

Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der
Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. h.c.(UMF Temeschburg) H.-H. Horch)

**Verteilung und prognostische Bedeutung von
uPA und PAI-1 bei der Parodontitis**

Rudolf Theiß

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Zahnheilkunde
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H. Deppe

2. Univ.-Prof. Dr. M. Schmitt

Die Dissertation wurde am 13.03.2006 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 19.07.2006
angenommen.

Meiner Ehefrau Andrea Katrin und unserer
Tochter Elisabeth Sara Theiß gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
 - 1.1. Parodontium
 - 1.2. Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA)
 - 1.3. Plasminogeninhibitor (PAI-1)
 - 1.4. Ziel der Untersuchung
2. Patienten, Material und Methoden
 - 2.1. Patienten
 - 2.1.1. Patientenkollektiv
 - 2.1.2. Patientenalter und Geschlecht
 - 2.2. Material
 - 2.2.1. Gewebeentnahme
 - 2.2.2. Gewebeaufbereitung
 - 2.2.2.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien
 - 2.2.2.2. Vorgehensweise
 - 2.3. Methoden
 - 2.3.1. Elisa
 - 2.3.1.1. Prinzip des Elisa-Tests
 - 2.3.1.2. Elisa-Test zur Bestimmung der uPA-Konzentration
 - 2.3.1.2.1. Material
 - 2.3.1.2.2. Methode
 - 2.3.1.3. Elisa-Test zur Bestimmung der PAI-1-Konzentration
 - 2.3.2. Proteingehalt
 - 2.3.2.1. Zweck der Bestimmung

- 2.3.2.2. Durchführung der Proteinbestimmung
 - 2.3.2.2.1. Material
 - 2.3.2.2.2. Methode
- 2.4. Statistische Analyse
- 3. Ergebnisse
 - 3.1. Verteilung von uPA und PAI-1 in gesunder Mundschleimhaut und in entzündeter Mundschleimhaut
 - 3.1.1. uPA- Verteilung im gesamten Patientenkollektiv
 - 3.1.2. PAI-1- Verteilung im gesamten Patientenkollektiv
 - 3.1.3. uPA- und PAI-1-Werte des selben Patienten
 - 3.2. uPA und PAI-1 in Bezug zum Geschlecht
 - 3.2.1. Vergleich der Werte zwischen den Geschlechter
 - 3.2.2. Vergleich der Werte innerhalb der Geschlechter
 - 3.3. uPA und PAI-1 im Vergleich zum Patientenalter
 - 3.4. Vergleich von uPA und PAI-1 des selben Patienten
- 4. Diskussion
- 5. Zusammenfassung
- 6. Literaturverzeichnis
- 7. Anhang
 - 7.1. Abkürzungen
 - 7.2. Tabellenverzeichnis
 - 7.3. Abbildungsverzeichnis
 - 7.4. Formeln
- 8. Lebenslauf
- 9. Danksagung

1. Einleitung

1.1 Parodontium

Die Gingiva, das Desmodont, der Alveolarknochen und das Wurzelzement bilden das Parodontium. Die Gingiva besteht aus einem mehrschichtigen, verhornendem Plattenepithel und enthält viele kollagene Fasern [7, S.2]. Sie liegt außen am Alveolarknochen, dem zahntragenden Teil des Kiefers, an.

Den Spalt zwischen Wurzeloberfläche und Alveolarknochen füllt das Desmodont aus. Es ist etwa 0,25 mm breit, und wird im Alter dünner [10, S.305]. Im gut durchbluteten Bindegewebe befinden sich die Parodontalfasern, die den Zahn beweglich in der Alveole befestigen [10, S.9]. Der Zahn selbst ist an der Wurzeloberfläche durch Wurzelzement geschützt, der in seiner Struktur und Härte dem menschlichen Knochen ähnelt, aber nicht vaskularisiert ist.

Zu den Hauptaufgaben des Parodontiums zählen die Verankerung des Zahnes, die Dämpfung der Kaukräfte, die Abwehr äußerer Noxen und die Trennung zwischen Zahnwurzel und Mundhöhle [10, S.299].

Die Parodontitis, eine bakterielle Entzündung des Parodontiums mit Verlust von Stützgewebe und möglichen systemischen Auswirkungen, spielt eine immer größere Rolle. Obwohl die Menschen immer älter werden, tritt die Bedeutung der Karies in den Hintergrund, weil sie immer effektiver bekämpft wird. Dies gelingt mit:

1. der individuellen Prophylaxe
2. den Fluoriden
3. der professionellen Zahnreinigung von Seiten des Praxispersonals

4. der erleichterten und verbesserten Zahnreinigung für die Patienten (elektrische Zahnbürsten, spezielle Zahnseiden)
5. neuen Behandlungsmethoden (z.B. die minimalinvasive Füllungstherapie)
6. effektive Aufklärung.

Darüber hinaus gelingt es oft mit Hilfe der Endodontologie sogar abgestorbene Zähne im Mund zu erhalten, so dass sie ihre Funktion weiter erfüllen. Falls ein Zahn trotz aller Bemühungen nicht erhaltungswürdig ist, kann mit Hilfe von Implantaten oder Brücken die Lücke funktionell und ästhetisch versorgt werden. Dadurch haben die Menschen die Möglichkeit eine gute Kaufunktion bis ins hohe Alter zu behalten.

Diese neuen bzw. deutlich verbesserten Möglichkeiten der Zahnpflege, -reparatur und -erhaltung haben aber nur einen geringen Nutzen, wenn die Zähne in einem erkranktem Parodontium ihre Stabilität verlieren und eventuell herausfallen.

Immer erfolgreicher versucht man deshalb heute durch gute Aufklärung und intensive Prophylaxe dem vorzubeugen. Falls eine Entzündung des Parodontiums bereits vorhanden ist, wird diese durch eine entsprechende Behandlung bekämpft.

Diese Parodontitisbehandlung, die das Langzeitziel „Erhaltung der parodontalen Gesundheit“ hat, verläuft in vier Phasen:

1. In der ersten werden die Patienten angeleitet, ihre Mundhygiene zu verbessern. Dies erreicht man durch Information, Motivation, Instruktion, Kontrolle und eine professionelle Zahnreinigung. Parallel dazu werden eventuelle kariöse Läsionen versorgt und nicht erhaltungswürdige Zähne entfernt. Falls Zahnlücken vorhanden sind, werden diese provisorisch versorgt. Die erste Phase endet mit dem Scaling und der Wurzelglättung. Das Sofortziel ist eine saubere, glatte und harte Oberfläche ohne unnötigen Zahnhartsubstanzverlust [26, S.144].

2. In der nächsten Phase wird, wenn nötig, die Parodontalchirurgie durchgeführt, mit dem Ziel die Effizienz des subgingivalen Scalings und der Wurzelglättung zu erhöhen, die Reinigungsmöglichkeit für den Patienten zu erleichtern, sowie die Entzündung zu beseitigen und eine ästhetische Verbesserung zu erreichen [19, S.12].
3. Wenn die parodontale Gesundheit ausreichend hergestellt ist, wird in der dritten Phase die endgültige Versorgung in Form von Kronen, Brücken, Implantaten und/oder herausnehmbarem Zahnersatz eingegliedert.
4. Die letzte Phase, die Erhaltungstherapie, hat zum Ziel die parodontale Gesundheit durch regelmäßige Kontrollen, durch Motivation des Patienten und eventuell durch professionelle Zahnreinigung langfristig zu erhalten.

Obwohl dieses System der Parodontitisbehandlung weit entwickelt und hochspezifisch ist, gibt es immer wieder Patienten, wie z.B. mit der sogenannten refraktären Parodontitis, bei denen es bis heute auch ohne erkennbaren Grund nicht gelingt, die Entzündung und damit den Knochenverlust zu stoppen.

Aufgrund des Tatbestandes, dass es Patienten gibt, bei denen ohne erkennbaren Grund die Behandlung scheitert, ist es wichtig, die Parodontitis, oder das Risiko sie zu bekommen, frühzeitig zu erkennen und dem entgegenzuwirken. Da die Wissenschaft sich darüber hinaus einig ist, dass die Erkrankung des Parodontiums zu den am weitesten verbreiteten Erkrankungen überhaupt zählt [11, S.46], ist es das Ziel dieser Dissertation, zu untersuchen, ob die Konzentration der Enzyme uPA und PAI-1 im parodontal entzündetem Gewebe erhöht ist.

Diese zwei Enzyme werden bereits als Marker bei z.B. Tumoren verwendet [28, S.388; 18, S. 727]. Außerdem sind sie bei Abbauvorgängen des Körpers [24, S.59], wie es auch bei der Parodontitis der Fall ist, beteiligt. So soll mit dieser Arbeit der erste Schritt getan werden, um

einen Marker zu finden, der bei der Beurteilung, der Behandlung und eventuell der Vermeidung der Parodontitis hilft.

1.2. Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA)

Der Proteinumsatz im menschlichen Organismus bei Auf- und Abbau oder Umstrukturierung von Gewebe beträgt ca. 300g in 24h [17, S.284].

Der Aufnahme und Synthese der Proteine nach dem jeweiligen genetischen Code steht dabei die extra- und intrazelluläre Proteolyse durch Proteasen gegenüber. Den jeweiligen Bedürfnissen entsprechend wird dieser Vorgang durch wenig bekannte Mechanismen sehr genau reguliert [17, S.284]. Dabei kann eine Protease in mehreren Bereichen aktiv werden. So ist Plasmin, ein proteolytisch wirksames Enzym [1, S.414] sowohl bei der Embryonalentwicklung oder dem Eisprung [16, S.33], als auch der Zellmigration [16,S.33] oder der Tumormetastasierung [15, S.376] bzw. –invasion [5, S.441] beteiligt. Plasmin wird wiederum aus Plasminogen, der in der Leber synthetisierten inaktiven Vorstufe (MG 91000) [25, S.1202], durch Plasminogenaktivatoren, wie z.B. der Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA), aktiviert.

Im Urin konnte uPA zuerst 1951 nachgewiesen werden [6, S.144]. Dies kann man auch noch an der Bezeichnung „Urokinase“ erkennen, auch wenn mittlerweile uPA aus diversen anderen Zellen isoliert werden konnte.

UPA wird von den Tubuluszellen der Niere, aber auch in den Zellen des Duktus deferens der Blase, Epithelien der Brustdrüse, Granulozyten, Makrophagen, Monozyten, Pneumozyten, Fibroblasten und Keratinozyten [3, S.13] in Form von Pro-uPA sezerniert. Die proteolytische inaktive Vorstufe Pro-uPA, codiert auf Chromosom 10 [2, S.6], besteht aus 411 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 48 kDa [24, S.59].

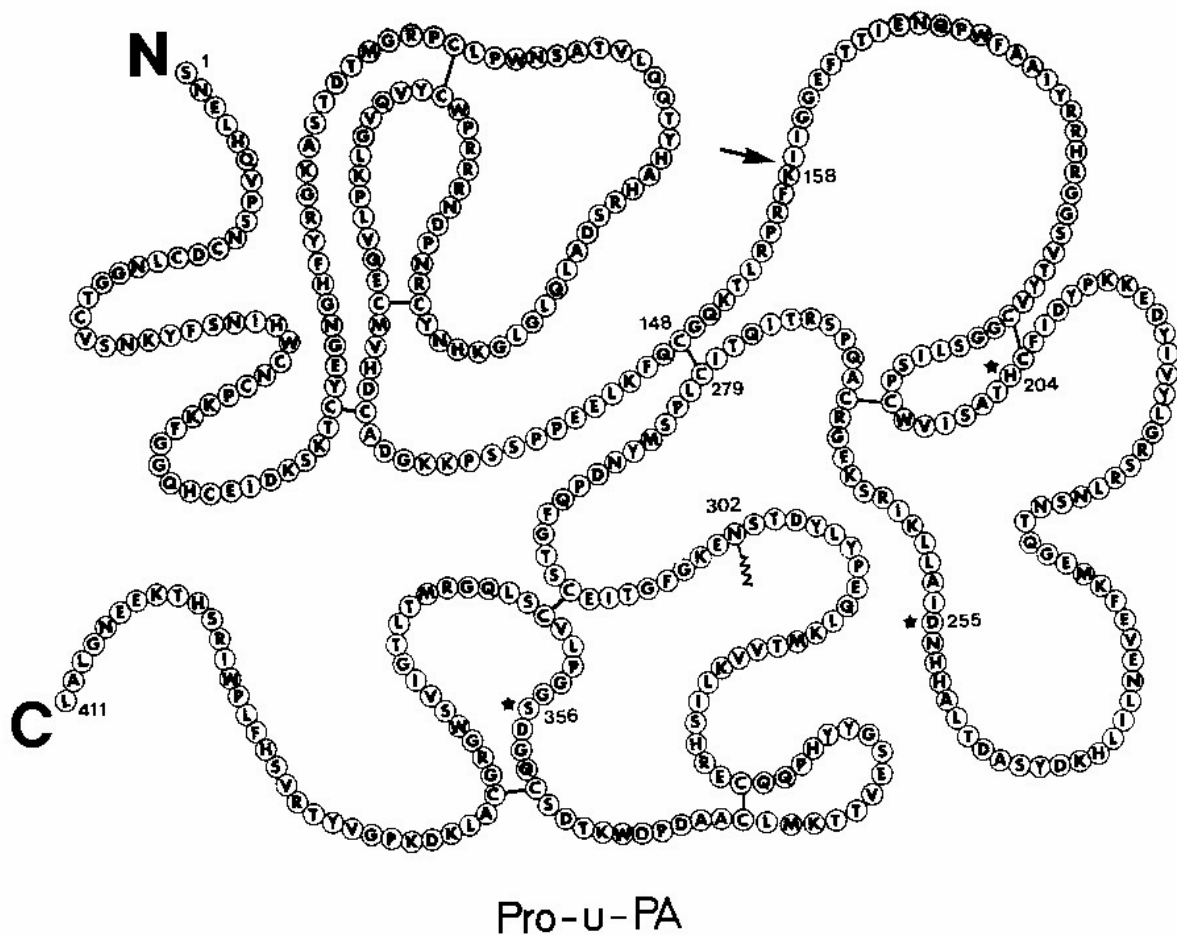


Abbildung 1: Die Sekundärstruktur des Pro-uPA [6, S. 144]

Für die erste aktivierte Form von uPA, dem HMW-uPA (high molecular weight uPA) wird Pro-uPA durch Plasmin und andere Enzyme wie z.B. Kathepsin B und L oder Kallikrein aktiviert, indem die Peptidbindung Lys¹⁵⁸ bis Ile¹⁵⁹ gespalten wird [27, S.131].

