

## 4. Diskussion

### 4.1 *Grundsätzliches*

Sekretorische Antikörper gelten im Sinne einer first line of defense als reaktiver Abwehrmechanismus, der den Makroorganismus vor potentiell schädlichen Mikroorganismen schützen soll (GENCO & SLOTS, 1984; CHILDERS & MCGHEE, 1989). Dieses Prinzip impliziert, dass eine Antigenexposition zu einer Immunantwort führt. Tatsächlich zeigen verschiedene Immunisierungsexperimente, dass sich das Immunsystem stimulieren lässt. Je nach Lokalisation und Verteilung der immunkompetenten Zellen wurden unterschiedliche Immunisierungswege untersucht:

◆ *Installation bakterieller Zellen in die großen Speicheldrüsen bzw. deren Ausführungsgänge:*

In Experimenten an Affen rief die Installation von Antigenen (z. B. von *S. mutans*) in den Ausführungsgang der Glandula parotidea erhöhte IgA-Titer hervor (EVANS ET AL., 1975; MCGHEE ET AL., 1975; WALKER, 1981). Die Wirksamkeit dieser Methode konnte somit bewiesen werden, klinische Studien am Menschen wurden aber nicht durchgeführt.

◆ *Injektion von Antigenen in die orale Mukosa:*

Diese Methode erbrachte in Immunisierungsstudien an Hamstern unterschiedliche Ergebnisse. BOWEN ET AL. fanden erhöhte Antikörpertiter im Serum (BOWEN ET AL., 1975), TAUBMAN und SMITH konnten erhöhte IgA-Titer im Speichel hervorrufen (TAUBMAN & SMITH, 1977).

Bei Experimenten an Hamstern und Ratten führte die Injektion bakterieller Glykosyltransferase (GTF) zur Bildung spezifischer Antikörper im Speichel (TAUBMAN & SMITH, 1977; TAUBMAN ET AL., 2001). Klinische Studien am Menschen wurden nicht unternommen.

◆ *Stimulierung des mukosaassoziierten Immunsystems (MALT) im Darm:*

Diese Methode zur Stimulation des sekretorischen Immunsystems basiert darauf, dass Antigene oral – in Form von Gelatine kapseln – aufgenommen und im Dünndarm von den dendritischen Zellen des Peyer'schen Plaques als solche präsentiert werden. Über einen T-Lymphozyten-abhängigen Prozess wird die Differenzierung von IgA-produzierenden Plasmazellen aktiviert (MESTECKY, 1987 a; TOMASI, 1989; RENEGAR ET AL., 1998). Es konnte ein generalisiertes Auftreten von spezifischen sekretorischen Antikörpern auf den betreffenden Schleimhäuten (auch in

der Mundhöhle) nachgewiesen werden. Dieses Verfahren wurde erfolgreich beim Menschen angewendet, hat aber den Nachteil, dass die Antigene zur Stimulation ständig extern zugeführt werden müssen.

◆ *lokale Stimulierung mukosaassoziiertes Lymphgewebes in Mundhöhle und Nasen-Rachenraum:*

Immunkompetente Antigene aus dem oralen Milieu stimulieren die in den Speicheldrüsen gelegenen Lymphozyten nach einer Aufnahme durch die Mundschleimhaut. Ein intensiver Kontakt der Antigene mit der Mundschleimhaut ist hierbei von großer Bedeutung (SMITH & TAUBMAN, 1990; SMITH ET AL., 2001). Der indirekte Zusammenhang zwischen einem lokalen Immunsystem und den Speicheldrüsen konnte in diversen Studien gezeigt werden:

Antigene der Zahnplaque von Molaren erreichten über die Mukosa das immunkompetente Gewebe der Parotis. Im Speichel der Parotis auf der jeweils betroffenen Seite konnten erhöhte Konzentrationen an s-IgA festgestellt werden (EMMINGS ET AL., 1975; WALKER, 1981; NAIR & SCHROEDER, 1983).

In Tierversuchen konnte durch diese Methode der nichtinvasiven, lokalen Stimulierung des mukosaassoziierten Lymphgewebes eine Erhöhung der Speichelantikörper ohne Veränderung der Serumantikörper hervorgerufen werden (LEHNER & CALDWELL, 1986).

Für Studien an Menschen liegen folgende Daten vor:

Eine Studie aus dem Jahre 1978 von KRASSE ET AL. mit *S. mutans* als Antigen sowie Studien von SMITH ET AL. aus den Jahren 1990 und 2001 mit Glycosyltransferase als Antigen konnten keine signifikante Erhöhung der IgA-Antikörper aufzeigen (KRASSE ET AL., 1978; SMITH & TAUBMAN, 1990; SMITH ET AL., 2001). Eine innovative Methode zur Stimulierung des sekretorischen Immunsystems stellt die intranasale Applikation von Antigenen dar. Die Tonsillen dienen dabei als regionales Immunsystem, in dem die Antigenpräsentation stattfindet und die Reifung der sekretorischen B-Lymphozyten erfolgt. Bei bisher durchgeführten Studien dienten abgetötete Bakterien oder lösliche Proteine als Antigene. Auch hier konnte keine signifikante Erhöhung der sekretorischen Antikörper nachgewiesen werden (FUKUIZUMI ET AL., 1997, 1999, 2000; HAJISHENGALLIS ET AL., 1995; HAJISHENGALLIS & MICHALEK, 1998, 1999; JESPERGAARD ET AL., 1999; KATZ ET AL., 1993; RUSSEL ET AL., 1999; WU & RUSSELL, 1993; SAITO ET AL., 2001; CHILDERS ET AL., 2002).

Allen obengenannten Stimulationsversuchen liegt eine externe („künstliche“) Zufuhr eines definierten, in der Regel präparierten und gereinigten Antigens zu Grunde. Gegenwärtig existieren nur wenige Studien über eine interne („natürliche“) Stimulation des sekretorischen Immunsystems:

HARDING und JALIL konnten in Studien um experimentelle Gingivitis (wobei hier die Bakterien der Zahnplaque den „natürlichen“ antigenen Stimulus darstellten) im Parotisspeichel von Probanden erhöhte Konzentrationswerte an s-IgA feststellen (HARDING ET AL., 1980; JALIL ET AL., 1993).

