

2. Probanden und Methoden

2.1 *Vorbereitende Maßnahmen*

2.1.1 Probandengut

Als Probanden konnten Studenten der Zahnheilkunde der Humboldt-Universität zu Berlin sowie Patienten des zahnmedizinischen Zentrums der Charité, Campus Virchow, gewonnen werden. Es stellten sich 14 Personen im Alter von 22 bis 37 Jahren (bei einem Altersmittelwert von 27,8 Jahren) zu Verfügung. Insgesamt wurde an fünf Tagen Speichel entnommen, wobei ebenfalls der Plaqueindex (nach QUIGLEY & HEIN, 1962) und der gingivale Blutungsindex (PBI nach MÜHLEMANN & SON, 1971) bestimmt wurde.

Voraussetzende Parameter zur Teilnahme waren:

- ◆ allgemeinmedizinische Unauffälligkeit,
- ◆ das Fehlen offener kariöser Läsionen,
- ◆ keine aktiven Parodontopathien,
- ◆ Abstinenz in Bezug auf Nikotin,
- ◆ männliches Geschlecht,
- ◆ mindestens 24 Zähne,
- ◆ keine dauerhafte Medikation.

2.2 *Klinischer Teil*

2.2.1 Versuchsablauf

Nach ausführlicher Aufklärung der Probanden über Versuchsablauf und -inhalt wurde bei jedem Probanden ein Zahnbefund über die Anzahl vorhandener und fehlender Zähne erhoben.

Die klinische Versuchsreihe erstreckte sich über einen Zeitraum von zwei Wochen. Jeder Proband wurde dazu angehalten, sich an den Versuchstagen zur gleichen Uhrzeit vorzustellen und zwar jeweils um 18 Uhr. Das Essen im Allgemeinen und das Trinken von zucker-, koffein-, teein- und säurehaltigen Getränken sollte ab drei Stunden vor Versuchsbeginn unterbleiben. Unter Beibehaltung ihrer individuellen Mundhygienemaßnahmen erschienen die Probanden zunächst an zwei Terminen,

nämlich an Tag „x“ sowie an Tag „x + 2“. Ab Tag „x + 2“ sollten sich die Probanden jeglicher Mundhygienemaßnahmen enthalten; die Zahnbürsten wurden eingesammelt und verwahrt. Die klinische Versuchsreihe setzte sich nun an den Tagen „x + 5“, „x + 8“ und „x + 13“ fort. Insgesamt wurde an neun aufeinanderfolgenden Tagen keine Mundhygiene betrieben (siehe Abbildung 2.1). Zu Beginn eines jeden Versuchstages erfolgte vor der Speichelentnahme sowohl die Bestimmung des Plaquewachstums als auch die Ermittlung des gingivalen Entzündungsgrades. Am letzten Tag der Versuchsreihe erhielt jeder Proband nach Speichelentnahme sowie nach der Bestimmung des Plaque- und Blutungs-Index eine professionelle Zahnreinigung.

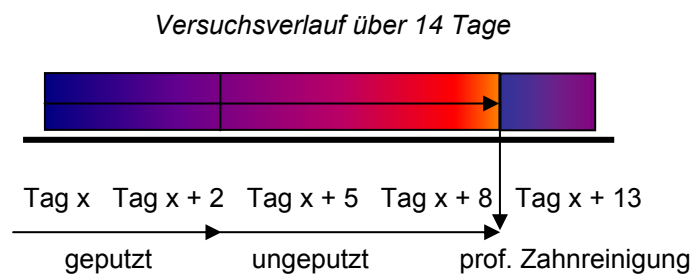


Abbildung 2.1: Darstellung des Versuchsablaufes über den Zeitraum von 14 Tagen

2.2.2 Bestimmung der Hygienestaten

Um eine Aussage über das quantitative Plaquewachstum innerhalb der Versuchsreihe machen zu können, wurden zu Beginn eines jeden Versuchstages folgende Hygienestaten erhoben:

2.2.2.1 Modifizierter Plaqueindex nach QUIGLEY und HEIN (QH)

Der Plaqueindex nach QUIGLEY und HEIN bewertet die flächenhafte Verteilung der Plaque auf der Zahnoberfläche nach Anfärbung mit einem Plaquerevelator. Im Rahmen dieser Studie wurde von einer Anfärbung der Zahnoberflächen abgesehen, da eine anschließende Entfernung der Plaque unterbleiben musste. Das Plaquewachstum wurde in sechs Grade (von 0 bis 5) eingeteilt, wobei sich der QH-Index aus der Formel „Summe der Bewertungsgrade dividiert durch die Summe der bewerteten Flächen“ berechnet. In dieser Versuchsreihe fanden im ersten und dritten Quadrant die vestibulären Flächen, im zweiten und vierten Quadrant die lingualen Flächen der Zähne 1, 2, 6 und 7 Beachtung.

Tabelle 2.1: Definition der Schweregrade des Plaquebefalls nach QUIGLEY & HEIN (1962)

Code	Diagnose
0	Keine Plaque
1	Vereinzelte Plaque-Inseln am Gingivalsaum
2	Durchgezogene Plaquelinie am Gingivalsaum
3	Plaque bedeckt ein Drittel der vestibulären Zahnfläche
4	Plaque bedeckt zwei Drittel der vestibulären Zahnfläche
5	Plaque bedeckt mehr als zwei Drittel der vestibulären Zahnfläche

2.2.2.2 Papillen-Blutungs-Index (PBI) nach MÜHLEMANN und SON

Der Entzündungszustand der Gingiva lässt sich mit Hilfe des Papillen-Blutungs-Index (PBI) bestimmen, da eine positive Korrelation zwischen der Blutungsneigung und dem bakteriell verursachten Entzündungsgrad der Gingiva besteht. Eine Blutung wird provoziert, indem mit einer stumpfen Parodontalsonde der Sulkus gingivae mit leichtem Druck ausgewischt wird. Die Intensität der auftretenden Blutung wird in vier Grade eingeteilt. Der PBI lässt sich aus Blutungszahl dividiert durch die Anzahl der untersuchten Papillen ermitteln, wobei in dieser Studie im ersten und dritten Quadranten die Zähne 1,2,6 und 7 von lingual, im zweiten und vierten Quadranten von bukkal sondiert wurden.

Tabelle 2.2: Definition der Papillenblutungsstärke nach MÜHLEMANN & SON (1971)

Code	Diagnose	Diagnosekriterium
0	Keine Blutung	20–30 Sekunden nach der Reizung ist kein Blut zu erkennen
1	Blutpunkte	20–30 Sekunden nach der Reizung erscheint nur ein einziger Blutpunkt
2	Linie/Punkte	Es werden eine feine Blutlinie oder mehrere Blutpunkte sichtbar
3	Dreieck	Das interdentale Dreieck füllt sich mit Blut
4	Tropfen	Profuse Blutung – sofort nach Sondierung füllt sich das interdentale Dreieck mit Blut und fließt über die Zähne bzw. die Gingiva

2.2.3 Gewinnung der Speichelproben

2.2.3.1 Beschaffung und Konstruktion der Apparatur zur drüsenspezifischen Speichelgewinnung

Zur Gewinnung des Speichels stand eine Apparatur zur Verfügung, die von Herrn Dr. M. Jancke im Rahmen seiner Dissertation konstruiert und als Duplikat der Abteilung für Zahnerhaltung und Präventivzahnmedizin der Charité überlassen wurde. Der Aufbau der Maschine sah wie folgt aus: In einer 12 x 14 x 20 cm großen Kammer wurde durch das Anschließen an den Suktork einer zahnärztlichen Einheit ein Unter-