HMW-uPA besteht aus 2 Peptidketten (A und B), die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind.

Durch die weitere Spaltung von HMW-uPA zwischen den Aminosäuren 135 und 136 entsteht die zweite aktivierte Form, das LMW-uPA (Low molecular weight uPA), und als Abspaltungsprodukt das inaktive ATF (Aminoternale Fragment).

1.3. Plasminogenaktivator Inhibitor

Zur Steuerung der Aktivität von uPA trägt der Plasminogenaktivator-Inhibitor PAI-1 bei.

Dieser bildet nur mit aktivem uPA, nicht aber mit inaktivem Pro-uPA, einen Komplex und reguliert dadurch direkt den Einfluß von uPA auf das Gesamtsystem.

PAI-1 wurde erstmals 1984 bei Patienten mit Mammakarzinom oder Dickdarmkarzinom nachgewiesen [12, S.2]. Sein Gen befindet sich auf dem Chromosom 7. Das Vorläuferprotein besteht aus 402 Aminosäuren, das aktive Protein hat 379 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa [2, S.9].

PAI-1 erfüllt im Körper unterschiedliche Funktionen. Bei Patienten mit verminderter PAI-1-Aktivität ist eine erhöhte Blutungsneigung selbst bei geringsten Verletzungen zu finden [2, S.10]. Die PAI-1-Sezernierung wird von Metastasen im menschlichen Organismus genutzt, um sich im neuen Gewebe festzusetzen [14, S.25]. Außerdem wird die PAI-1-Konzentration bei Magen-Karzinomen als Prognosefaktor angesehen [14, S.26; 21, S.2900].

1.4. Ziel der Untersuchung

Zu Beginn einer Parodontitisbehandlung ist es sehr schwer abzuschätzen, ob es sich um eine aggressive oder chronische Parodontitis handelt. Diese Einschätzung ist aber maßgeblich für die Wahl der Behandlung (Einsatz von Antibiotika) bzw. deren Erfolg ausschlaggebend. Die bisher vorhandenen Mittel der genaueren Bestimmung der Aggressivität sind langwierig oder teuer, und damit nur begrenzt einsetzbar. Deshalb wäre eine Methode hilfreich die diese Einschätzung erleichtert.

Bei Tumoren, z.B. beim Mammacarcinom, hat sich schon herausgestellt, dass uPA und PAI-1 als Prognosefaktoren geeignet sind [28, S.388 und S.396; 5, S.441; 18, S.727 und S.729].

Neben dem Vorkommen bei Tumoren treten uPA und PAI-1 aber auch bei

Entzündungsvorgängen [24, S.59] und verstärkten Blutungen – und das sind wesentliche Merkmale der Parodontitis [7, S.5-6]- in Erscheinung.

Also liegt es nahe, zu untersuchen, ob uPA und PAI-1 nicht auch hier zur Abschätzung der Prognose verwendbar sind. Daher muss untersucht werden, ob uPA und PAI-1 in erhöhter Konzentration in parodontalem Granulationsgewebe vorkommen.

Dazu vergleicht die vorliegende Arbeit die Konzentration in Granulationsgewebe erkrankter Parodontien mit der in gesunder Gingiva.

In weiteren Untersuchungen soll geklärt werden, in wieweit eine erhöhte Konzentration zur Ausbildung einer Parodontitis beiträgt, und ob eine Beeinflussung dieser Faktoren bei der Heilung der Parodontitis helfen kann.

2. Patienten, Material und Methoden

2.1. Patienten

2.1.1. Patientenkollektiv

In der Zeit von März 2001 bis März 2004 wurden 58 Gewebeproben von 51 Patienten entnommen. Der Hauptteil der Proben stammt von Patienten, die in der Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie des Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München (Direktor: Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. H. H. Horch) behandelt wurden. Außerdem wurden Proben in der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Ludwigs-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. R. Hickel) und in den Praxen von Dr. Neumann, Dr. Gillich und Dr. Black gesammelt.

Dem Ziel der Untersuchung entsprechend, wurden Gewebeproben aus Arealen mit der klinischen Diagnose einer Parodontitis marginalis profunda entnommen. Als Vergleichsmaterial wurden Proben gesunder Gingiva gewonnen.

2.1.2. Patientenalter und Geschlecht

Bei den Patienten, die an der Studie teilnahmen, handelte es sich um 26 Frauen (44,8%) und 32 (55,2 %) Männern im Alter zwischen 7 und 73 Jahren (Medianwert 52 Jahre).

2.2. Material

2.2.1. Gewebeentnahme

Um eine unnötige Belastung der Patienten zu vermeiden, wurden nur Proben von dem im Rahmen der regulären Behandlung ohnehin zu entfernendem Gewebe genommen. Über dieses Vorgehen wurden die Patienten aufgeklärt und ihr Einverständnis wurde eingeholt. Das zu untersuchende Granulationsgewebe wurde von Patienten mit einer Parodontitis marginalis profunda im Rahmen einer chirurgischen Parodontistherapie oder bei Zahnextraktionen entnommen.

Die für diese Untersuchung benötigte gesunde Gingiva stammt ebenfalls von Parodontitisbehandlungen, bei denen Zahnfleischlappen ausmodelliert wurden, von Extraktionen, Implantatfreilegungen oder anderen Operationen (z.B. eine Schlotterkammexzision).

Beide Gewebearten wurden bis zur weiteren Analyse in nummerierten, unsterilen Kryoröhrchen (Nalgene, Wiesbaden, New York; Bestell-Nr. 5011-0012) verschlossen und am Tage der entnahme in flüssigem Stickstoff bei -180° in der Frauenklinik und Poliklinik der Technischen Universität München (Direktor Univ.-Prof. Dr. M. Kiechle) tiefgefroren.

2.2.2. Gewebeaufbereitung

2.2.2.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Dismembrator (Braun-Melsungen, Deutschland) mit Teflonkapsel und

Stahlkugel

Flüssiges N₂ im N₂-Tank

Kryoröhrchen (Cryovials 1,2 ml Nalgene Nr. 5011-0012)

TBS-Stammlösung:

24,2 g Tris-Base (Trishydroxymethylaminomethan; Sigma, München) werden mit destilliertem Wasser auf 900 ml aufgefüllt und mit HCl auf pH 8,5 eingestellt.

Anschließend werden 73,05g NaCl dazugegeben und das Gesamtvolumen auf 1 l aufgefüllt. Die Lösung wird bei 4 Grad Celsius gelagert.

TBS-Gebrauchslösung:

Um die Gebrauchslösung zu erhalten, werden 100 ml TBS-Stammlösung mit 900 ml destilliertem Wasser vermischt. Anschließend wird ein pH-Wert von 8,5 kontrolliert bzw. eingestellt.

TBS mit 10% TritonX:

10g Triton X-100 (Sigma, München) wird in 100 ml TBS-Gebrauchslösung unter leichtem Erwärmen (ca. 40° C) vollständig gelöst und anschließend im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

2.2.2.2. Vorgehensweise

Die tiefgefrorenen Proben wurden aus den Kryoröhrchen entnommen, gewogen und dokumentiert.

Anschließend wurden sie einzeln in den vorgekühlten Teflonbehälter des Dismembrators, in dem sich eine ebenfalls vorgekühlte Stahlkugel befindet, überführt und in die Halterung des Dismembrators eingespannt. Je nach Größe der Gewebeprobe wurde diese 10 – 40 s auf maximaler Stärke pulverisiert. Mit einem gekühltem Spatel wurde die Probe mit kaltem TBS-Pulver gemischt. Im Anschluß wurde 10%- Triton X zugegeben. Triton X lagert sich in der Zellmembran ein und löst diese unspezifisch auf. Dazu wurden die Proben im Kühlschrank bei 4 Grad Celsius für 12 Stunden unter leichtem Schütteln aufbewahrt.

Danach wurde die Gewebesuspension eine Stunde bei 4 Grad Celsius und einer Umdrehungszahl von 100.000 g zentrifugiert.

Der klare Überstand wurde abpipettiert und erneut im Stickstofftank gelagert.

Die Mengen der TBS-Gebrauchslösung und des TritronX wurden anhand des Probengewichts aus der nachfolgenden Tabelle entnommen.

Gewicht des Gewebes in mg	TBS-Gebrauchslösung (ml)	10% Triton X in μ l
≤ 300	2 X 0,90	2 X 100
280 – 300	2 X 0,85	2 X 94
260 – 280	2 X 0,80	2 X 89
240 – 260	2 X 0,75	2 X 83
220 – 240	2 X 0,70	2 X 78
200 – 220	2 X 0,65	2 X 72
180 – 200	2 X 0,60	2 X 67
160 – 180	2 X 0,55	2 X 61
140 – 160	1 X 0,90	100
120 – 140	1 X 0,80	89
100 – 120	1 X 0,70	78
50 – 100	1 X 0,50	56
≤ 50	1 X 0,30	34

Tabelle1: Mengen-Gewicht-Relation zum Gewebeaufschluß nach Herstellerangaben

2.3. Methoden

2.3.1. Elisa

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Konzentration von uPA und PAI-1, in den abpipetierten Flüssigkeiten, mit Hilfe des Elisa-Tests bestimmt.

2.3.1.1. Prinzip des Elisa-Tests

Der Enzymgekoppelte Immunabsorptionstest (**Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay**) kann zur spezifischen Bestimmung von Proteinen, z.B. Aids-Antikörper, eingesetzt werden. Dabei basiert er immer auf folgendem Prinzip: Der Elisa-Test benutzt eine spezifische Erkennungsreaktion zwischen Antigen und Antikörper und verbindet diese in mehreren Schritten, dem sogenannten „Sandwich-Verfahren“, mit einer enzymgesteuerten Farbreaktion. Als erster Schritt wird dazu die Probe mit dem zu bestimmenden Antigen (z.B. uPA; PAI-1) auf ein Trägermaterial, auf dem entsprechende Antikörper fixiert sind, aufgetragen. Diese verbinden sich zu einem mit der Trägerplatte fest verbundenem Antikörper-Antigen-Komplex.

Nach einer Spülung zur Entfernung der Probenreste wird in einem zweiten Schritt in Form einer Lösung der gleiche Antikörper, der das Antigen an der Trägerplatte fixiert, hinzugegeben. Dieses Mal ist an dem Antikörper ein Enzym gekoppelt, das im dritten Schritt zur Einfärbung der Probe beiträgt. Nach diesem Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex ist die Sandwichmethode benannt.

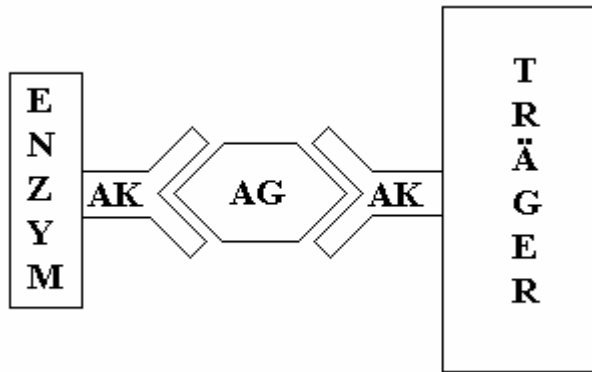


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexes

Um zu verhindern, dass alle Enzyme zur Einfärbung beitragen, muß die Platte nun ein weiteres Mal gespült werden. Danach fügt man eine Farbstoff-Vorstufe hinzu, die vom Enzym in einen Farbstoff umgewandelt wird.

Die Stärke der Verfärbung wird photometrisch bestimmt und mit den Standards bekannter Konzentrationen verglichen. So kann die Konzentration des Antigens in der untersuchten Probe bestimmt werden.

2.3.1.2. ELISA-Test zur Bestimmung der uPA-Konzentration

Bei dieser Untersuchung ist das zu bestimmende Antigen das uPA. Das verwendete Imubind uPA ELISA KIT (American diagnostica inc., Greenwich USA, Produkt-Nummer 894) misst freies, an den Inhibitor oder an den Rezeptor gebundenes uPA und auch die Vorstufen Pro-uPA und HMW-uPA.

Die untere Grenze dieser Messung beträgt 10 pg uPA/ml je Probe.