LIE und SCHENK untersuchten ebenfalls die Auswirkungen der („natürlich“) anwachsenden Plaquemenge während der Entstehung einer Gingivitis auf den Gehalt an sekretorischem IgA im stimulierten und unstimulierten Speichel der Parotis (LIE ET AL., 2002; SCHENK ET AL., 1993). Angaben über Veränderungen der s-IgA Werte im stimulierten und unstimulierten Speichel der Submandibularis/-lingualis wurden jedoch nicht gemacht, obwohl der Gehalt an intraglandulären IgA-produzierenden Plasmazellen im Vergleich zur Parotis höher liegt (bei annähernd gleichem Gehalt an s-IgA im Speichel) (STUCHELL & MANDEL, 1978; KORSRUD & BRANDTZAEG, 1980).

In bedeutend geringerem Umfang als bei der Entstehung einer Gingivitis ist der Einfluss des s-IgA auf die Entstehung parodontaler Erkrankungen geklärt, und es existieren widersprüchliche Daten über die Konzentration sekretorischer Antikörper im Speichel von parodontal Kranken und Gesunden (ORSTAVIK & BRANDTZEAG, 1975; RANNEY ET AL., 1981; SANDHOLM & GRONBLAD, 1984; HENSKENS ET AL., 1996; MYINT ET AL., 1997; HÄGEWALD ET AL., 2000).

#### **4.2 Probanden**

ZINKERNAGEL konnte zeigen, dass die Reaktion des sekretorischen Immunsystems von der Dosis, der Lokalisation und dem Zeitpunkt der Antigenapplikation abhängt (ZINKERNAGEL, 2000). Bei vorliegender Studie wurde deshalb besonderen Wert darauf gelegt, Probanden mit annähernd ähnlichen „Aktivitätszuständen“ des sekretorischen Immunsystems auszuwählen und mögliche externe Störfaktoren auf das sekretorische Immunsystem so gering wie möglich zu halten. Folgende Kriterien waren daher in diesem Zusammenhang Bedingungen für die Teilnahme:

- ◆ Es wurden ausschließlich männliche Probanden im Alter zwischen 20 und 30 Jahren ausgewählt. So konnte der Einfluss von menstruationszyklusabhängigen Hormonschwankungen ausgeschlossen werden (GOMEZ ET AL., 1993).
- ◆ Ausschlusskriterien waren Nikotin-, Alkohol- und Drogenabusus. Einer einseitigen Ernährungsform durften die Probanden nicht anhängen.
- ◆ Lokale Faktoren des Mundraumes, die auf eine primär erhöhte Bakterienzahl und damit auf eine erhöhte Antigenexposition hindeuten, gehörten ebenfalls zu den Ausschlusskriterien dieser Studie.

Diese waren insbesondere:

- ◆ Parodontitiden,
- ◆ Mundschleimhauterkrankungen,
- ◆ offene kariöse Läsionen.

In anderen Studien um experimentelle Gingivitis wurden nur vereinzelt Aussagen zum Stand der Mundhygiene der Probanden vor Beginn der Studie getroffen. Einheitlich niedrige Werte der Mundhygieneindizes wurden durch eine initiale professionelle Zahnreinigung erreicht (eine Woche vor Studienbeginn, SCHENK ET AL., 1993, am ersten Tag der Versuchsreihe, LIE ET AL., 2002). Diese drastische Reduktion der Mikroorganismen (Antigenexposition) könnte das sekretorische Immunsystem in einen eher „unnatürlichen“ Zustand versetzen, der für vorliegende Studie nicht erwünscht war. In vorliegender Studie wurde bewusst auf eine initiale Zahnreinigung verzichtet, da diese zu einer nicht zu kalkulierenden Milieuveränderung in der Mundhöhle führen kann mit ebenfalls unkalkulierbaren Auswirkungen auf die s-IgA-Produktion (ZINKERNAGEL, 2000 zugrunde legend). Generell lag bei den Probanden der vorliegenden Studie vor dem Verzicht auf jegliche Mundhygienemaßnahmen eine gute bis sehr gute Mundhygiene vor (quantifiziert durch QH und PBI – aufgrund dieser erhobenen Werte vor Beginn der Studie kann auf den generellen Zustand der häuslichen Mundhygiene geschlossen werden). Die Antigenbelastung durch bakterielle Zahnplaque kann also vor Beginn der Studie für jeden Probanden als gering eingestuft werden.

Zweifellos bedingen ein genetischer Polymorphismus und der biologische Rhythmus entscheidend den Speichel in seiner Sekretion und Zusammensetzung, ohne dass auf sie eingewirkt werden kann. Jegliche Einflussfaktoren sind jedoch bei In-vivo-Stu-

dien nicht abgrenzbar und müssen letztendlich als interindividuelle Diskrepanz bei der Betrachtung der Ergebnisse bedacht werden.

### **4.3 Methodik klinischer Untersuchungsparameter**

Zur Sicherung der Validität ermittelte stets der gleiche Behandler den Plaque- und gingivalen Entzündungsstatus anhand von international anerkannten, vergleichbaren Indices (PBI – MÜHLEMANN und SON, QH – QUIGLEY und HEIN). Somit wurden interindividuelle Diskrepanzen, die stets bei der Durchführung, z. B. in Form von differierenden Sondierungsintensitäten und Gradeinteilungen auftreten können, minimiert. Die Ergebnisse wurden direkt am Behandlungsstuhl in einen Computer eingegeben. So konnten Übertragungsfehler durch das Ansagen und Notieren von Befunddaten auf ein geringes Maß reduziert werden.

Eine zahnärztliche Einheit mit heller Lichtquelle und einem Luftbläser sowie ein oberflächenversiegelter Mundspiegel und eine Parodontalsonde dienten der zuverlässigen Befundaufnahme. Die Apparatur zur Speichelabnahme wurde stets an die gleiche zahnärztliche Einheit angeschlossen und die Suktoren in einer routinemäßig ausgewählten Reihenfolge im Mundraum platziert bzw. aus ihm entfernt. Um sicherzustellen, dass die gesamte gewonnene Speichelmenge aus den Schläuchen der Apparatur in die Auffanggefäße gelangt, wurde nach Ablauf der Speichelabnahmezeit vor dem Ausschalten der zahnärztlichen Einheit eine einminütige Leerlaufzeit eingehalten.