druck von -5 mmHg erzeugt. In dieser Unterdruckbox waren in einem Ständer die Probengefäße untergebracht, in die ein Durchtrittsröhrchen für die jeweilige Entnahmestelle hineinragte. Insgesamt waren vier Sauger, die an die jeweilige Speicheldrüse adaptiert wurden, über Silikonschläuche mit der Unterdruckbox verbunden. Für den Unterkiefer wurden zwei Sauger an einem frontal ausgeschnittenen Abformlöffel befestigt. Zwei $2,5 \times 0,8$ cm große nierenförmige Sauger deckten lingual jeweils die Caruncula und die Plica sublingualis ab. Dadurch war es möglich, den Speichel der großen Unterkieferdrüsen links und rechts gesondert zu entnehmen. Wegen der eng beieinander liegenden Ausführungsgänge konnte jedoch nicht das Sekret der Glandula submandibularis von dem der Gl. sublingualis getrennt werden. Um eine störungsfreie Entnahme des sublingualen Sekretes trotz seiner hohen Viskosität zu erreichen, mussten hier Schläuche mit 2 mm Innendurchmesser eingesetzt werden. Durch die Befestigung der ableitenden Schläuche der Submandibularisauger an einem individualisierten Kunststofflöffel blieben die Sauger in ihrer Position etwas flexibel und passten sich beim Einsetzen automatisch den anatomischen Platzverhältnissen an. Eine optische Kontrolle war jederzeit möglich. Innerhalb der Dichtfläche der Sauger war ein Messingdrahtgitter eingearbeitet. Damit wurde verhindert, dass die bewegliche Mukosa in den Hohlraum eingesaugt wurde und den Schlauchanschluss verschloss. Die Sauger wurden hergestellt, indem die späteren Hohlräume aus weichem Dentalwachs auf einer Glasplatte aufgewachst und dann mit additionsvernetzendem Silikon umspritzt wurden. Die der Glasplatte anliegenden Ränder wurden dadurch zu glatten Dichtflächen. Nach dem Ausbrühen des Wachses waren die in den Wachskern eingearbeitenden Messinggitter fest in die Wand der Saugers integriert.

Für die Parotis war je ein frei zu platzierender runder Sauger mit 2 cm Durchmesser an einem Schlauch mit 1 mm Innendurchmesser vorhanden, der auf die Papilla parotidea gesetzt und durch den Unterdruck an seinem Platz gehalten wurde.

2.2.3.2 Durchführung der Speichelabnahme

Nach der Bestimmung von API und PBI wurde der Proband aufgefordert, in einem separaten Raum im Stuhl der zahnärztlichen Einheit entspannt Platz zu nehmen. Es erfolgte nun die Applikation der Sauger der eingeschalteten Speichelabnahmeapparatur an den jeweiligen Speicheldrüsen unter Zuhilfenahme der Lichtquelle der zahn-

ärztlichen Einheit. Über einen Zeitraum von 20 Minuten wurde der unstimulierte Speichel in den dafür vorgesehenen Auffanggefäßen gesammelt. Danach wurden die Sauger kurzzeitig aus der Mundhöhle des Probanden entfernt, die Silikonschläuche durch das Einhalten einer zweiminütigen Leerlaufzeit gereinigt, die benutzten gegen unbenutzte Auffanggefäße ausgetauscht und die Sauger reponiert. Um eine Stimulation der Speicheldrüsen zu erreichen, wurden dem Probanden nun fünf Tropfen einer 2%igen Zitronensäurelösung einmalig auf die Mitte des Zungenrückens geträufelt. Erneut fand eine 20-minütige Speichelabnahme statt. Nach Beendigung erfolgte die Reinigung der Apparatur und der sorgfältige Verschluss der Auffanggefäße.