2.3.1.2.1. Material

Imubind uPA ELISA Kit (American diagnostica inc., Greenwich, USA, Product No. 894)

enthält:

- ◆ 6 X 16 Mikrotiterplatten mit uPA-Antikörpern
- ◆ 6 uPA-Standards in Standardfläschchen
- ◆ 2 Detection Antikörper (biotinylated anti-human uPA)
- ◆ 1 Enzyme Conjugate (Streptavidin-horseradish peroxidase 60 µl)
- ◆ 1 Enzyme Conjugate Diluent
- ◆ 1 Substrat TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine 11ml)
- ◆ 2 PBS-Puffer, pH 7,4

desweiteren werden benötigt:

- ◆ destilliertes Wasser
- ◆ 10-200 µl Pipetten
- ◆ 50-200 µl Mehrfachpipetten
- ◆ Mikrotiterplattenlesegerät (450 nm) (Titertek multiscan, ICN-Flow, Meckenheim, Deutschland)
- ◆ 0,5 N Schwefelsäure
- ◆ Rinderserum Albumin (BSA)
- ◆ TBS (Tris Buffered Saline) pH 8,5 (Sigma, München)

Vorbereitung der Reagenzien:

A. uPA-Standards

Es werden je 1,0 ml destilliertes Wasser in die Standardfläschchen 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 und 1,0 ng/ml gegeben.

In das Standardfläschchen mit der Aufschrift 0,0 ng/ml werden 2,0 ml destilliertes Wasser zugegeben. Die Fläschchen werden dann 3 Minuten vorsichtig gemischt, nicht geschüttelt.

B. Detection Antikörper

Es werden 5,5 ml destilliertes Wasser dem Detection Antikörper zugegeben und das Ganze 3 Minuten vorsichtig gemischt.

C. Enzyme Conjugate Diluent

Dem Enzym Conjugate Diluent werden 20 ml destilliertes Wasser zugegeben und gut gemischt.

D. Waschpuffer

1 PBS-Päckchen wird in 900 ml destilliertes Wasser gelöst. Dann werden 4 ml 25% Triton X-100 zugegeben. Anschließend wird das Ganze mit destilliertem Wasser auf insgesamt 1 l aufgefüllt und gut gemischt.

E. Probenpuffer

Es werden 1 mg BSA mit 100 ml Waschpuffer vermischt, so dass eine 1% Lösung entsteht. Der Probenpuffer wird verwendet, um die Gewebeproben zu verdünnen.

2.3.1.2.2. Methode

Um die Meßgenauigkeit zu erhöhen, werden jeweils Doppelbestimmungen, also zwei Messungen der gleichen Konzentration, durchgeführt. Für die weitere Auswertung wird dann der Mittelwert der beiden Messergebnisse genommen.

Die Gewebeproben werden in zwei unterschiedlichen Verdünnungen (1:20 und 1:100) untersucht. Alle Ergebnisse dieser beiden Verdünnungen werden getrennt in Bezug auf die entsprechenden Standardwerte verglichen. Die Verdünnung, bei der die Werte zwischen den Standardwerten liegen, ist genauer und wird für die weitere Auswertung herangezogen. Bei der Bestimmung der uPA-Konzentration war dies die 1:20-Verdünnung.

Die ersten beiden Vertiefungen der Mikrotiterplatte bleiben leer. In die folgenden werden der Reihe nach je 100 µl Standardproben (zur späteren photometrischen Bestimmung der Konzentrationen anhand der Eichkurve), Kontrollproben bekannter Konzentrationen (zur Kontrolle der Eichkurve) und die uPA Proben aus dem zu untersuchenden Gewebe auf die Mikrotiterplatten gegeben und zugedeckt über Nacht bei 4°C ruhen gelassen. Diese Zeit ist nötig, damit als erster Schritt der Antikörper-Antigen-Komplex entsteht.

Die Plattenbelegung wird im folgenden Schema verdeutlicht.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LW1	S4	T1	T3	T5	T7	T9	T11	T13	T15	T17	T19
B	LW2	S4	T1	T3	T5	T7	T9	T11	T13	T15	T17	T19
C	S1	S5	T1	T3	T5	T7	T9	T11	T13	T15	T17	T19
D	S1	S5	T1	T3	T5	T7	T9	T11	T13	T15	T17	T19
E	S2	S6	T2	T4	T6	T8	T10	T12	T14	T16	T18	T20
F	S2	S6	T2	T4	T6	T8	T10	T12	T14	T16	T18	T20
G	S3	PK	T2	T4	T6	T8	T10	T12	T14	T16	T18	T20
H	S3	PK	T2	T4	T6	T8	T10	T12	T14	T16	T18	T20

Abbildung 3: Plattenbelegung für den Elisa-Test (LW: Leerwert S: Standardprobe

PK: Kontrollprobe T: zu testende Gewebeprobe)

Am nächsten Tag werden die Platten 4 mal mit Waschpuffer abgespült, um alle Rückstände (andere Proteine, Blutplasma, Lösungsmittel, etc.) zu entfernen. Danach wird in jede Vertiefung 100 µl Detection-Antikörper zugegeben. Nach 1 Stunde zugedeckter Lagerung bei Raumtemperatur wird erneut 4 mal mit Waschpuffer gespült.

Nun werden 12 µl Enzyme Conjugate mit 12 ml Enzyme Conjugate Diluent gemischt und davon je 100 µl in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte gegeben. Abgedeckt wird sie wieder eine Stunde bei Raumtemperatur gelagert und dann erneut 4 Mal mit Waschpuffer abgespült. Jetzt wird je 100 µl Substrat (TMB) zugegeben, das bei der Reaktion mit dem bereits vorhandenem Enzyme Conjugate Diluent die Proben bläulich verfärbt. Nach 20 Minuten bei Raumtemperatur wird die Enzymreaktion durch Zugabe von je 50 µl 0,5-N-Schwefelsäure gestoppt. Die Farbe der Lösung schlägt durch die Änderung des pH-Wertes in gelb um. Innerhalb von 30 Minuten muß nun die photometrische Bestimmung mit einem Mikrotiterplattenlesegerät, das an einen Computer angeschlossen ist, bei einer Wellenlänge von 450 nm erfolgen.

Dabei führt das Computerprogramm (EIA-Programm, ICN-Flow, Meckenheim, Deutschland) mit Hilfe der Plattenbelegung und den Verdünnungswerten der Proben folgende Berechnungen durch:

Zuerst errechnet es den Mittelwert der Absorption der beiden am Anfang leer gelassenen Vertiefungen der Mikrotiterplatte (sogenannter Leerwert) und zieht ihn von den weiteren gemessenen Werten ab. Dies ist notwendig, da sowohl die Mikrotiterplatte selbst als auch die in den Vertiefungen befindlichen Lösungen einen Teil des Lichtes absorbieren. Durch die Subtraktion dieser Leerwerte erhält man die gesuchten Absorptionswerte.

Anschließend wird mit Hilfe der berechneten Werte der Standardproben, eingezeichnet in ein Diagramm, eine Eichkurve erstellt. Diese wird mit den Werten der Kontrollproben überprüft.

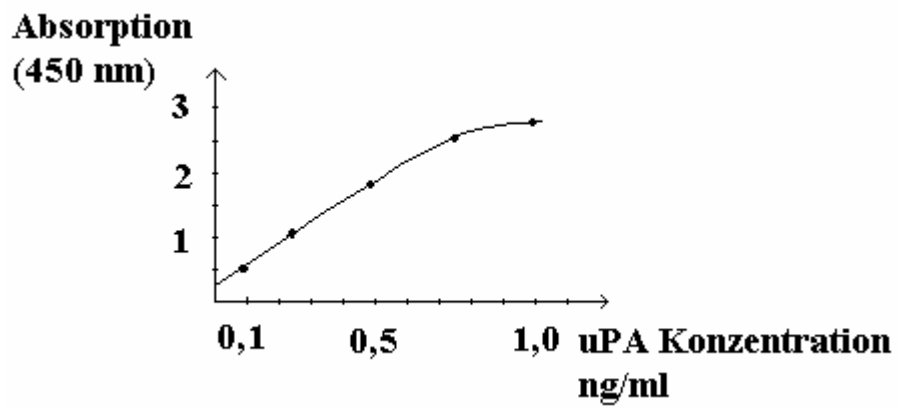


Abbildung 4: Eichkurve

Mit Hilfe dieses Diagramms und der gemessenen photometrischen Werte der unbekannt
Proben kann das Programm die Konzentrationen berechnen.

2.3.1.3. Elisa-Test zur Bestimmung der PAI-1-Konzentration

Die Vorgehensweise und die Auswertung entspricht dem oben beschriebenen uPA-Elisa-Test.

Bei der Messung mit dem Imubind Tissue PAI-1 ELISA Kit (Produkt-Nummer 821) von der American Diagnostica Inc., Greenwich USA, wird freies, aktives und inaktives PAI-1 und die PAI-1-Komplexe erfasst.

Die untere Grenze dieser Messung beträgt 50 pg PAI-1/ml Probe.

2.3.2. Proteingehalt

Neben der Messung von uPA und PAI-1 mit Hilfe des Elisa-Tests wird von jeder einzelnen Probe in einem ähnlichen Verfahren die Proteinkonzentration bestimmt.

2.3.2.1. Zweck der Bestimmung

Da die Proben unterschiedliche Größen und Gewichte haben und durch verschiedene Gewebsbestandteile, wie z.B. Blutserum, unterschiedlich stark verdünnt sind, können die schon ermittelten Konzentrationen sowohl von uPA als auch von PAI-1 nicht verglichen werden.

Ermittelt man aber den Proteingehalt sämtlicher Proben, kann man den Quotienten (Proteingehalt/Enzymkonzentration) der einzelnen Proben miteinander vergleichen.

2.3.2.2. Durchführung der Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgt nach einem ähnlichen, etwas kürzeren Verfahren, als der Elisa-Test, der bereits bei der uPA- und PAI- Bestimmung angewendet wurde.

2.3.2.2.1. Material

Für die Bestimmung des Proteingehalts der Proben wurde das BCA Protein Kit (Nummer 23225 KMS Labor St. Augustin) verwendet.

Verwendete Materialien:

- ◆ BCA Protein Kit von KMS Labor St. Augustin
enthält: Reagenz A, Reagenz B und Rinderserumalbumin (BSA 2 mg/ml)
- ◆ Triton X-100 von Sigma
- ◆ Precimat von Boehringer Mannheim 125601
- ◆ Tris (Trishydroxymethylaminomethan) von Merck 1.08382
- ◆ Mikrotiterplatten von Greiner 655001
- ◆ Pipetten
- ◆ Spektralphotometer (Filter bei 540 nm)

Vorbereitung der Reagenzien:

A. TBS-Stammlösung

24,2 g Tris werden auf 900 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt und der pH Wert mit HCl auf 8,5 eingestellt. Dazu kommen 73,05 g NaCl und das Volumen wird mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt. Der pH Wert wird überprüft und gegebenenfalls korrigiert.

Als Gebrauchslösung wird die Stammlösung 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt.

B. 0,1 % Triton X-100

1 g Triton X-100 wird mit 9 ml TBS-Gebrauchslösung gemischt.

Anschließend werden 10 µl dieser Lösung mit 990 µl TBS-Gebrauchslösung gemischt um 0,1 % Triton X-100 zu erhalten.

C. BSA- Standards (Standardverdünnungen)

400 µl BSA werden mit 400 µl 0,1 % Triton X-100 gemischt. Es entsteht eine BSA Konzentration von 1 mg Albumin/ml.

Durch weiteres Verdünnen dieser Lösung mit 0,1 % Triton X-100 nach folgendem Schema erhält man 9 verschiedene Standardlösungen.

Konzentration µl/ml	Standards	BSA 1mg/ml	0,1 % Triton X-100 in µl
20	St 1	10 µl	490
40	St 2	20 µl	480
60	St 3	30 µl	470
80	St 4	40 µl	460
100	St 5	50 µl	450
160	St 6	80 µl	420
240	St 7	120 µl	380
320	St 8	160 µl	340
400	St 9	200 µl	300

Tabelle 2: Mischungsverhältnis für die 9 Standardkonzentrationen

D. Kontrollproben-Lösungen

5 µl Precimat werden mit 995 µl 0,1 % Triton X-100 gemischt um eine Verdünnung 1:200 zu erhalten (K1).

Für die Kontrolllösung K2 werden 200 µl K1 mit 800 µl 0,1 % Triton X-100 gemischt.

Die Verdünnung beträgt 1:1000.

E. Reagenz AB

20 ml Reagenz A werden mit 400 µl Reagenz B gemischt

2.3.2.2.2. Methode

Wie bei den vorherigen Bestimmungen werden hier wieder unterschiedliche Konzentrationen der nach der Gewebsaufbereitung abpipetierten Flüssigkeit verwendet, um eine höhere Messgenauigkeit zu erreichen. Bei der Proteinbestimmung werden 50 µl mit 150 µl 0,1 % Triton X-100 gemischt, um eine Verdünnung von 1:31 zu erhalten.