Zur Bestimmung des Plaquewachstums und des gingivalen Entzündungsgrades stehen eine Reihe von Methoden zur Auswahl. Die Plaque kann z. B. nach ihrer Lokalität, ihrer Dicke, ihrer Schichtung und ihrem prozentualen Anteil bezogen auf die vorhandenen Zähne beurteilt werden. Bezüglich der gingivalen Entzündung gibt das Erscheinungsbild der Gingiva in Farbe, Kontur und Blutungsneigung oder die Sulkusflüssigkeit mit ihrer Fließrate eine Orientierung (RATEITSCHAK ET AL., 1984).

Um das Plaquewachstum im Versuchsverlauf zu dokumentieren, wurde der Index nach QUIGLEY & HEIN (QH-Index) modifiziert nach TURESKY ausgewählt (QUIGLEY & HEIN, 1962; TURESKY & GLICKMAN, 1970). Er bietet mit seiner Einteilung in sechs Grade die Möglichkeit einer sehr detaillierten Differenzierung der flächenhaften Plaqueverteilung. Es wurden vier Zähne pro Quadrant, welche bei jedem Probanden

vorhanden waren, im Studienverlauf kontrolliert. Die variable Betrachtung von linguale Zahnflächen im zweiten und dritten Quadranten sowie von vestibulären Zahnflächen im ersten und vierten Quadranten, ergab einen generellen Überblick über die orale Situation. Für diese Studie zeigte sich eine weitere Modifizierung bezüglich der Testdurchführung als unumgänglich:

Zur Bestimmung der Plaquemenge wurde auf das Anfärben mit einem Plaquerevelator verzichtet, da eine darauffolgend notwendige Entfernung der Farbzonen nicht ohne Zerstörung der Plaque hätte durchgeführt werden können. Dieses Vorgehen war mit dem Versuchsziel nicht vereinbar (die Bestimmung des Plaqueindex nach QUIGLEY und HEIN sieht ein Anfärben der Zahnplaque vor). Trotz dieser Abänderung konnte das Plaquewachstum unter Zuhilfenahme des zahnärztlichen Luftbläasers durch temporäre Trocknung im Sinne des QH-Index problemlos quantifiziert werden. Ergänzend wurde für die Ermittlung der gingivalen Entzündungsneigung der Papillen-Blutungs-Index nach MÜHLEMANN und SON ausgewählt (MÜHLEMANN & SON, 1971). An den Zähnen, an denen die QH-Messungen durchgeführt wurden, erfolgte das Sondieren des gingivalen Sulkus unter Einbeziehung der mesialen und distalen Papille. Somit lag eine einheitliche Zahl von Messwerten vor (der Plaqueindex nach QH sieht normalerweise fünf, der Papillen-Blutungs-Index nur vier Bewertungsstufen vor). Aus der Blutungsstärke ergab sich jeweils ein Wert zwischen 0 und 4, welcher, entsprechend addiert, in der statistischen Auswertung der Einordnung des Entzündungsgrades diente. Studien belegen, dass gingivale Entzündungen durch das leichte Provozieren von Blutungen mittels dentaler Sonde mit einer höheren Zuverlässigkeit nachgewiesen werden können als durch rein visuelle Entzündungszeichen (GREENSTEIN & POLSON, 1981).

Mit der Kombination dieser Indices (QH-Index/PBI) konnten bukkale und linguale Glattflächen der Zähne sowie die Interdentalräume bewertet werden. Beide Indices korrelieren mit der ansteigenden Bakterienanzahl im Mundraum und stellen, nach Aufsummierung der beobachteten Einzelwerte pro Zahn und Division durch die Zahnanzahl einen statistisch verwertbaren, absoluten Zahlenwert dar.

#### 4.4 Methodik der Speicheluntersuchung

##### 4.4.1 Methodik Speichelgewinnung

Die Gewinnung von Speichelproben kann auf verschiedene Weise geschehen. Primär ist dabei zwischen stimuliertem und unstimuliertem Speichelfluss zu unterscheiden, wobei die Speichelsekretion immer irgend einer Art von Stimulation unterworfen ist (KERR, 1961). Um für eine Untersuchung ausreichende Probenmengen zu gewinnen, ist es notwendig, den Speichelfluss in geeigneter Weise zu stimulieren:

Zur nichtinvasiven Stimulation des Speichelflusses können die mastikatorische und die gustatorische Methode eingesetzt werden. Bei Ersterer wird dem Probanden ein standardisiertes Stück Paraffin zum Kauen gegeben. Nach anfänglichem zweiminütigem Kauen wird der Mund von Speichel entleert und der Speichel danach unter fortgesetztem Kauen für eine definierte Zeitspanne durch zwischenzeitliches Ausspucken gesammelt.

Die gustatorische Methode verwendet 1–6 %ige Zitronensäure, die in standardisierter Menge in festen Intervallen auf die Zunge getropft wird. Salz und Zucker sind ebenfalls zur Anwendung gekommen. Zur Gewinnung unstimulierten Speichels existieren im Wesentlichen vier Methoden (NAVAZESH, 1993):

◆ Draining method:

Der Proband lässt überschüssigen Speichel bei etwas nach vorn geneigtem Kopf über die leicht geöffnete Unterlippe in ein Sammelgefäß laufen.

◆ Spitting method:

Der Speichel wird im Mundboden gesammelt und etwa einmal pro Minute in ein Sammelgefäß gespuckt.

◆ Suction method:

Der Speichel wird durch periodisches Saugen aus dem Mundboden in ein Sammelgefäß geleitet.

◆ Swab absorbent method:

Der Speichel wird durch in den Mund eingebrachte Watterollen aufgenommen, die anschließend zur Mengenbestimmung gewogen bzw. zentrifugiert werden, um die Probe zu erhalten.

In vorliegender Studie wurde, um einen direkten Vergleich über die Menge an s-IgA in der Ruhephase und im stimulierten Zustand der Speicheldrüsen zu erhalten, Speichel vor und nach gustatorischer Stimulation mit 2%iger Zitronensäure verwendet.

