelle 10 fasst die Messergebnisse für die gesamten Peroxidasen zusammen. Es konnte in allen Proben Peroxidasaktivität nachgewiesen werden. Für diese desorbierten Anteile der Peroxidasen ist für die Bestimmung mit Guajakol ein signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Messreihen festgestellt wor-

4. Ergebnisse

den, mit NBS als Substrat wurde eine Tendenz ermittelt. Dabei ist nach beiden Methoden in der ersten Messreihe signifikant mehr Aktivität von den Prüfkörpern abgelöst worden als in der zweiten Messreihe. Am Prüfkörper verblieben bis auf Ausnahmen sowohl mit Guajakol als Substrat als auch mit NBS als Substrat nachweisbare Peroxidaseaktivitäten. Sie fielen mit beiden Methoden in der ersten Messreihe höher aus als in der zweiten und es bestand keine Korrelation zwischen den Messreihen 1 und 2. Wie aus Tabelle 10a zu entnehmen ist, war bei Bestimmung mit Guajakol die am Prüfkörper verbliebene Aktivität sowohl bei Messreihe 1 als auch bei Messreihe 2 hoch signifikant größer als die desorbierte Aktivität. Gleichzeitig wurde bei Messreihe 1 keine Korrelation zwischen desorbierten und verbliebenen Aktivitäten gefunden, während sich bei Messreihe 2 eine signifikante Korrelation zwischen diesen beiden Anteilen der Peroxidaseaktivität feststellen ließ. Dagegen war bei Bestimmung mit NBS die am Prüfkörper verbliebene Aktivität sowohl in Messreihe 1 als auch in Messreihe 2 hoch signifikant kleiner als die desorbierte Aktivität. Weiterhin ergab sich in der Messreihe 1 eine signifikante Korrelation zwischen den beiden Anteilen, die aber bei der zweiten Messreihe nicht bestätigt werden konnte.

Ein Größenvergleich der mit beiden Methoden bestimmten Peroxidaseaktivitäten war wegen der unterschiedlichen Definition der Aktivitätseinheiten nicht möglich. Wie Tabelle 10b erkennen lässt, deutet die Korrelationsanalyse aber darauf hin, dass die mit beiden Methoden ermittelten desorbierten Aktivitäten stark miteinander korrelierten, während sich für die am Prüfkörper verbliebenen Aktivitäten keine signifikante Korrelation ermitteln ließ. Die Gesamtsumme der adsorbierten Aktivitäten widerspiegelte die Befunde für die desorbierten Aktivitäten in abgeschwächter Form.

4. Ergebnisse

Tab. 10: An den Prüfkörpern adsorbierte Aktivitäten der Gesamtperoxidase
(PER = mit Guajakol als Substrat; SPO = mit NBS als Substrat)

Variable	Reihe	MW	S	n	Min	Max	Vergleich der Reihen ^{*)}
PEREF [$\mu\text{U}^*/\text{cm}^2$]	1	0,0943	0,0937	25	0,006	0,384	$r = 0,418 / p = \mathbf{0,037}$
	2	0,0444	0,0354	25	0,002	0,098	$t = 2,924 / p = \mathbf{0,007}$
PERPF [$\mu\text{U}^*/\text{cm}^2$]	1	0,4548	0,2674	23	0,1847	1,0976	$r = -0,044 / p = 0,848$
	2	0,2894	0,2269	24	0,0179	0,7350	$t = 2,242 / p = \mathbf{0,036}$
PERPGF [$\mu\text{U}^*/\text{cm}^2$]	1	0,5457	0,3038	23	0,21	1,23	$r = 0,081 / p = 0,719$
	2	0,3321	0,2479	24	0,03	0,81	$t = 2,792 / t = \mathbf{0,011}$
SPOEF [$\mu\text{U}/\text{cm}^2$]	1	1077,6	1004,7	25	71,6	2503,1	$r = 0,377 / p = \mathbf{0,063}$
	2	139,5	36,2	25	81,1	203,3	$t = 4,730 / p < \mathbf{0,001}$
SPOPF [$\mu\text{U}/\text{cm}^2$]	1	9,78	8,82	25	0,81	26,1	$r = 0,223 / p = 0,294$
	2	1,51	0,15	24	1,16	1,82	$t = 4,829 / p < \mathbf{0,001}$
SPOPGF [$\mu\text{U}/\text{cm}^2$]	1	1087,4	1013,2	25	73,2	2518,7	$r = 0,380 / p = \mathbf{0,067}$
	2	141,2	36,9	24	82,6	204,9	$t = 4,842 / p < \mathbf{0,001}$

^{*)}Reihe 1 mit Reihe 2. PEREF: n = 25; PERPF und PERPGF: n = 22

Tab. 10a: Vergleich der vom Prüfkörper desorbierten mit den am Prüfkörper verbliebenen Peroxidaseaktivitäten

Variablenpaar	Reihe	N	Korrelation		t-Test	
			r	p	t	p
PEREF : PERPF	1	23	0,227	0,297	-6,643	<0,001
	2	24	0,547	0,006	-5,759	<0,001
SPOEF : SPOPF	1	25	0,966	<0,001	5,360	<0,001
	2	24	-0,132	0,538	18,309	<0,001

4. Ergebnisse

Tab. 10b: Korrelation der unterschiedlich bestimmten Peroxidaseaktivitäten

Variablenpaar	r	p	n
PEREF1 : SPOEF1	0,651	<0,001	25
PEREF2 : SPOEF2	0,510	0,005	25
PERPF1 : SPOPF1	0,146	0,253	23
PERPF2 : SPOPF2	-0,067	0,380	23
PERPGF1 : SPOPGF1	0,387	0,034	23
PERPGF2 : SPOPGF2	0,380	0,037	23

Tabelle 11 enthält die Angaben zur Lysozymaktivität, die in zwei Messreihen von den Prüfkörpern desorbiert wurde. Im Eluat gelang der Nachweis in der ersten Messreihe bei 13 Probanden und in der zweiten Messreihe bei 9 Probanden. Insgesamt handelte es sich um sehr niedrige Aktivitäten. Die statistische Analyse mit dem gepaarten t-Test war hier nicht möglich, da nur für drei Probanden paarweise Messwerte vorlagen. Der ungepaarte t-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Messreihen auf.

Tab. 11: Vom Prüfkörper desorbierte Aktivitäten des Lysozims

Variable	Reihe	MW	s	N	Min	Max	Vergleich der Reihen
LYSEF [ng/cm ²]	1	1,30	0,74	13	0,81	3,53	ungepaarter t-Test: t = -1,488 / p = 0,152
	2	1,94	1,30	9	0,46	4,74	

^{*)}Reihe 1 mit Reihe 2; n= 3 Paare

Eine Übersicht der in den Eluaten bestimmten Aktivitätskonzentrationen der gesamten Proteasen, der Protease-Inhibitoren und der α -Amylase ist Abbildung 8 zu entnehmen. Die Aktivitäten für Proteasen fielen in der ersten Messreihe größer aus als in der zweiten Messreihe und waren außerdem eine Größenordnung geringer als die Aktivitäten der Protease-Inhibitoren, bei denen gleichzeitig in der zweiten Messreihe die größeren Aktivitäten gefunden wurden. Bei der Einordnung der Aktivitäten der α -Amylase ist zu beachten, dass sie in kU/l angegeben werden.

4. Ergebnisse

Tabelle 12 fasst die statistischen Maßzahlen für α -Amylase zusammen. Es konnte an nahezu allen Prüfkörpern Amylaseaktivitäten nachgewiesen werden. Die Messwerte zeigten aber eine sehr große Streubreite.

Tab. 12: An den Prüfkörpern adsorbierte Aktivitäten der α -Amylase

Variable	MW	s	n	Min	Max
AMYEF [μ U/cm ²]	193,1	228,4	24	57,7	921,4

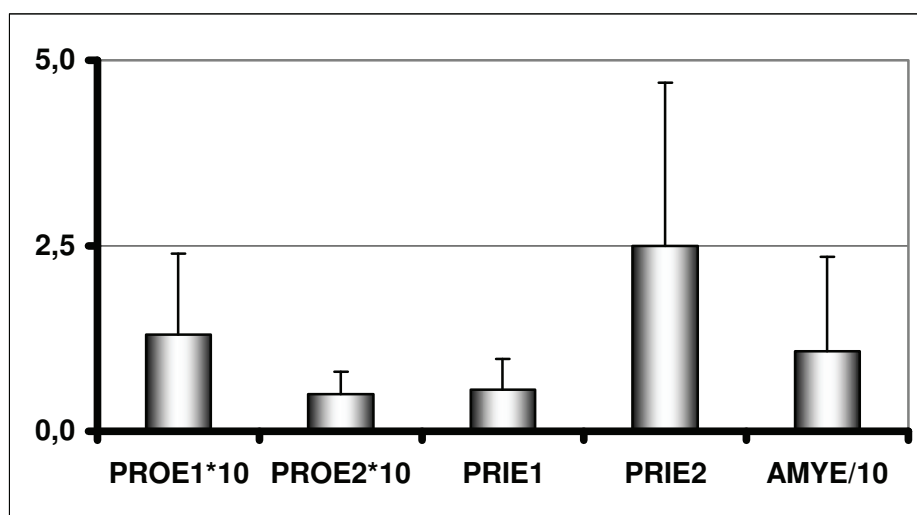


Abb. 8: Aktivitäten der gesamten Proteasen, der Protease-Inhibitoren sowie der α -Amylase im Eluat der Prüfkörper (PRO [U/l], PRI [U/l], AMY [kU/l])

Die Ergebnisse und Berechnungen zur Bestimmung der Proteasenaktivität sind in Tabelle 13 aufgeführt. Es konnte eine desorbierte Proteaseaktivität bei 12 Probanden in der ersten Messreihe und bei 16 Probanden in der zweiten Messreihe nachgewiesen werden. Die Mittelwerte waren in der ersten Messreihe höher als in der zweiten Messreihe, die Differenz erreichte aber nur im ungepaarten t-Test das Signifikanzniveau. Gleichzeitig ergab die Korrelationsanalyse einen signifikanten Zusammenhang zwischen den paarweise vorliegenden desorbierten Proteaseaktivitäten der beiden Messreihen.

4. Ergebnisse

Tab. 13: An den Prüfkörper adsorbierte Aktivitäten der Proteasen

Variable	Reihe	MW	s	n	Min	Max	Vergleich der Reihen
PROEF [$\mu\text{U}/\text{cm}^2$]	1	2,32	1,92	12	0,19	5,22	*) $r = -0,867 / p = 0,012$ t = 1,542 / $p = 0,174$ +)
	2	0,89	0,56	16	0,08	2,11	
PROPF [$\mu\text{U}/\text{cm}^2$]	2	0,013	0,011	16	0,002	0,050	**) $r = -0,270 / p = 0,482$
PROPGF [$\mu\text{U}/\text{cm}^2$]	2	0,912	0,497	9	0,12	1,75	t = 5,384 / p = 0,001

*) Reihe 1 mit Reihe 2; 7 Paare +) ungepaarter t-Test ($n_1=12/n_2=16$): $t = 2,489 / p = 0,028$ (ungleiche Varianzen)

**) Vergleich PROEF mit PROPF; Reihe 2: 9 Paare

Am Prüfkörper gelang der Nachweis bei 16 Probanden in der zweiten Messreihe. Sie zeigten in der Korrelationsanalyse keinen Zusammenhang zu den desorbierten Aktivitäten und fielen signifikant geringer aus. Die gesamte adsorbierte Aktivität war gegenüber der desorbierten Aktivität nur geringfügig erhöht.

Die Untersuchungen zu den Protease-Inhibitoren werden in Tabelle 14 zusammengefasst. In der ersten Messreihe gelang der Nachweis im Eluat bei 24 Probanden, in der zweiten Messreihe bei 15 Probanden. Eine Korrelation zwischen beiden Messreihen konnte nicht gefunden werden. In der ersten Messreihe wurde signifikant mehr Protease-Inhibitor-Aktivität abgelöst als in der zweiten Messreihe. Am Prüfkörper verbliebene Aktivität konnte in der ersten Messreihe bei allen Probanden und in der Wiederholung bei 23 Probanden ermittelt werden. Die mittlere Aktivität fiel in der ersten Messreihe signifikant höher aus als in der zweiten Messreihe; wenn im ungepaarten t-Test alle Messwerte berücksichtigt wurden, war der Unterschied noch deutlicher. Es bestand keine Korrelation zwischen diesen beiden Untersuchungen. Wie Tabelle 14a ausweist, bestand in beiden Messreihen kein Zusammenhang zwischen desorbierter und am Prüfkörper verbliebener Aktivität der Protease-Inhibitoren. Die am Prüfkörper verbliebenen Aktivitäten waren signifikant geringer als die desorbierten Aktivitäten im Eluat.

4. Ergebnisse

Tab. 14: An den Prüfkörper adsorbierte Aktivitäten der Protease-Inhibitoren

Variable	Reihe	MW	s	n	Min	Max	Vergleich der Reihen ^{*)}
PRIEF [μ U/cm ²]	1	10,016	7,352	24	-2,73	23,13	**) r = -0,079 / p = 0,778 t = 2,595 / p = 0,021 ⁺⁾
	2	4,441	3,900	15	0,88	17,09	
PRIPF [μ U/cm ²]	1	0,248	0,065	25	0,114	0,338	***) r = 0,201 / p = 0,358 t = 9,830 / p < 0,001
	2	0,085	0,066	23	-0,076	0,202	
PRIPGF [μ U/cm ²]	1	10,265	7,735	24	-2,50	23,47	****) r = -0,130 / p = 0,659 t = 2,592 / p = 0,022 ⁺⁾
	2	4,721	4,001	14	0,93	17,23	

*) Reihe 1 mit Reihe 2

) n = 15 Paare; ⁺⁾ ungepaarter t-Test (n₁=24/n₂=15): t=3,085 / **p < 0,001
(ungleiche Varianzen)

***) n = 23 Paare

****) n = 14 Paare; ⁺⁾ ungepaarter t-Test (n₁=24/n₂=14): t=3,001 / **p = 0,005**
(ungleiche Varianzen)

Tab. 14a: Vergleich desorbiertes und verbliebener Protease-Inhibitor-Aktivitäten

Variablenpaar	Reihe	N	Korrelation		t-Test	
			r	p	t	p
PRIEF : PRIPF	1	24	0,343	0,101	6,529	<0,001
	2	14	0,389	0,169	4,268	0,001

Auch für die Summe der an den Prüfkörpern adsorbierten Aktivitäten der Protease-Inhibitoren konnte keine Korrelation zwischen den Messreihen gefunden werden, und die Befunde in Messreihe 1 fielen signifikant höher aus als in Messreihe 2.

Die Gesamtaktivität der Proteasen und die Aktivität der Protease-Inhibitoren stehen in Wechselbeziehung zueinander. In Tabelle 14b werden deshalb die Ergebnisse der Korrelationsanalyse zwischen Proteasen und Protease-Inhibitoren aufgeführt. In Messreihe 1 zeigte die im Eluat bestimmte, desorbierte Aktivität der Proteasen eine signifikante negative Korrelation zur Aktivität der Protease-Inhibitoren, die am Prüfkörper verblieben waren.

4. Ergebnisse

Tabelle 14b: Linearkorrelation der Proteaseaktivitäten mit den Aktivitäten der Protease-Inhibitoren

		n	Korrelation	
Variable 1	Variable 2		r	p
PROEF1	PRIEF1	11	-0,181	0,297
	PRIPF1	12	-0,737	0,003
	PRIPGF1	11	-0,189	0,289
PROEF2	PRIEF2	6	0,145	0,354
	PRIPF2	11	-0,201	0,245
	PRIPGF2	6	0,351	0,197
PROPF2	PRIEF2	11	-0,015	0,482
	PRIPF2	15	-0,066	0,407
	PRIPGF2	10	-0,054	0,441

In der zweiten Messreihe konnte dieser Befund aber nicht bestätigt werden. Weitere Korrelationen der desorbierten Proteaseaktivität mit der desorbierten Aktivität der Protease-Inhibitoren bzw. ihrer Gesamtaktivität oder der am Prüfkörper verbliebenen Protease-Aktivität mit der desorbierten, am Prüfkörper verbliebenen oder gesamten Aktivität der Protease-Inhibitoren konnten nicht aufgedeckt werden.

4.3. Vergleich der Speichelkonzentrationen mit den hypothetischen Konzentrationen

Unter der Annahme einer 0,1 mm dicken Speichelschicht konnten aus den Mengen bzw. Aktivitäten der an den Prüfkörpern adsorbierten Speichelkomponenten ihre hypothetische Konzentration in diesem Flüssigkeitsvolumen berechnet werden. Diese berechneten Werte ließen sich dann anhand des gepaarten t-Tests mit den realen Speichelkonzentrationen vergleichen.

4. Ergebnisse

Tab. 15a: Vergleich der Konzentrationen im stimulierten Gesamtspeichel mit den berechneten hypothetischen Konzentrationen

Paar ..SP mit ..PV	Speichel		...PV		n	Korrelation r / p	t-Test t / p
	MW	s	MW	s			
EW..1	484,0	474,1	9,8	9,4	10	0,122/0,736	3,170/ 0,011
EW..2	584,1	189,4	40,8	23,3	25	0,372/ 0,067	14,925/ <0,001
TH..1	0,111	0,120	0,019	0,012	21	-0,057/0,805	3,455/ 0,003
TH..2	0,093	0,062	0,019	0,015	25	0,086/0,684	5,956/ <0,001
IGA..1	405,3	197,7	28,49	18,94	18	-0,164/0,516	7,927/ <0,001
IGA..2	374,9	164,4	61,1	29,3	15	0,005/0,987	7,287/ <0,001
IGG..1	17,38	10,52	0,25	0,09	18	-0,027/0,914	6,905/ <0,001
CA..1	0,458	0,128	0,071	0,051	24	0,013/0,952	13,832/ <0,001
CA..2	0,439	0,156	0,097	0,080	25	-0,146/0,486	9,214/ <0,001

In den Tabellen 15a und 15b sind für die jeweiligen Paare die Mittelwerte und Standardabweichungen der Speichelkonzentrationen den aus den desorbierten Anteilen berechneten hypothetischen Konzentrationen gegenüber gestellt. Wie der gepaarte t-Test auswies, lagen die mittleren hypothetischen Konzentrationen bzw. Aktivitätskonzentrationen signifikant, größtenteils sogar höchst signifikant unter den mittleren Werten für den Speichel. Gleichzeitig konnte in keinem Fall eine signifikante Korrelation zwischen den Konzentrationen im Speichel und den hypothetischen Konzentrationen festgestellt werden. Lediglich bei Gesamteiweiß der zweiten Messreihe wurde eine Tendenz hierfür ausgewiesen.

Aus der Summe der von den Prüfkörpern adsorbierten Menge der Speichelkomponenten konnte die hypothetische Gesamtkonzentration bzw. Gesamtaktivitätskonzentration dieser Komponenten berechnet werden. Die Tabelle 16 fasst den Vergleich dieser Gesamtwerte mit den Angaben für den stimulierten Nüchtern Gesamtspeichel zusammen.

4. Ergebnisse

Tab. 15b: Vergleich der Aktivitätskonzentrationen im stimulierten Gesamtspeichel mit den berechneten hypothetischen Aktivitätskonzentrationen

Paar ..SP mit ..PV	Speichel		...PV		n	Korrelation r / p	t-Test t / p
	MW	s	MW	s			
PER..1	0,087	0,099	0,009	0,009	25	-0,070/0,741	3,853/ 0,001
SPO..1	403,4	156,0	107,8	100,4	25	-0,242/0,244	7,211/ <0,001
LYS..1	2,64	3,10	0,13	0,07	13	-0,105/0,733	2,906/ 0,013
LYS..2	6,10	5,74	0,19	0,13	9	0,271/0,481	3,103/ 0,015
AMY..1	72,9 ^{*)}	66,2	19,3 ^{**)}	22,8	24	-0,116/0,589	5,393/ <0,001
PRO..1	3,195	1,831	0,232	0,192	12	0,459/0,134	5,863/ <0,001
PRO..2	4,871	2,577	0,089	0,056	16	-0,166/0,539	7,392/ <0,001
PRI..1	0,042	0,046	0,922	0,761	14	0,222/0,445	-4,381/ 0,001
PRI..2	0,088	0,017	0,444	0,390	15	0,102/0,718	-3,548/ 0,003

^{*)} [kU/l]

^{**)} [U/l]

Auch unter Berücksichtigung der an den Prüfkörpern verbliebenen Anteile ergab sich, dass mit Ausnahme der mit Guajakol als Substrat bestimmten Peroxidase der ersten Messreihe, die berechneten hypothetischen Konzentrationen signifikant unter den gemessenen Speichelkonzentrationen lagen. Das im Vergleich zu Tabelle 15a und 15b häufig geringere Signifikanzniveau wies aber darauf hin, dass sich die Werte angenähert hatten. Gleichzeitig war auch hier festzustellen, dass keine Korrelation zwischen den Speichelkonzentrationen und den hypothetischen Konzentrationen ausgewiesen wurde.