Als nächstes wird die unbehandelte Mikrotiterplatte mit je 200 µl des entsprechend vorbereiteten Reagenz AB (s.u.) gefüllt. Dies entspricht dem bei den vorherigen Analysen bereits auf den Platten vorhandenen Antigen. Anschließend kommen entsprechend dem nachfolgenden Schema je 50 µl von den vorbereiteten Proben, 0,1 % Triton X-100 (Leerwert), Kontrollproben-Lösung oder die Standardverdünnungen auf die Mikrotiterplatte.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LW	LW	St 4	St 8	P 1	P 5	P 9	P 13	P 17	P 21	P 25	P 29
B	LW	LW	St 4	St 8	P 1	P 5	P 9	P 13	P 17	P 21	P 25	P 29
C	LW	St 1	St 5	St 9	P 2	P 6	P 10	P 14	P 18	P 22	P 26	P 30
D	LW	St 1	St 5	St 9	P 2	P 6	P 10	P 14	P 18	P 22	P 26	P 30
E	LW	St 2	St 6	K1	P 3	P 7	P 11	P 15	P 19	P 23	P 27	P 31
F	LW	St 2	St 6	K1	P 3	P 7	P 11	P 15	P 19	P 23	P 27	P 31
G	LW	St 3	St 7	K2	P 4	P 8	P 12	P 16	P 20	P 24	P 28	P 32
H	LW	St 3	St 7	K2	P 4	P 8	P 12	P 16	P 20	P 24	P 28	P 32

Tabelle 3: Plattenbelegung für die Proteinbestimmung

LW: Leerwert (200 µl Reagenz AB + 50 µl 0,1 % Triton X-100), St: Standardverdünnungen,

K: Kontrollproben, P: Proben

Die Messung wird auch hier in Doppelbestimmung durchgeführt, um die Fehlerquote gering zu halten.

Die Inkubationszeit bei Raumtemperatur beträgt 10 – 16 h. In dieser Zeit entsteht zwischen mindestens zwei Peptidbindungen und den aus dem Reagenz AB stammenden Kupferionen ein blavioletter Komplex. Anschließend wird die Farbintensität mit dem Spektralphotometer bei 540 nm gemessen.

Aus den gemessenen Standardwerten (nach Abzug der Leerwerte) erstellt der Computer ein Diagramm, in dem die gemessenen Werte deren tatsächlichen Konzentrationen zugeordnet werden. Dies wird mit Hilfe der Kontrollprobenwerte, deren Konzentrationen ebenfalls bekannt sind, überprüft. Jetzt errechnet er von den gemessenen Probenwerten die Proteinkonzentration.

Zum Schluß muß bei den vom Computer ermittelten Ergebnissen noch der Mittelwert der jeweils gleichen Proben (Doppelbestimmung) errechnet werden.

2.4. Statistische Analyse

Die gesammelten Werte wurden zur Weiterverarbeitung in einer Excel-Datei gespeichert.

Die Standardabweichung, der Minimal-, Maximal-, Median-, und Mittelwert sowie die jeweilige Probenanzahl wurden für die deskriptive Statistik verwendet.

Der U-Test von Mann, Whitney und Wilcoxon wird für den Vergleich von uPA bzw. PAI-1 bei unverbundener Stichproben, sowohl von gesunder Schleimhaut und Granulationsgewebe unterschiedlicher Patienten, als auch der Konzentrationen von uPA und PAI-1 bei männlichen und weiblichen Patienten verwendet.

Bei dem Vergleich von PAI-1 bzw. uPA in gesundem und entzündetem Gewebe des selben Patienten wurde der Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben angewendet.

Für die Untersuchung, ob zwischen Alter und uPA- bzw. PAI-1-Konzentration ein Zusammenhang besteht, wurde die Korrelation von Pearson angewendet.

Mit dieser Korrelation wurde auch untersucht, ob zwischen uPA und PAI-1 sowohl in gesundem als auch in erkranktem Gewebe ein Zusammenhang besteht.

Bei allen Test wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Verteilung von uPA und PAI-1 in gesunder Mundschleimhaut und in entzündeter Mundschleimhaut

Es wurden 58 Gewebeproben von 51 Patienten entnommen, wobei bei sieben Patienten sowohl gesunde als auch erkrankte Mundschleimhaut gewonnen werden konnte.

Bei zwei Proben konnten keine Ergebnisse für PAI-1 erzielt werden, da die Probenmenge nur für die uPA- und Protein-Bestimmung ausreichte .

3.1.1. Die uPA- Verteilung im gesamten Patientenkollektiv

Die uPA-Konzentration von 58 Proben wurde ermittelt. Diese stammen von 51 Patienten, da bei 7 sowohl die gesunde Mundschleimhaut als auch das Granulationsgewebe untersucht wurde.

Die folgende Tabelle (Tabelle 4) vergleicht die uPA-Werte zwischen gesunder Mundschleimhaut und Granulationsgewebe. Dabei ist zu sehen, dass der Mittelwert von uPA in Granulationsgewebe um das 3,5 fache höher ist als in gesunder Mundschleimhaut.

Es besteht ein hoch signifikanter Unterschied ($p < 0,002$) zwischen den uPA-Konzentrationen der beiden Gruppen, die in Abbildung 5 graphisch dargestellt sind.

	uPA (ng/mg) in Granulationsgewebe	uPA (ng/mg) in gesunder Mundschleimhaut
Min	0,27	0,07
Max	8,89	0,79
Median	0,86	0,29
Mittelwert	1,16	0,33
SD	1,42	0,19

Tabelle 4: Verteilung von uPA (ng/mg) in Granulationsgewebe und in gesunder Mundschleimhaut. (n=58)

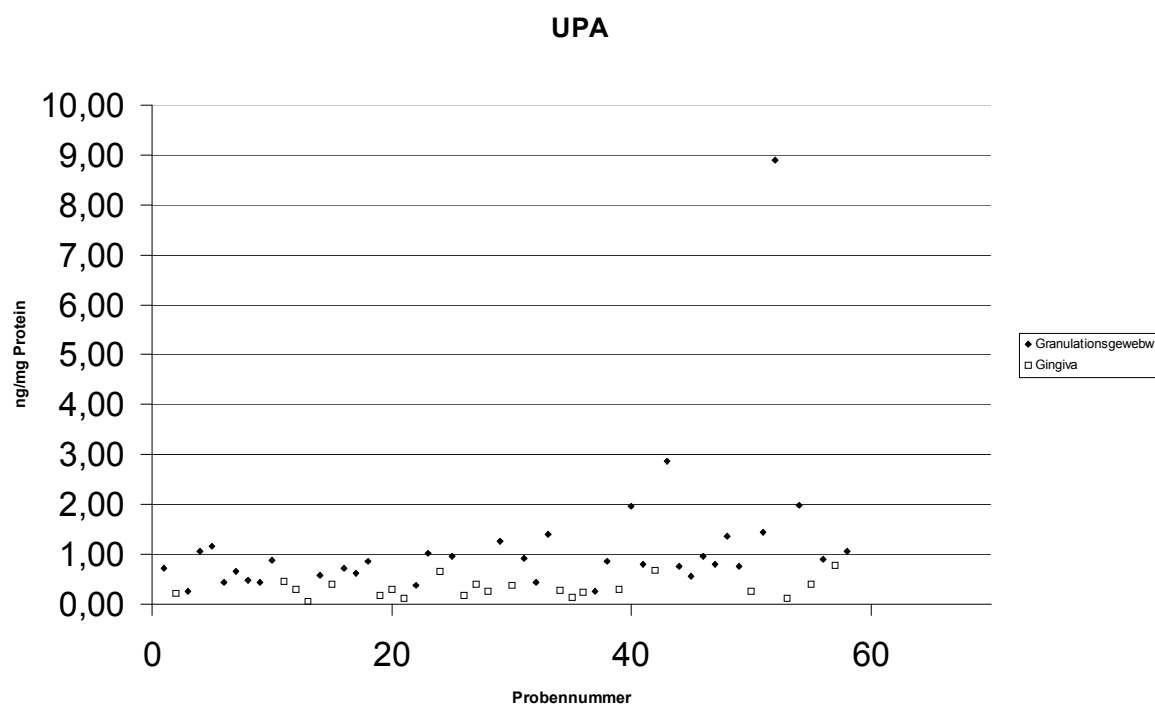


Abbildung 5: Vergleich von uPA in gesunder Mundschleimhaut und in Granulationsgewebe (n=58)

3.1.2. PAI-1- Verteilung im gesamten Patientenkollektiv

Die PAI-1 Konzentration wurde im Gegensatz zu uPA (58 Proben) bei 56 Proben ermittelt.

Bei zwei Proben war die entnommene Gewebemenge so gering, dass sie nur zur Bestimmung der uPA Konzentration gereicht hat.

Diese 56 Proben stammen von 49 Patienten, bei 7 konnte sowohl die gesunde Mundschleimhaut als auch das Granulationsgewebe untersucht werden.

Die nächste Tabelle vergleicht die PAI-1-Werte zwischen gesunder Mundschleimhaut und Granulationsgewebe. Dabei sieht man, dass der Mittelwert von PAI-1 im Granulationsgewebe um das 1,9-fache höher ist als in gesunder Mundschleimhaut.

Es besteht ein hoch signifikanter Unterschied ($p < 0,002$) zwischen den PAI-1-Konzentrationen der beiden Gruppen, die in Abbildung 6 graphisch dargestellt sind.

	PAI-1 (ng/mg) in Granulationsgewebe	PAI-1 (ng/mg) in gesunder Mundschleimhaut
Min	5,07	1,83
Max	36,74	16,37
Median	15,97	8,94
Mittelwert	16,47	8,70
SD	6,34	4,28

Tabelle 5: Verteilung von PAI-1 (ng/mg) in Granulationsgewebe und in gesunder Mundschleimhaut. (n=56)

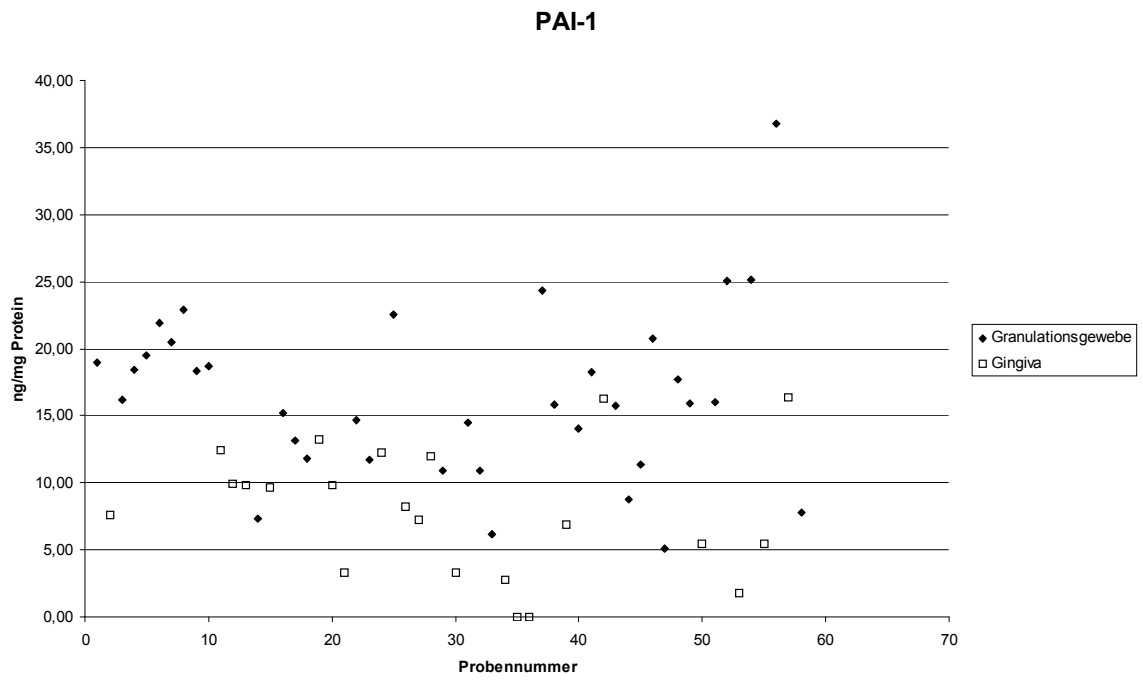


Abbildung 6: Vergleich von PAI-1 in gesunder Mundschleimhaut und in Granulationsgewebe
(n=56)

3.1.3. uPA- und PAI-1-Werte des gleichen Patienten

Bei 7 Patienten war es möglich Proben sowohl von gesunder Mundschleimhaut als auch von Granulationsgewebe zu entnehmen. Dies hat den Vorteil, dass bei ein und demselben Patienten untersucht werden kann, ob die Konzentrationen unterschiedlich sind.

Die nächste Tabelle (Tabelle 6) vergleicht die uPA-Werte, die sich aus den Probandaten in Tabelle 7 ergeben.

	uPA (ng/mg) in Granulationsgewebe	uPA (ng/mg) in gesunder Mundschleimhaut
Min	0,27	0,13
Max	1,06	0,68
Median	0,89	0,40
Mittelwert	0,82	0,41
SD	0,26	0,21

Tabelle 6: Verteilung von uPA (ng/mg) in Granulationsgewebe und in gesunder Mundschleimhaut. (n=7)

Probe	uPA Gingiva	uPA Granulationsgewebe
Patient A	0,23	0,27
Patient B	0,47	0,89
Patient C	0,66	0,97
Patient D	0,30	0,86
Patient E	0,68	0,81
Patient F	0,13	1,06
Patient G	0,40	0,90
Mittelwert	0,41	0,82
SD	0,21	0,26

Tabelle 7: Verteilung von uPA (ng/mg) auf die einzelnen Proben. (n=7)

Die PAI-1 Werte dieser 7 Patienten, die in Tabelle 8 dargestellt sind, werden in Tabelle 9 verglichen.