Um eine genauere Aussage über die Konzentration an s-IgA sowie über die Potenz der großen Speicheldrüsen hinsichtlich ihrer Möglichkeit, s-IgA bereitzustellen, treffen zu können, war das Sammeln von nach Drüsen getrennten Speichelproben erforderlich. Der auf diese Weise gewonnene Speichel ist vom Mundmilieu (Enzymen anderer Herkunft, Bakterien und deren Stoffwechselprodukten) unbeeinflusst. Nach der Sekretion stattfindende Modifikationen und Verunreinigungen werden weitgehend verhindert. Weiterhin wird bei der drüsenspezifischen Speichelgewinnung ausgeschlossen, dass die Anwesenheit einer zum Teil sehr hohen Antigenkonzentration die Detektion der Antikörper erschwert, indem diese über spezifische Antigen-Antikörper-Komplexe gebunden werden.

Die Gewinnung von reinem Parotissekret konnte schon 1910 von Carlson und Crittenden verwirklicht werden (CARLSON & CRITTENDEN, 1910). Eine ähnliche, 1916 von LASHLEY (LASHLEY, 1916) beschriebene Apparatur ist mit geringen Modifikationen noch heute gebräuchlich. Der Kollektor besteht aus zwei konzentrischen Hohlräumen in einer flachen Metall- oder Kunststoffschale. Der innere Hohlraum ist über einen Schlauch mit dem Sammelbehälter verbunden und wird auf das Ostium des Stenton'schen Ganges plaziert. Der äußere Hohlraum hält mittels applizierten Unterdrucks den Kollektor an der Wangenschleimhaut fest.

Die Gewinnung von Submandibularis-/Sublingualissekret bereitete aus anatomischen Gründen größere Probleme. 1955 wurde von SCHNEYER (SCHNEYER, 1955) eine Weiterentwicklung des Segregators von PICKERILL (PICKERILL, 1919) vorgestellt, die es ermöglichen sollte, die Sekrete der Gl. submandibularis und der Gl. sublingualis getrennt aufzunehmen. Der Kollektor musste für jeden Probanden individuell angefertigt werden, um der anatomischen Schwankungsbreite Rechnung zu tragen. Dass es durch Unterteilung der Kammern tatsächlich gelingt, die Sekrete der beiden Drüsen zu trennen, darf allerdings bezweifelt werden. Individuelle anatomische Verhältnisse sorgen teilweise schon vor Austritt der Sekrete in die Mundhöhle für eine Mischung und die Ostien der Dukti liegen häufig sehr dicht beieinander (ROHEN, 1988). Schneyers Apparatur wurde häufig zur Grundlage von Weiterentwicklungen, die einen besseren Halt im Mundboden (WOLF, 1964), die universelle Einsatzfähig-

keit desselben Kollektors bei einer größeren Probandenzahl (TRUELOVE ET AL., 1967) oder die Reduzierung der Störanfälligkeit durch Schluckbewegungen (STEPHEN ET AL., 1978) zum Ziel hatten. Seit 1986 ist eine kommerziell hergestellte Anlage für die Gewinnung von Mundbodensekreten erhältlich, die durch bewegliche Teile den individuellen anatomischen Gegebenheiten angepasst werden kann (COUDERT ET AL., 1986). Von einer Trennung des Sekretes der Gl. submandibularis von dem der Gl. sublingualis ist dabei nicht mehr die Rede. Auch bei der in dieser Studie zur Anwendung gekommenen Apparatur wird der Speichel der Gll. submandibulares bzw. -linguales gemeinsam gewonnen.

Generell stellt jeder in die Mundhöhle eingebrachte Fremdkörper einen Reiz in Bezug auf die Speichelproduktion dar. Man kann davon ausgehen, dass es sich bei der Gewinnung von unstimuliertem Speichel mittels der Abnahmeapparatur auch um eine Form des Reizspeichels handelte, wobei es demzufolge nahezu unmöglich ist, „echten“ Ruhespeichel drüsenspezifisch zu gewinnen.

Um Speichelproben mit den für diese Untersuchung notwendigen Eigenschaften zu erhalten, sollte der Speichel gleichzeitig nach Drüsen getrennt und möglichst vollständig über einen längeren Zeitraum gesammelt werden, ohne dabei in Kontakt mit dem Mundmilieu zu gelangen. Um sicherzustellen, dass die gustatorische Stimulation sich in der Speichelzusammensetzung niederschlägt, wurde ein mit 20 Minuten vergleichsweise langer Zeitraum für die Speichelentnahme gewählt. Dadurch entstanden für die großen Speicheldrüsen in der Mehrzahl relativ große Proben von mehreren Millilitern.

Während der Entnahme des Speichels mit der unter Material und Methoden beschriebenen Apparatur war zu beobachten, dass der Zungenrand und der Mundboden von einem zäh-mukösen Film überzogen blieben, sich jedoch keine Pfützen im Mundboden bildeten und das Frenulum labiale trocken blieb. Es kann somit davon ausgehen werden, dass der Speichel aus den großen Drüsen des Mundbodens vollständig abgesaugt wurde und keine Mischung von links und rechts stattfand. Der muköse Film auf der Schleimhaut war Indiz dafür, dass das Sekret der kleinen Drüsen nicht mit aufgenommen wurde. Bei Abnahme des Parotisspeichels konnte der blasenfreie Entnahmevorgang beobachtet werden, und die trockene Wangenschleimhaut zeigte an, dass der Parotisspeichel vollständig aufgefangen wurde. Um sicherzustellen, dass die gesamte gewonnene Speichelmenge aus den Schläuchen der Appa-

ratur in die Auffanggefäße gelangt, wurde nach Ablauf der Speichelabnahmezeit vor dem Ausschalten der zahnärztlichen Einheit eine einminütige Leerlaufzeit eingehalten. Das Kauen zur Stimulation des Speichelflusses während der Entnahmeprozedur musste dabei unterbleiben, um den sicheren Sitz der Apparatur nicht zu gefährden (aus diesem Grund kam hier nur die Stimulation mit Zitronensäure in Frage). Generell wurde bei Gewinnung der Speichelproben auf standardisierte Bedingungen (z. B. gleiche Uhrzeit der Speichelabnahme, ruhige Atmosphäre) geachtet, um den Einfluss circadianer Schwankungen auf Sekretionsrate und IgA-Produktion zu vermeiden (DIMITROU & DOHERTY, 2002). Zur Minimierung der Einflüsse von Proteasen und Glykohydrolasen aus den Speicheldrüsen bzw. bakteriellen Ursprungs, erfolgte nach Speichelgewinnung ein sofortiger gekühlter Transport der Speichelproben. Nach der Speichelmengenbestimmung wurden die Proben zentrifugiert, in Röhrchen abgefüllt, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und erst zur labortechnischen Untersuchung wieder aufgetaut.