4. Ergebnisse

Tab. 16: Vergleich der Speichelkonzentrationen mit den berechneten hypothetischen Gesamtkonzentrationen

Paar ..SP mit ..GPV	Speichel		...PGV		n	Korrelation r / p	t-Test t / p
	MW	s	MW	s			
EW..2	545,5	156,7	15,7	4,0	9	0,112/0,774	10,167/< 0,001
TH..1	0,118	0,124	0,040	0,018	19	-0,042/0,864	2,711/ 0,014
TH..2	0,122	0,088	0,021	0,013	8	-0,217/0,605	3,109/ 0,017
PER..1	0,077	0,098	0,055	0,030	23	-0,128/0,561	1,028/0,315
SPO..1	403,4	156,0	108,7	101,3	25	-0,242/0,244	7,168/< 0,001
PRO..2	4,330	2,762	0,091	0,050	9	-0,161/0,680	4,590/ 0,002
PRI..1	0,042	0,046	0,947	0,762	14	0,224/0,441	-4,498/ 0,001
PRI..2	0,088	0,017	0,472	0,401	14	0,102/0,728	-3,597/ 0,003

4.4. Korrelationen zwischen den Speichelsekretionsraten und den hypothetischen Konzentrationen bzw. Aktivitätskonzentrationen

Neben dem Vergleich der Speichelkonzentrationen mit den hypothetischen Konzentrationen wurde auch die Korrelation der Speichelsekretionsraten mit den adsorbierten Mengen anhand der hypothetischen Konzentrationen untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in der Tabelle 17 aufgeführt. Bei den Korrelationen zwischen den Speichelsekretionsraten und hypothetischen Konzentrationen auf Basis der eluierten Mengen ergab sich in zwei Fällen ein Hinweis auf eine Wechselbeziehung: Immunglobulin G und Proteaseaktivität der ersten Messreihe zeigten eine signifikant positive lineare Abhängigkeit der desorbierten Pellikelbestandteile von den Speichelsekretionsraten. Zwischen der Peroxidaseaktivität der zweiten Messreihe und IgG war nur eine schwache Tendenz erkennbar.

Für alle anderen Speichelparameter lies sich keine signifikante Korrelation nachweisen. Auch für die verfügbaren hypothetischen Gesamtkonzentrationen konnte keine Korrelation zu den Speichelsekretionsraten gefunden werden.

4. Ergebnisse

Tab. 17: Korrelationen der Speichelsekretionsraten mit den hypothetischen Konzentrationen

Variablenpaar	r	p	N
AMYPV1:SRAMY	-0,099	0,322	24
IGAPV1:SRIGA	-0,223	0,187	18
IGAPV2:SRIGA	-0,042	0,441	15
IGGPV1:SRIGG	0,424	0,040	18
PERPV1:SRPER	0,155	0,230	25
PERPV2:SRPER	0,274	0,093	25
SPOPV1:SRSP0	-0,103	0,312	25
SPOPV2:SRSP0	-0,056	0,395	25
LYSPV1:SRLYS	-0,142	0,321	13
LYSPV2:SRLYS	-0,116	0,384	9
EWPV2:SREW	0,077	0,357	25
PROPV1:SRPRO	0,543	0,034	12
PROPV2:SRPRO	-0,222	0,213	15
PRIPV1:SRPRI	0,121	0,340	14
PRIPV2:SRPRI	0,166	0,347	8
EWPV1:SREW	-0,143	0,347	10
CAPV1:SRCA	-0,116	0,294	24
CAPV2:SRCA	-0,114	0,294	25
EWGPV2:SREW	-0,366	0,166	9
PROGPV2:SRPRO	-0,321	0,200	9
PRIGPV1:SRPRI	0,122	0,339	14
PRIGPV2:SRPRI	0,167	0,346	8
PERGPV1:SRPER	-0,268	0,108	23
PERGPV2:SRPER	0,093	0,332	24
SPOGPV1:SRSP0	-0,103	0,312	25
SPOGPV2:SRSP0	-0,058	0,393	24
THGPV1:SRTH	0,045	0,428	19
THGPV2:SRTH	-0,313	0,226	8

4. Ergebnisse

In Tabelle 18 wird die Streubreite der Messergebnisse für Speichel- und Pellikelbestandteile anhand der Variationskoeffizienten miteinander verglichen. Bei Thiozyanat, Immunglobulin G, Protease-Inhibitoren, Peroxidasen bei Bestimmung mit Guajakol als Substrat und Lysozym wiesen die in der Pellikel gebundenen Anteile eine geringere Streubreite aus als die Komponenten im Speichel. Für Kalzium und Peroxidasen, bei Bestimmung mit NBS als Substrat, ergaben sich für die Pellikelbestandteile größere Streubreiten als für die Komponenten im Speichel. Bei sekretorischem Immunglobulin A, Gesamteiweiß, Proteasen und α -Amylase ist eine eindeutige Aussage hierzu nicht möglich.

Tab. 18: Variationskoeffizienten im Speichel und in der Pellikel

Komponente	VK [%]				
	Speichel		Pellikel		
	Konz.	SR	eluiert (...EF.)	gesamt (...PGF.)	
Thiozyanat	107,6	118,3	64,8	46,5	
sIgA	48,6	85,6	61,8	n.b.	
IgG	61,3	51,5	36,7	n.b.	
Gesamteiweiß	87,4	78,7	96,4	25,5	
Kalzium	27,3	55,3	72,1	n.b.	
Proteasen	54,7	77,9	83,0	54,5	
Protease-Inhibitoren	107,4	109,5	73,4	71,9	
α -Amylase	91,9	128,7	118,2	n.b.	
Peroxidase	PER	114,9	116,6	99,4	55,7
	SPO	38,7	66,7	93,2	93,2
Lysozym	108,6	163,5	56,8	n.b.	

n.b. = nicht bestimmt

5. Diskussion

Die Ausbildung eines Biofilms auf Oberflächen der Mundhöhle ist von entscheidender Bedeutung für die orale Gesundheit, aber auch für die Auswahl von dentalen Restaurationsmaterialien. Insbesondere geht es um mögliche biologische Wechselwirkungen zwischen dem Restaurationsmaterial und Geweben in der Mundhöhle. So kann es durch nicht mikrobiologisch bedingte Schleimhautveränderungen zu einer mechanisch-irritativen Stomatitis oder zur allergischen Kontaktstomatitis kommen. Organisiert sich die Pellikel bakteriell, ergibt sich im Bereich des verwendeten Werkstoffs eine quantitativ und qualitativ differenzierte Plaquebildung (Edgerton 1993, Hannig 1999). Dadurch können Karies, Gingivitiden, parodontologische Läsionen und Stomatitiden entstehen. Durch die selektive Adsorption von Speichelbestandteilen als Pellikel und später als Plaque kann das Bakterienwachstum beeinflusst werden. Auch durch die Anlagerung von Candidapilzen in der Plaquematrix können orale Candidosen oder Prothesenstomatitiden ausgelöst werden. Die Ausbildung solcher Erkrankungen ist wesentlich von der Zusammensetzung der Pellikel auf der Prothesenbasis abhängig. Wenn die prothetische Behandlung auf wissenschaftlicher Evidenz beruhen soll, sind somit auch Kenntnisse der Pellikelbildung als Funktion der Oberflächenbeschaffenheit, der mikrobiellen Adhäsion an Biomaterialien und der Zellreaktion auf implantierte Materialien wesentlich (Edgerton und Levine 1993). Quantitative Untersuchungen über das Adsorptionsverhalten von Speichelproteinen an PMMA fehlen jedoch in der Literatur. Um Vergleiche mit verschiedenen dentalen Restaurationsmaterialien vornehmen zu können, war eine normierte Untersuchung mit einem Vergleich der adsorbierten Speichelproteine pro Flächeneinheit erforderlich.

Die Entstehung einer Pellikel auf Oberflächen der Mundhöhle und deren Besiedlung durch Mikroorganismen ist von zahlreichen Faktoren abhängig. Die Oberflächenbeschaffenheit der Ausgangsmaterialien, aber auch die elektrische Ladung der Oberfläche haben einen entscheidenden Einfluss auf das Adsorptionsverhalten von Proteinen (Carlén 2001). Schon Edgerton et al. (1987) erhoben die Forderung, dass die Eiweißkomponenten in der Pellikel auch quantitativ bestimmt

5. Diskussion

werden sollten, da die Speichelpellikel der Auslöser der Besiedlung mit Mikroorganismen und der nachfolgenden Plaquebildung ist. Solche Untersuchungen wurden aber nur selten publiziert (Yao et al. 2001, Carlén et al. 2001). Nach Döbert et al. (2002) beeinflusst zwar die chemische Natur des Substrats die Geschwindigkeit der Pellikelbildung, aber die Gesamtmenge der adsorbierten Speichelproteine soll identisch sein. Die Übertragbarkeit dieser an Glimmer, Silikon und Graphit ermittelten Ergebnisse auf Dentalmaterialien ist noch zu überprüfen.

Auf professionell gereinigten Zahnflächen finden sich schon nach wenigen Sekunden Makromoleküle und Speichelproteine (Norde 1984). Pellikelstrukturen konnten auf gereinigten Schmelzplättchen schon nach weniger als einer Minute nachgewiesen werden (Hannig 1999). Nach 2 Minuten stellte sich bereits ein Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption ein (Skjörland et al. 1995). Verschiedene Speichelkomponenten sind auf Grund ihrer unterschiedlichen Bindungen zu verschiedenen Zeiten auf Oberflächen der Mundhöhle nachweisbar (Skjörland et al. 1995, Vacca-Smith und Bowen 2000). Nach 30 Minuten hatte sich ein stabiles Gleichgewicht der Pellikel eingestellt. Ein weiterer Anstieg der Pellikelmenge war innerhalb von 10 Stunden nicht nachzuweisen. Die Pellikelbildung ist ein dynamischer Prozess, der im weiteren Verlauf die Zusammensetzung der Pellikel durch Ersetzen, Entfernen oder Modifizieren von Komponenten beeinflussen kann. In späteren Phasen können auch zusätzlich Materialien in die Pellikel eingelagert werden; 30 Minuten Bildungszeit wurden daher als ideal angesehen (Vacca-Smith und Bowen 2000). In dieser Arbeit ist deshalb von einer 30-Minuten-Pellikel ausgegangen worden. Nach Scannapieco und Levine (1990) wäre sie als sogenannte frühe Pellikel einzustufen.

Vacca-Smith und Bowen (2000) desorbierten Pellikelproteine durch Gelelektrophorese-Pufferlösung von Hydroxylapatitscheiben, jedoch scheint diese Methode ungeeignet für die isolierte quantitative Bestimmung von Speichelproteinen, da sich bei der elektrophoretischen Bestimmung nur die Summation der Proteine in Abbildungen abschätzen lässt. Carlén et al. (1998) konnten belegen, dass eine 0,15 mol/l Phosphatpufferlösung, Wasser oder EDTA-Lösung von 4 mmol/l keine

5. Diskussion

Verbesserung der Desorption von Speichelproteinen vom Zahnschmelz oder Hydroxylapatit gegenüber der Gelelektrophorese-Pufferlösung bewirkten. Am effektivsten war in diesen Untersuchungen die Desorption mit 2%iger NaCl-Lösung. In der vorliegenden Arbeit wurde mit NaCl-Lösung der Konzentration 0,5 mol/l desorbiert. Alle Proben sind gleich behandelt worden, so dass eine Vergleichbarkeit gewährleistet ist.

Die Bildung der Pellikel ist abhängig von der Zusammensetzung des Speichels und von der Lokalisation der Probekörper (Carlén et al. 1998, Hannig 1999). Die Pellikel sollte deshalb aus Speichel gebildet werden. Aus diesem Grund wurden die Probanden instruiert, die Probekörper durch Lutschbewegungen langsam im Mund umzulagern. Ein möglicher mechanischer Einfluss der Zunge oder der Probekörper untereinander während der Bewegung sollte somit bei allen Probanden ähnlich sein bzw. mit dem gleichen Fehler eingehen.

Alle untersuchten Speichelkomponenten konnten in den Desorptionslösungen der PMMA-Prüfkörper nachgewiesen werden (Abb. 5-8). Auf der Oberfläche des Prothesenbasiskunststoffs hatte sich somit eine Pellikel gebildet. Auch der qualitative Vergleich zur Pellikel auf Zahnschmelz (Lendenmann et al. 2000) war gegeben. Die Ergebnisse stimmen gut mit qualitativen Untersuchungen von Hannig (1997) über die Pellikelbildung in vivo an dentalen Restaurationsmaterialien überein. Sie kann dagegen nicht völlig mit in vitro gebildeter Pellikel verglichen werden, da bei der üblichen Zentrifugation des Speichels bereits Komponenten verloren gehen können (Carlén et al. 1998). Über den Nachweis von Thiozyanat in der Pellikel wurde im Schrifttum bisher nicht berichtet.

Zur Charakterisierung des Speichels der Probanden wurde stimulierter Nüchternspeichel untersucht, da beim Lagern und Bewegen der Prüfkörper im Mund von einer mechanischen Stimulation des Speichelflusses auszugehen ist. In den Speichelproben konnten alle untersuchten Komponenten nachgewiesen werden (Tab. 1-4 und Abb. 1-4). Abweichungen von der Normalverteilung waren nur selten signifikant. Alle Teilnehmer an der Studie hatten eine Fließrate des stimulierten Speichels im physiologischen Bereich. Ein Vergleich mit Daten aus der Rostocker Arbeitsgruppe (Jentsch et al. 1992, Jentsch und Göcke 1995,

5. Diskussion

Szymanska et al. 1995, Göcke et al. 2005) ergab, dass sich die Speichelbefunde im Bereich für gesunde Personen bewegten. Nur für Protease-Inhibitoren und α -Amylase fanden Göcke et al. (2005) deutlich höhere Aktivitäten bei Probanden mit neu eingegliederten Prothesen. Die mit Guajakol bestimmten Peroxidase-Aktivitäten fielen für kariesaktive Probanden erkennbar höher aus (Jentsch et al. 1992, Jentsch und Göcke 1995, Szymanska et al. 1995). Für Thiozyanat, Proteasen, Protease-Inhibitoren, Lysozym, α -Amylase, sIgA, Gesamteiweiß und Kalzium ergaben die Doppelbestimmungen in keinem Fall eine signifikante Korrelation zwischen den beiden Messreihen, was auf eine gewisse intraindividuelle und interindividuelle Variation der untersuchten Komponenten im Speichel hinweist, die aber für Thiozyanat, Proteasen, α -Amylase, sIgA und Kalzium nicht signifikant ausfiel. Bei den Protease-Inhibitoren, Lysozym und Gesamteiweiß muss dagegen mit einer größeren Variation gerechnet werden. Auch die Protease-Aktivität im Speichel war deutlich höher als die Aktivität der Protease-Inhibitoren (Tab. 2).

Aus dem Nachweis in den Eluaten der Prüfkörper (Abb. 5-8) lässt sich ableiten, dass die Speichelkomponenten an den PMMA-Prüfkörpern unterschiedlich stark adsorbiert worden waren. Am häufigsten gelang der Nachweis für Thiozyanat (Tab. 8), Kalzium (Tab. 9), Peroxidasen (Tab. 10), α -Amylase (Tab. 12) und Protease-Inhibitoren (Tab. 14). Für Gesamteiweiß (Tab. 5) und sIgA (Tab. 6) gelang der Nachweis je Proband in mindestens einer Messreihe, aber auch Lysozym (Tab. 11) und Proteasen (Tab. 13) wurden bei der überwiegenden Anzahl der Probanden zumindest einmal nachgewiesen, wie aus den Tabellen A8 und A9 mit den Originalmesswerten zu ersehen ist. Die Adsorption von Speichelkomponenten an Prüfkörpern aus PMMA war somit sehr intensiv.

Bei den Untersuchungen von Gesamteiweiß in der Pellikel (Tab. 5) konnten in der zweiten Messreihe signifikant größere Mengen an Eiweiß vom Prüfkörper desorbiert werden als bei der ersten Messreihe, wo nur in 10 von 25 Proben ein Nachweis gelungen war. Ein vermuteter Zusammenhang zwischen der Adsorption von Eiweiß an den Prüfkörpern und seinem Gehalt im Speichel ließ sich aber weder für die Konzentration (Tab. 15a und 16) noch für die Sekretionsrate (Tab. 17)

5. Diskussion

durch die Korrelationsanalyse belegen. In der zweiten Messreihe gelang ein Nachweis von nicht desorbiertem Gesamteiweiß direkt am Prüfkörper für 9 Probanden. Diese Mengen waren signifikant geringer als die desorbierten Mengen im Eluat, d.h. nur ein kleinerer Teil des Gesamteiweißes war sehr fest am Prüfkörper gebunden. Eine Korrelation zu den desorbierten Mengen wurde nicht gefunden. Die Korrelationsanalyse ließ auch keinen Zusammenhang zwischen den Messreihen 1 und 2 erkennen (Tab. 5). Schon Embery et al. (1984) unterschieden zwischen lose gebundenen, äußeren Proteinen und fest gebundenen, inneren Proteinen der Pellikel. Auch Hannig (1997, 1999) wies eine fest adsorbierte, elektronendichte Basalschicht und eine lose angeordnete Außenschicht nach. Hannig et al. (2005) fanden, dass mit Ausnahme von Guanidin-HCl alle getesteten Desorptionslösungen nur zu einer teilweisen Entfernung der äußeren globulären Pellikelschicht führten. Beobachtungen anderer Autoren stimmen dahingehend überein, dass Speichelproteine der Pellikel unterschiedlich desorbierbar sind (Vassilakos et al. 1982, 1993, Arnebrant und Simonsson 1991). Die fest gebundenen Anteile an Gesamteiweiß, wie sie in dieser Arbeit ermittelt wurden, stimmen mit diesen Angaben überein.

Untersuchungen von Al-Hashimi und Levine (1989) hatten deutliche Unterschiede zwischen den Proteinen in der Schmelzpellikel zu den Proteinen in den Speichelproben ergeben. Es trat also eine selektive Adsorption von Speichelproteinen auf. Eine solche selektive Adsorption muss auch für die Pellikel an PMMA-Prüfkörpern angenommen werden. Amaechi et al. (1999) hatten bei fünf Probanden eine große interindividuelle Variation der Werte für die Dicke der Pellikel gefunden, was als indirekter Hinweis auf quantitative Unterschiede bei der Pellikelbildung gewertet werden kann. Densitometrische Auswertungen der in vitro gebildeten Pellikel auf Hydroxylapatitpulver ergaben, dass die relativen Gesamtmengen innerhalb eines Individuums bis zum Achtfachen variierten (Carlén et al. 1998). Die in dieser Arbeit gefundenen Unterschiede zwischen den beiden Messreihen liegen somit noch innerhalb der Bandbreite der intraindividuellen Variation bei der Pellikelbildung. Die Gesamtproteinmenge zeigte bei diesen Autoren auch keine Korrelation zu der Menge einzelner Proteine. Das

5. Diskussion

spricht ebenfalls für eine selektive Adsorption. Nach Untersuchungen von Edgerton et al. (1995) an PMMA-Perlen mit einer Oberfläche von $0,35 \text{ m}^2/\text{g}$ betrug die adsorbierte Menge 43 ng Protein pro mg Polymer, woraus sich 137 ng pro $11,14 \text{ cm}^2$ entsprechend der Fläche unserer Prüfkörper berechnen ließ. Diese Befunde entsprechen somit in der Größenordnung den Ergebnissen der ersten Messreihe. Hahn Berg et al. (2001) fanden in vitro bei Untersuchungen mit verdünntem, unstimuliertem Gesamtspeichel an Quarzglas nach weniger als einer Stunde einen Plateauwert bei etwa $5 \text{ mg}/\text{m}^2$ oder $0,5 \text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Nach Abspülen reversibel gebundener Proteine mit phosphatgepufferter Saline entstand ein neues Plateau bei ca. $4 \text{ mg}/\text{m}^2$ oder $0,4 \text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Diese Werte stimmen in der Größenordnung mit dem mittleren Eiweißgehalt der Pellikel bei Messreihe 2 überein. Stößer et al. (2001) fanden bei Versuchen mit stimuliertem Gesamtspeichel an 10 mg Hydroxylapatitpulver mit einer Oberfläche von $66 \text{ m}^2/\text{g}$ eine Adsorption von ca. $330 \text{ }\mu\text{g}$ Speichelproteinen, woraus sich $50 \text{ ng}/\text{cm}^2$ berechnen lassen. Dieser Wert liegt noch unter dem Mittelwert in Messreihe 1.