2.3 Labortechnischer Teil

2.3.1 Behandlung der Speichelproben

Vor der Speichelabnahme wurde das durchschnittliche Gewicht eines Speichelgefäßes mit Hilfe einer Laborwaage ermittelt, das später vom jeweiligen Gesamtgewicht des Ruhe- und Reizspeichels subtrahiert wurde. Somit ergab sich die produzierte Speichelmenge der entsprechenden Drüsen.

Nach der Speichelentnahme wurden die Speichelröhrchen sofort ausgewogen und in einer Kühlzentrifuge bei 4° C 15 Minuten lang mit 6000 U/min zentrifugiert. Um über den gesamten Versuchsverlauf eine Systematik aller Speichelproben zu gewährleisten, wurde jedes zur Verwendung kommende Aliquot mit einer Registriernummer versehen. In dieser waren die Angaben über den Probanden, den Tag der Speichelabnahme, die Art des Speichels (stimuliert/unstimuliert) und die jeweilige Speicheldrüse enthalten. Von dem gewonnenen Ruhe- und Reizspeichel wurden zweimal 200 µl Speichel abpipettiert, in das entsprechend markierte Röhrchen gegeben, mit 200 µl Glykoll versehen und bei – 80° C bis zur Laboranalyse gelagert. Der verbliebene Restspeichel wurde verworfen.

2.3.2 Labortechnische Durchführung

Die labortechnische Verarbeitung der Speichelproben fand in einem Zeitraum von sechs Wochen fortlaufend statt.

2.3.2.1 Bestimmung der Antikörper im Speichel

Die Bestimmung der unspezifischen und spezifischen Antikörper wurde mittels eines Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) auf 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. In Vorversuchen wurden die optimalen Verdünnungen für jeden Schritt empirisch festgelegt und während des gesamten Versuchsverlaufes beibehalten. Auf eine Platte konnten maximal 20 Proben, also der an allen Versuchstagen gesammelte unstimulierte oder stimulierte Speichel eines Probanden, aufgetragen werden. Zusätzlich wurde auf jeder Platte eine Standardkurve erstellt und eine Verdünnungsreihe einer Kontrollprobe (unverdünnt und 1:3 verdünnt) gemessen. Die Kontrollmessung diente der internen Qualitätssicherung. Insgesamt kamen von 14 Probanden 560 Speichelproben zur Auswertung. Das folgende Schema zeigt die räumliche Aufteilung einer Mikrotiterplatte (Abbildung 2.2):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Leerwert		Probe 1 (1:7,5)		Probe 5		Probe 9		Probe 13		Probe 17	
B	Standard		Probe 1 (1:37,5)		Probe 6		Probe 10		Probe 14		Probe 18	
C	Standard		Probe 2		Probe 7		Probe 11		Probe 15		Probe 19	
D	Standard		Probe 3		Probe 8		Probe 12		Probe 16		Probe 20	
E	Standard		Probe 4		Probe 9		Probe 13		Probe 17			
F	Standard		Probe 5		Probe 6		Probe 10		Probe 14		Probe 18	
G	Kontr. (unver.)		Probe 3		Probe 7		Probe 11		Probe 15		Probe 19	
H	Kontr. (1:3)		Probe 4		Probe 8		Probe 12		Probe 16		Probe 20	

Abbildung 2.2: Räumliche Aufteilung einer Mikrotiterplatte

2.3.2.2 Bestimmung der unspezifischen und spezifischen IgA-Immunglobuline im Speichel

Der erste Schritt bestand in der Beschichtung der Platten mit Anti-human-IgA bzw. der entsprechenden Bakterienlösung in einer Verdünnung von 1:5000 sowie 1:2500