#### **4.4.2 Methodik zur Bestimmung der sekretorischen Immunglobuline**

Als Analyseverfahren zur Konzentrationsmessung des gesamt-sekretorischen Immunglobulin A und der spezifischen Antikörper wurde ein Sandwich-ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) verwendet. Dieser hat sich in den letzten Jahren zu einem Standardverfahren entwickelt, das sich universell einsetzen lässt und mit einer hohen Sensitivität Konzentrationen bis in den ng-Bereich nachweisen kann (BUTLER ET AL., 1990). In früheren Jahren wurde für die Bestimmung der IgA-Immunglobuline im Speichel häufig die bereits 1965 entwickelte Radiale Immundiffusion nach MANCINI verwendet (MANCINI & HEREMANS, 1965). Diese hat gegenüber dem ELISA aber folgende Nachteile: Der Gehalt an IgA-Molekülen wird gegenüber der Messung im ELISA unterschätzt, da dimere (und oligomere) IgA-Moleküle bestehend aus (mindestens) zwei IgA-Molekülen, der J-Kette und dem SC-Fragment aufgrund ihrer Größe langsamer im Gel diffundieren als monomeres IgA. Die nach der MANCINI-Methode gemessenen Werte müssen daher mit einem Korrekturfaktor multipliziert werden. Die Größe dieses Faktors ist jedoch abhängig vom Autor und schwankt zwischen Werten von 1,6 und 3,0 (BRATTHALL & ELLEN 1982). Im ELISA stehen beide IgA-Moleküle im IgA-Dimer für die Bindung an die anti-human IgA-Antikörper zur Verfügung. Die Standardisierung der Tests erfolgt mit monomerem IgA. Durch die Spezifität der verwendeten Antikörper gegen die Alpha-Kette des

IgA sowie die Standardisierung mit einem monomeren Standard entspricht das Ergebnis der Menge der monomeren IgA-Moleküle (MESTECKY & RUSSELL, 1986). Die Standardisierung der spezifischen IgA-Konzentration erfolgte gegen einen Pool mit monomeren, pathogenspezifischen IgA-Molekülen, daher ist eine absolute Konzentrationsangabe für die Bestimmung spezifischer Antikörper nicht möglich. Diese Art der Quantifizierung stellt eine verbreitete Vorgehensweise dar (CAMLING & KOHLER, 1987; HÄGEWALD, 1991). Ein weiterer Vorteil des ELISA liegt in der Möglichkeit, auch größere Probenmengen in unterschiedlichen Verdünnungsstufen im tolerablen Zeitrahmen zu messen. Heute findet daher fast ausschließlich der ELISA Anwendung (SATO, 1991; SCHENK ET AL., 1993; HOCINI ET AL., 1993; HÄGEWALD ET AL., 1995). Für die Bestimmung spezifischer Antikörper ist eine sensitive Methode notwendig, da diese niedriger konzentriert sind als das Gesamt-s-IgA.

#### **4.4.3 Validität der labortechnischen Untersuchung**

Die Speichelmenge wurde mit Hilfe einer digitalen, geeichten Waage sogleich nach dem Ende der klinischen Untersuchungen ermittelt. Das standardisierte, gemittelte Leergewicht der Probengefäße wurde zur Sicherheit kontrolliert und vom Messergebnis subtrahiert.

Zur Sicherung der Pipettierqualität und zur Fehlerminimierung bei der Erstellung von Verdünnungsreihen wurden alle Messungen in doppelter Ausführung vollzogen. Wichen die Vergleichswerte um mehr als 25 % voneinander ab, wurde dies als „missing value“ in die Auswertung eingerechnet. Zur Kontrolle, ob die beobachteten Messwerte durch eine unspezifische Bindung hervorgerufen wurden, lief parallel auf jeder Mikrotiterplatte die Messung eines Leerwertes mit. In das entsprechende Well wurde anstelle einer Speichelprobe oder eines Standards lediglich Verdünnungspuffer eingebracht. Es war nicht möglich, alle Messungen zeitlich parallel auszuführen. Um den IgA-Vergleich nicht durch Schwankungen zu beeinflussen, wurden alle Proben von zwei Probanden, bezogen auf alle sekretorischen Antikörper, stets gemeinsam gemessen. Auf einer Mikrotiterplatte, die jeweils mit einem Antikörper beschickt wurde, fanden die Ruhe- oder Reizspeichelproben eines Probanden aller Untersuchungstage Platz.

## 4.5 *Ergebnisse*

### 4.5.1 **Speichelmenge**

Die Bestimmung der tatsächliche Sekretionsleistung von Drüsengewebe gelingt nur, wenn die sezernierte Menge pro Zeiteinheit in Relation zum Drüsengewicht gesetzt wird (DAWES, 1969). Dies ist jedoch bei der Untersuchung humaner Speicheldrüsen in vivo nicht möglich, auf eine Bestimmung der Drüsengröße mit szintigraphischen Verfahren wurde aus ethischen Überlegungen in diesem Pilotprojekt verzichtet. Zur Auswertung wurde daher nur die exokrine Sekretionsleistung der Speicheldrüsen herangezogen.

Speichelproben lassen sich anhand ihres Gewichtes genauer quantifizieren als durch Volumenbestimmung (ATKINSON ET AL., 1993). Aufgrund des spezifischen Gewichtes von ca.  $1 \text{ g/cm}^3$  lässt sich die Speichelflussrate direkt in ml/min ausdrücken. Über die gemessenen Mengenwerte gibt es in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben. Je nach verwendeter Sammelmethode entsteht bereits durch die Entnahme selbst, wie oben schon erwähnt, eine mehr oder weniger starke Stimulation, die die Ruhesekretion beeinflusst. Für bewusst stimulierte Speichelflussraten ist die Art der Stimulation bestimmend. Hinzu kommen große interindividuelle Unterschiede in der Sekretionsleistung (BIRKHED & HEINTZE, 1989).