Auch bei den Bestimmungen von sekretorischem Immunglobulin A konnte in der zweiten Messreihe signifikant mehr sIgA analysiert werden als in der ersten Messreihe (Tab. 6). Im Speichel war dagegen kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Messreihen zu verzeichnen (Tab. 4). Auch am Prüfkörper direkt konnte noch sIgA nachgewiesen werden. Die Korrelationsanalyse ergab aber weder für den Vergleich der beiden Messreihen beim desorbierbaren oder fester gebundenen sIgA noch beim Vergleich des desorbierten mit dem am Prüfkörper verbliebenen sIgA (Tab. 6) oder beim Vergleich mit der Speichelkonzentration (Tab. 15a) bzw. Speichelsekretionsrate (Tab. 17) eine Abhängigkeit der Adsorption von sIgA am PMMA.

Nach Lendenmann et al. (2000) ist sekretorisches IgA ein Hauptprotein der Pellikel, so dass auch an PMMA eine Bindung von sIgA zu erwarten war. Pratt-Terpstra et al. (1991) stellten nach ca. 60 min eine maximale Oberflächenkonzentration von $47 \text{ ng}/\text{cm}^2$ bei Fluorethylen-Propylen-Kopolymer (FEP-Teflon), von $73 \text{ ng}/\text{cm}^2$ bei Zelluloseazetat und von $65 \text{ ng}/\text{cm}^2$ bei Glas fest. Das ist zu vergleichen mit $28 \text{ ng}/\text{cm}^2$ bei Schmelz nach ca. 10 min. Die Adsorption des sIgA an

5. Diskussion

künstliche Substrate ist somit abhängig von der freien Oberflächenenergie des jeweiligen Substrats. Diese Angaben lagen deutlich unter den eigenen Befunden (Tab. 6). Zu berücksichtigen ist aber, dass durch den Direktnachweis auf den Schmelzscheibchen nur sIgA in der äußeren Schicht erfasst wurde.

Immunglobulin G war bei 18 von 25 Probanden im Eluat der Prüfkörper festzustellen (Tab. 7). Im Vergleich zum sIgA (Tab. 6) wurde deutlich weniger IgG von den Prüfkörpern desorbiert und der Variationskoeffizient (Tab. 18) war deutlich geringer. Es ist zu vermuten, dass IgG nur in geringen Mengen am Prüfkörper angelagert wurde. Es muss aber offen bleiben, ob IgG so fest am Prüfkörper gebunden war, dass es sich nicht komplett mit Kochsalzlösung ablösen ließ. Im Gegensatz zu den meisten anderen Komponenten konnte für IgG eine signifikante Korrelation mit seiner Sekretionsrate (Tab. 17) im stimulierten Speichel gefunden werden. Übereinstimmend mit Aussagen von Stößer et al. (2001) hing die Menge des adsorbierten IgG also von der kontinuierlich verfügbaren Menge im Speichel ab. Quantitative Angaben über IgG in der Pellikel sind im Schrifttum nicht vorhanden.

Bis auf vier Ausnahmen in Messreihe 1 konnte von den Prüfkörpern Thiozyanat desorbiert werden (Tabelle 8). Die pro cm^2 desorbierten Mengen (THEF) zeigten eine beträchtliche Streuung; es ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Messreihen. Die Desorption des Thiozyanats durch die Kochsalzlösung war nicht komplett, da am Prüfkörper noch weiteres Thiozyanat (THPF) nachgewiesen wurde. In Messreihe 1 wurde mehr fest gebundenes Thiozyanat ermittelt als in Messreihe 2. Dadurch ist auch insgesamt (THPGF) in der zweiten Messreihe signifikant weniger Thiozyanat an den Prüfkörpern adsorbiert worden. Da die durchschnittlichen Konzentrationen des Thiozyanats im stimulierten Speichel (Tab. 2) keinen signifikanten Unterschied zeigten, lässt sich dieser Unterschied nicht aus der Speichelkonzentration ableiten. Aus dem Vergleich von desorbiertem Thiozyanat (THEF) mit fest gebundenem Thiozyanat (THPF) ergibt sich, dass etwa die Hälfte des Thiozyanats sehr fest am PMMA anhaftete (Tab. 8). Da keine signifikante Korrelation zwischen den beiden Messreihen nachgewiesen werden konnte, muss die Adsorption des Thiozyanats an PMMA-Prüfkörpern

5. Diskussion

durch andere Faktoren bestimmt worden sein. Die Oberfläche von PMMA ist negativ geladen. Zur Bindung von Thiozyanat sind daher Kationen als Brückenbildner erforderlich. Hierfür kommen vor allem das ebenfalls in der Pellikel nachgewiesene Kalzium (Tab. 9), aber auch vorwiegend positiv geladene Eiweiße wie z.B. das Lysozym (Tab. 11) in Frage. Die Adsorption von Thiozyanat an Oberflächen sollte analog zur Adsorption von sauren Proteinen erfolgen. Nach Eggen und Röllä (1984) adsorbieren basische Proteine an exponierte Phosphatgruppen der Oberfläche, während sich saure Proteine an Kalziumionen in der Oberflächenschicht binden. Kalziumionen waren in den Pellikelproben in etwa dreifachem Überschuss im Vergleich zum Thiozyanat vorhanden (Tab. 8 und 9).

Thiozyanat ist Teil des Peroxidase-Systems im Mund. Es besitzt eine antibakterielle Aktivität bei physiologischen Konzentrationen dieser Komponenten im Speichel (Epstein et al. 1984). Auch das Wachstum von *C. albicans* ist empfindlich gegen die Wirkung des Peroxidase-Systems. Sein Nachweis in der Pellikel bedeutet, dass das Peroxidase-System auch auf unterschiedlichen Flächen im Mund wirksam sein könnte.

Im Eluat der Prüfkörper konnte Kalzium in beiden Messreihen nachgewiesen werden (Tab. 9). Es bestand kein wesentlicher Unterschied, aber dennoch eine signifikante Korrelation zwischen den Messreihen. Da die Messwerte in beiden Messreihen einen weiten Bereich umfassten, lässt sich schlussfolgern, dass die Adsorption des Kalziums von der Speichelzusammensetzung der jeweiligen Probanden abhängig war. Eine direkte Korrelation mit der Konzentration (Tab. 15a) oder Sekretionsrate (Tab. 17) des Kalziums im Speichel konnte aber nicht belegt werden. Es muss offen bleiben, ob die Menge des adsorbierten Kalziums von anderen, hier nicht erfassten Speichelkomponenten abhing und dadurch indirekt eine Korrelation entstand. Da die Pellikel durch saure Proteine eine negative Ladung besitzt, ist über das positiv geladene Kalzium eine Anheftung von Speichelproteinen und folglich auch von Bakterien auf Oberflächen in der Mundhöhle erst möglich.

In allen Eluaten der Prüfkörper konnten Aktivitäten für Peroxidasen nachgewiesen werden. Auch am Prüfkörper direkt waren bei fast allen Proben mit beiden

5. Diskussion

Bestimmungsmethoden Aktivitäten von fest haftender Peroxidase nachweisbar. Bei Bestimmung mit Guajakol sollten laut Soininen und Ellfolk (1972) von Bakterien stammende Peroxidasen nicht erfasst werden. Die mit beiden Methoden bestimmten Aktivitäten korrelierten sowohl im Speichel (Tab. 3) als auch in den Eluaten der Prüfkörper (Tab. 10b) signifikant miteinander. Der Variationskoeffizient der im Speichel ermittelten Werte mit Guajakol war aber fast doppelt so groß wie bei der Bestimmung mit NBS (Tab. 18). Die Variationskoeffizienten für die Bestimmung im Eluat der Prüfkörper waren dagegen für beide Methoden annähernd gleich groß. Diese Befunde lassen sich am besten dahingehend interpretieren, dass die Peroxidaseaktivität in der Pellicel wie im Speichel von einer größeren, mit 0,5 mol/l Kochsalzlösung desorbierbaren Fraktion und einer kleineren, fest am Prüfkörper haftenden Fraktion herrührt. Trotz höherer Aktivitäten in der ersten Messreihe blieb die Rangordnung der Probanden erhalten, da zwischen den Messreihen eine Korrelation bestand (Tab. 10).

Bei Bestimmung der Peroxidase mit Guajakol war die am Prüfkörper verbliebene Aktivität der Peroxidase in beiden Messreihen signifikant größer als im Eluat (Tab. 10a). Nur bei der zweiten Messreihe bestand ein Zusammenhang zwischen desorbierter und am Prüfkörper verbliebener Peroxidase-Aktivität. Die Bestimmung mit NBS ergab ein umgekehrtes Ergebnis: Die Aktivität der Peroxidase am Prüfkörper war hier in beiden Messreihen signifikant geringer als im Eluat (Tab. 10a). Zwischen desorbierter und am Prüfkörper verbliebener Aktivität bestand nur bei der ersten Messreihe eine signifikante Korrelation. Die desorbierten Aktivitäten korrelierten dagegen stark miteinander (Tab. 10b). Ein Größenvergleich zwischen den beiden Bestimmungsmethoden ist aber nicht möglich. Ein Zusammenhang zwischen den mit beiden Methoden am Prüfkörper ermittelten Aktivitäten ließ sich nicht feststellen. Die Korrelationen der gesamten desorbierten Aktivitäten (Tab. 10b) beider Messreihen entsprechen in abgeschwächter Form den vom Prüfkörper desorbierten Aktivitäten der Peroxidase. Diese Befunde der Korrelationsanalysen sprechen für das Vorliegen von zwei unterschiedlichen Fraktionen der Peroxidase in der Pellicel.

5. Diskussion

Aus den berechneten hypothetischen Aktivitätskonzentrationen (Tab. 15b) ließ sich unter Berücksichtigung der Befunde für Gesamteiweiß (Tab. 15a) ableiten, dass eine selektive Anreicherung der Peroxidase an der Oberfläche der PMMA-Prüfkörper stattgefunden hat. Dieser Effekt trat mit Guajakol als Substrat noch deutlicher hervor als mit NBS als Substrat, wenn nur die desorbierbaren Aktivitäten berücksichtigt wurden. Werden jedoch die Gesamtaktivitäten betrachtet (Tab. 16), dann waren die Anreicherung für die mit NBS ermittelte Aktivität wieder signifikant größer und die mit Guajakol ermittelte Aktivitäten nicht mehr nachweisbar.

Das Laktoperoxidase-System im Mund besitzt eine antibakterielle Aktivität bei physiologischen Konzentrationen dieser Komponenten im Mund. Auch das Wachstum von *Candida albicans* ist empfindlich gegen das Peroxidase-System (Epstein et al. 1984). Die irreversible Bindung der Peroxidase an Schmelzpulver nach Pruitt und Adamson (1977) korrespondiert mit dem am Prüfkörper gebunden gebliebenen Anteil in dieser Arbeit (Tab. 10). Der von den Autoren gewählte indirekte Nachweis über den Aktivitätsverlust des Speichels lässt es aber offen, ob nur die Sialoperoxidaseaktivität oder die gesamte Aktivität der Peroxidasen erfasst wurde. Durch die Anreicherung von Peroxidase auf der Oberfläche des Prothesenbasiskunststoffes könnten Adhäsion und Entwicklung von Streptokokken und anderen Mikroorganismen eingedämmt werden, zumal in dieser Arbeit erstmals auch Thiozyanat in der Pellikel nachgewiesen wurde. Die Wirksamkeit der Peroxidasen bei Prothesenstomatitiden sollte deshalb zukünftig mehr Berücksichtigung finden. Quantitative Angaben über die Peroxidase-Aktivität in der Pellikel waren im Schrifttum nicht vorhanden.

Im Eluat der Prüfkörper konnten nur geringe Aktivitäten für Lysozym nachgewiesen werden und der Nachweis gelang nicht bei allen Probanden (Tab. 11). Wie beim Speichel war die mittlere Aktivität in der zweiten Messreihe höher als in der ersten Messreihe, der ungepaarte t-Test ergab aber im Gegensatz zum Speichel kein Signifikanzniveau. Eine Aussage zur intraindividuellen Variation von Lysozym in der Pellikel war nicht möglich, da nur drei Wertepaare für beide Messreihen vorlagen. Ein Zusammenhang mit der Aktivität im Speichel konnte nicht

5. Diskussion

bestätigt werden (Tab. 15a und 17). Ein Bezug zur oralen Gesundheit der Probanden wurde in den vorliegenden Untersuchungen nicht vorgenommen. Da die Probanden überwiegend aus dem zahnmedizinischen Dienst kamen, kann jedoch von einer guten Mundpflege ausgegangen werden. Der direkte Nachweis von Lysozym am Prüfkörper war aus technischen Gründen nicht möglich. Somit kann auch nicht sicher festgestellt werden, ob eine vollständige Desorption des Lysozyms vom Prüfkörper gelungen war.

Quantitative Angaben zum Lysozym in der Pellikel sind selten. Die mittleren Werte von 1,30 ng/cm² bzw. 1,94 ng/cm² in dieser Arbeit sind mit den Befunden von Hannig et al. (2005b) zu vergleichen, die nach 30 Minuten Bildungszeit der Pellikel an Scheibchen aus Rinderschmelz eine mittlere desorbierbare Lysozymaktivität von 26,79±17,48 U/cm² fanden. In allen Pellikelproben am Schmelz ließ sich dort Lysozymaktivität nachweisen, und durch Desorption mit Phosphatpuffer konnte weitere Aktivität nachgewiesen werden, die an den Schmelzscheibchen verblieben war. Schon Pruitt et al. (1969) berichteten, dass Lysozym in der Pellikel offensichtlich aus einem fest gebundenen Anteil, der seine Aktivität behält, und aus einem durch Substratpuffer ablösbaren Anteil besteht. Nach Ruan et al. (1986) wurden 12,6 ng/mm² Lysozym an gepulvertem Schmelz adsorbiert, was 12,6 µg pro 10 cm² entspricht und damit um vier Größenordnungen größer ist als für die Adsorption an PMMA in dieser Arbeit. Allerdings muss für Schmelzpulver auch eine völlig andere Oberflächenaktivität als für intakte Schmelzoberflächen an den Zähnen oder für kompakte PMMA-Prüfkörper angenommen werden. Bei Adsorption an HA-Perlen wurde die Aktivität des Lysozyms im Vergleich zu seiner Aktivität in Lösung signifikant reduziert, wahrscheinlich durch eine Konformationsänderung (Kho et al. 2005). Eine gleichartige Beeinflussung der Lysozymaktivität auf Oberflächen des PMMA war nicht überprüfbar. Peroxidase und Lysozym zeigten bei der Inhibition der Adhärenz von *S. mutans* an Hydroxylapatit additive Effekte (Roger et al. 1994). Beide Enzyme waren in dieser Arbeit in der Pellikel auf PMMA nachweisbar, so dass dieser additive Effekt hier ebenfalls möglich erscheint.

5. Diskussion

Aktivitäten der α -Amylase konnten im Eluat der Prüfkörper bei nahezu allen Probanden nachgewiesen werden. Sie unterlagen jedoch einer sehr großen Streuung (Tab. 12). Von einer selektiven Anlagerung der Amylase am PMMA kann nicht sicher ausgegangen werden, da die hypothetische Konzentration um mehr als den Faktor 1000 unter der Speichelkonzentration lag (Tab. 15b); eine Korrelation mit der Aktivität im Speichel bestand nicht. Bei Untersuchungen über immobilisierte α -Amylase fanden Hannig et al. (2003), dass die mittlere immobilisierte Aktivität auf Schmelz mit $1,1 \pm 0,5$ U/cm² und Dentin mit $2,2 \pm 1,1$ U/cm² signifikant höher war als auf Amalgam, Keramik, Goldlegierung und Komposit. Die Werte für Komposit mit $0,4 \pm 0,2$ U/cm² lagen dabei um gut drei Größenordnungen über der mittleren desorbierten Aktivität von 193 ± 228 μ U/cm² in dieser Arbeit. Es ist denkbar, dass die Desorption mit 0,5 mol/l Kochsalzlösung nur unvollständig war und adsorbierte Aktivität dadurch zum Teil unentdeckt blieb, denn eine Bestimmung der gebundenen Aktivität direkt auf dem Prüfkörper war in den Untersuchungen nicht möglich. Für eine solche Annahme spricht auch der Befund von Steinberg et al. (1998), dass an Acryl ca. 35 % der gesamten α -Amylase aus dem Speichel gebunden wurde. Schon Pruitt et al. (1969) berichteten, dass Amylase aus Speichel von Rinderschmelz schwerer ablösbar war als reine Amylase. Wahrscheinlich erfolgte die Adsorption an andere gebundene Proteine. Auch Hannig et al. (2004) berichteten, dass schon nach 3 Minuten alle Pellikelproben bei der Direktbestimmung auf Rinderschmelz immobilisierte Amylaseaktivität zeigten. Der Mittelwert für 87 Proben lag nach 30 Minuten mit $1,39 \pm 1,87$ mU/cm² nur um knapp eine Größenordnung über den Befunden dieser Arbeit. Dabei zeigte die Pellikel an bukkalen Stellen mit $2,85 \pm 3,65$ mU/cm² eine signifikant höhere mittlere Amylaseaktivität als an palatinalen Stellen mit $0,63 \pm 0,32$ mU/cm². Solche Differenzen konnten in dieser Arbeit nicht untersucht werden, da die Probanden die Prüfkörper während der dreißigminütigen Tragezeit im Mund hin und her bewegten. Kohavi et al. (1997) fanden für die Adsorption der α -Amylase an Titan $0,13 \pm 0,07$ μ g/mm², an Schmelz $0,32 \pm 0,06$ μ g/mm² und an Dentin $0,52 \pm 0,01$ μ g/mm². Diese Befunde belegen, wie auch die Ergebnisse von Hannig et al. (2003), dass der Amylasegehalt der Pellikel vom Werkstoff abhängt.

5. Diskussion

Nach Lee et al. (2001) hängt die Zusammensetzung aber auch vom Speicheltyp ab.

Proteolytische Aktivität konnte nicht in jedem Eluat der Prüfkörper nachgewiesen werden (Tab. 13). Dabei war die nachgewiesene Aktivität der Proteasen in der ersten Messreihe signifikant größer als in der zweiten Messreihe. Zwischen Reihe 1 und Reihe 2 wurde eine signifikant negative Korrelation der Protease-Aktivitäten im Eluat ausgewiesen. Wegen der geringen Zahl von sieben Messwertpaaren kann ein Zufallsbefund aber nicht ausgeschlossen werden. Ein Nachweis von am Prüfkörper verbliebener Aktivität gelang an 16 Prüfkörpern der Reihe 2. Da an sieben Prüfkörpern ein Nachweis gelang, obwohl der Nachweis im Eluat negativ ausgefallen war, konnte in der Summe bei Reihe 2 ein nahezu vollständiger Nachweis von Protease-Aktivität in der Pellikel erreicht werden. Für die neun Paare mit beiden Nachweisen war die Aktivität der fest adsorbierten Proteasen signifikant niedriger als die desorbierbare Aktivität. Zwischen desorbierter und nicht desorbierbarer Aktivität der Proteasen bestand keine Korrelation. Insgesamt kann die Adsorption von Protease-Aktivität an PMMA als gesichert angesehen werden. Es erscheint denkbar, dass sie durch das Vorhandensein der Protease-Inhibitoren im Speichel und in der Pellikel in ihrer Wirksamkeit moduliert wurden. Die Rolle der Proteasen bei der Bildung und Reifung der Pellikel sollte jedoch weiterhin Beachtung finden.