und 1:1000 in frischem Phosphatpuffer (siehe Abbildung 2.3). Jedes Well der Mikrotiterplatte wurde mit 100 μl dieser Lösung beschickt und bei Raumtemperatur für eine Stunde auf einem Schüttler (ca. 200 U/min) inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte die Vorbereitung der Standardreihen und Speichelproben. Die Proben wurden nach dem Auftauen mit Probenpuffer zunächst auf 1:3,75 verdünnt. Die geometrische Weiterverdünnung um den Faktor 5 erfolgte bis zum Erhalt von zwei Verdünnungen. Zur internen Qualitätssicherung wurden die Kontrollproben in zwei Verdünnungen mitgemessen. Die maßgebende Standardkurve wurde anhand eines kommerziellen Standardserums erstellt (Konzentration siehe Tabelle 2.3). Ausgehend von einer Verdünnung von 1:10000 wurden fünf Verdünnungen im Verhältnis 1:3 hergestellt. Nach viermaligem Waschen der Mikrotiterplatten mit einem Waschpuffer erfolgte das Auftragen von Standard und Proben. Pro Well wurden je 25 μl Standard oder Probe eingesetzt und mit 75 μl Peptidassaypuffer auf 100 μl ergänzt. Daraufhin wurden die Platten für eine halbe Stunde auf den Schüttler gestellt und danach bei +4° C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte, nach erneutem viermaligem Waschen der Platten, das Auftragen von 100 μl biotinyliertem Anti-IgA-Antikörper (Konzentration siehe Tabelle 2.3). Die Inkubationszeit bei Raumtemperatur auf dem Schüttler betrug eine Stunde. Nach einem erneuten Waschvorgang wurde jedes Well mit 100 μl Streptavidin-Peroxidase beschickt und unter Schütteln eine Stunde inkubiert. Wiederum erfolgte vor dem Einsatz des Färbemittels TMB-Galatti ein viermaliges Waschen. Das frisch angesetzte Färbemittel (1:100) wurde in einem Volumen von 110 μl ca. zehn Minuten bei Dunkelheit inkubiert, bis eine abgestufte Blaufärbung in den Wells zu erkennen war. Dieser enzymatische Farbumschlag wurde mittels 50 μl einer 4N H_2SO_4 gestoppt.