Eine Übersicht über die von verschiedenen Autoren gefundenen Speichelflussraten gibt Tabelle 4.1:

Tabelle 4.1 Übersicht – Speichelflussraten

<b>Autor</b>	<b>Parotis in Ruhe</b>	<b>Parotis stimuliert</b>
HEFT & BAUM, 1984	0,044–0,056 ml/min/Drüsenpaar	0,619–0,843 ml/min/Drüsenpaar, 2% Zitronensäure
BAUM, 1981		0,713–0,955 ml/min/Drüsenpaar, 2% Zitronensäure
MÜNZEL, 1976	0,05 ml/min/Drüsenpaar	Ruhewert x 3 bis x 20; Durchschnitt 0,3–0,7 ml/min/Drüsenpaar
SUBER ET AL., 1984		0,32–0,36 ml/min/Drüsenpaar, Zitronendrops
<i>Vorliegende Arbeit</i>	<i>0,1–0,25 ml/min (Drüsenpaar), 0,09–0,13 ml/min/Drüse (Seite)</i>	<i>0,40–0,49 ml/min/Drüsenpaar, 0,20–0,27 ml/min/Drüse (Seite) 2% Zitronensäurelösung</i>
<b>Autor</b>	<b>Submand. in Ruhe</b>	<b>Submand. stimuliert</b>
MÜNZEL, 1976	0,5 ml/min/Drüsenpaar	Ruhewert x 2 bis x 3
PEDERSEN ET AL., 1985	0,012–0,073 ml/min/Drüse (Seite)	0,085–0,282 ml/min/Drüse (Seite), Zitronendrops
DAWES, 1969	0,26 ml/min/Drüse (Seite)	bis 3 ml/min/Drüse (Seite), Zitronendrops
KASHKET & EBERSOLE, 1983		1,0–2,0 ml/min/Drüsenpaar Paraffinkauen
BEN-ARYEH ET AL., 1987	0,25–0,52 ml/min/Drüsenpaar	1,28–1,66 ml/min/Drüsenpaar 2% Zitronensäure
MÜNZEL, 1976	0,33–0,52 ml/min/Drüsenpaar	
NAVAZESH & CHRISTENSEN, 1982	0,47–0,52 ml/min/Drüsenpaar	1,15 ml/min/Drüsenpaar Zitronensäurepapier, 2,64 ml/min/Drüsenpaar Zitronendrops, 2,38 ml/min/Drüsenpaar Gummibasiskauen
ERICSSON, 1978	0,25–0,35 ml/min/Drüsenpaar	1,0–3,0 ml/min/Drüsenpaar Paraffinkauen
EWE, 1987	0,5 ml/min/Drüsenpaar	Kauen: Ruhewert x 2,3 Geruch: Ruhewert x 2 7,4 ml/min/Drüsenpaar, Zitronensäure
<i>Vorliegende Arbeit</i>	<i>0,37–0,54 ml/min/Drüsenpaar 0,1–0,29 ml/min/Drüse (Seite)</i>	<i>0,60–0,69 ml/min/Drüsenpaar, 0,29–0,36 ml/min/Drüse (Seite), 2%ige Zitronensäurelösung</i>

In vorliegender Studie decken sich die Mittelwerte für den Ruhepeichel der Submandibularis/-lingualis, sowie die Mittelwerte für den Reizspeichel der Parotis mit den Angaben in der Literatur (siehe Tabelle 4.1). Die Mittelwerte für den unstimulierten Speichel der Parotis und die Werte für den stimulierten Speichel der Submandibularis/-lingualis lagen unter den Werten anderer Autoren. Ursache für Differenzen können die unterschiedliche Methodik der Stimulation und die Sammelmethode sein.

Der signifikante Anstieg der Speichelmenge sowohl bei der Parotis als auch bei der Submandibularis/-lingualis im unstimulierten und stimulierten Zustand über den

Ausgangswert an Tag x hinaus lässt vermuten, dass eine Erhöhung der intraoralen Bakterienmenge zu einer Erhöhung der sezernierten Speichelmenge führt. Diese Annahme deckt sich mit den Resultaten der Studie von CHANG ET AL., die eine Erhöhung der Speichelmenge nach Zunahme der Plaquemenge im Rahmen einer orthodontischen Behandlung beobachteten (CHANG ET AL., 1999). In anschließenden Untersuchungen müsste diese Hypothese bestätigt werden, da unseres Wissens nach zu dieser Fragestellung keine weiteren Veröffentlichungen existieren. Insbesondere wären hier die Feed-back-Mechanismen zu untersuchen, über die diese Speichelstimulation erfolgt.

#### 4.5.2 Gesamtmenge der IgA-Imunglobuline und spezifische Antikörper im Versuchsverlauf

Sekretorische Antikörper sind, im Sinne einer **first line of defence** als **reaktives Immunsystem** in der Lage, die Adhäsion und Ausbreitung pathogener Mikroorganismen in der Mundhöhle einzudämmen (MCNABB & TOMASI, 1981).

Ausgehend von der Vorstellung, dass das sekretorische Immunsystem Einfluss auf die bakterielle Besiedelung der Mundhöhle hat, ist zu erwarten, dass im Versuchsverlauf auf einen Anstieg der Plaquemenge (Antigenanstieg) zumindest ein temporärer Konzentrationsanstieg der sekretorischen Antikörper folgt.

Wie bereits in anderen Studien zu experimenteller Gingivitis (LIE ET AL., 2002, SCHENCK ET AL., 1993), entwickelten auch in vorliegender Studie alle Probanden nach Aussetzen der Mundhygienemaßnahmen eine mit Hilfe des Blutungsindex PBI quantifizierbare Gingivitis. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von SCHENCK ET AL. konnte auch in dieser Studie keine Proportionalität zwischen der Intensität der Gingivitis (verifiziert durch den PBI nach MÜHLEMANN und SON) und der Plaquemenge (verifiziert durch QUIGLEY und HEIN) und der Gesamtmenge an aus den Drüsengängen sezernierten s-IgA hergestellt werden (SCHENCK ET AL., 1993). Während der 14-tägigen Studiendauer fand keine longitudinale Veränderung der Konzentration an sekretorischem IgA sowohl der Parotis als auch den Glandulae submandibularis/-lingualis statt.