Aktivitäten von Protease-Inhibitoren waren im Eluat der Prüfkörper eindeutig nachweisbar (Tab. 14). In der ersten Messreihe wurden signifikant mehr Protease-Inhibitoren von den Prüfkörpern abgelöst als in der zweiten Messreihe. Die fehlende Korrelation zwischen den Messreihen deutet auf eine hohe intraindividuelle Korrelation hin. Die am Prüfkörper verbliebenen Aktivitäten der Protease-Inhibitoren waren ebenfalls in der ersten Messreihe signifikant höher als in der zweiten Messreihe. Auch hier muss mit einer hohen intraindividuellen Variation gerechnet werden. In beiden Messreihen war kein Zusammenhang zwischen desorbierter und am Prüfkörper verbliebener Aktivität der Protease-Inhibitoren erkennbar. Am Prüfkörper verbliebene Aktivitäten waren signifikant geringer als

5. Diskussion

im Eluat der Prüfkörper (Tab. 14a). Es konnte also der größte Teil der Protease-Inhibitor-Aktivität mit der Kochsalzlösung desorbiert werden.

Die Aktivitäten von Proteasen und Protease-Inhibitoren befinden sich in einem wechselseitigen Gleichgewicht. Ein Vergleich der Angaben in den Tabellen 13 und 14 zeigte, dass im Mittel höhere Aktivitäten für Protease-Inhibitoren als für Proteasen ermittelt wurden. Es konnte jedoch nur in der ersten Messreihe eine signifikante Korrelation zwischen desorbierten Proteasen und am Prüfkörper verbliebenen Protease-Inhibitoren festgestellt werden (Tab. 14b). Dieser Nachweis gelang in der Wiederholung nicht. Weitere Zusammenhänge der Proteasen und der Protease-Inhibitoren im Desorbat, am Prüfkörper direkt oder zwischen den Gesamtproteasen und den gesamten Protease-Inhibitoren konnten nicht ermittelt werden. Insgesamt wurde die Adsorption von Protease-Inhibitoren an PMMA belegt. Gemäß Tabelle 2 wurde im Speichel ein Überschuss der Proteasen gegenüber den Protease-Inhibitoren von ungefähr 100:1 ermittelt, während sich gemäß Tab. 13 und Tab. 14 für die Pellikel ein Überschuss der Protease-Inhibitoren von ungefähr 1:4 ergab. Auch diese Befunde unterstützen die Hypothese über eine selektive Anreicherung einzelner Speichelproteine in der Pellikel.

Die vergleichsweise hohe Gesamtaktivität der Protease-Inhibitoren an PMMA gegenüber den Proteasen kann prinzipiell als positiv bewertet werden, denn die Schutzfunktionen des Speichels z.B. durch Peroxidasen, sIgA, Muzine oder Laktoferrin können in ihrer Wirkung durch Proteasen eingeschränkt werden. Das wiederum führt möglicherweise zur vermehrten Ansammlung von Bakterien oder Pilzen und somit zur Ausbildung von Krankheiten. Bei einem Überschuss an Protease-Inhibitoren kann die Aktivität der Proteasen minimiert und somit das Milieu auf der Prothesenoberfläche positiv beeinflusst werden. Wenn Zellen von *C. albicans* mit Proteasen oder Glykosidasen behandelt wurden, reduzierte sich ihre Adhäsion an PMMA, das mit Submandibularis-/Sublingualisspeichel bedeckt war (Edgerton et al. 1993). Die Wirkung der Protease als Pathogenitätsfaktor von *C. albicans* (Morschhäuser et al. 1996) wurde somit auf der Oberfläche der Prothesenbasis durch Protease-Inhibitoren eingeschränkt.

5. Diskussion

Ahn et al. (2002, 2003) sowie Lee et al. (2001) fanden Cystatine – spezifische Inhibitoren der Cystein-Proteinasen - in der Pellikel an allen untersuchten Bracket-materialien. Der Nachweis in der Pellikel auf PMMA stimmt hiermit überein. In letzter Zeit sind viele Komplexe zwischen Muzinen des Speichels und anderen Speichelproteinen wie α -Amylase, prolinreiche Proteine, Histatin, Statherin, Cystatin und Lysozym gefunden worden, die nicht-kovalent an MG1 gebunden sind (Iontcheva et al. 1997). Die Pellikel könnte also eher durch Adsorption dieser Komplexe statt nur durch Adsorption von einzelnen Komponenten gebildet worden sein (Hannig und Joiner 2006). In den Komplexen sind die Proteine möglicherweise besser vor proteolytischem Abbau geschützt. Außerdem wirken diese Komplexe konzentrierend für die Proteine auf der Oberfläche.

Die Adsorption einzelner Speichelproteine in der Pellikel wird als selektiv beschrieben (Ahn et al. 2002, 2003, Carlén et al. 1998, Edgerton und Levine 1993, Hannig et al. 2005a, Hannig und Joiner 2006, Ilie et al. 2003, Lee et al. 2001, Lendenmann et al. 2000, Scannapieco und Levine 1990). Durch den Vergleich der Konzentrationen im Speichel mit berechneten hypothetischen Konzentrationen sollte untersucht werden, ob sich eine solche selektive Anreicherung auch in der Pellikel auf PMMA belegen ließe. Die mittleren hypothetischen Konzentrationen bzw. Aktivitätskonzentrationen lagen signifikant unter denen des Speichels, auch bei Berücksichtigung der am Prüfkörper verbliebenen Mengen (Tab. 15a und b, Tab. 16). Nur für Protease-Inhibitoren wurde eine Zunahme gefunden. Der gepaarte t-Test alleine würde demnach bei der Mehrzahl der untersuchten Komponenten nicht für eine selektive Anreicherung sprechen und einen verdünnten Speichelrückstand nicht ausschließen. Dann ließe sich aber die Zunahme bei den Protease-Inhibitoren nicht erklären. Gleichzeitig konnte in keinem Fall eine signifikante Korrelation zwischen den Konzentrationen im Speichel und den hypothetischen Konzentrationen festgestellt werden, die gegeben sein müsste, wenn es sich einfach um verdünnten Speichel handelte. Beide Befunde zusammen genommen sprechen deshalb gegen die theoretische Annahme, dass es sich bei den analysierten Komponenten der Probekörper um Speichelreste handeln würde. Gegen eine solche Annahme sprechen auch die zum Teil sehr unterschiedlichen Variationsko-

5. Diskussion

effizienten von Speichel und Pellikel (Tab. 18). Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Berechnung der hypothetischen Konzentrationen auf der Grundlage einer Speichelschichtdicke von 0,1 mm erfolgte (Collins und Dawes 1987). Wenn statt dessen die angegebenen Schichtdicken der Pellikel zugrunde gelegt werden, verschieben sich die Größenordnungen für den Gehalt der Pellikel. Lendenmann et al. (2000) führten Schichtdicken von 30-100 nm auf. Das hypothetische Volumen wäre dann um drei Größenordnungen geringer anzusetzen, woraus sich um drei Größenordnungen höhere hypothetische Konzentrationen in der Pellikel ergeben würden. Auf dieser Basis wäre für Eiweiß, sIgA, Peroxidasen mit NBS, IgG und Proteasen eine Anreicherung in der Pellikel um mindestens eine Größenordnung, für Thiozyanat, Peroxidasen mit Guajakol und Kalzium um mindestens zwei Größenordnungen und für Protease-Inhibitoren sogar um drei bis vier Größenordnungen zu verzeichnen. Selbst bei Annahme einer Schichtdicke von 1 μm (Amaechi et al. 1999) ergibt sich zumindest für Thiozyanat, Peroxidasen mit Guajakol, Kalzium und Protease-Inhibitoren eine Anreicherung in der Pellikel. Die Befunde an PMMA standen somit in Übereinstimmung mit anderen Angaben zur selektiven Anreicherung der Pellikelkomponenten aus dem Speichel und erweitern sie um das bisher nicht analysierte Thiozyanat.

Für eine selektive Anreicherung sprach auch die Untersuchung der Korrelationen zwischen den Sekretionsraten der Speichelkomponenten und den hypothetischen Konzentrationen. Hier konnte nur für Immunglobulin G und Proteaseaktivität in der ersten Messreihe eine signifikante Wechselbeziehung aufgezeigt werden. Eine entsprechende Tendenz bestand bei Peroxidase in der zweiten Messreihe. Insgesamt sprechen diese Ergebnisse gegen eine Beziehung zwischen dem Gehalt des Speichels an bestimmten Komponenten und ihrem mengenmäßigen Vorkommen in der Pellikel. Nach Untersuchungen von Stößer et al. (2001) änderte sich die Zusammensetzung der Pellikel entsprechend der Verfügbarkeit der Speichelproteine. Bei den vorliegenden Untersuchungen war die volle Verfügbarkeit über die gesamte Zeit der Pellikelbildung gewährleistet. Nach Hahn Berg et al. (2001) erreichten die adsorbierten Mengen der gesamten Speichelproteine einen Plateauwert bei 5 mg/cm^2 bzw. 4 mg/cm^2 . Nach Norde (1984) erreichte die

5. Diskussion

Adsorptionsisotherme von Biopolymeren ein Plateau im Bereich von einigen mg pro m² Oberfläche des Sorbents. Je größer der Ladungskontrast zwischen Polymer und Oberfläche war, desto höher war die Adsorption an der Oberfläche. Laut Cantarero et al. (1980), die die Adsorption von Eiweißen in Polystyrolröhrchen für ELISA-Tests untersuchten, war bis zu einer Ausgangskonzentration von 1000 ng in der Lösung die Bindung eine Funktion der Konzentration. Danach verringerte sich der Anstieg. Der maximale Anteil von gebundenem Protein variierte mit der Art des Proteins. Er war bei größeren Molekülen bezüglich der Molzahl geringer, was mit einer einschichtigen Bedeckung überein stimmte. Eine lineare Korrelation wäre demnach nur für Proteine mit geringer Speichelkonzentration zu erwarten. Tatsächlich wurden in dieser Arbeit für IgG und Proteasen nur geringe Werte im Speichel ermittelt.

Betrachtet man die Streubreite der Messergebnisse anhand der Variationskoeffizienten, so kann für Thiozyanat, Immunglobulin G, Protease-Inhibitoren, Peroxidase mit Guajakol und Lysozym festgestellt werden, dass die Streubreiten der Komponenten in der Pellikel niedriger sind als im Speichel. Für Kalzium und Peroxidase mit NBS konnten dagegen größere Streubreiten in der Pellikel ermittelt werden als im Speichel. Auch diese Befunde sprechen für eine selektive Anreicherung in der Pellikel, die mehr von den Oberflächeneigenschaften des Prüfkörpers als von der Konzentration in der Lösung des Speichels abhängt.

In zwei weiteren Dissertationen an der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik und Werkstoffkunde der Universität Rostock wurde mit kompakten Prüfkörpern ähnlicher Größe und gleichen Analysemethoden die Pellikelbildung an Dentalkeramik Empress 2 (Tschannerl 2004) und an Reintitan Grad 2 (Hügel 2005) anhand der gleichen Speichelkomponenten untersucht. Durch diese Analyse unter vergleichbaren Bedingungen ist ein quantitativer Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit möglich. In den Tabellen 19a und 19b werden zunächst die Ergebnisse von je 25 Bestimmungen gegenübergestellt. Sofern in der vorliegenden Arbeit zwei Messreihen vorhanden waren, wurden sie ohne Berücksichtigung der Ausfallwerte gemittelt.

5. Diskussion

Während in dieser Arbeit ein fehlender Nachweis im Eluat als ausgefallener Wert behandelt wurde, hatte Hügel (2005) für die Pellikel an Reintitan fehlende Nachweise mit dem Wert null in die Mittelwertberechnung einbezogen. Bei den Untersuchungen von Tschannerl (2004) wurden die Belegungen pro Flächeneinheit aus den im Anhang angeführten Originalwerten der Konzentrationen im Eluat zurück berechnet, um statistische Berechnungen zu ermöglichen. Daraus ergaben sich für die Pellikel an der Dentalkeramik Empress 2 gegenüber den Angaben in Tabelle 15 von Tschannerl (2004) einzelne Korrekturen.

Tab. 19a: Vergleich der Pellikelbildung an Polymethylmethacrylat mit Dentalkeramik Empress 2 und Reintitan Grad 2
Gesamteiweiß, Thiozyanat, Kalzium, sIgA und IgG^{*)}

Komponenten	Autor	ohne Ausfallwerte			mit Ausfallwert = 0		
		n	MW	s	n	MW	S
Gesamteiweiß [ng/cm ²]	Empress 2 ^{*)}	11	2170,8	645,1	25	955,1	1176,0
	Reintitan Grad 2	0	-	-			
	PMMA	25	233,5	133,9			
Thiozyanat [nmol/cm ²]	Empress 2	25	4,60	2,304			
	Reintitan Grad 2	25	2,160	0,192			
	PMMA	25	0,193	0,120			
Kalzium [nmol/cm ²]	Empress 2	25	35,553	1,172			
	Reintitan Grad 2	0	-	-			
	PMMA	25	0,829	0,522			
sekretorisches IgA [ng/cm ²]	Empress 2	0	-	-			
	Reintitan Grad 2	0	-	-			
	PMMA	24	315,4	198,0	25	302,8	203,9
IgG [ng/cm ²]	Empress 2	0	-	-			
	Reintitan Grad 2	0	-	-			
	PMMA	18	2,5	0,9	25	1,81	1,4

^{*)} korrigierte Werte

5. Diskussion

Tab. 19b: Vergleich der Pellikelbildung an Polymethylmethacrylat mit Dentalkeramik Empress 2 und Reintitan Grad 2

Komponenten	Autor	ohne Ausfallwerte			mit Ausfallwert = 0		
		n	MW	s	n	MW	S
Peroxidasen [$\mu\text{U}/\text{cm}^2$]	Empress 2 ^{*)}	25	4655,3	372,8			
	Reintitan Grad 2	25	4164,0	886,0			
	PMMA	25	608,5	509,4			
Proteasen [$\mu\text{U}/\text{cm}^2$]	Empress	0	-	-			
	Reintitan Grad 2	0	-	-			
	PMMA	21	1,00	0,82	25	0,84	0,84
Protease- Inhibitoren [$\mu\text{U}/\text{cm}^2$]	Empress 2	18	251,5	96,3	25	181,1	140,9
	Reintitan Grad 2	0	-	-			
	PMMA	23	6,64	3,97	25	6,10	4,22
α -Amylase [$\mu\text{U}/\text{cm}^2$]	Empress 2	19	458,0	357,6	25	348,1	368,5
	Reintitan Grad 2 ^{*)}	2	411,5	4,9	25	32,9	113,9
	PMMA	24	193,1	228,4	25	185,4	226,9
Lysozym [ng/cm ²]	Empress 2	9	9,06	6,13	25	3,26	5,68
	Reintitan Grad 2	0	-	-			
	PMMA	19	1,49	0,88	25	1,14	1,00

^{*)} korrigierte Werte

Bei der Teststatistik wurde zunächst mit Hilfe des U-Tests nach Mann-Whitney verglichen, wie sich die Anzahl positiver Nachweise pro 25 Probekörper bei den drei Werkstoffen unterschied. Im zweiten Schritt wurden alle negativen Analyseergebnisse durch den Wert null ersetzt, da zum Teil höhere Messwerte bei gleichzeitig geringerer Anzahl an Nachweisen auftraten, wodurch der Mittelwertvergleich mit dem t-Test verfälscht worden wäre. Tabelle 20 fasst die Testergebnisse zusammen, wenn Ausfallwerte mit null bewertet wurden. Während in dieser Arbeit an PMMA der Nachweis aller untersuchten Komponenten gelang, waren an Dentalkeramik und an Reintitan weniger Pellikelkomponenten nachzuweisen.

5. Diskussion

Von den drei geprüften Werkstoffen muss die Pellikelbildung an Reintitan am geringsten eingestuft werden, da im Eluat von Reintitan kein Nachweis für Gesamteiweiß, Proteasen, Protease-Inhibitoren, Kalzium, sIgA, IgG und Lysozym sowie nur in zwei Proben ein Nachweis von α -Amylase gelang. Ein sicherer Nachweis ist an Reintitan nur für hohe Peroxidasaktivitäten und für Thiozyanat gelungen. Da auch an Dentalkeramik und an PMMA in jeder Probe sowohl Peroxidase als auch Thiozyanat eindeutig nachgewiesen wurden, war das Peroxidasystem demnach in der Pellikel auf allen drei Werkstoffen aktiv. Andererseits ist nur am PMMA mit einem Immunschutz gegen Besiedlung durch Mikroorganismen zu rechnen, da nur hier ein Nachweis für sIgA und IgG in der Pellikel gelang.

Der Vergleich der Pellikelbildung an Dentalkeramik mit PMMA fällt weniger klar aus. Die Komponenten sIgA, IgG und Proteasen konnten an Dentalkeramik nicht nachgewiesen werden. Für Gesamteiweiß war aber trotz einer wesentlich geringeren Anzahl an Proben mit positivem Nachweis der Mittelwert an Dentalkeramik sogar dann noch signifikant höher als an PMMA, wenn die ausgefallenen Nachweise mit dem Wert null in die Mittelwertberechnung einfließen. Auch bei Protease-Inhibitoren, Kalzium, Peroxidasen und Thiozyanat wurden von Dentalkeramik signifikant höhere Aktivitäten bzw. Mengen als von PMMA desorbiert. Bei Lysozym und α -Amylase war eine Tendenz für höhere Werte vorhanden. Andererseits ergab sich aus der Anzahl positiver Nachweise in den 25 Proben bei Protease-Inhibitoren, α -Amylase und Lysozym ein Vorteil für die Pellikel an PMMA. Das Fehlen eines Nachweises für Proteasen an der Dentalkeramik lässt sich durch die außergewöhnlich hohen Werte für ihren Gegenspieler, die Protease-Inhibitoren in der Pellikel, zwanglos erklären. Es ist davon auszugehen, dass bei einer Besiedlung der Dentalkeramik mit Keimen von *C.albicans* die für das Eindringen in die Mundschleimhaut erforderliche saure Protease wirksam inhibiert wird.

Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass nach der Desorption mit 0,5 mol/l NaCl weitere, am PMMA verbliebene Anteile für Gesamteiweiß, Thiozyanat, Peroxida-

5. Diskussion

sen, Proteasen, Protease-Inhibitoren und sIgA nachgewiesen werden konnten, während Tschannerl (2004) und auch Hügel (2005) darüber nicht berichteten.

Tab. 20: Testergebnisse beim Vergleich der Pellikelbildung an Polymethylmethacrylat mit Dentalkeramik Empress 2 und Reintitan Grad 2 ^{*)}

Komponenten	Anzahl positiver Nachweise ^{**)}			Mittelwertvergleich ^{***)}		
	Z	p	Vergleich	t	P	Vergleich
Gesamteiweiß	-7,000	<0,001	P > R	8,383	<0,001	P > R
	-7,000	<0,001	P > E	-3,091	0,005	P < E
Thiozyanat	0	1	P = R	-43,469	<0,001	P < R
	0	1	P = E	-9,463	<0,001	P < E
Kalzium	-7,000	<0,001	P > R	7,944	<0,001	P > R
	0	1	P = E	-135,4	<0,001	P < E
S IgA	-6,725	<0,001	P > R	7,425	<0,001	P > R
	-6,725	<0,001	P > E	7,425	<0,001	P > E
IgG	-5,250	<0,001	P > R	6,514	<0,001	P > R
	-5,250	<0,001	P > E	6,514	<0,001	P > E
Peroxidasen	0	1	P = R	-17,395	<0,001	P < R
	0	1	P = E	-32,053	<0,001	P < E
Proteasen	-5,957	<0,001	P > R	5,039	<0,001	P > R
	-5,957	<0,001	P > E	5,039	<0,001	P > E
Protease-Inhibitoren	-6,725	<0,001	P > R	7,226	<0,001	P > R
	-2,291	0,022	P > E	-6,206	<0,001	P < E
A-Amylase	-6,165	0,001	P > R	3,003	0,004	P > R
	-2,017	0,044	P > E	-1,880	0,066	(P < E)
Lysozym	-5,480	<0,001	P > R	5,676	<0,001	P > R
	-2,286	0,022	P > E	-1,845	0,077	(P < E)

^{*)} R= Reintitan Grad 2 / E= Empress 2 / P= PMMA

^{**)} U-Test

^{***)} t-Test

5. Diskussion

Da bei einer Analyse direkt am Prüfkörper immer nur die äußerste Schicht erfasst werden kann, muss in Betracht gezogen werden, dass die untersuchten Komponenten so fest an das PMMA gebunden waren, dass sie mit der gewählten Methodik nicht vollständig erfasst wurden. Nach Hannig et al. (2005) führte selbst eine Lösung von 15 % NaCl nur zu einer teilweisen Entfernung der äußeren globulären Pellikelschicht an Schmelzplättchen.