Probe	PAI-1	PAI-1
	Gingiva	Granulationsgewebe
Patient A	7,63	16,22
Patient B	12,45	18,73
Patient C	12,29	22,54
Patient D	6,86	15,80
Patient E	16,26	18,22
Patient F	1,83	7,78
Patient G	5,43	36,74
Mittelwert	6,65	19,43
SD	4,74	8,85

Tabelle 8: Verteilung von PAI-1 (ng/mg) auf die einzelnen Proben. (n=7)

	PAI-1 (ng/mg) in Granulationsgewebe	PAI-1 (ng/mg) in gesunder Mundschleimhaut
Min	7,78	1,83
Max	36,74	16,26
Median	18,22	7,63
Mittelwert	19,43	8,96
SD	8,85	4,93

Tabelle 9: Verteilung von PAI-1 (ng/mg) in Granulationsgewebe und in gesunder Mundschleimhaut. (n=7)

Anhand des Wilcoxon-Tests konnte ein signifikanter Unterschied der uPA- und PAI-1-Werte zwischen gesunder und entzündeter Mundschleimhaut nachgewiesen werden ($p < 0,05$), da bei jedem der sieben Patienten der uPA- und der PAI-1-Wert des Granulationsgewebes höher ist als bei der gesunden Schleimhaut.

3.2. UPA und PAI-1 im Vergleich zum Geschlecht

Die folgenden Tabellen und Abbildungen vergleichen die uPA-Werte zwischen den Geschlechtern in gesunder bzw. entzündeter Mundschleimhaut.

Bei den uPA-Werten besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den weiblichen und den männlichen Patienten.

	uPA (ng/mg) bei weiblichen Patienten	uPA (ng/mg) bei männlichen Patienten
Min	0,13	0,07
Max	0,79	0,68
Median	0,4	0,26
Mittelwert	0,42	0,28
SD	0,22	0,15
Anzahl	8	14

Tabelle 10: Vergleich von den uPA Werten zwischen den männlichen und den weiblichen Patienten in gesunder Mundschleimhaut (n=22)

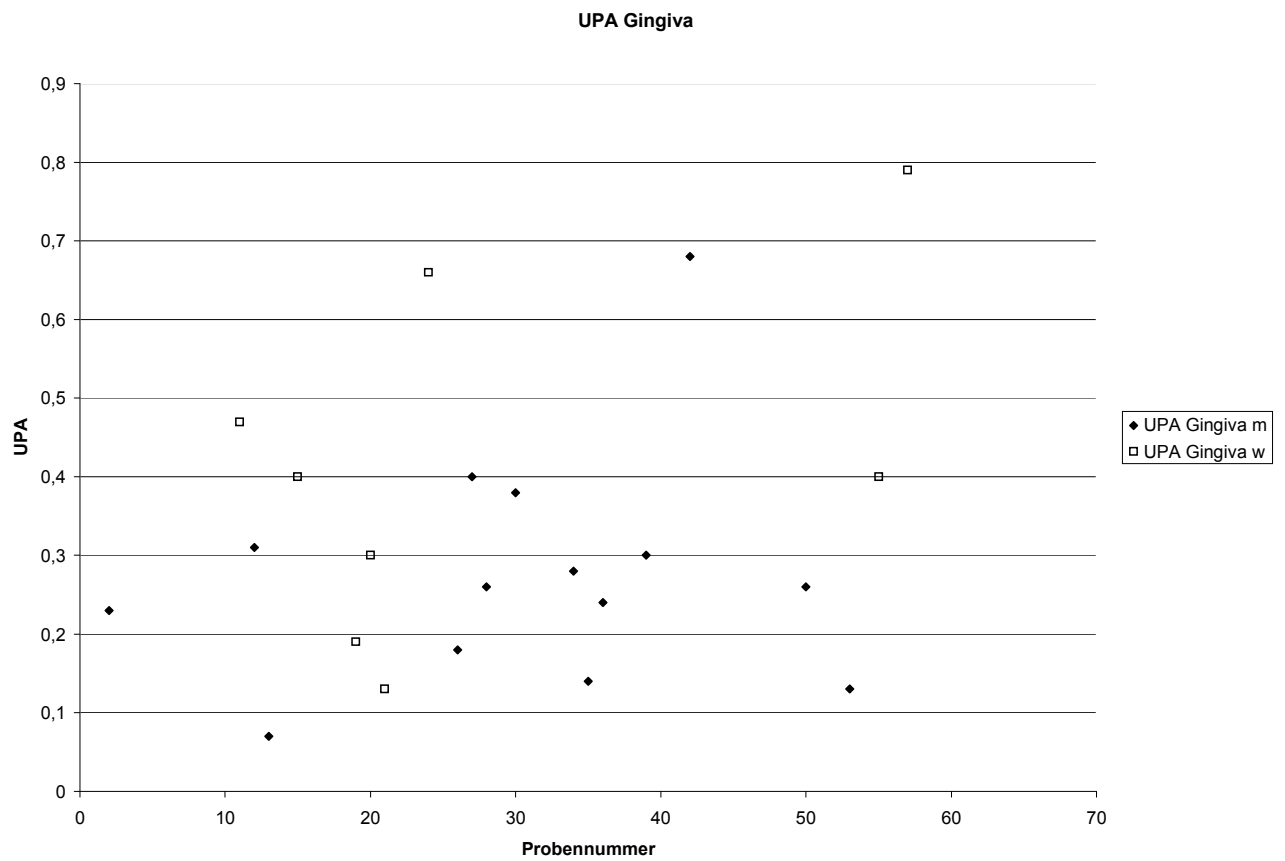


Abbildung 7: Vergleich von den uPA Werten zwischen den männlichen und den weiblichen Patienten in gesunder Mundschleimhaut (n=22)

	uPA (ng/mg) bei weiblichen Patienten	uPA (ng/mg) bei männlichen Patienten
Min	0,38	0,27
Max	1,41	8,89
Median	0,74	0,95
Mittelwert	0,80	1,52
SD	0,32	1,95
Anzahl	18	18

Tabelle 11 : Vergleich von den uPA Werten zwischen den männlichen und den weiblichen Patienten in entzündeter Mundschleimhaut (n=36)

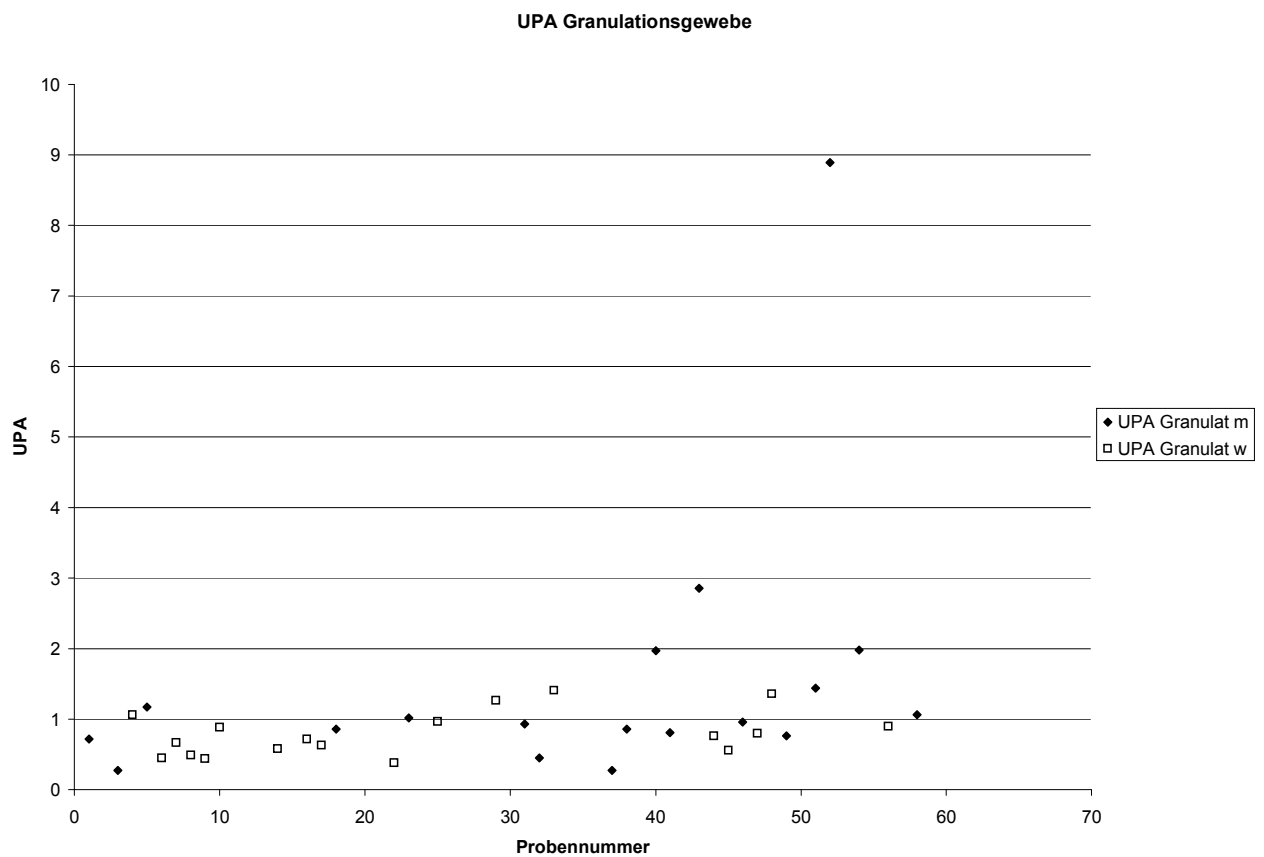


Abbildung 8: Vergleich von den uPA Werten zwischen den männlichen und den weiblichen

Patienten in entzündeter Mundschleimhaut (n=36)

Die nächsten Tabellen und Diagramme vergleichen die PAI-1-Werte zwischen den

Geschlechtern in gesunder bzw. entzündeter Mundschleimhaut.

Wieder besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den weiblichen und männlichen

Patienten bei den gemessenen PAI-1-Werten.

	PAI-1 (ng/mg) bei weiblichen Patienten	PAI-1 (ng/mg) bei männlichen Patienten
Min	3,30	1,83
Max	16,37	16,26
Median	11,07	7,46
Mittelwert	10,32	7,61
SD	4,26	4,1
Anzahl	8	12

Tabelle 12: Vergleich von den PAI-1 Werten zwischen den männlichen und den weiblichen

Patienten in gesunder Mundschleimhaut (n=20)

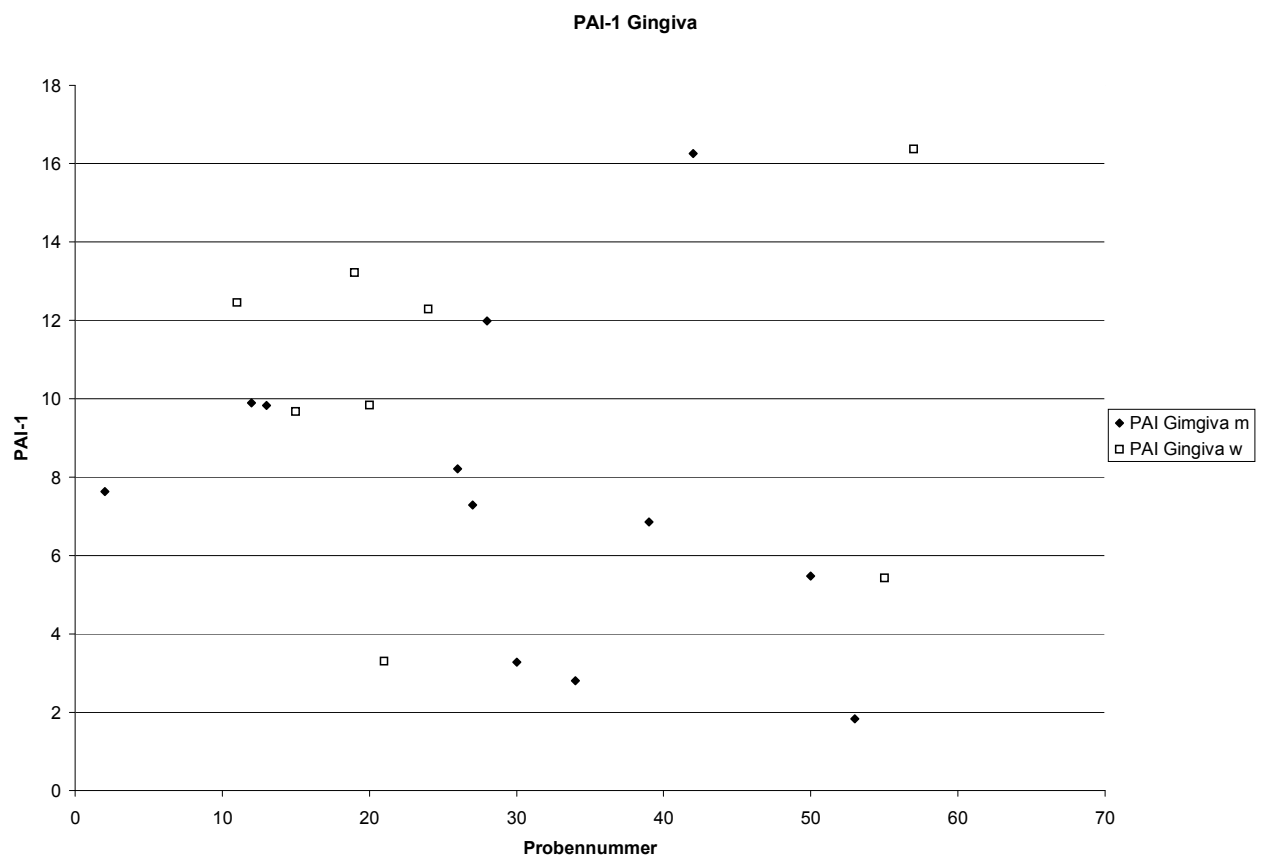


Abbildung 9: Vergleich von den PAI-1 Werten zwischen den männlichen und den weiblichen