Da die Speichelsekretion und IgA-Produktion unterschiedlichen Regelkreisen unterworfen sind, wurde von einigen Autoren empfohlen, die **IgA-Sekretionsrate** zu berücksichtigen, welche eine detailliertere Auskunft über die sezernierte IgA-Menge

in Verbindung mit der aktuellen Speichelproduktion gibt (MYINT ET AL., 1997). Eine große Menge Speichel mit geringer IgA-Konzentration kann möglicherweise mehr IgA zur Verfügung stellen als eine kleine Menge Speichel mit einer hohen Konzentration an IgA. Im Vergleich zur Studie von LIE ET AL. (hier liegen die Medianwerte der Sekretionsraten für IgA-Gesamt im stimulierten Parotisspeichel bei 30 µg/min – 60 µg/min) weist vorliegende Versuchsreihe etwa doppelt so hohe Werte auf (55 µg/min – 100 µg/min), was mit der Antigenbelastung zu Beginn der Studie zusammenhängen könnte. In der Studie von LIE ET AL. erhielten alle Probanden am ersten Versuchstag eine professionelle Zahnreinigung. Eine andere Erklärung wären Unterschiede in den verwendeten Standardisierungsmaterialien. In der vorliegenden Studie wurden Kalibratoren mit durch Referenzlabors bestimmten Konzentrationen von monomerem IgA verwendet. Die Kalibrierung erfolgte damit auf die Menge des monomeren IgAs; gegenüber einer Kalibrierung auf dimeres s-IgA ergeben sich daher um den Faktor zwei höhere Werte.

Im Versuchsverlauf vorliegender Studie zeigte sich 6 und 12 Tage nach Aussetzen der Mundhygienemaßnahmen ein signifikanter Anstieg der Sekretionsrate bei stimuliertem Speichel der Parotis. Dieser Unterschied zwischen den Resultaten der Glandula parotidea/Glandulae submandibularis/-lingualis könnte einerseits mit der diffizileren und somit fehleranfälligeren Sammelmethode des Submandibularis/-lingualispeichels, andererseits mit der anatomischen Lagebeziehung zwischen dem Ausführungsgang (und generell dem Drüsengewebe) der Glandula parotidea und der Plaqueansammlung auf der Oberfläche der Molaren erklärt werden (enger Kontakt zwischen Antigenansammlung und immunologisch aktivem Gewebe). So zeigten Studien, dass die Glandula parotidea einseitig lokal durch Antigenkontakt stimuliert werden kann (EMMINGS ET AL., 1975).

Die Ergebnisse dieser Studie stehen in Widerspruch zu den Daten der Studien von LIE ET AL., in der keine Steigerung der Sekretion des s-IgA während des Versuchsverlaufs im stimulierten Speichel der Parotis festzustellen war (LIE ET AL., 2002). Das Modell der immunologischen Toleranz könnte diese Differenzen erklären:

**Immunologische Toleranz** bezeichnet das Unvermögen, mit einer Immunantwort auf Epitope zu reagieren, auf die ein Individuum potentiell ansprechen könnte. In Bezug auf die Antigen dosis zeigt sich, dass niedrige Antigenkonzentrationen über einen längeren Zeitraum und sehr hohe Dosen an Antigenen Toleranz induzieren.

Man spricht von „Low-zone“- und „High-zone“-Toleranz, wobei die „Low-zone“-Toleranz nur die T-Lymphozyten, die „High-zone“-Toleranz sowohl T- als auch B-Lymphozyten betrifft. Die Toleranz der T-Zellen ist von wesentlich längerer Dauer (mehrere Monate) als die der B-Zellen (einige Wochen), was wahrscheinlich mit der schnelleren Erneuerung der B-Lymphozyten erklärt werden kann (KLEIN, 1991). Wird das Vorhandensein des „Tolerogens“ aufgehoben, gewinnt der betroffene Organismus langsam die Fähigkeit zurück, auf das Antigen zu reagieren.

MCPHERSON ET AL. konnten in Studien am Intestinaltrakt zeigen, dass zur initialen Aktivierung der Antikörperproduktion nur eine minimale Menge an Antigen notwendig ist – wird diese Menge quantitativ überschritten, findet eine generelle Hemmung („High-zone“-Toleranz) der Antikörperproduktion in Bezug auf dieses Antigen statt (MCPHERSON ET AL., 2000, 2001).

Da in der Studie von LIE ET AL. keine Angaben zum Stand der Mundhygiene vor Beginn des mundhygienefreien Intervalls gemacht werden (am ersten Versuchstag erhielt jeder Proband eine professionelle Zahnreinigung), könnte bei einem großen Teil der Probanden eine generell vernachlässigte Mundhygiene vorgelegen haben. Möglicherweise befand sich das sekretorische Immunsystem dieser Probanden generell in einem „toleranten“ Zustand (erhöhte Antigenbelastung durch vernachlässigte Mundhygiene). Die Reduktion der Keimzahl mittels professioneller Zahnreinigung zu Studienbeginn könnte zur Aufhebung des toleranten Zustandes zu kurz gewesen sein.

Die Ergebnisse der Studien über die Reaktionsfähigkeit des sekretorischen Immunsystems von ZINKERNAGEL weisen in die gleiche Richtung: Die Reaktion des sekretorischen Immunsystems hängt von der Dosis, der Lokalisation und dem Zeitpunkt der Applikation ab.

- ◆ Antigene, die das lymphatische Gewebe der Speicheldrüsen nicht in ausreichend hoher (also subimmunogener) Dosis und für einen ausreichend langen Zeitraum erreichen, werden immunologisch ignoriert – „**Low-zone“-Toleranz**, s.o.;
- ◆ Antigene, die in sehr hohen Dosen und mit einer sehr langen Verweildauer auf das lymphatische Gewebe treffen, wirken hemmend auf die Reaktion der T-Zellen. Es findet eine immunologische Desensibilisierung bezüglich der zugeführten Anti-

gene statt, die eine vermehrte Antikörperproduktion verhindert – „**High-zone**“-**Toleranz**, s.o. (ZINKERNAGEL, 2000) (Abbildung 4.1).