Insgesamt ergibt sich aus der unterschiedlichen Pellikelbildung an diesen drei Werkstoffen eine sehr unterschiedliche Gefährdung für das Auftreten einer Entzündung der Mundschleimhaut, denn aus den Untersuchungen von Edgerton et al. (1993) ergibt sich im Umkehrschluss, dass eine unterschiedliche Zusammensetzung der Pellikel zu unterschiedlicher Besiedlung mit *C. albicans* führt.

7. Zusammenfassung

Die Ausbildung und Zusammensetzung eines Biofilms auf Oberflächen in der Mundhöhle ist von entscheidender Bedeutung für die orale Gesundheit, aber auch für die Auswahl von dentalen Restaurationmaterialien. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb das Adsorptionsverhalten von Speichelkomponenten an Prüfkörpern aus Polymethylmethacrylat (PMMA) untersucht.

Für die Untersuchungen standen 25 freiwillige Probanden im Alter von 17 bis 52 Jahren zur Verfügung. Die Pellikelbildung erfolgte an hochglanzpolierten zylindrischen Probekörpern aus Polymethylmethacrylat-Heißpolymerisat mit 11,16 cm² Oberfläche. Die Probekörper blieben über 30 Minuten bis zur Gleichgewichtsreaktion mit dem Mischspeichel im Mund. Nach Desorption mit einer 0,5 mol/l NaCl-Lösung erfolgte in den Eluaten die Bestimmung von Gesamtprotein, sekretorischem Immunglobulin A, Immunglobulin G, Thiozyanat, Kalzium, Gesamtperoxidasen, α -Amylase, Lysozym, Gesamtproteasen und Protease-Inhibitoren. Bei Gesamtprotein, sIgA, Thiozyanat, Peroxidasen, Proteasen und Protease-Inhibitoren gelang durch eine Modifizierung der Bestimmungsmethoden auch der quantitative Nachweis von am Prüfkörper verbliebenen, nicht desorbierbaren Anteilen. Mastikatorisch stimulierter Nüchterngesamtspichel wurde mit Kochsalzlösung versetzt und nach Zentrifugation auf die gleichen Komponenten analysiert.

Durch Umrechnung in Menge bzw. Aktivität jeder Pellikelkomponente pro cm² Prüfkörperfläche wurde ein Vergleich mit der Pellikelbildung an anderen Dentalmaterialien ermöglicht. Unter Annahme einer 0,1 mm dicken Schicht auf der Prüfkörperoberfläche konnte eine hypothetische Konzentration für jede Komponente berechnet und mit dem Gehalt im stimulierten Nüchterngesamtspichel verglichen werden. Zweite Messreihen für Gesamtprotein, Thiozyanat, sIgA, Lysozym, Proteasen, Protease-Inhibitoren und Kalzium ermöglichten Aussagen zur inter- und intraindividuellen Variabilität der Pellikelzusammensetzung.

Alle untersuchten Speichelkomponenten konnten in den Desorptionslösungen der PMMA-Prüfkörper quantitativ bestimmt werden, Lysozym und Proteasen aller-

7. Zusammenfassung

dings nicht bei jedem Probanden. Die Adsorption von Speichelkomponenten an Prüfkörpern aus PMMA war somit sehr intensiv und unter qualitativen Aspekten analog der Adsorption an Zahnschmelz und anderen dentalen Restaurationmaterialien. Die unterschiedlichen Befunde für nicht desorbierte und desorbierte Anteile der Peroxidasen in der Pellikel auf PMMA sprechen für das Vorliegen von mindestens zwei unterschiedlich stark gebundenen Fraktionen. Das Vorkommen von Thiozyanat in der Pellikel konnte erstmalig belegt werden.

Nur bei den Protease-Inhibitoren war die mittlere hypothetische Konzentration der Pellikelkomponenten signifikant größer als die Speichelkonzentration. Fehlende Korrelationen mit der Speichelzusammensetzung sprachen gegen die Annahme einer einfachen verdünnten Speichelschicht auf den Prüfkörpern. Bei einer im Schrifttum angegebenen Schichtdicke der Pellikel von 100 nm wäre für Gesamteiweiß, Peroxidasen mit NBS, sIgA, IgG und Proteasen eine selektive Anreicherung um mindestens eine Größenordnung, für Thiozyanat, Peroxidasen mit Guajakol und Kalzium eine Anreicherung um mindestens zwei Größenordnungen und für Protease-Inhibitoren eine Anreicherung von drei bis vier Größenordnungen gegenüber dem Speichel zu verzeichnen.

Immunglobulin G und Proteasen, für die nur geringe Werte im Speichel ermittelt wurden, zeigten eine signifikante Korrelation zwischen hypothetischer Konzentration und Sekretionsrate im Speichel. Für diese Komponenten kann vermutet werden, dass eine Sättigung der Pellikelschicht noch nicht erreicht war.

Der gemeinsame Nachweis von Thiozyanat und Peroxidasen in der Pellikel bedeutet, dass das Peroxidase-System des Speichels auch auf verschiedenartigen Oberflächen der Mundhöhle wirksam sein könnte. Zusammen mit Lysozym und Immunglobulinen ist ein positiver Effekt für die Abwehr einer mikrobiellen Besiedlung auf PMMA zu erwarten. Da für Protease-Inhibitoren im Mittel höhere Aktivitäten als für die gesamten Proteasen gefunden wurden, bleibt die Schutzfunktion des Speichels, die durch Proteasen eingeschränkt wird, in der Pellikel weitgehend erhalten. Insgesamt sprechen die Befunde am PMMA für eine selektive Anreicherung der Speichelkomponenten in der Pellikel, die vor allem durch die Oberflächeneigenschaften des Prüfkörpermaterials bestimmt wird.

Literaturverzeichnis

- Ahn, S.-J.; Kho, H.-S.; Lee, S.-W.; Nahm D.-S.:** Roles of salivary proteins in the adherence of oral Streptococci to various orthodontic brackets. *J Dent Res.* 2002; 81: 411-415
- Ahn, S.-J.; Kho, H.-S.; Kim, K.-K.; Nahm, D.-S.:** Adhesion of oral streptococci to experimental bracket pellicles from glandular saliva. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003; 124: 198-205
- Al-Hashimi, I.; Levine, M. J.:** Characterization of in vivo Salivary Derived enamel pellicle. *Arch Oral Biol.* 1989; 34: 289-295
- Amaechi, B.T.; Higham, S.M.; Edgar, W.M.; Milosevic, A.:** thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion. *J Dent Res.* 1999; 78: 1821-1828
- Amano, A.; Nakagawa, I.; Hamada, S.:** Studying initial phase of biofilm formation: molecular interaction of host proteins and bacterial surface components. *Methods Enzymol.* 1999; 310: 501-513
- An, Y.H.; Friedman, R.J.:** Concise Review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res.* 1998; 43: 338-348
- Armstrong, W.G.:** Characterisation studies on the specific human salivary proteins adsorbed in vitro by hydroxyapatite. *Caries Res.* 1971; 5: 215-227
- Baum B.J.; Ship, J.A.; Wu, A.J.:** Salivary gland function and aging: a model for studying the interaction of aging and systemic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1992; 4: 53-64.
- Bennick, A.; Chau, G.; Goodlin, R.; Abrams, S.; Tustian, D.; Madapallimatam, G.:** The role of human salivary acidic proline rich proteins in the formation of acquired dental pellicle in vivo and their fate after adsorption to the human enamel surface. *Arch Oral Biol.* 1983; 28: 19-27
- Bergmann, J.E.; Gülzow, H.J.:** Detection of binding of denatured salivary α -amylase to streptococcus sangius. *Arch Oral Biol.* 1995; 40: 973-974
- Betts, R.H.; Dainton, F.S.:** Electron transfer and other processes involved in the spontaneous bleaching of acidified solutions of ferric thiocyanate. *J Am Chem Soc.* 75: 1953; 5721-5727

7. Literaturverzeichnis

- Boackle, R.J.; Dutton, S.L.; Robinson, W.L.; Vesely, J.; Lever, J.K.; Su, H.R.; Chang, N.S.:** Effects of removing the negatively charged N-terminal region of the salivary acidic proline-rich proteins by human leucocyte elastase. *Arch Oral Biol.* 1999; 44: 575-585
- Brandtzaeg, P.:** Salivary immunoglobulins. In: Tenovou, J. (ed.): *Human saliva: Clinical chemistry and microbiology*, Vol. II. CRC Press, Boca Raton, 1989; 3-43
- Bradway, S.D.; Bergey, E.J.; Scannapieco, F.A.; Ramasubbu, N.; Zawacki, S.; Levine, M.J.:** Formation of salivary-mucosal pellicle: the role of transglutaminase. *Biochem J.* 1992; 284 (Pt. 2): 557-564
- Busscher, H.-J.; Geertsema-Doornbusch, G.I.; van der Mei, H. C.:** Adhesion to silicon rubber of yeasts and bacteria isolated from voice prostheses: influence of salivary conditioning films. *J Biomed Mater Res.* 1997; 34: 201-209
- Cannon, R. D.; Nand, A. K.; Jenkinson, H. F.:** Adherence of *Candida albicans* to human salivary components adsorbed to hydroxyapatite. *Microbiology* 1995; 141 (Pt 1): 213-219
- Cantarero, L.A.; Butler, J.E.; Osborne, J.W.:** The adsorptive characteristics of proteins for polystyrene and their significance in solid-phase immunoassays. *Anal Biochem.* 1980; 105: 375-382
- Carlén, A.; Börjesson, A.-C.; Nikdel, K.; Olsson, J.:** Composition of pellicles formed in vivo on tooth surfaces in different parts of the dentition, and in vitro on hydroxyapatite. *Caries Res.* 1998; 32: 447-455
- Carlén, A.; Nikdel, K.; Wennerberg, A.; Holmberg, K.; Osson, J.:** Surface characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin. *Biomaterials* 2001; 22: 481-487
- Carlén, A.; Eliasson, L.; Aronsson, G.; Birkhed, D.:** Human minor and major gland saliva proteins and ability to mediate *Actinomyces naeslundii* adherence. *Arch Oral Biol.* 2004; 49: 177-181.
- Chandra, J.; Mukherjee, P. K.; Leidich, S.D.; Faddoul, F. F.; Hoyer, L.L.; Douglas, L.J.; Ghannoum, M.A.:** Antifungal Resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res.* 2001; 80: 903-908
- Collins, L.M; Dawes, C.:** The surface area of the adult human mouth and thickness of the salivary film covering the teeth and the oral mucosa. *J Dent Res.* 1987; 66: 1300-1302

7. Literaturverzeichnis

- DeFife, K.M.; Shive, M.S.; Hagen, K.M.; Clapper, D.L.; Anderson, J. M.:** Effects of photochemically immobilized polymer coatings on protein adsorption, cell adhesion, and the foreign body reaction to silicone rubber. *J Biomed Mater Res.* 1999; 44: 298-307
- Deimling, D.; Breschi, L.; Hoth-Hannig, W.; Ruggeri, A.; Hannig, C.; Nekrashevych, Y.L.; Prati, C.; Hannig, M.:** Electron microscopic detection of salivary α -amylase in the pellicle formed in situ. *J Oral Sci.* 2004; 112: 503-509
- De Farias, D.G.; Bezerra, A.C.:** Salivary antibodies, amylase and protein from children with early childhood caries. *Clin Oral Investig.* 2003; 7: 154-157
- De Jong, H. P.; Boer, P. de; Busscher, H.J.; Pelit, A.W.J van; Arends, J.:** Surface free energy of human enamel after pellicle formation and fluoride application. In: ten Cate, J. M.; Leach, S.A.; Arends, J. (eds.): *Bacterial Adhesion and Preventive Dentistry.* IRL Press, Oxford, England, 1984; 125-131
- Döbert, A.; Güntzer, M.; Fiebinger, M.; Zimehl, R.; Hannig, M.:** Säureprotektive Eigenschaften der in situ gebildeten Pellikel. Arbeitsgemeinschaft für Grundlagenforschung in der DGZMK, Autorenreferate der 34. Jahrestagung, Mainz 10./11.01.2002; V8
- Dong, J.; Vylkova, S.; Li, X.S.; Edgerton, M.:** Calcium blocks fungicidal activity of human salivary histatin 5 through disruption of binding with candida albicans. *J Dent Res.* 2003; 82: 748-752
- Dowd, F.J.:** Saliva and dental caries. *Dent Clin North Am.* 1999; 43: 579-598
- Edgerton, M.; Levine, M.J.:** Biocompatibility: its future in prosthodontic research. *J Prosthet Dent.* 1994; 69: 406-415
- Edgerton, M.; Raj, P.A.; Levine, M.J.:** Surface-modified poly(methyl methacrylate) enhances adsorption and retains anticandidal activities of salivary histatin 5. *J Biomed Mater Res.* 1995; 29: 1277-1286
- Edgerton, M.; Scannapieco, F.A.; Reddy, M.S.; Levine, M.J.:** Human submandibular-sublingual saliva promotes adhesion of candida albicans to polymethylmethacrylate. *Infect Immun.* 1993; 61: 2644-2652
- Edgerton, M.; Lo, S.E.; Scannapieco, F.A.:** Experimental salivary pellicles formed on titanium surfaces mediate adhesion of streptococci. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996; 11: 443-449
- Edgerton, M.; Tabak, L.A.; Levine, M.J.:** Saliva: A significant factor in removable prosthodontic treatment. *J Prosthet Dent.* 1987; 57: 57-66

7. Literaturverzeichnis

- Eggen, K.-H.; Rölla, G.:** Gel filtration, ion exchange chromatography and chemical analysis of macromolecules present in acquired enamel pellicle (2-hour-pellicle). *Scand J Dent Res.* 1982; 90: 182-188
- Eggen, K.-H.; Rölla, G.:** Further studies on the composition of the acquired enamel pellicle. *Scand J Dent Res.* 1983; 91: 439-446
- Eggen, K.-H.; Rölla, G.:** Further information on the composition of the acquired pellicle. In: Guggenheim, B. (ed.): *Cariology Today.* Karger, Basel; 1984; 109-118
- Embery, G.; Heaney, T.G.; Stanbury, J.B.:** Studies on the organic polyanionic constituents of human acquired dental pellicle. *Arch Oral Biol.* 1986; 31: 623-625
- Embery, G.; Hoggs, S.D.; Hraney, T.G.; Standbury, J.B.; Green, D.R.J.:** Some considerations on dental pellicle formation and early bacterial colonisation: the role of high and low molecular weight proteins of the major and minor salivary glands. In: ten Cate, J.M.; Leach, S.A.; Arends, J.(eds.): *Bacterial Adhesion and Preventive Dentistry,* IRL Press, Oxford, Washington/DC, 1984; 73-84
- Epstein, J.B.; Truelove, E.L.; Izutsu, K.T.:** Oral candidiasis: pathogenesis and host defense. *Rev Infect Dis.* 1984; 6: 96-106
- Ericson, T.; Pruitt, K.M.; Arwin, H.; Lundstrom, I.:** Ellipsometric studies of film formation on tooth enamel and hydrophilic silicon surfaces. *Acta Odontol Scand.* 1982; 40: 197-201
- Featherstone, J.D.; Behrman, J.M.; Bell, J.E.:** Effect of whole saliva components on enamel demineralization in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4: 357-362
- Ferguson D.B.:** Salivary electrolytes. In: Tenovuo J (Hrsg.): *Human saliva: Clinical chemistry and microbiology,* Vol. I. CRC Press, Boca Raton / FL; 1989; 124-132
- Gabriel, M.O.; Grünheid, T.; Zentner, A.:** Glycosylation pattern and cell attachment-inhibiting property of human salivary mucins. *J Periodontol.* 2005; 76: 1175-1181
- Gazi, M.L.; Cox, S.W.; Clark, D.T.; Eley, B.M.:** A comparison of cysteine and serine proteinase in human gingival crevicular fluid with tissue, saliva and bacterial enzymes by analytical isoelectric focusing. *Arch Oral Biol.* 1996; 41: 393-400

7. Literaturverzeichnis

- Geller, J.H.; Rovelstad, G.H.:** Electrophoresis of saliva: relationship of protein components to dental caries. *J Dent Res.* 1995; 38: 1060-1065
- Ghezzi, E.M.; Ship JA:** Aging and secretory reserve capacity of major salivary glands. *J Dent Res.* 2003; 82: 844-848
- Gibbons, R.J.; Etherden, I.; Peros, W.:** Aspects of the attachment of oral streptococci to experimental pellicles. In: Mergenhagen, S.E.; Rosan, B. (eds.): *Molecular Basis of Oral Microbial Adhesion.* American Society for Microbiology, Washington, DC, 1985; 77-84
- Gibbons, R.J.; Hay, D.I.:** Absorbed salivary proline-rich proteins as bacterial receptors on apatitic surfaces. In: Switalski, L.; Höök, M.; Beachey, E. (eds.): *Molecular Mechanisms of Microbial Adhesion (Proceedings of the Second Gulf Shores Symposium, May 6-8, 1988),* Springer: New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, 1989; 143-163
- Gibbons, R.J.; Hay, D.I.; Childs, W.C.; Davis, G.:** Role of cryptic receptors (cryptitopes) in bacterial adhesion to oral surfaces. *Arch Oral Biol.* 1990; 35: 107-114
- Gibbons, R.J.:** bacterial adhesion to oral tissue: a model for infection diseases. *J Dent Res.* 1989; 68: 750-760
- Gibbons, R.J.; Hay, D.I.:** Absorbed salivary acidic proline-rich proteins contribute to the adhesion of streptococcus mutans JBP to apatitic surfaces. *J Dent Res.* 1989; 68: 1303-1307
- Gibbons, R.J.; Hay, D.I.:** Human salivary acidic proline-rich proteins and statherin promote the attachment of actinomyces viscosus LY7 to apatitic surfaces. *Infect Immun.* 1988; 56: 439-445
- Glantz, P.-O.; Natiella, J.R.; Vaughan, C.D.:** Structural studies of human saliva. *Acta odontol Scand.* 1989; 47: 17-24
- Göcke, R.; Groß, C.; von Schwanewede, H.:** Veränderungen im unstimulierten und stimulierten Nüchterngesamtspichel nach Protheseneingliederung. *Dtsch Zahnärztl Z.* 2005; 60: 503-508
- Göcke, R.; Simm, R.; Szymanska, D.; Seyfarth, M.; von Schwanewede, H.:** Multivariate Speichelanalysen bei Patienten mit Stomatitis prothetica. *Dtsch Zahnärztl Z.* 1997; 52: 368-372

7. Literaturverzeichnis

- Grahn, E.; Tenovuo, J.; Lehtonen, O.P.; Eorola, E.; Vilja, P.:** Antimicrobial systems of human whole saliva in relation to dental caries, cariogenic bacteria, and gingival inflammation in young adults. *Acta Odontol Scand.* 1988; 46: 67-74
- Gristina, A.G.; Naylor, P.T.; Myrvik, Q.:** The race for the surface: Microbes, tissue cells, and biomaterials. In: Switalski, L.; Höök, M.; Beachey, E. (eds.): *Molecular Mechanisms of Microbial Adhesion (Proceedings of the Second Gulf Shores Symposium, May 6-8, 1988)*. Springer-Verlag; New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, 1989, 177-209
- Groß, C.:** Veränderungen im unstimulierten und stimulierten Nüchterngesamt-speichel nach Protheseneingliederung. *Med. Diss., Rostock*, 2002
- Gusman, H.; Travis, J.; Helmerhorst, E.J.; Potempa, J.; Troxler, R.F.; Oppenheim, F.G.:** Salivary histatin 5 is an inhibitor of both host and bacterial enzymes implicated in periodontal disease. *Infect Immun.* 2001; 69: 1402-1408
- Gusman, H.; Leone, C.; Helmerhorst, E.J.; Nunn, M.; Flora, B.; Troxler, R.F.; Oppenheim, F.G.:** Human salivary gland-specific daily variations in histatin concentrations determined by a novel quantitation technique. *Arch Oral Biol.* 2004; 49: 11-22.
- Hägewald, S.; Fishel, D.; Bernimoulin, J.P.; Christian, C.:** Veränderungen der IgA-Immunantwort im Verlauf der Therapie von aggressiver Parodontitis. *Dtsch Zahnärztl Z.* 2003; 58: 365-370
- Hahn, R.; Weiger, R.; Netuschil, L.; Brüch, M.:** Microbial accumulation and vitality on different restorative materials. *Dent Mater.* 1993; 9: 312-316
- Hahn Berg, I.C.; Kalfas, S.; Malmsten, M.; Arnebrant T.:** Proteolytic degradation of oral biofilms in vitro and in vivo: potential of proteases originating from *Euphausia superba* for plaque control. *Eur J Oral Sci.* 2001; 109: 316-324
- Hannig, C.; Hoch, J.; Becker, K.; Hannig, M.; Attin, T.:** Lysozyme activity in the initially formed in situ pellicle. *Arch Oral Biol.* 2005; 50: 821-828
- Hannig, C.; Zech, R.; Henze, E.; Attin, T.:** Pellicle-bound salivary amylase activity on different surfaces. *Caries Res* 2004; 38: 386 (abstract 86)
- Hannig, C.; Zech, Attin, T.; Henze, E.; Brinkmann, K.; Zech, R.:** Immobilization and activity of human α -amylase in the acquired enamel pellicle. *Arch Oral Biol.* 2004; 49: 469-475
- Hannig, C.; Hannig M.; Attin, T.:** Review. Enzymes in the acquired enamel pellicle. *Eur J Oral Sci.* 2005; 113: 2-13