Patienten in gesunder Mundschleimhaut (n=20)

	PAI-1 (ng/mg) bei weiblichen Patienten	PAI-1 (ng/mg) bei männlichen Patienten
Min	5,07	7,78
Max	36,74	25,15
Median	16,45	15,97
Mittelwert	16,13	16,80
SD	7,66	4,89
Anzahl	18	18

Tabelle 13: Vergleich von den PAI-1 Werten zwischen den männlichen und den weiblichen Patienten in entzündeter Mundschleimhaut (n=36)

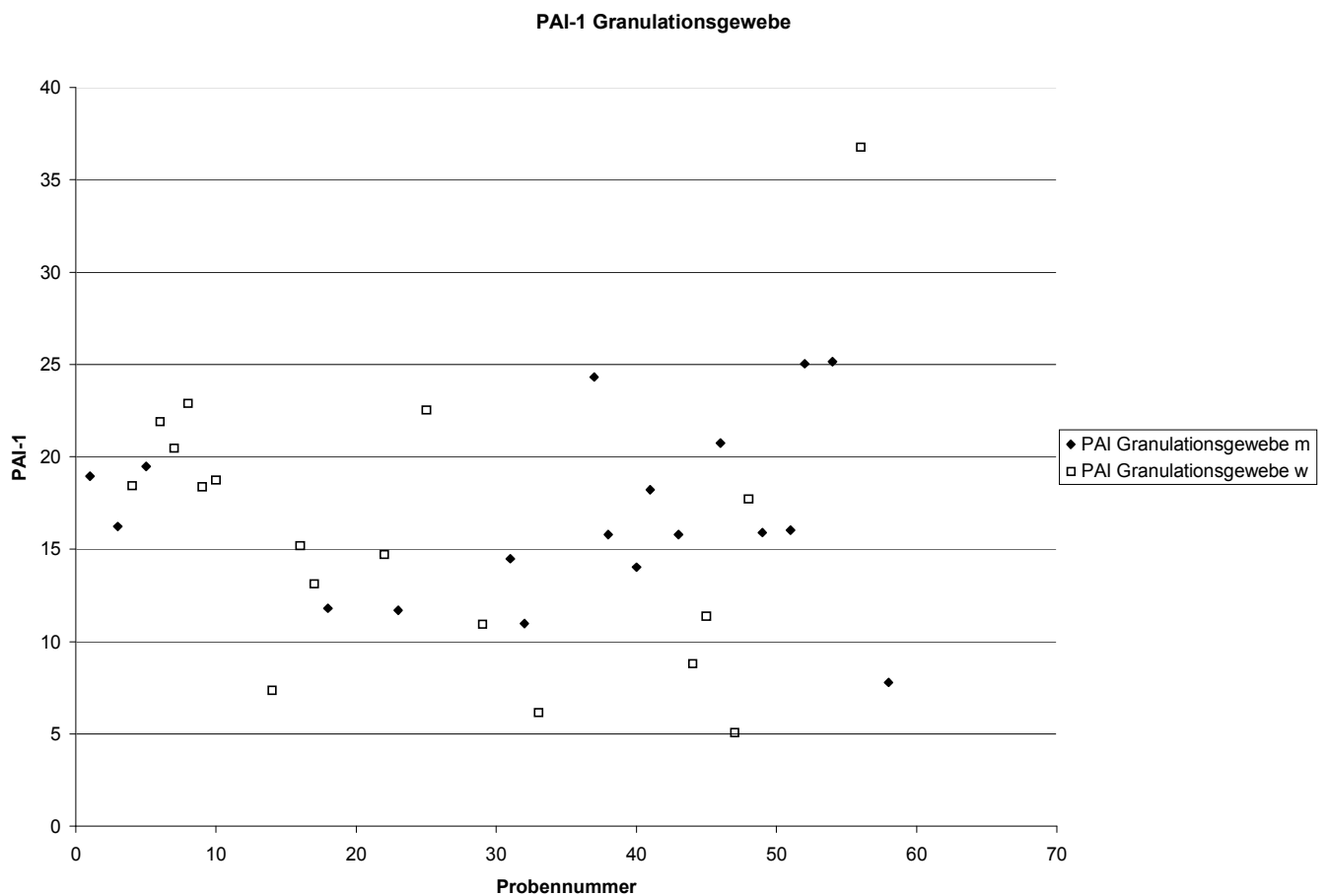


Abbildung 10: Vergleich von den PAI-1 Werten zwischen den männlichen und den weiblichen Patienten in entzündeter Mundschleimhaut (n=36)

3.3. UPA und PAI-1 im Vergleich zum Patientenalter

Bei 4 Patienten war es nicht mehr möglich, das Alter zu bestimmen.

Bei den restlichen 54 Patienten zeigt die Tabelle 14 und die Abbildung 11 die uPA-Werte in Bezug zum Patientenalter.

Die Patienten wurden am Altermedianwert in zwei Gruppen aufgeteilt.

	uPA in Gingiva Alter \leq 59	uPA in Gingiva Alter $>$ 59
Min	0,19	0,07
Max	0,79	0,66
Median	0,38	0,14
Mittelwert	0,40	0,25
SD	0,19	0,20
Anzahl	11	7

Tabelle 14: Vergleich von uPA in gesunder Mundschleimhaut geteilt am Altermedianwert (n=18)

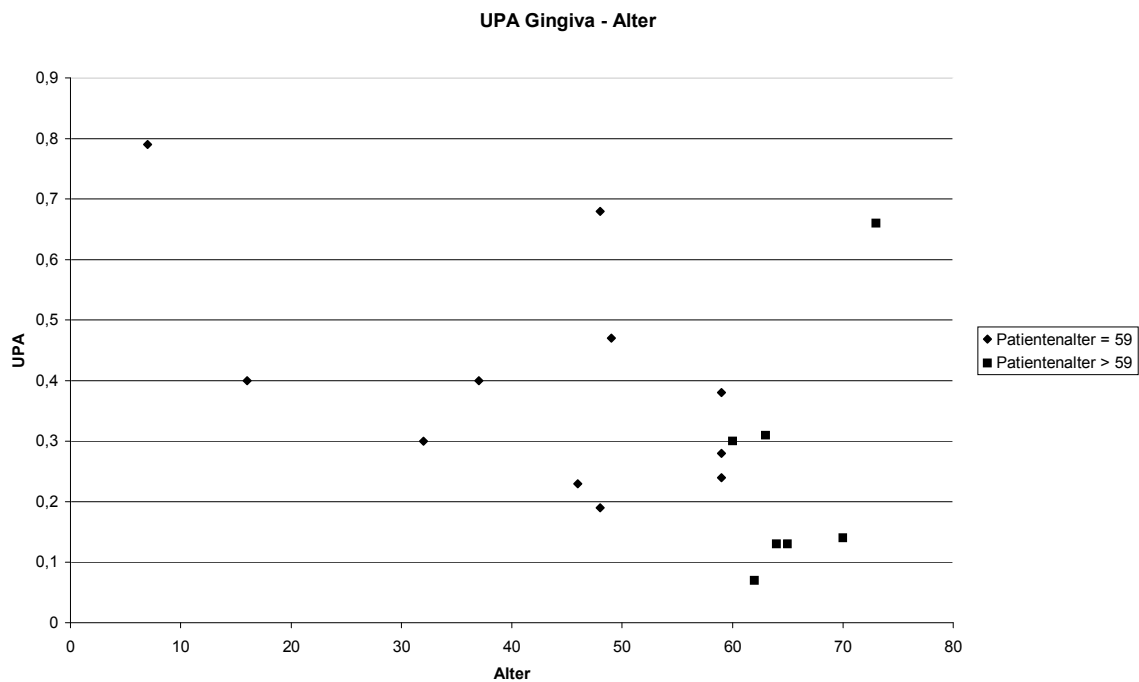


Abbildung 11: Vergleich von uPA in gesunder Mundschleimhaut und dem Patientenalter
(n=18)

Zwischen dem uPA-Wert, gemessen in gesunder Mundschleimhaut, und dem Patientenalter besteht ein gegensinniger Zusammenhang, da die Korrelation von Pearson den Wert $r = -0,59$ liefert.

Da der Wert näher an $-0,5$ als an -1 liegt, folgt daraus, dass es, abgesehen vom Alter noch andere Faktoren geben muß, die den uPA-Wert in gesunder Mundschleimhaut beeinflussen.

Im Gegensatz dazu besteht kein Zusammenhang zwischen den uPA-Werten aus entzündeter Mundschleimhaut und dem Patientenalter (Tabelle 15 und Abbildung 12), da die Berechnung nach der Korrelation von Pearson den Wert $r = 0,07$ liefert.

	uPA in Granulationsgewebe	uPA in Granulationsgewebe
	Alter \leq 59	Alter $>$ 59
Min	0,27	0,45
Max	8,89	1,98
Median	0,79	0,95
Mittelwert	1,23	1,04
SD	1,80	0,46
Anzahl	22	14

Tabelle 15: Vergleich von uPA in entzündeter Mundschleimhaut geteilt am Altermedianwert (n=36)

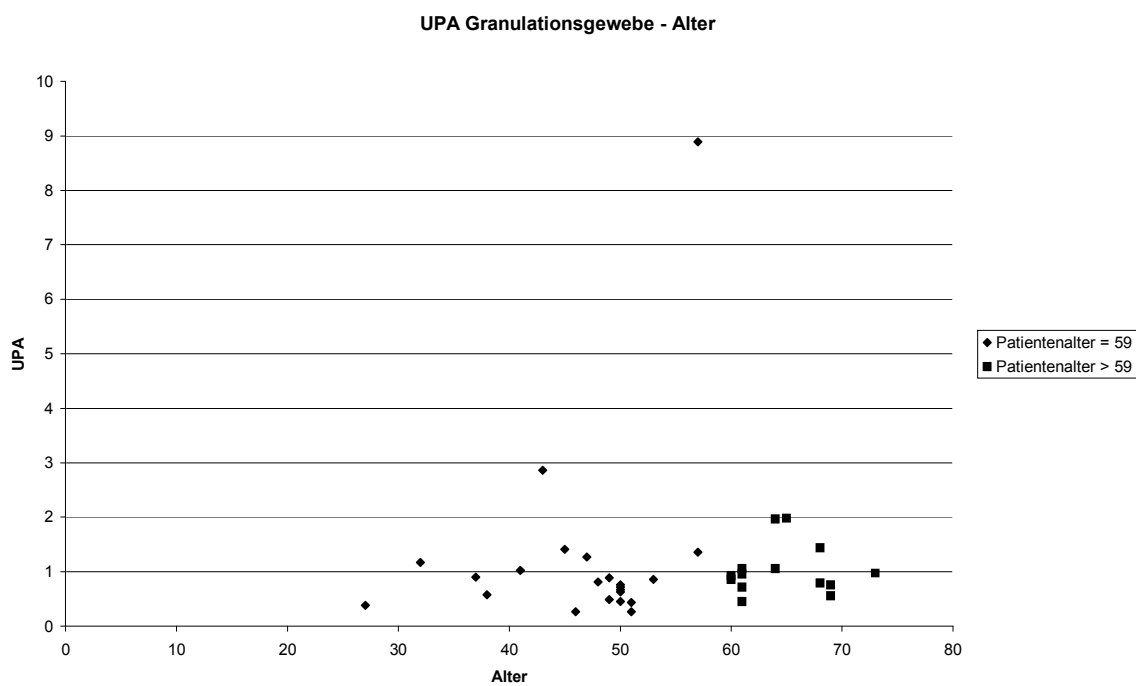


Abbildung 12: Vergleich von uPA in Granulationsgewebe und dem Patientenalter (n=36)

Die Tabelle 16 und die Abbildung 13 zeigen bei 16 Proben die PAI-1-Werte im gesunden Gewebe in Bezug zum Patientenalter. Die Patienten wurden anhand ihres Alters in zwei Gruppen aufgeteilt.