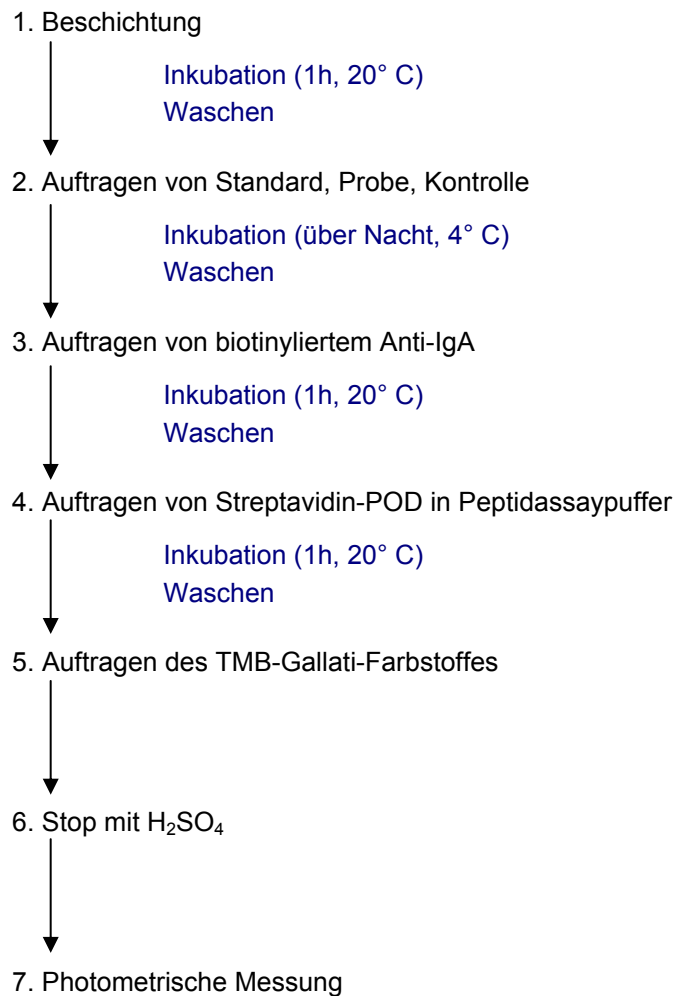


Abbildung 2.3: Arbeitsschritte während eines IgA-Assays

2.3.3 Auswertung

Die Auswertung der Mikrotiterplatten erfolgte durch Bestimmung der optischen Dichte mit Hilfe eines Photometers. Die Platten wurden bei einer Testwellenlänge von 450 nm und einer Referenzfiltereinstellung von 490 nm gemessen, um eventuelle unterschiedliche Resorptionen der Platten selbst auszugleichen. Zunächst wurde anhand der auf jeder Platte vorhandenen Standardreihe eine halblogarithmische Standardkurve erstellt. In einem weiteren Schritt wurden dann alle Wells einer Platte direkt auf diesen Standard bezogen und in Prozentwerten ausgegeben.

Tabelle 2.3: Verwendete Lösungen und Verdünnungen in den IgA-Assays

Assay	Beschichtung Verdünnung in PBS	Standard Verdünnung in Peptidassaypuffer	Antikörper Verdünnung in Peptidassaypuffer
<i>IgA – gesamt</i>	Beschichtungs- antikörper IgA 1:5000	Proteinstandard- serum 2,34 g/l	Biotinylierter IgA- Antikörper 1,4 mg/l
<i>IgA 1</i>	Beschichtungs- antikörper IgA 1 1:1000	Proteinkontroll- serum 2,49 g/l	Biotinylierter IgA- Antikörper 1,4 mg/l
<i>IgA 2</i>	Beschichtungs- antikörper IgA 2 1:1000	Pool-Serum	Biotinylierter IgA- Antikörper 1,4 mg/l
<i>Candida albicans (Ca)</i>	Ca-Homogenat 1:5000	Proteinstandard- serum 2,34 g/l	Biotinylierter IgA- Antikörper 1,4 mg/l
<i>Treponema denticola (Td)</i>	Td-Homogenat 1:5000	Proteinstandard- serum 2,34 g/l	Biotinylierter IgA- Antikörper 1,4 mg/l
<i>Porphyromonas gingivalis (Pg)</i>	Pg-Homogenat 1:5000	Proteinstandard- serum 2,34 g/l	Biotinylierter IgA- Antikörper 1,4 mg/l
<i>Actinobacillus actinomycetem - comitans (Aa)</i>	Aa-Homogenat 1:2500	Proteinstandard- serum 2,34 g/l	Biotinylierter IgA- Antikörper 1,4 mg/l

2.4 Statistische Qualitätskontrolle

Da alle Assays auf mehreren Mikrotiterplatten an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden, erfolgte als Qualitätskontrolle die Messung einer Kontrollprobe auf jeder Platte. Aus den Messwerten dieser Probe wurde der Mittelwert und die Standardabweichung für jeden Analysetag berechnet und zur weiteren Berechnung des Inter-Assay-Variationskoeffizienten (VK) herangezogen:

$$VK (\%) = SD/MW \times 100$$

(SD = Standardabweichung, MW = arithmetischer Mittelwert)

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Statistikpaket SPSS 10.0 für Windows. In der deskriptiven Statistik wurden verteilungsfreie Stichprobenparameter wie Median und Perzentile bestimmt. Als statistische Tests wurden nicht-parametrische Verfahren gewählt:

- ◆ Für verbundene Stichproben einer Bestimmungsgruppe wurde der Wilcoxon-Test angewendet.
- ◆ Unverbundene Stichproben (z. B. die Gegenüberstellung der einzelnen Tage) wurden mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert. Das Signifikanzniveau wurde für alle Tests auf $p < 0,05$ festgelegt.