7. Literaturverzeichnis

- Hannig, M.:** Bildung, Funktion und Bedeutung der Pellikel I. Biochemische, bakteriologische und strukturelle Aspekte. *Oralprophylaxe* 1994; 16: 39-46
- Hannig, M.:** Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials in vivo. *Eur J Oral Sci.* 1999 a; 107: 55-64
- Hannig, M.:** Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clin Oral Investig.* 1999 b; 3: 88-95
- Hannig, M.:** Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials. *Eur J Oral Sci.* 1997; 105: 422-433
- Hannig, M.; Bössmann, K:** Pellicula dentis (I) – Ultrastrukturelle Vielfalt als Ausdruck komplexer Bildung und Reifung. *Quintessenz* 1989 a; 40: 1319-1327
- Hannig, M.; Balz, M.:** Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res.* 1999; 33: 372-379
- Hannig, M.; Fiebiger, M.; Güntzer, M.; Döbert, A.; Zimehl, R.; Nekrashevych, Y.:** Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. *Arch Oral Biol.* 2004; 49: 903-910
- Hannig, M.; Joiner A.:** The structure, function and properties of the acquired pellicle. In: Druckwort, R.M. (ed.): *The teeth and their environment.* Chapter 2. (Monogr Oral Sci., Vol. 19). Basel; Karger; 2006; 29-64
- Hannig, M.; Khanafer, A.K.; Hoth-Hannig, W.; Al-Marrawi, F.; Acil, Y.:** Transmission electron microscopy comparison of methods for collecting in situ formed enamel pellicle. *Clin Oral Investig.* 2005; 9: 30-37
- Hara, A.T.; Ando, M.; González-Cabezas, C.; Cury, J.A.; Serra, M.C.; Zero, D.T.:** Protective effect of the acquired enamel pellicle against different erosive challenges in situ. *Caries Res.* 2004; 38: 390 (abstract 97)
- Hopp, M.; Jacobi, R.; Dettlaff, S.; Schulz, J.; Abert, C.:** SDS-gelektrophoretische Untersuchungen zur Speichelprotein-Adsorption an Dentalmaterialien. *Wiss. Zeitschr Humboldt-Univ Berlin, R. Med.* 1989; 38: 397
- Huber, W.:** Modifikation von DIN 32645 zur Bestimmung der Nachweis- und Erfassungsgrenze. *GIT Labor-Fachzeitschr.* 2001; 12: 1308-1309
- Hügel, S.:** Quantitative Bestimmung von Speichelkomponenten in der Pellikel an Rheintitan Grad 2. Med. Diss.; Rostock, 2005
- Humphrey, S.P.; Williamson, R.T.:** A review of saliva: Normal composition, flow and function. *J Prosthet Dent.* 85: 2001; 162 –269

7. Literaturverzeichnis

- Ilie, N.; Kunzelmann, K.-H.; Felten, K.; Hickel, R.:** Oberflächeneigenschaften von Dentalrestaurationsmaterialien in Abhängigkeit von der Pellikelbildung. *Dtsch Zahnärztl Z.* 2003; 58: 38-41
- Iontcheva, I.; Oppenheim, F.G. ; Troxler, R.F.:** Human salivary mucin MG1 selectively forms heterotypic complexes with amylase, proline-rich proteins, statherin, and histatin. *J Dent Res.* 1997; 76: 734-743
- Iacono, V.J.; Byrnes, T.P.; Crawford, I.T.; Grossbard, B.L.; Pollock, J.J.; MacKay, B.J.:** Lysozyme-mediated de-chaining of *Streptococcus mutans* and its antibacterial significance in an acidic environment. *J Dent Res.* 1985; 64: 48-53.
- Jainkittivong, A., Johnson, D.A., Yeh, C.-K.:** The relationship between salivary histatin levels and oral yeast carriage. *Oral Microbiol Immunol.* 1998; 13: 181-187.
- Jensen, J.L.; Lamkin, M.S.; Oppenheim, F.G.:** Adsorption of human salivary proteins to hydroxyapatite: a comparison between whole saliva and glandular salivary secretions. *J Dent Res.* 1992; 71: 1569-1576
- Jentsch, H.; Göcke, R.; Seyfarth, M.; Tessenow, W.; Beetke, E.:** Vergleichende Untersuchungen zum Gehalt an antibakteriellen Faktoren im Speichel. *Dtsch Zahnärztl Z.* 1992; 47: 581-585.
- Johnsson, M.; Levine, M.J.; Nancollas, G.H.:** Hydroxyapatite binding domains in salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4: 371-378
- Junker, A.; Schmidt, H.; Birkenmeier, G.:** Analyse von alpha2-Makroglobulin (alpha2-M) in gesunder Gingiva und bei Paradontitis. *Dtsch Zahnärztl Z.* 2000; 55: 497-501.
- Juriaanse, A.C.; Booij, M.; Arends, J.; Ten Bosch, J.J.:** The adsorption in vitro of purified salivary proteins on bovine dental enamel. *Arch Oral Biol.* 1981; 26: 91-96.
- Juriaanse, A.C.; Booij, M.:** Isolation and partial characterisation of three acidic proteins in saliva. *Arch Oral Biol.* 1979; 24: 621-625
- Kennedy, S.; Davis, C.; Abrams, W.R.; Billings, P.C.:** Submandibular salivary protease: lack of role in anti-HIV activity. *J Dent Res.* 1998; 77: 1515-1519.
- Kho, H.-S.; Vacca Smith, A.M.; Koo, H.; Scott-Anne, K.; Bowen, W.H.:** Interactions of *Streptococcus mutans* glucosyltransferase B with lysozyme in solution and on the surface of hydroxyapatite. *Caries Res.* 2005; 39: 411-416

7. Literaturverzeichnis

- Kohavi, D.; Klinger, A.; Steinberg, D.; Sela, M.N.:** Adsorption of salivary proteins onto prosthetic titanium components. *J Prosthet Dent.* 1995; 74: 531-534
- Kohavi, D.; Klinger, A.; Steinberg, D.; Mann, E.; Sela, M.N.:** α -Amylase and salivary albumin adsorption onto titanium, enamel and dentin: an in vivo study. *Biomaterials* 1997; 18: 903-906
- König, K.G.:** Karies und Parodontopathien. Ätiologie and Prophylaxe. Thieme, Stuttgart – New York, 1987
- Kousvelari, E.E.; Ciardi, J.E.; Bowers, M.R.:** Altered bacterial aggregation and adherence associated with changes in rat parotid-gland salivary proteins induced in vivo by β -adrenergic stimulation. *Arch Oral Biol.* 1988; 53: 341-346
- Kousvelari, E.E.; Baratz, R.S.; Burke, B.; Oppenheim, F.G.:** Immunochemical identification and determination of proline-rich proteins in salivary secretions, enamel pellicle, and glandular tissue specimens. *J Dent Res.* 1980; 59: 1430-1438
- Kuboki, Y.; Teraoka, K.; Okada, S.:** X-ray photoelectron spectroscopic studies of the adsorption of salivary constituents on enamel. *J Dent Res.* 1987; 66: 1016-1019
- Lamkin, M.S., Arancillo, A.A.; Oppenheim, F.G.:** Temporal and compositional characteristics of salivary proteins adsorbed to hydroxyapatite. *J Dent Res.* 1996; 75: 803-808
- Lee, S.-J.; Kho, H.-S.; Lee, S.-W.; Yang, W.-S.:** Experimental salivary pellicles on the surface of orthodontic materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001; 119: 59-66
- Lendenmann, U.; Grogan, J.; Oppenheim, F.G.:** Saliva and dental pellicle: A review. *Adv Dent Res.* 2000; 14: 22-28
- Li, J.; Helmerhorst, E.J.; Yao, Y.; Nunn, M.E.; Troxler, R.F.; Oppenheim, F.G.:** Statherin is an in vivo pellicle constituent: identification and immunquantification. *Arch Oral Biol.* 2004; 49: 379-385
- Lie, T.:** Scanning and transmission electron microscope study of pellicle morphogenesis. *Scand J Dent Res.* 1977; 85: 217-231
- Liu, B.; Rayment, S.A.; Gyurko, C.; Oppenheim, F.G.; Offner, G.D.; Troxler, R.F. :** The recombinant N-terminal region of human salivary mucin MG2 (MUC7) contains a binding domain for oral Streptococci and exhibits candidacidal activity. *Biochem J.* 2000; 345: 557-564

7. Literaturverzeichnis

Lockowandt, P.; Loges, H.; Wagner, I.-V.: Restaurative Werkstoffe und initiale Pellikelbildung. *Dtsch Zahn-Mund-Kieferheilkd.* 1991; 79: 147-151

Lohinai, Z.; Stachlewitz, R.; Virag, L.; Székely, A.D.; Hasko, G.; Szabo, C.: Evidence for reactive nitrogen species formation in the gingivomucosal tissue. *J Dent Res.* 2001; 80: 470-475

Mandel, I.D.: The function of saliva. *J Dent Res.* 1987; 66: 623-627

Mansson-Rahemtulla, B.; Baldone, D.C.; Pruitt, K.M.; Rahemtulla, F.: Specific assays for peroxidases in human saliva. *Arch Oral Biol.* 1986; 31: 661-668.

Marcotte, H.; Lavoie, M.C.: Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998; 62: 71-109.

Márton, K.; Boros, I.; Fejérdy, P.; Madléna, M.: Evaluation of unstimulated flow rates of whole and palatal saliva in healthy patients wearing complete dentures and in patients with Sjogren's syndrome. *J Prosthet Dent.* 2004; 91: 577-581.

Meckel, A. H.: The formation and properties of organic films on teeth. *Arch Oral Biol.* 1965; 10: 585-598.

Mestecky, J.: Saliva as a manifestation of the common mucosal immune system. *Ann NY Acad Sci.* 1993; 694: 184-194.

Millsap, K.W.; Bos, R.; van der Mei, H.C.; Busscher, H. J.: Adhesion and surface-aggregation of candida albicans from saliva on acrylic surfaces with adhering bacteria as studied in a parallel plate flow chamber. *Antonie van Leeuwenhoek* 1999; 75: 351-359.

Moreno, E.C.; Kresak, M.; Hay, D.I.: Adsorption thermodynamics of acidic proline-rich salivary proteins onto calcium apatites. *J Biol Chem.* 1982; 257: 2981-2989

Morschhäuser, J.; Köhler, G.; Hacker, J.: Gibt es Pathogenitätsfaktoren bei Pilzen? *Mycoses* 1996; 39 Suppl. 1: 51-54.

Närhi, T.O.; Tenovuo, J.; Ainamo, A.; Vilja, P.: Antimicrobial factors, sialic acid, and protein concentration in whole saliva of elders *Scand J Dent Res.* 1994; 102: 120-125.

Nakamura-Minami, M.; Furuichi, Y.; Ishikawa, K.; Mitsuzono-Tofuku, Y.; Izumi, Y.: Changes of alpha 1-protease inhibitor and secretory leukocyte protease inhibitor levels in gingival crevicular fluid before and after non-surgical periodontal treatment. *Oral Dis.* 2003; 9: 249-254.

7. Literaturverzeichnis

- Navazesh, M.; Christensen, C.M.:** A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurement procedures. *J Dent Res.* 1982; 61: 1158-1162.
- Newburn, E.:** *Cariology.* 3rd ed.; Quintessence, Chicago; 1989; 66-72.
- Niedemeier, W.:** Psychogene Prothesenunverträglichkeit oder sialogene Schleimhautintoleranz? *Dtsch Zahnärztl Z.* 1996; 51: 73-80.
- Niedermeier, W.; Huber, M.; Fischer, D.; Beier, K.; Müller, N.; Schuler, R.; Brinninger, A.; Fartasch, M.; Diepgen, Th.; Matthaeus, C.; Meyer, C.; Hector, M.P.:** Significance of saliva for the denture-wearing population. *Gerodontology* 2000; 17: 104-118.
- Niedermeier, W.; Schaller, K.-H.; Fischer, D.:** Die Sekretion der Speichel- und Schleimdrüsen im quantitativen Vergleich. *Dtsch Zahnärztl Z.* 1989; 44: 52-56.
- Niedermeier, W.H.; Krämer, R.:** Salivary secretion and denture retention. *J Prosthet Dent.* 1992; 67: 211-216.
- Nikiforuk, G.:** *Understanding dental caries, Vol. 1. Etiology and mechanisms. Basic and clinical aspects.* 1. Aufl.; Karger, Basel, 1985; S. 253-256.
- Nieuw Amerongen, A.V.; Bolscher, J.G.; Veerman, E.C.:** Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res.* 2004; 38: 247-253.
- Norble, R.E.:** Salivary alpha-amylase and lysozyme levels: a noninvasive technique for measuring parotid vs. submandibular/sublingual gland activity. *J Oral Sci.* 2000; 42: 83-86.
- Norde, W.:** Adsorption of biopolymers and its relevance for particle adhesion: a physico-chemical approach. In: Ten Cate, R.; Leach, S.A.; Arends, J. (eds.): *Bacterial adhesion and preventive dentistry.* IRL Press; Oxford, Washington DC, 1984; 1-17.
- Nyvad, B.; Fejerskov, O.:** Development, structure and pH of dental plaque. In: Thylstrup, A.; Fejerskov, O. (eds.): *Textbook of clinical cariology,* 2nd ed. Munksgaard: Copenhagen, 1994; 89-110.
- Nyvad, B.; Fejerskov, O.:** Transmission electron microscopy of early microbial colonization of human dental enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* 1987; 95: 297-307.
- Ofek, I.; Perry, A.:** Molecular basis of bacterial adherence to tissues. In: Mergenhagen, S.E.; Rosan, B. (eds.): *Molecular basis of oral microbial adhesion.* American Society for Microbiology, Washington DC; 7-13.

7. Literaturverzeichnis

- Osserman, E.F.; Lawlor, D.P.:** Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. *J Exp Med.* 1966; 124: 921-952.
- O'Sullivan, J.M.; Cannon, R.D.; Sullivan, P.A.; Jenkinson, H.F.:** Identification of salivary basic proline-rich proteins as receptors for candida albicans adhesion. *Microbiology-UK* 1997; 143(Part 2): 341-348.
- Özden, A.N.; Haghghat, N.; Al-Hashimi, I.:** Preliminary evaluation of salivary pellicle on nickelchromium alloy in vivo. *Quintessence Int* 2002; 33: 731-735.
- Park, A. W.; Yaacob, H.B.:** A synopsis of the origins and function of dental plaque and pellicle. *J Nihon Univ Sch Dent.* 1994; 36: 157-174.
- Piotrowski, J.; Czajkowski, A.; Murty, V.L.; Slomiany, A.; Slomiany, B.L.:** Identification of human salivary protease activity toward mucin: differences with caries. *Biochem Int* 1992; 28: 939-947.
- Pratt-Terpstra, I.H.; Mulder, J.; Weerkamp, A.H.; Feijen, J.; Busscher, H.J.:** Secretory IgA adsorption and oral streptococcal adhesion to human enamel and artificial solid substrata with various surface free energies. *J Biomater Sci Polymer Edn.* 1991; 2: 239-253.
- Proctor, G.B.; Pramanik, R.; Carpenter, G.H.; Rees, G.D.:** Salivary proteins interact with dietary constituents to modulate tooth staining. *J Dent Res.* 2005, 84: 73-78.
- Proctor, G.B.; Carpenter, G.H.:** Chewing stimulates secretion of human salivary secretory immunoglobulin A. *J Dent Res.* 2001; 80: 909-913.
- Pruitt, K.M.; Adamson, M.:** Enzyme activity of salivary lactoperoxidase adsorbed to human enamel. *Infect Immun.* 1977; 17: 112-116.
- Pruitt, K.M.; Caldwell, R.C.; Jamieson, A.D.; Taylor, R.E.:** The interaction of salivary proteins with tooth surface. *J Dent Res.* 1969; 48: 818-823.
- Quirynen, M.; van der Mei, H.C.; Bollen, C.M.L.; van den Bossche, L.H.; Doornbusch, G.I.; van Steenberghe, D.; Busscher, H.J.:** The influence of surface-free energy on supra- and subgingival plaque microbiology. An in vivo study on implants. *J Periodontol.* 1994; 65: 162-167.
- Robinson, C.; Walker, J.; Kirkham, J.; Brookes, S.J.; Shore, R.C.:** Protein-mineral interactions as aetiological factors in dental caries. *Caries Res.* 1998; 32: 267-317.

7. Literaturverzeichnis

- Roger, V.; Tenovuo, J.; Lenander-Lumikari, M.; Söderling, E.; Vilja, P.:** Lysozyme and lactoperoxidase inhibit the adherence of *Streptococcus mutans* to saliva-treated hydroxyapatite in vitro. *Caries Res.* 1994; 28: 421-428.
- Rølla, G.; Ciardi, J.E.; Schultz, S.A.:** Adsorption of glucosyltransferase to saliva coated hydroxyapatite. *Scand J Dent Res.* 1983; 91: 112-117.
- Rølla, G.; Ciardi, J.E.; Bowen, W.H.:** Identification of IgA, IgG, lysozyme, albumin, alpha-amylase and glucosyltransferase in the protein layer adsorbed to hydroxyapatite from whole saliva. *Scand J Dent Res.* 1983; 91: 186-190.
- Rølla, G.; Bowen, W.H.:** Surface adsorption of fluoride and ionic exchange reactions on hydroxyapatite. *Acta Odontol Scand.* 1982; 36: 219-224.
- Rølla, G.; Embery, G.:** Sulfated glycoproteins in the acquired pellicle and I plaque from *Macaca fascicularis* demonstrated with labelled sulfate. *Scand J Dent Res.* 1977; 85: 237-240.
- Rosan, B.; Eifert, R.; Golub, E.:** Bacterial surfaces, salivary pellicles, and plaque formation. In: Mergenhagen SE, Rosan B (eds.): *Molecular basis of oral microbial adhesion.* American Society for Microbiology, Washington DC, 1985; 69-76.
- Rosan, B.; Mergenhagen, S.E.:** Preface. In: Mergenhagen, S.E.; Rosan, B. (eds.): *Molecular basis of oral microbial adhesion.* American Society for Microbiology, Washington DC; 1985, 9.
- Rosin, M.; Hanschke, M.; Splieth, C.; Kramer, A.:** Activities of lysozyme and salivary peroxidase in unstimulated whole saliva in relation to plaque and gingivitis scores in healthy young males. *Clin Oral Investig.* 1999; 99: 133-137.
- Roth, M.; Böring, H.:** Proteinadsorption an und –desorption von Hydroxylapatit in vitro (Poster-Abstract). *Wiss Zeitschr Humboldt-Univ. Berlin, Reihe Med.* 1989; 38: 399.
- Roukema, P.A.; Boerman, J.W.; Valentijn-Benz, M.; Nieuw Amerongen, A.V.:** Factors involved in the adherence of salivary proteins to hydroxyapatite. In: Zelles, T. (ed.): *Saliva and salivation.* (Adv. Physiol. Sci., Vol. 28); Budapest, 1981; 283-288.
- Ruan, M.S.; Di Paola, C.; Mandel, I.D.:** Quantitative immunochemistry of salivary proteins adsorbed in vitro to enamel and cementum from caries-resistant and caries-susceptible human adults. *Arch Oral Biol.* 1986; 31: 597-609.
- Ruechel, R.:** Virulence factors of *Candida* species. In: Samaranayake, L.P.; MacFarlane, T.W. (eds.): *Oral candidosis.* Wright, London, 1990; 47-65.