	PAI-1 in Gingiva Alter ≤ 59	PAI-1 in Gingiva Alter > 59
Min	2,80	1,83
Max	16,37	12,29
Median	9,76	8,35
Mittelwert	9,70	7,34
SD	4,93	4,10
Anzahl	10	6

Tabelle 16: Vergleich von PAI-1 in gesunder Mundschleimhaut und dem Patientenalter

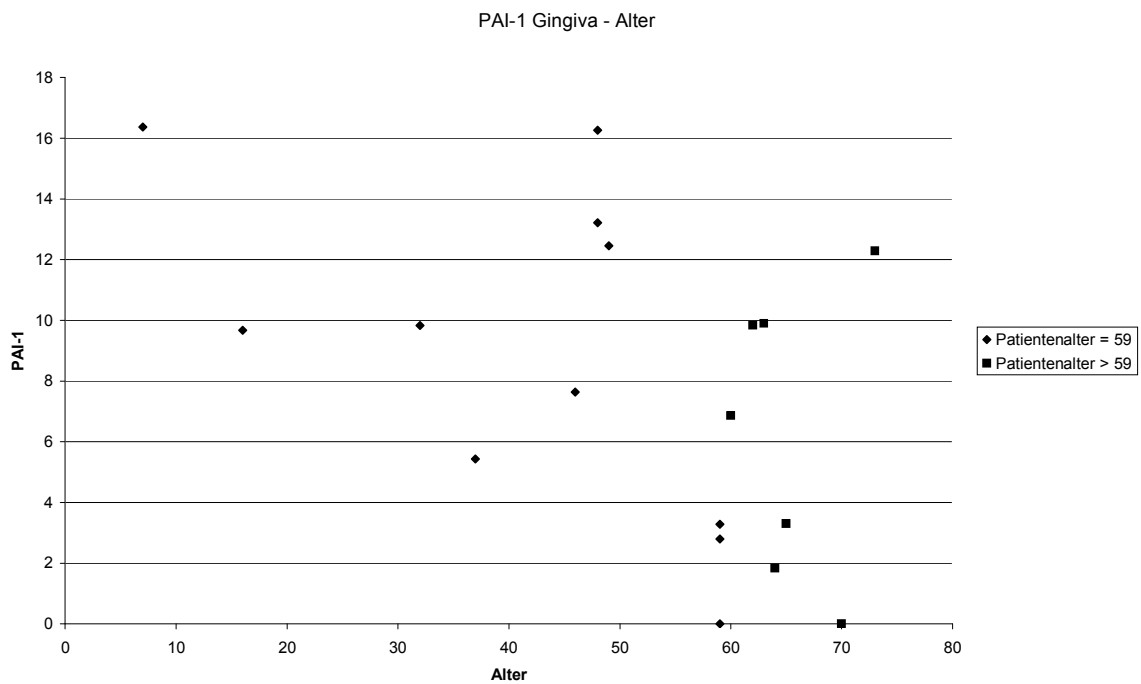


Abbildung 13: Vergleich von PAI-1 in gesunder Mundschleimhaut und dem Patientenalter

(n=16)

Wie schon bei dem Vergleich von uPA-Werten der gesunden Mundschleimhaut und dem Patientenalter, besteht auch bei dem entsprechendem Vergleich der PAI-1-Werten mit dem Alter ebenfalls ein gegensinniger Zusammenhang. Dieses Mal liegt der Wert der Korrelation von Pearson bei $r = -0,54$, und damit wieder näher an $-0,5$ als an -1 .

Daraus folgt, dass es auch andere Faktoren, abgesehen von Alter geben muß, die den PAI-1-Wert in gesunder Mundschleimhaut beeinflussen.

Tabelle 17 und die Abbildung 14 zeigen bei 36 Patienten die Vergleiche PAI-1-Werte entzündeter Mundschleimhaut mit dem Patientenalter.

	PAI-1 in Granulationsgewebe	
	Alter ≤ 59	Alter > 59
Min	6,14	5,07
Max	36,74	25,15
Median	16,97	15,15
Mittelwert	17,39	15,01
SD	6,61	5,83
Anzahl	22	14

Tabelle 17: Vergleich von PAI-1 in Granulationsgewebe und dem Patientenalter (n=36)

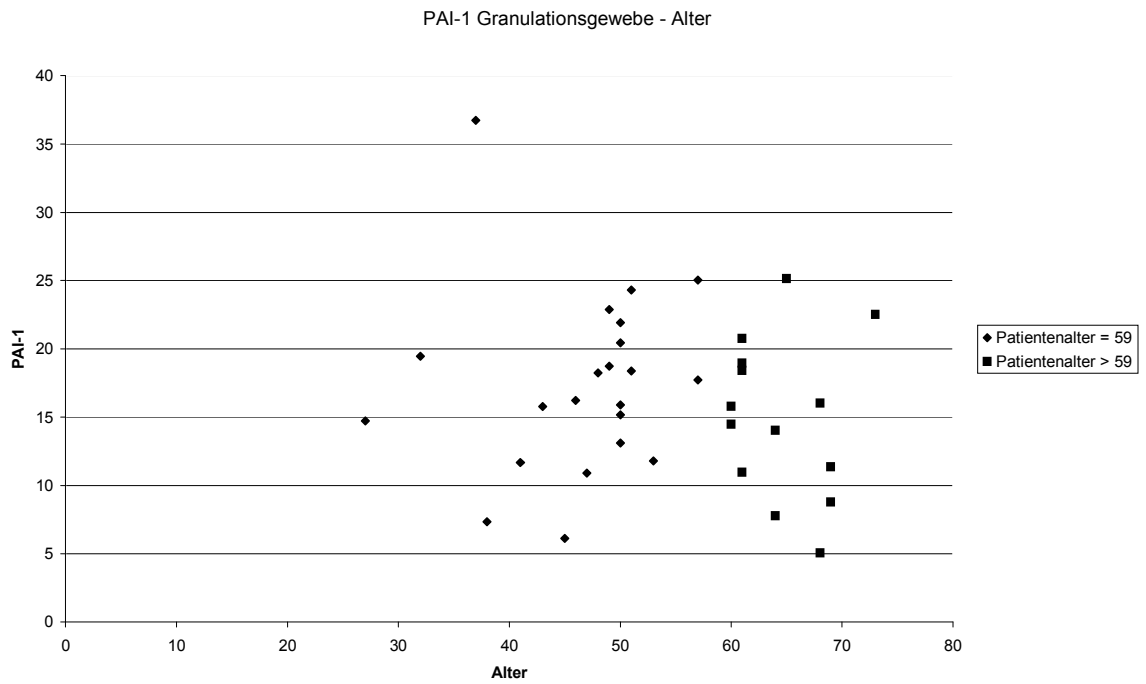


Abbildung 14: Vergleich von PAI-1 in Granulationsgewebe und dem Patientenalter (n=36)

Hier besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen den PAI-1-Werten in entzündeter Mundschleimhaut und dem Patientenalter, da die Korrelation von Pearson mit dem Wert $r = -0,11$ nahe an Null liegt.

Die folgende Tabelle 18 zeigt alle gemessenen uPA-Werte in Bezug zum Patientenalter.

Die Berechnung nach der Korrelation von Pearson liefert keinen signifikanten

Zusammenhang zwischen den gemessenen uPA-Werten und den dazugehörigen

Patientenalter ($r = 0,05$).

	uPA (ng/mg)	Alter
Min	0,07	7
Max	8,89	73
Median	0,68	52
Mittelwert	0,88	53
SD	1,23	13,61
Anzahl Proben	54	54

Tabelle 18: Vergleich von uPA und Patientenalter (n=54)

Es ergibt sich ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang, wenn die gesamten PAI-1 Werte mit den entsprechenden Alter der Patienten verglichen werden (Tabelle 19). Die Korrelation von Pearson liefert den Wert $r = - 0,11$.

	PAI-1 (ng/mg)	Alter
Min	1,83	7
Max	36,74	73
Median	14,26	52
Mittelwert	14,11	53
SD	6,83	13,61
Anzahl Proben	52	52

Tabelle 19: Vergleich von PAI-1 mit dem Patientenalter (n=52)

3.4. Vergleich von uPA und PAI-1 im gesamten Patientenkollektiv

In gesunder Mundschleimhaut besteht ein Zusammenhang zwischen den gemessenen uPA- und PAI-1-Werten. Die Korrelation von Pearson liefert den Wert $r = 0,63$. Die Tatsache, dass der Wert näher an 0,5 als an 1 liegt, zeigt, dass es noch weitere Faktoren gibt, die Einfluss auf die gemessenen Werte haben.

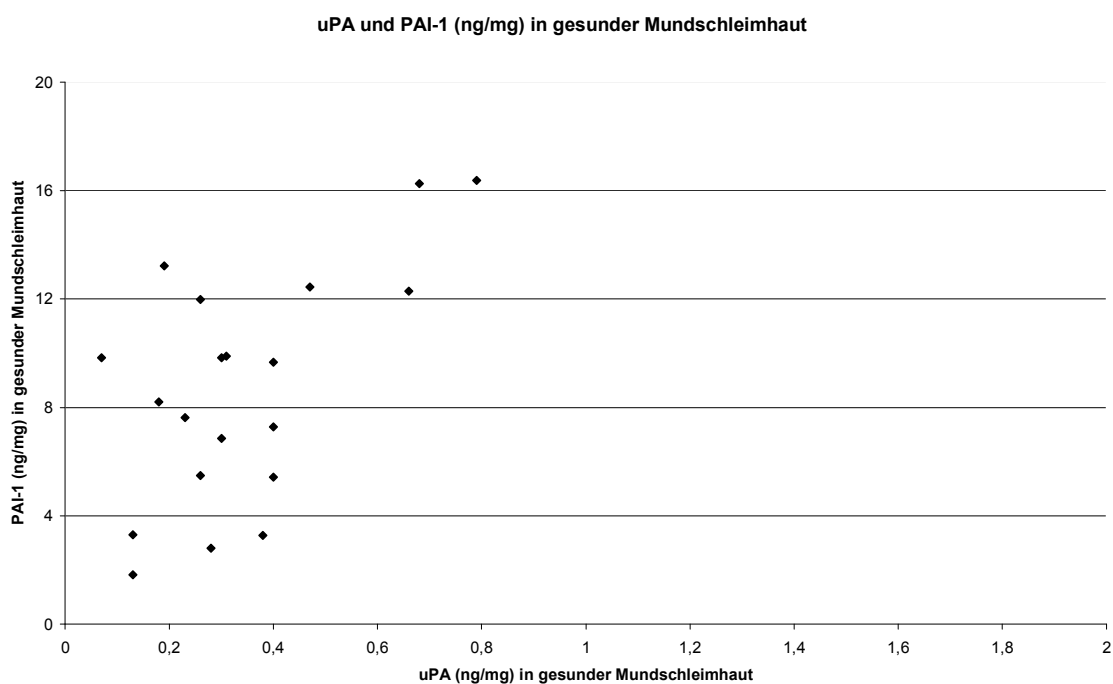


Abbildung 15: Vergleich zwischen uPA und PAI-1 in gesunder Mundschleimhaut (n=20)

Bei einem Wert von $r = 0,20$ nach der Korrelation von Pearson zeigt sich keine signifikante Korrelation zwischen uPA und PAI-1 in entzündeter Mundschleimhaut.

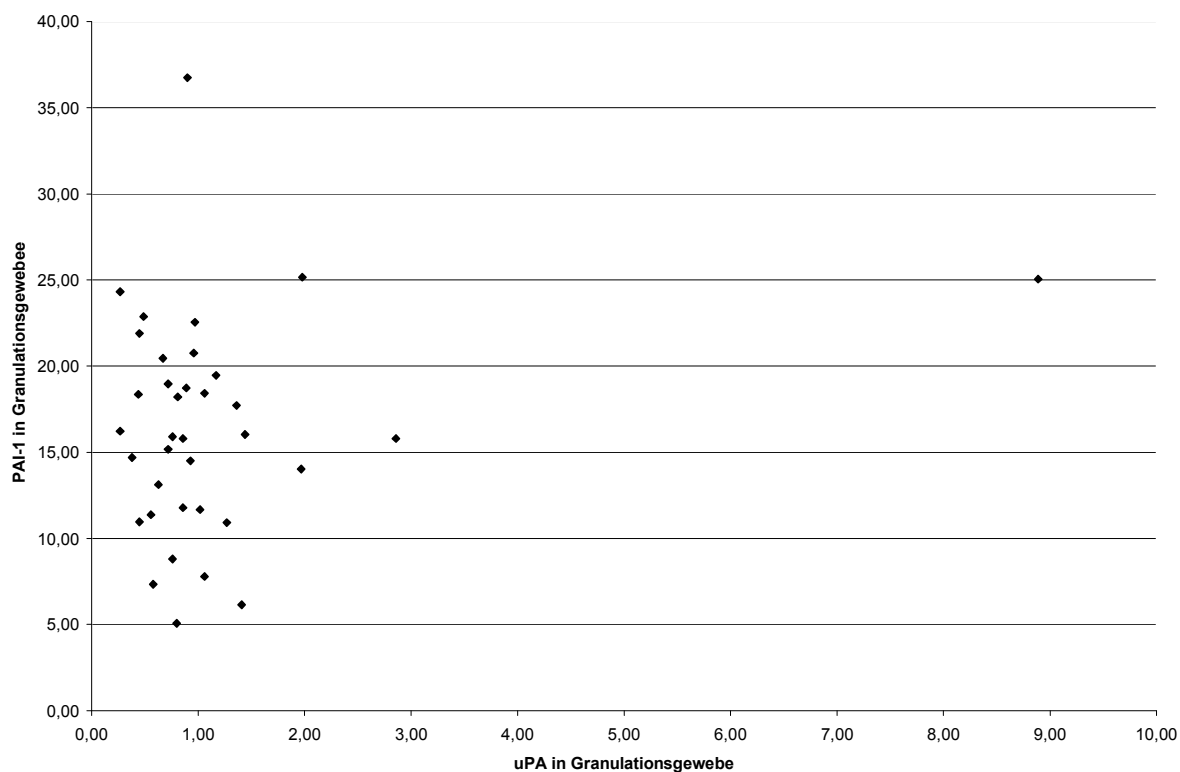


Abbildung 16: Vergleich von uPA und PAI-1 in Granulationsgewebe (n= 36)

Vergleicht man alle gemessenen uPA und PAI-1 Werte miteinander, ohne zu berücksichtigen, ob sie von Proben aus entzündeter oder gesunder Mundschleimhaut stammen, so erhält man ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang ($r = 0,33$).