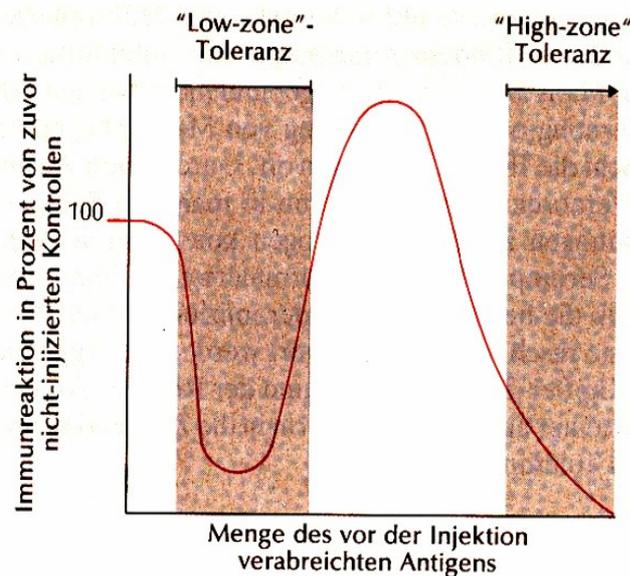


Abbildung 4.1: Einfluss der Antigendosis auf die Induktion von Toleranz (KLEIN, 1991)

### Ergebnisse – spezifische Antikörper

Die Schutzfunktion der Immunglobuline wird auf ihre spezifische Antigen-Bindung zurückgeführt. Für eine Untersuchung der vermuteten s-IgA-Schutzfunktion ist daher die Bestimmung der spezifischen Antikörpertiter von großer Bedeutung. Die Effektivität des sekretorischen Immunsystems hängt entscheidend von der Konzentration des spezifischen IgA ab (STONE ET AL., 1987).

Die mikrobielle Zahnplaque stellt eine Aggregation verschiedenster Bakterien dar. Auf einer gereinigten Zahnoberfläche siedeln sich zunächst grampositive Bakterien-spezies an. Nach etwa zwei Tagen vollzieht sich ein Übergang von einer ausschließlich grampositiven zu einer komplexen bakteriellen Mischflora mit großen Anteilen gramnegativer Organismen (THEILADE & MIKKELSEN, 1982).

In vorliegender Studie fand ein signifikanter Anstieg der Konzentrationen der spezifischen Antikörper, angegeben als spezifische s-IgA-Konzentration, gegen Zell-homogenate der parodontalpathogenen Keime *Porphyromonas gingivalis* und *Treponema denticola* zwei bzw. vier Tage nach Aussetzen der häuslichen Mundhygienemaßnahmen statt. Dieses Ergebnis lässt auf eine direkte Reaktion des sekre-

torischen Immunsystems schließen. Studien an Affen zeigten, dass *Porphyromonas gingivalis* in vivo die Sekretion von spezifischem IgA induziert (BLANCHARD ET AL., 1991) und zu einer spezifischen Aktivierung von B-Lymphozyten in der Lage ist (GEMMELL & SEYMOUR, 1992; LINDEMANN ET AL., 1996).

Die vorliegenden Ergebnisse stehen im Widerspruch zu der Untersuchung von LIE ET AL., in der kein signifikanter Anstieg der spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnte.

Den Konzentrationsanstieg in vorliegender Studie gegen oben genannte gramnegative Spezies könnte möglicherweise mit dem sog. Booster-Effekt, auch immunologische Sekundärantwort genannt, erklärt werden. Dieser beschreibt die Aktivierung von durch einen vormaligen (primären) Antigenkontakt aktivierten B-Lymphozyten (Gedächtniszellen/ memory cells). Die Immunantwort auf diese wiederholte Aktivierung fällt, im Vergleich zum Antigen-Erstkontakt, schneller und mit einer höheren Konzentration an betreffenden Antikörpern aus (KLEIN, 1991).

Aufgrund der guten bzw. sehr guten Mundhygiene der Probanden vor Versuchsbeginn (der bei den Probanden in der Studie von LIE ET AL. möglicherweise nicht vorlag) könnte in Bezug auf erwähnte gramnegative Bakterien von einer Sekundärkonfrontation und -antwort ausgegangen werden. Die hervorgerufene Sekundärantwort könnte, im Gegensatz zu oben erwähnten Immunisierungsstudien, als „natürliches Boostern“ bezeichnet werden. Unter diesem Aspekt dürfte bei den Probanden der vorliegenden Studie keine immunologische Toleranz im Bezug auf diese Keime vorgelegen haben.

Die Probanden der vorliegenden Studie zeigten zu Versuchsbeginn allgemein niedrige Werte der Mundhygieneindizes PBI und QH, wobei davon ausgegangen werden kann, dass dieser Zustand generell die häusliche Mundhygiene des Einzelnen widerspiegelte.

Trotz kurzfristiger Erhöhung der spezifischen Antikörper gegen die o.g. gramnegativen Bakterien und Ansteigen der Werte der Sekretionsrate, konnte in vorliegender Studie keine effektive und länger anhaltende Immunantwort durch die natürlich anwachsende Plaquemenge hervorgerufen werden.

Verschiedene andere Immunisierungsstudien am Menschen (KRASSE ET AL., 1978; COLE ET AL., 1984) brachten ebenfalls widersprüchliche Ergebnisse, obwohl bei ihnen im Unterschied zu der in der vorliegenden Studie praktizierten „natürlichen“ Stimulation des sekretorischen Immunsystems das Antigen extern appliziert wurde, und damit sowohl der Applikationsort als auch die Dosis des Antigens quantifizierbar waren. Eine Immunantwort hätte somit erwartungsgemäß eindeutiger ausfallen müssen. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung und ihr Vergleich mit früheren Ergebnissen zur Induktion von spezifischem s-IgA zeigen deutlich, dass die in den letzten Jahrzehnten zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse durch die modernen immunologischen Konzepte der „Low-/High-zone“-Toleranz erklärt werden können. In nachfolgenden Untersuchungen muss daher wesentliches Gewicht auf die Bestimmung der Antigen-Exposition und damit auch auf eine Quantifizierung der immunologischen Toleranz gelegt werden. Weiterhin erhebt sich die Frage, welche weiteren Schutzfaktoren insbesondere bei Vorliegen einer Immuntoleranz den Organismus lokal wie systemisch vor Oralpathogenen schützen.