7. Literaturverzeichnis

- Rudney, J.D.; Hickey, K.L.; Ji, Z.:** Cumulative correlations of lysozyme, lactoferrin, peroxidase, S-IgA, amylase, and total protein concentrations with adherence of oral viridans streptococci to microplates coated with human saliva. *J Dent Res.* 1999; 78: 759-768.
- Ruhl, S.; Sandberg, A.L.; Cisar J.O.:** Salivary receptors for the proline-rich protein-binding and lectin-like adhesins of oral actinomyces and streptococci. *J Dent Res.* 2004; 83: 505-510.
- Rupp, F.; Axmann, D.; Ziegler, C.; Geis-Gerstorfer, J.:** Adsorption/desorption phenomena on pure and teflon[®]-af coated titania surfaces studied by dynamic contact angle analysis. *J Biomed Mater Res.* 2002; 62: 567-578.
- Rykke, M.; Sønju, T.; Rølla, G.:** Interindividual and longitudinal studies of amino acid composition of pellicle collected in vivo. *Scand J Dent Res.* 1990; 98: 129-134.
- Rykke, M.; Sønju, T.; Skjørland, K.; Rølla, G.:** Protein adsorption to hydroxyapatite and to calcium fluoride in vitro and amino acid analyses of pellicle formed on normal enamel and on calcium-fluoride-covered enamel in vivo. *J Dent Res.* 1996; 75: 1779-1788.
- Sandholm L:** Proteases and their inhibitors in chronic inflammatory periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1986; 13: 19-26.
- Samaranayake, L.P.; McCourtie, J.; MacFarlane, .T.W:** Factors affecting the in-vitro adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Arch Oral Biol.* 1980; 25: 611-615.
- Scannapieco, F.A.; Levine, M.J.:** Saliva and dental pellicles. In: Genco, R.J.; Goldman, H.M.; Cohen, D.W. (eds.): *Contemporary periodontics. Section D: Etiology of periodontal diseases. Chapter 8.* CV Mosby, St. Louis u.a., 1990; 117-125.
- Scannapieco, F.A.; Torres, G.I.; Levine, M.J.:** Salivary amylase promotes the adhesion of oral streptococci to hydroxyapatite. *J Dent Res.* 1995; 74: 1360-1366.
- Scannapieco, F.A.:** Saliva bacterium interactions in oral microbial ecology. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1994; 5: 203-248.
- Scheinin, A.; Mäkinen, K.:** The effect of various sugars on the formation and chemical composition of dental plaque. *Int Dent J.* 1971; 21, 302-321.

7. Literaturverzeichnis

- Schenkels, L.C.P.M.; Veerman, E.C.I.; Nieuw Amerongen, A.V.:** Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1995; 6: 161-175.
- Schmidt, R.; Thews, G.:** Physiologie des Menschen. Springer Verlag, Berlin, 1995; 26
- Scully, C.; El-Kabir, M.:** Candida and oral candidosis: A Review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1994; 5: 125-157.
- Sewon, L.A.; Karjalainen, S.M.; Soderling, E.; Lapinleimu, H.; Simell, O.:** Associations between salivary calcium and oral health. *J Clin Periodontol.* 1998; 25: 915-919.
- Seyfarth, M.; Neumann, I.; Simm, R.; Kaben, U.:** Nachweis von Candida-spezifischen Antikörpern im Speichel. *Immun Infekt.* 1994; 22: 152-153.
- Shugars, D.C.; Watkins, C.A.; Cowen, H.J.:** Salivary concentrations of secretory leukocyte protease inhibitor, an antimicrobial protein, is decreased with advanced age. *Gerontology* 2001; 47: 246-253.
- Sikorska, M.H.; Mielnik-Blaszczak, M.; Kapec, E.:** The relationship between the levels of sIgA, lactoferrin and alpha (1) proteinase inhibitor in saliva and permanent dentition caries in 15-years-olds. *Oral Microbiol Immunol.* 2002; 17: 272-276.
- Simm, R.; Göcke, R.; Seyfarth, M.:** Speichel - ein bestimmender Abwehrfaktor beim Krankheitsbild Stomatitis prothetica. *Zahn-Mund-Kieferheilkd.* 1990; 78: 739-741.
- Sipahi, C.; Anil, N.; Bayramli, E.:** The effect of acquired salivary pellicle on the surface free energy and wettability of different denture base materials. *J Dent.* 2001; 29: 197-204.
- Skjørland, K.K.; Rykke, M.; Sønju, T.:** Rate of pellicle formation in vivo. *Acta Odontol Scand.* 1995; 53: 358-362.
- Slomiany, B.L.; Murty, V.L.; Mandel, I.D.; Sengupta, S.; Slomiany, A.:** Effect of lipids on the lactic acid retardation capacity of tooth enamel and cementum pellicles formed in vitro from saliva of caries-resistant and caries-susceptible human adults. *Arch Oral Biol.* 1990; 35: 175-180.
- Slomiany, B.L.; Murty, V.L.; Zdebska, E.; Slomiany, A.; Gwozdziński, K.; Mandel, I.D.:** Tooth surface-pellicle lipids and their role in the protection of dental enamel against lactic-acid diffusion in man. *Arch Oral Biol.* 1986; 31: 187-191.

7. Literaturverzeichnis

- Slomiany, B.L.; Murty, V.L.; Piotrowski, J.; Slomiany, A.:** Salivary mucins in oral mucosal defence. *Gen Pharmacol.* 1996; 27: 761-771.
- Soares, R.V., Lin, T., Siqueira, C.C., Bruno, L.S., Li, X., Oppenheim, F.G., Offner, G., Troxler, R.F.:** Salivary micelles: identification of complexes containing MG2, sIgA, lactoferrin, amylase, glycosylated proline-rich protein and lysozyme. *Arch Oral Biol.* 2004; 49: 337-343.
- Sønju, T.; Scheie, A.Aa.; Pearton, K.:** Bacterial agglutinating potential of some pellicle and salivary proteins. In: Ten Cate, R.; Leach, S.A.; Arends, J. (eds.): *Bacterial Adhesion and Preventive Dentistry.* IRL Press: Oxford, Washington/DC, 1984; 51-61.
- Sønju, T.:** Pellicle – formation, composition and possible role. In: Thylstrup, A.; Fejerskov, O. (eds) *Textbook of Cariology, Chapter4;* Copenhagen: Munksgard International, 1986; 46-55.
- Sønju, T.:** Investigations of some salivary glycoproteins and their possible role in pellicle formation. *Norske Tannlaegeforenings Tidende.* 1975; 85: 393-403.
- Sønju, T.; Rølla, G.:** Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth in vivo. Rate of formation and amino acid analysis. *Caries Res.* 1973; 7: 30-38.
- Sønju Clasen, A.B.; Hannig, M.; Sønju, T.:** Variations in pellicle thickness: a factor in tooth wear? In: Addy, M.; Embery G, Edgar M, Orchardson R (eds.): *Tooth wear and sensitivity. Clinical advances in restorative dentistry.* London: Martin Dunitz, 2000; S. 189-195.
- Sønju Clasen, A.B.; Hannig, M.; Skørland, K.; Sønju, T.:** Analytical and ultrastructural studies of pellicle on primary teeth. *Acta Odontol Scand* 1997; 55, 339-343.
- Steinberg, D.; Shahar, E.:** Early formation of *Streptococcus sobrinus* biofilm on various dental restorative materials. *J Dent* 2002; 30: 47-51.
- Steinberg, D.; Klinger, A.; Kohavi, D.; Sela, M.N.:** Adsorption of human salivary proteins to titanium powder. I. Adsorption of human salivary albumin. *Biomaterials* 1995; 16: 1339-1343.
- Steinberg, D.; Sela, M.N.; Klinger, A.; Kohavi, D.:** Adhesion of periodontal bacteria to titanium, and titanium alloy powders. *Clin Oral Impl Res.* 1998; 9: 67-72.

7. Literaturverzeichnis

- Stösser, L.; Apitz, N.; Kehrer, U.; Kneist, S.; Heinrich-Weltzien, R.:** In vitro pellicle formation with human stimulated mixed saliva and hydroxy-apatite. *Caries Res.* 2000; 34: 346-347 (abstract 3).
- Szymanska, D.; von Schwanedede, H.; Göcke, R.; Beetke, E.:** Langzeituntersuchung zur Konzentration von Speichelkomponenten in Relation zu Patienten mit Stomatitis prothetica. *Dtsch Zahnärztl Z.* 1995; 50: 739-741.
- Tabak, L.A.; Levine, M.J.; Jain, N.K.; Bryan, A.R.; Cohen, R.E.; Monte, L.D.; Zawacki, A.; Nancollas, G.H.; Slomiany, A.; Slomiany, B.L.:** Adsorption of human salivary mucins to hydroxyapatite. *Arch Oral Biol.* 1985; 30: 423-427.
- Tanida, T.; Okamoto, T.; Okamoto, A.; Wang, H.; Hamada, T.; Ueta, E.; Osaki, T.:** Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva of patients with oral candidiasis. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32: 586-594.
- Taubmann, M.A.; Smith, D.J.:** Immune components in dental plaque. *J Dent Res.* 1976; 55 (Spec Iss C1): 53-62.
- Tenovuo J, Pruitt KM:** Relationship of the human peroxidase system to oral health. *J Oral Pathol.* 1984; 13: 573-584.
- Tenovuo J.; Pruitt, K.M.:** Relationship of the human salivary peroxidase system to oral health. *J Oral Pathol.* 1984; 13: 573-584.
- Tenovuo, J.:** Non immunoglobulin defense factors in human saliva. In: Tenovuo, J. (ed.): *Human saliva: Clinical chemistry and microbiology; vol. II.* CRC Press, Boca Raton / FL; 55-91.
- Tenovuo, J.; Lumikari, M.; Soukka, T.:** Salivary lysozym, lactoferrin and peroxidase: antibacterial effects on cariogenic bacteria and clinical applications in preventive dentistry. *Proc Finn Dent Soc.* 1991; 87: 197-208.
- Tschannerl, F.:** Die quantitative Bestimmung von Speichelkomponenten in der Pellikel an der Dentalkeramik Empress 2. *Med. Diss., Rostock; 2005*
- Twetman, S.; Lindqvist, L.; Sund, M.L.:** Effect of human lysozyme on 2-desoxyglucose uptake by *S. mutans* and other oral micro-organisms. *Caries Res.* 1986; 20: 223-229.
- Vacca-Smith, A.M.; Bowen W.H.:** In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. *Arch Oral Biol* 2000; 45: 277-291.

7. Literaturverzeichnis

- Vacca-Smith, A.M.; Venkitaraman, A.R.; Schilling, K.M.; Bowen, W.H.:** Characterization of glucosyltransferase of human saliva adsorbed onto hydroxyapatite surfaces. *Caries Res.* 1996; 30: 354-360.
- Vassilakos, N.; Rundegren, J.; Arnebrant, T.; Glantz, P.-O.:** Adsorption from salivary fractions at solid/liquid and air/liquid interfaces. *Arch Oral Biol.* 1992; 37: 549-557.
- Vitkov, L.; Hannig, M.; Nekrashevych, Y.; Krautgartner, W.D.:** Supramolecular pellicle precursors. *Eur J Oral Sci.* 2004, 112: 320-325.
- Vitorino, R.; Lobo, M.J.; Duarte, J.; Ferrer-Correia, A.J.; Tomer, K.B.; Dubin, J.R.; Domingues, P.M.; Amado, F.M.:** In vitro hydroxyapatite adsorbed salivary proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 320: 342-364.
- Wagner, T.; Borg von Zepelin M, Rüchel R.:** pH-dependent denaturation of extracellular aspartic proteinases from candida species. *J Med Vet Mycol.* 1995; 33: 275-278.
- Waltimo, T.; Vallittu, P.; Haapasalo, M.:** Adherence of candida species to newly polymerized and water-stored denture base polymers. *Int J Prosthodont* 2001; 14: 457-460.
- Witholt, B.; van Heerikhuizen, H.; de Leij, L.:** How does lysozyme penetrate through the bacterial outer membrane? *Biochim Biophys Acta* 1976; 443: 534-545.
- Wood, S.R.; Shore, R.C.; Brookes, S.J.; Kirkham, J., Walker, J.; Robinson, C.:** Bacteriolytic activity of lysozyme bound to tooth enamel surface in vitro. *Caries Res* 2000; 34: 347 (abstract 113).
- Yang, Y.; Koh, D.; Ng, V.; Lee, C.Y.; Chan, G.; Dong, F.; Goh, S.H.; Anantharaman, V.; Chia, S.E.:** Self perceived work related stress and the relation with salivary IgA and lysozyme among emergency department nurses. *Occup Environ Med.* 2002; 59: 836-841.
- Yao, Y.; Berg, E.A.; Costello, C.E.; Troxler, R.F.; Oppenheim, F.G.:** Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. *J Biol Chem.* 2003; 278: 5300-5308.
- Yao, Y.; Grogan, J.; Zehnder, M.; Lendenmann, U.; Nam, B.; Wu, Z.; Costello, C.E.; Oppenheim, F.G.:** Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry. *Arch Oral Biol.* 2001; 46: 293-303.

7. Literaturverzeichnis

Yao, Y.; Lamkin, M.S.; Oppenheim, F.G.: Pellicle precursor protein cross-linking: characterization of an adduct between acidic proline-rich Protein (PRP-1) and statherin generated by transglutaminase. *J Dent Res.* 2000; 79: 930-938.

Yeh, C.K.; Dodds, M.W.; Zuo, P.; Johnson, D.A.: A population-based study of salivary lysozyme concentrations and candidal counts. *Arch Oral Biol.* 1997; 42: 25-31.

Zehnder, M.; Yoa, Y.; Lendenmann, U.; Grogan, J.; Oppenheim, F.G.: Mechanico-chemical pellicle collection and analysis. *J Dent Res.* 2000; 79: 430 (abstract 2289).

Zuabi, O.; Machtei, E.E.; Ben Aryes, H.; Ardekian, L.; Peled, M.: The effect of smoking and periodontal treatment on salivary composition in patients with established periodontitis. *J Periodontol.* 1999; 70: 1240-1246

8. Anhang

Tab. A1: Charakterisierung der Probanden

NR	ALTER	Geschlecht	RAUCHER
	[Jahre]		ja=1 / nein=2
1	46	w	2
2	30	w	2
3	25	m	2
4	21	w	2
5	25	w	2
6	25	w	2
7	24	w	2
8	50	m	2
9	22	w	2
10	48	w	2
11	19	w	1
12	18	w	2
13	52	m	2
14	19	w	2
15	18	w	2
16	17	w	2
17	18	w	1
18	17	w	1
19	46	w	2
20	41	m	2
21	25	w	2
22	24	m	1
23	17	w	2
24	27	w	1
25	28	m	2

Tab. A2: Fließrate und Pufferdaten des Speichels

NR	FL	PH	CO2	BIC	BE
	[ml/min]		[kPa]	[mmol/l]	[mmol/l]
1	0,720	6,800	3,410	3,7	-30,1
2	3,870	7,350	3,450	14,5	-8,8
3	2,090	7,270	2,900	10,1	-14,3
4	0,780	6,820	3,760	4,6	-28,2
5	3,830	7,030	4,080	8,2	-20,7
6	1,440	7,420	3,610	17,9	-4,6
7	0,790	7,170	2,270	6,3	-19,4
8	1,770	7,015	4,930	9,6	-20,0
9	1,200	7,220	3,400	10,5	-15,0
10	3,300	7,245	2,720	9,0	-15,7
11	1,030	6,860	2,540	3,4	-28,3
12	0,770	6,860	3,330	4,5	-27,5
13	1,220	7,030	3,700	7,4	-21,5
14	3,210	7,300	2,560	9,6	-13,9
15	1,780	7,230	2,230	7,1	-17,5
16	1,010	7,410	1,980	9,4	-11,9
17	1,960	7,340	2,290	9,5	-13,1
18	2,150	7,390	3,350	15,5	-7,3
19	1,510	7,110	2,790	6,7	-20,5
20	0,710	7,080	3,970	8,8	-19,3
21	1,480	7,150	4,290	11,3	-15,8
22	2,270	7,279	3,820	13,6	-11,1
23	0,760	6,790	3,750	4,4	-28,9
24	1,790	7,140	3,660	9,5	-17,3
25	1,340	7,250	3,040	10,1	-14,7

Tab. A3: Speicheldaten für Thiozyanat, gesamte Proteasen und Protease-Inhibitoren

NR	THSP1	THSP2	PROSP1	PROSP2	PRISP1	PRISP2
	[mmol/l]	[mmol/l]	[U/l]	[U/l]	[U/l]	[U/l]
1	0,282	0,035	1,6886	8,4572	-0,0134	0,0567
2	0,024	0,022		5,4664	0,0169	0,0937
3	0,015	0,044		6,0102	0,0005	0,0897
4	0,176	0,131	1,4310	2,8048		0,0850
5	0,049	0,048	3,1911	8,5001	0,0005	0,0639
6	0,023	0,037	2,5615	8,6003	0,0291	0,0514
7	0,032	0,055	2,1465	3,2770		0,0595
8	0,056	0,093	2,9049	6,1390	0,0086	0,0773
9	0,044	0,055	1,4310	6,3536	0,0063	0,0911
10	0,033	0,076	1,1448	5,7097		0,0802
11	0,243	0,115	4,9226	5,5952		0,0706
12	0,074	0,095	4,1356	2,5186		0,0989
13	0,419	0,073	5,6238	5,4235	0,0092	0,1065
14	0,131	0,238	6,2964	3,5632		0,1173
15	0,042	0,276	2,4327	5,5094		0,0992
16	0,105	0,049	5,0085	1,8031	0,0180	0,1104
17	0,043	0,053	5,6668	3,3629		0,0870
18	0,376	0,058	4,0211	1,1734		0,0856
19	0,076	0,057	6,3966	0,1002		0,0891
20	0,069	0,081	4,3073	9,7022	0,1275	0,0633
21	0,032	0,154	2,3039	0,6010	0,0900	0,0894
22	0,018	0,153	2,8477	1,8460	0,0908	0,0805
23	0,096	0,139	1,0589	4,6794	0,0685	0,0552
24	0,063	0,081	7,4555	5,8957	0,0867	0,0980
25	0,065	0,121	7,8991	5,4378	0,0782	0,0865

Tab. A4: Speicheldaten für Lysozym, α -Amylase und Peroxidasen

NR	LYSSP1	LYSSP2	AMYSPI	AMYSP2	PERSPI	SPOSP1
	[mg/l]	[mg/l]	[U/l]	[U/l]	[U*/l]	[U/l]
1	1,104	2,879	6.030	12.985	0,4615	648,7
2	0,823	1,480	6.030	25.909	0,1818	393,8
3	0,142	12,964	35.678	10.492	0,2000	410,5
4	1,984	2,660	139.092	90.530	0,2143	264,4
5	8,598	3,567	29.386	101.947	0,0100	216,7
6	1,984	0,614	34.612	21.668	0,0169	255,1
7	6,413	3,567	69.606	6.030	0,0100	266,7
8	0,458	3,569	6.030	45.687	0,0185	307,5
9	0,614	1,984	211.372	85.445	0,0291	322,9
10	0,614	1,104	222.185	124.479	0,0769	431,6
11	0,823	4,425	28.864	40.682	0,0100	523,9
12	8,598	6,802	73.023	106.872	0,0100	404,3
13	6,413	3,569	89.184	6.030	0,1000	430,1
14	0,614	19,929	10.794	39.637	0,0395	468,0
15	1,480	6,413	66.029	36.582	0,0306	634,3
16	1,984	6,802	143.675	48.119	0,0882	342,8
17	0,614	2,879	6.030	20.944	0,0326	323,7
18	1,984	2,322	35.758	71.596	0,0638	756,8
19	0,823	1,873	72.883	47.657	0,1304	675,9
20	0,614	1,873	6.030	47.135	0,0938	455,6
21	0,079	4,425	154.167	59.757	0,1200	388,7
22	5,486	8,434	40.240	123.635	0,0984	517,4
23	2,879	4,425	26.210	143.092	0,0938	273,5
24	0,983	4,425	121.585	61.928	0,0136	144,7
25	4,425	2,879	144.539	102.992	0,0191	227,7

Tab. A5: Speicheldaten für sekretorisches Immunglobulin A, Immunglobulin G, Gesamteiweiß und Kalzium

NR	IGASP1	IGASP2	IGGSP1	EWSP1	EWSP2	CASP1	CASP2
	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mmol/l]	[mmol/l]
1			37,8	1.449,3	806,1	0,270	0,320
2	525,8	178,5	4,5	171,8	752,3	0,250	0,290
3	230,5	285,0	23,8	29,2	306,4	0,320	0,480
4	302,0	316,0	34,5	468,2	607,1	0,370	0,560
5	305,0	441,1	4,5	118,8	610,9	0,430	0,510
6	567,3	280,5	3,5	203,5	706,5	0,490	0,600
7	594,7	573,7	5,0	330,6	431,7	0,460	0,760
8	740,1	713,3	9,5	165,9	613,3	0,370	0,670
9	294,5	208,5	25,0	143,7	753,6	0,390	0,440
10	594,1	245,0	17,8	590,4	783,9	0,340	0,590
11	216,5	447,6	32,8	1.219,4	225,8	0,760	0,120
12	736,0	230,0	31,5	722,5	395,6	0,530	0,380
13	294,5	577,0	26,3	641,1	352,5	0,540	0,490
14	666,0	313,6	8,8	290,3	595,9	0,560	0,320
15	252,0	554,0	16,3	26,1	881,4	0,320	0,450
16	517,7	260,0	19,5	327,5	868,8	0,410	0,120
17	512,4	381,0	3,9	12,5	497,1	0,490	0,630
18	221,0	26,0	6,3	234,2	303,2	0,450	0,540
19	61,5		19,5	293,5	457,7	0,680	0,420
20	375,8	124,0	32,0	295,3	470,0	0,480	0,370
21	127,5	368,2	16,3	396,7	881,4	0,520	0,330
22				284,0	575,0	0,670	0,400
23	497,2		31,5	521,1	538,9	0,390	0,510
24			24,5	508,9	636,9	0,510	0,280
25			16,3	341,9	549,8	0,470	0,390

Tab. A6: Gesamteiweiß, sekretorisches IgA und IgG in der Pellikel

NR	EWEF1	EWEF2	EWPF2	EWPGF2	IGAEF1	IGAEF2	IGAPF1	IGAPF2
	[ng/cm ²]	[ng/cm ²]	[ng/cm ²]	[ng/cm ²]	[ng/cm ²]	[ng/cm ²]	[%]	[%]
1	116,65	727,60						
2	85,81	630,52			243,29	362,06	0,05	0,11
3	159,41	408,54			134,09	456,00	0,06	0,12
4	312,90	730,21				292,96	0,03	0,04
5		737,84			84,99	321,13	0,24	0,04
6	20,32	664,89			198,57	311,81	0,09	0,13
7		589,26			3,97	344,85	0,13	
8	15,27	660,94				1.006,32	0,07	0,15
9		683,06				1.150,72	0,15	0,13
10		667,21			252,95	923,25	0,20	0,09
11	70,91	407,84			842,76	602,89	0,23	0,21
12		356,95			547,55	681,29	0,22	0,14
13		329,59			374,09	472,90	0,02	0,14
14		242,57			282,12	448,38	0,06	0,16
15		528,17			302,47	799,59	0,13	0,15
16	38,63	424,84			121,63	986,20	0,09	0,16
17		231,55	0,668	232,22	178,86		0,21	0,23
18		100,92	1,215	102,14	432,48		0,07	0,12
19		134,51	0,684	135,20	318,29		0,15	0,08
20		131,56	0,699	132,26	286,72		0,23	0,08
21		130,35	0,642	130,99	198,81		0,08	0,19
22	2,36	133,92	0,715	134,63	268,12		0,20	0,21
23	156,47	186,50	0,444	186,94	325,40		0,18	
24		174,31	1,064	175,38	353,64		0,02	
25		182,13	1,095	183,22	227,06		0,05	0,06

Tab. A7: Thiozyanat in der Pellikel

NR	THEF1	THEF2	THPF1	THPF2	THPGF1	THPGF2
	[nmol/cm ²]	[nmol/cm ²]	[nmol/cm ²]	[nmol/cm ²]	[nmol/cm ²]	[nmol/cm ²]
1	0,102	0,101	0,0218		0,12	
2	0,206	0,035				
3	0,172	0,061	0,2459		0,42	
4	0,102	0,056	0,0602	0,0256	0,16	0,08
5	0,051	0,061	0,1114		0,16	
6	0,069	0,065	0,2894	0,2830	0,36	0,35
7		0,096	0,1716			
8	0,099	0,101				
9	0,159	0,083	0,2279		0,39	
10	0,137	0,119	0,1409		0,28	
11	0,152	0,123	0,1370		0,29	
12	0,205	0,101	0,1204	0,0295	0,33	0,13
13	0,319	0,061	0,2856	0,0653	0,60	0,13
14	0,378	0,069	0,2497	0,1140	0,63	0,18
15	0,070	0,110	0,1409	0,0922	0,21	0,20
16		0,056	0,0474	0,0960		0,15
17	0,156	0,406	0,2459		0,40	
18	0,076	0,406	0,2856		0,36	
19	0,149	0,379	0,1754		0,32	
20	0,414	0,356	0,2023		0,62	
21	0,288	0,393	0,1460		0,43	
22	0,506	0,356	0,1754		0,68	
23	0,192	0,334	0,5570		0,75	
24		0,435		0,0346		0,47
25		0,347				

Tab. A8: Kalzium, Lysozym und α -Amylase in der Pellikel

NR	CAEF1	CAEF2	LYSEF1	LYSEF2	AMYEF1
	[nmol/cm ²]	[nmol/cm ²]	[ng/cm ²]	[ng/cm ²]	[μ U/cm ²]
1	0,48	0,65	0,93		336,70
2	0,54	1,34	0,90		62,28
3	0,75	0,47	0,81		66,53
4	0,58	0,51			62,95
5	0,57	0,49	0,83		70,75
6	0,51	0,84	0,96		67,04
7	0,52	0,47			106,81
8	0,45	0,48			111,20
9	0,54	0,53			116,36
10	0,50	0,53	1,34	1,42	104,26
11	0,47	0,45	0,92		
12	0,65	0,64	0,99		121,58
13	0,60	2,58		2,42	125,72
14	0,52	0,47		2,98	181,28
15	0,78	0,66		1,97	162,61
16	0,62	0,70		0,46	327,64
17	0,47	0,47			185,12
18	0,53	0,66		1,06	867,67
19	0,46	0,46		1,00	921,47
20	0,53	0,46	3,53		175,09
21	2,72	1,52	1,01		73,90
22	0,78	1,03	1,78	1,44	57,74
23	1,89	2,44			126,22
24	0,65	2,25	1,20	4,74	128,75
25		3,22	1,64		75,22

Tab. A9: Gesamte Peroxidasen mit Guajakol als Substrat in der Pellikel

NR	PEREF1	PEREF2	PERPF1	PERPF2	PERPGF1	PERPGF2
	[$\mu\text{U}^*/\text{cm}^2$]	[$\mu\text{U}^*/\text{cm}^2$]	[$\mu\text{U}^*/\text{cm}^2$]	[$\mu\text{U}^*/\text{cm}^2$]	[$\mu\text{U}^*/\text{cm}^2$]	[$\mu\text{U}^*/\text{cm}^2$]
1	0,059	0,062	0,5910	0,1076	0,65	0,17
2	0,184	0,084		0,5378		0,62
3	0,081	0,098		0,2151		0,31
4	0,161	0,095	0,2787	0,4123	0,44	0,51
5	0,063	0,089	0,2861	0,5199	0,35	0,61
6	0,146	0,091	0,2676	0,5558	0,41	0,65
7	0,134	0,068	1,0976	0,5199	1,23	0,59
8	0,069	0,085	0,4268		0,50	
9	0,316	0,072	0,8027	0,1076	1,12	0,18
10	0,384	0,038	0,2971	0,3944	0,68	0,43
11	0,178	0,079	0,4373	0,7350	0,61	0,81
12	0,084	0,005	0,5722	0,0914	0,66	0,10
13	0,028	0,004	0,3209	0,0699	0,35	0,07
14	0,022	0,002	0,5396	0,1380	0,56	0,14
15	0,022	0,004	0,1864	0,0484	0,21	0,05
16	0,006	0,003	0,2169	0,0359	0,22	0,04
17	0,032	0,023	0,2259	0,7350	0,26	0,76
18	0,036	0,018	0,1847	0,2510	0,22	0,27
19	0,060	0,011	0,3890	0,3586	0,45	0,37
20	0,019	0,010	0,2115	0,0179	0,23	0,03
21	0,036	0,018	0,4141	0,0717	0,45	0,09
22	0,027	0,066	0,1864	0,3765	0,21	0,44
23	0,019	0,035	0,7350	0,0179	0,75	0,05
24	0,113	0,012	0,9143	0,2510	1,03	0,26
25	0,077	0,038	0,8785	0,3765	0,95	

Tab. A10: Peroxidasen mit NBS als Substrat in der Pelikel

NR	SPOEF1	SPOEF2	SPOPF1	SPOPF2	SPOPGF1	SPOPGF2
	[$\mu\text{U}/\text{cm}^2$]	[$\mu\text{U}/\text{cm}^2$]	[$\mu\text{U}/\text{cm}^2$]	[$\mu\text{U}/\text{cm}^2$]	[$\mu\text{U}/\text{cm}^2$]	[$\mu\text{U}/\text{cm}^2$]
1	1.931,73	153,02	16,0022	1,431	1.947,74	154,45
2	2.193,50	164,48	15,7673	1,276	2.209,27	165,76
3	1.745,91	154,73	16,6601	1,440	1.762,57	156,17
4	1.758,50	162,21	17,1280	1,450	1.775,63	163,66
5	2.165,19	104,58	16,6117	1,576	2.181,80	106,15
6	2.080,85	180,96	17,7393	1,502	2.098,58	182,47
7	2.503,07	152,93	15,6275	1,502	2.518,70	154,44
8	2.245,31	167,38	22,0563	1,628	2.267,36	169,00
9	1.960,01	173,87	18,5837	1,590	1.978,59	175,46
10	2.383,64	177,20	22,1961	1,605	2.405,84	178,81
11	1.920,72	162,00	17,2230	1,553	1.937,94	163,55
12	2.176,00	90,86	26,1384	1,760	2.202,14	92,62
13	86,98	134,21	0,8071		87,79	
14	71,59	81,07	1,6237	1,572	73,21	82,64
15	109,81	83,12	1,3984	1,694	111,21	84,81
16	153,65	95,20	1,0792	1,526	154,73	96,73
17	221,78	130,29	1,8958	1,441	223,67	131,73
18	78,18	196,52	2,2103	1,492	80,39	198,01
19	145,99	86,29	1,6986	1,375	147,69	87,66
20	179,98	149,80	1,6893	1,300	181,67	151,10
21	127,49	132,38	2,5715	1,474	130,06	133,85
22	162,79	119,03	1,8724	1,821	164,66	120,85
23	150,69	115,47	2,0226	1,497	152,72	116,97
24	179,03	116,18	1,7695	1,160	180,80	117,34
25	207,24	203,28	2,1477	1,587	209,39	204,87

Tab. A11: Gesamte Proteasen in der Pellicel

NR	PROEF1	PROEF2	PROPF2	PROPGF2
	[μ U/cm ²]	[μ U/cm ²]	[μ U/cm ²]	[μ U/cm ²]
1			0,0180	
2		0,49		
3				
4	0,19		0,0051	
5		1,14	0,0108	1,15
6	1,06	0,80	0,0095	0,81
7	0,41	2,11		
8	4,18	0,41		
9	4,76	0,08		
10	0,86		0,0023	
11			0,0498	
12		0,64		
13	5,22		0,0298	
14		0,11	0,0092	0,12
15	0,99	1,24		
16		1,10	0,0059	1,10
17	4,91	0,33	0,0128	0,34
18		1,74	0,0072	1,75
19	2,36			
20	0,77	1,18		
21	2,08		0,0072	
22		1,14	0,0103	1,15
23		0,58	0,0041	0,59
24			0,0121	
25		1,18	0,0064	1,18

Tab. A12: Protease-Inhibitoren in der Pellikel

NR	PRIEF1	PRIEF2	PRIPF1	PRIPF2	PRIPGF1	PRIPGF2
	[mU/cm ²]	[mU/cm ²]	[mU/cm ²]	[mU/cm ²]	[mU/cm ²]	[mU/cm ²]
1	-2,73	1,77	0,227	0,072	-2,50	1,84
2	5,30		0,217	0,138	5,52	
3	3,26		0,160	-0,076	3,42	
4	5,69		0,320	0,065	6,01	
5	19,78		0,331	0,049	20,11	
6			0,243	0,019		
7	20,94		0,337	0,040	21,28	
8	10,81		0,179		10,99	
9	22,41	2,58	0,203	0,003	22,61	2,58
10	14,52	0,88	0,233	0,051	14,75	0,93
11	16,03	3,71	0,180	0,044	16,21	3,76
12	6,36	3,25	0,217	0,202	6,57	3,45
13	7,18	6,85	0,208	0,169	7,39	7,02
14	23,13	3,55	0,337	0,150	23,47	3,70
15	7,38		0,268	0,047	7,65	
16	2,00	2,40	0,334	0,093	2,33	2,49
17	2,33	4,44	0,114	0,072	2,45	4,52
18	4,03	1,94	0,184		4,21	
19	10,87	7,18	0,338	0,184	11,21	7,36
20	18,36	3,89	0,259	0,053	18,62	3,94
21	4,74		0,278	0,161	5,02	
22	8,40	2,75	0,241	0,124	8,64	2,88
23	4,60		0,309	0,087	4,90	
24	18,29	4,32	0,308	0,074	18,60	4,40
25	6,73	17,09	0,182	0,140	6,91	17,23

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe von mir verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht wurden.

Wismar, August 2008

Lebenslauf

Name: Falk Gerath
Geburtsdatum: 01. September 1971
Geburtsort: Rostock / Mecklenburg-Vorpommern
Wohnort: Dahlmannstrasse 18 / 23966 Wismar
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1978 – 1988 Polytechnische Oberschule Kirchdorf auf Poel
1988 – 1990 Erweiterte Oberschule Wismar
Juli 1990 Allgemeine Hochschulreife

Studium:

1992 – 1997 Studium der Zahnmedizin an der Humboldt-Universität zu Berlin
13.10.1993 Naturwissenschaftliche zahnärztliche Vorprüfung
29.03.1995 Zahnärztliche Vorprüfung
08.-10.1997 Zahnärztliches Staatsexamen
28.01.1998 Erteilung der Approbation
08.2008 Einreichung der Dissertation an der Universität Rostock

Berufsausübung:

02.1998-02.2000 Vorbereitungsassistent bei M. und C. Schafrik in Gägelow
seit 05.2000 Niederlassung in eigener Praxis in Wismar

Wismar, den 01. August 2008

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. habil. H. von Schwanewede, Direktor der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik und Werkstoffkunde und geschäftsführender Direktor der Klinik und Polikliniken für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde „Hans Morat“ der Universität Rostock, für die Überlassung des Themas und die stets gewährte Unterstützung beim Anfertigen der vorliegenden Arbeit.

Herrn Priv.-Doz. Dr. rel. nat. habil. R. Göcke bin ich sehr dankbar für die umfangreiche Betreuung der experimentellen Arbeiten im biochemischen Labor, die Unterstützung bei der Versuchsauswertung und die ständige Diskussionsbereitschaft. Herzlich danke ich der Medizinisch-Technischen Assistentin Frau Butzlaff für die Unterstützung bei den biochemischen Laboruntersuchungen sowie dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Universität Rostock für die analysierten Proben.

Den freiwilligen Probanden, ohne deren Engagement und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, zu danken, ist mir ein großes Bedürfnis.

Ich danke Ihnen allen herzlich.

Thesen zur Dissertation

Quantitative Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten von Speichelkomponenten in der Pellikel des Prothesenbasiskunststoffes PMMA

von Falk Gerath

1. In der vorliegenden Arbeit wurde das Adsorptionsverhalten von Speichelkomponenten an dem Prothesenkunststoff Polymethylmethacrylat (PMMA) quantitativ untersucht und die Zusammensetzung im stimulierten Nüchterngesamtspichel mit der Zusammensetzung der Pellikel an PMMA verglichen.
2. Für die Untersuchungen standen 19 weibliche und 6 männliche freiwillige Probanden im Alter zwischen 17 und 52 Jahren zur Verfügung, welche die Prüfkörper 30 min. bis zur Gleichgewichtsreaktion im Mund bewegten. Anschließend erfolgte die Gewinnung von stimuliertem Nüchterngesamtspichel.
3. Nach Abspülen der Prüfkörper wurden die Pellikelkomponenten mit 0,5 mol/l NaCl-Lösung von den Prüfkörpern desorbiert und aufkonzentriert. Anschließend erfolgte die quantitative Bestimmung der Pellikelkomponenten mit Methoden der Speichelanalyse.
4. Folgende Speichelkomponenten wurden bestimmt: Gesamteiweiß, α -Amylase, Gesamtproteasen, Protease-Inhibitoren, sekretorisches Immunglobulin A, Immunglobulin G, Peroxidasen, Thiozyanat, Lysozym und Kalzium.
5. In den Eluatn nach Desorption der Pellikel konnten alle geprüften Speichelkomponenten analysiert und quantifiziert werden. Auf der PMMA-Oberfläche bildete sich somit eine Pellikel, die mit der Pellikel am Zahnschmelz weitgehend vergleichbar ist.
6. Verunreinigungen der Desorptionslösungen durch Speichelreste konnten ausgeschlossen werden, da kein Kalium nachgewiesen werden konnte.
7. Erstmals konnte Thiozyanat in der Pellikel von PMMA-Festkörpern nachgewiesen werden. Die Desorption gelang von fast allen Prüfkörpern und war somit eindeutig.

8. Das sekretorische Immunglobulin A konnte als ein Hauptprotein der Pellikel auf PMMA-Oberflächen identifiziert werden. Das sIgA ließ sich verhältnismäßig leicht von den PMMA-Prüfkörpern desorbieren und dominierte in den Eluaten.
9. Durch Modifikation der Bestimmungsmethoden konnten für einige Komponenten auch an den Prüfkörpern verbliebene Restmengen quantitativ erfasst werden. Für Gesamtprotein, Peroxidase bei Bestimmung mit NBS als Substrat sowie Gesamtproteasen und Protease-Inhibitoren waren die an den Prüfkörpern verbliebenen, nicht desorbierten Anteile deutlich kleiner als die desorbierten Anteile. Für Thiozyanat waren die nicht desorbierten und die desorbierten Anteile etwa gleich groß. Für Peroxidase bei der Bestimmung mit Guajakol als Substrat waren die nicht desorbierten Anteile größer als die desorbierten. Die einzelnen Komponenten der Pellikel bildeten somit unterschiedliche Anteile an festen und weniger festen Adsorptionsbindungen zum PMMA.
10. An der Oberfläche der PMMA-Prüfkörper erfolgte eine selektive Adsorption der Speichelkomponenten, denn für keine Komponente konnte eine signifikante Korrelation mit der Speichelzusammensetzung gefunden werden. Die selektive Adsorption der Speichelkomponenten am PMMA-Prüfkörper wird in erster Linie durch die Oberflächeneigenschaften der Prüfkörper und nicht so sehr von der Konzentration im Speichel beeinflusst.
11. Bei den meisten Komponenten wurde eine Sättigung der Oberfläche erreicht, denn nur für Immunglobulin G und Proteasen, deren Speichelkonzentrationen niedrig waren, konnte eine signifikante Korrelation der Pellikelbestandteile mit der Speichelsekretionsrate nachgewiesen werden.
12. Bei der Anreicherung von Speichelkomponenten in der Pellikel an PMMA-Oberflächen liegt eine hohe inter- und intraindividuelle Variabilität vor, wie durch Doppelmessreihen und Vergleiche von Speichel- und Pellikelzusammensetzung festgestellt werden konnte.

13. Durch den Nachweis von Peroxidasen und Lysozym sind wichtige Komponenten der unspezifischen Abwehr in der Pellikel auf PMMA quantifiziert worden. Lysozym bildet in Kombination mit Peroxidasen einen Inhibitor für Mikroorganismen auf Prothesenmaterialien und ist somit eine positive Komponente in der Pellikel von PMMA-Körpern.
14. Die Protease-Inhibitoren hatten in der Regel eine höhere Aktivität als die Proteasen. Die erhöhte Aktivität der Protease-Inhibitoren hat einen positiven Einfluss auf den Schutz vor Infektionen mit Candida-Pilzen.