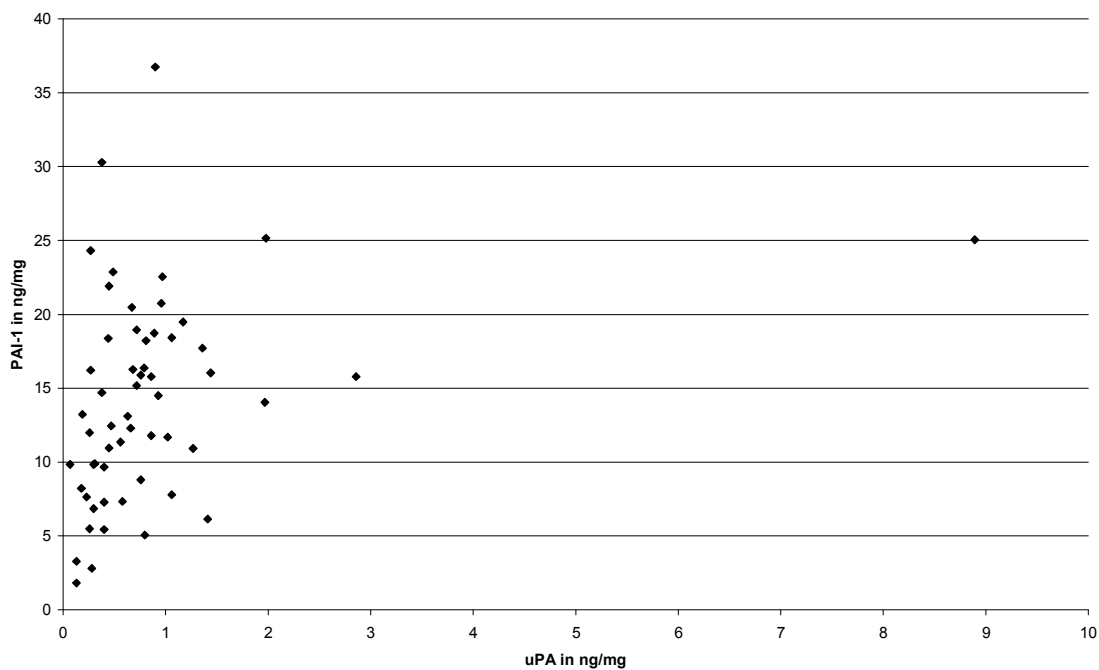


Abbildung 17: Vergleich von uPA und PAI-1, alle Proben (n= 56)

4. Diskussion

Die parodontale Gesundheit wird für die Menschen immer wichtiger. Dies ist auch daran zu erkennen, dass die gesetzlichen Krankenkassen seit 2004 die Kosten für eine Untersuchung des parodontalen Gewebes übernehmen. Es ist also in ihrem Interesse, die möglichen Folgekosten einer unbehandelten Parodontitis zu reduzieren, da neben den unmittelbaren Problemen, wie Zahnverlust auch langfristige systemische Erkrankungen entstehen können. Durch die Parodontitis werden z.B. der Diabetes, das Risiko von Frühgeburten, cardiale Erkrankungen, Osteoporose oder Atemwegserkrankungen begünstigt [11, S. 46]. Die Schwere dieser Folgen zeigt, wie wichtig es ist, die Parodontitis möglichst frühzeitig zu erkennen und zu behandeln. Dies um so mehr, da etwa 70-75% der Weltbevölkerung unter Erkrankungen des Parodontiums leiden [11, S. 46].

Bisher bekannte Risikofaktoren, die eine Parodontitis begünstigen, sind Funktionsstörungen neutrophiler Granulozyten, eine inadäquate Immunantwort, AIDS, Diabetes mellitus, Zigarettenrauchen und die Einnahme einiger Medikamente [7, S.21].

Abgesehen von diesen Faktoren gibt es noch keine Möglichkeiten, die Ursache für die unterschiedlichen Prädispositionen für marginale Parodontitiden bei systemisch gesunden Erwachsenen zu bestimmen, beziehungsweise gefährdete Personen prospektiv zu identifizieren und zu therapieren. Daher ist es wichtig, diesbezüglich weitere Untersuchungen durchzuführen [7, S.20].

Ähnlich wichtig ist eine Prognose bei der Festlegung der Behandlung von Tumoren. Dort wurden Faktoren untersucht, die neben der Tumorausbreitung auch bei der Wundheilung und bei Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen [8, S.193]. Unter anderem haben sich bei den Untersuchungen verschiedener Tumore, wie z.B. die der weiblichen Brust [9, S.2513; 8, S.195], des Ösophagus [20, S.1755-1763], der Lunge [23, S.120-123], dem Magen [21, S.2900], uPA und PAI-1 als unabhängige prognostische Faktoren gezeigt [5, S.441].

Die Tatsache, dass uPA und PAI-1, genauso wie bei Tumoren auch bei Entzündungen beteiligt sind [24, S.59], legt die Vermutung nahe, dass sie auch bei der Parodontitis eine wichtige Rolle spielen. Sollte dies zutreffen, könnte man sie entweder als Prognosefaktoren einsetzen, um die Neigung zur Erkrankung festzustellen, bevor ein Schaden entstanden ist, oder um bei bereits erkrankten Menschen die Schwere des Krankheitsverlaufes vorherzubestimmen und damit frühzeitig die richtige Behandlung einzuleiten. Eine andere Möglichkeit wäre, durch gezieltes, z.B. medikamentöses, Eingreifen in den Entzündungsprozess, uPA oder PAI-1 so zu beeinflussen, dass die parodontalen Schäden verringert oder gar verhindert werden.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass tatsächlich sowohl uPA als auch PAI-1 im entzündeten Gewebe des Parodontiums höhere Konzentrationen aufweisen als in der gesunden Mundschleimhaut. Die Unterschiede sind sogar in beiden Fällen hoch signifikant ($p < 0,002$).

Bei uPA ist der Mittelwert im entzündeten Gewebe um das 3,5-fache höher als in gesunder Mundschleimhaut. Bei gesunder Mundschleimhaut entspricht in der vorliegenden Arbeit der uPA-Medianwert von 0,29 und der uPA-Mittelwert von 0,33 den bei anderen Untersuchungen gemessenen Werten. In einer Untersuchung von Hundsdorfer [13, S.25] wurde bei gesunder Mundschleimhaut ein uPA-Medianwert von 0,24 und ein uPA-Mittelwert von 0,51 gefunden. Wenn man diese Ergebnisse mit den Werten bei entzündeter Mundschleimhaut (Medianwert 0,86 und Mittelwert 1,16) vergleicht, wird der deutliche Unterschied zwischen den uPA-Konzentrationen in gesunder- und entzündeter Mundschleimhaut bestätigt.

Die Ergebnisse der erst vor kurzem veröffentlichten Untersuchung von Papadimitriou an Hunden decken sich mit denen dieser Arbeit. Da die Enzyme in dieser Arbeit in einer anderen Relation bestimmt wurden, lassen sich nicht die tatsächlichen Konzentrationen, aber deren Verhältniss vergleichen. Bei den untersuchten erwachsenen Hunden war die Plasminogen-

aktivator-konzantration im parodontal stark entzündetem Gewebe 3,7-fach höher als in Gesunden. [22, S. 192]

Bei PAI-1 zeigte sich der Mittelwert von entzündetem Gewebe in der vorliegenden Arbeit um das 1,9-fache höher als in gesunder Mundschleimhaut. Die bei dieser Untersuchung gemessenen PAI-1 Werte gesunder Mundschleimhaut (Medianwert : 8,94 und Mittelwert 8,70) entsprechen denen, die bei anderen Untersuchungen beschrieben wurden. So hat die Untersuchung von Hundsdorfer [13, S.25] bei PAI-1 in gesunder Mundschleimhaut einen Medianwert von 5,35 und einen Mittelwert von 8,44 ergeben.

Zum gleichen Ergebnis kommt auch die Studie von Buduneli. Seine Untersuchung zeigt, dass die uPA und die PAI-1 Konzentration bei Parodontitispatienten im Vergleich zu den Konzentrationen bei gesunden Patienten erhöht ist. Außerdem stellt er fest, dass das Rauchen auf die uPA und PAI-1-Konzentration keinen Einfluss hat. [4, S. 423]

Bei 7 Patienten war es möglich, sowohl Proben von gesunder Mundschleimhaut als auch von Granulationsgewebe zu entnehmen. Dies hat den Vorteil, dass bei ein und demselben Patienten untersucht werden konnte, ob die Konzentrationen unterschiedlich sind.

Anhand des Wilcoxon-Tests konnte ein signifikanter Unterschied der uPA- und PAI-1-Werte zwischen gesunder und entzündeter Mundschleimhaut nachgewiesen werden ($p < 0,05$), da bei jedem der sieben Patienten der uPA- und der PAI-1-Wert des Granulationsgewebes höher war als bei der gesunden Schleimhaut.

Der Vergleich der uPA- bzw. PAI-1 Werten zwischen den Geschlechtern ergab dagegen keine signifikante Unterschiede.

Bei 54 Patientenproben war das Alter bekannt und konnte für die weitere Auswertung verwendet werden. Zwischen dem uPA-Wert, gemessen in gesunder Mundschleimhaut, und dem Patientenalter besteht ein gegensinniger Zusammenhang, da die Korrelation von Pearson den Wert $r = -0,59$ liefert. Da der Wert näher an $-0,5$ als an -1 liegt, folgt daraus, dass es, abgesehen vom Alter, noch andere Faktoren geben muß, die den uPA-Wert in gesunder Mundschleimhaut beeinflussen.

Im Gegensatz dazu besteht kein Zusammenhang zwischen den uPA-Werten aus entzündeter Mundschleimhaut und dem Patientenalter, da die Berechnung nach der Korrelation von Pearson den Wert $r = 0,07$ liefert.

Auch bei dem Vergleich der PAI-1-Konzentrationen in gesunder Gingiva mit dem Patientenalter ergibt sich ein gegensinniger Zusammenhang. Die Korrelation von Pearson ergibt den Wert $r = -0,54$, der damit wieder näher an $-0,5$ als an -1 liegt.

Daraus folgt wie schon bei uPA, dass es auch andere Faktoren, abgesehen von Alter, geben muß, die den PAI-1-Wert in gesunder Mundschleimhaut beeinflussen.

Bei 36 Patienten wurde die PAI-1-Konzentrationen entzündeter Mundschleimhaut mit dem Patientenalter verglichen. Das Ergebnis lieferte, wie schon bei uPA, keinen signifikanten Zusammenhang, da die Korrelation von Pearson mit dem Wert $r = -0,11$ nahe an Null liegt.

Vergleicht man alle gemessenen uPA-Konzentrationen, also sowohl die im entzündeten als auch die in gesunder Gingiva, mit dem Patientenalter, so liefert die Korrelation von Pearson keinen signifikanten Zusammenhang ($r = 0,05$).

Bei dem entsprechendem Vergleich der PAI-1-Werte erhält man die gleiche Aussage ($r = -0,11$).

In gesunder Mundschleimhaut besteht ein Zusammenhang zwischen den gemessenen uPA- und PAI-1-Werten ($r = 0,63$). Also kann man beim niedrigen Wert eines der Enzyme davon ausgehen, dass das zweite ebenfalls gering konzentriert ist.

Der Vergleich der Konzentrationen von uPA und PAI-1 im entzündetem Gewebe ergibt ebenfalls einen gewissen Zusammenhang ($r = 0,20$), ebenso wie die Untersuchung aller Proben ($r = 0,33$). Allerdings ist diese Korrelation nicht signifikant, da $r > 0$ aber kleiner 0,5 ist. Dies bedeutet, dass bei erhöhter uPA-Konzentration nicht unbedingt auch der PAI-1-Wert hoch ist. Diese Tatsache legt nahe, dass man für die Beurteilung, ob eine Neigung zur Parodontitis vorliegt, beide Konzentrationen bestimmen sollte.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ein Rückschluß von der Konzentration des Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp und /oder seinem Inhibitor PAI-1 auf den Grad bzw. den Verlauf einer Parodontitis möglich ist.

Um die Relevanz und die Praxistauglichkeit dieses Zusammenhanges einschätzen zu können, sollten weitere Untersuchungen zu diesem sehr neuen Ansatz durchgeführt werden.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Konzentration des Plasminogenaktivators uPA und des Plasminogenaktivator-Inhibitors PAI-1 im Granulationsgewebe parodontal erkrankter Zähne im Vergleich zur gesunden Gingiva untersucht.

In der Zeit von März 2001 bis März 2004 wurden 58 Proben von 51 Patienten entnommen.

Bei sieben Patienten konnte sowohl gesunde als auch entzündete Mundschleimhaut entnommen werden. Dadurch war auch ein intraindividueller Vergleich möglich.

Die uPA-Konzentration wurde im Granulationsgewebe von 36 Patienten bestimmt. In der gesunden Mundschleimhaut konnte die uPA-Konzentration bei 22 Patienten ermittelt werden.

Die PAI-1-Konzentration wurde in 36 Proben aus Granulationsgewebe und in 20 Proben aus gesunder Gingiva bestimmt.

Die einzelnen Konzentrationen wurden mit der ELISA Technik ermittelt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem U-Test für zwei unverbundene Proben von Mann, Whitney und Wilcoxon, mit dem Wilcoxon Test für zwei verbundene Stichproben und mit der Korrelation von Pearson.

Der Mittelwert von uPA lag im Granulationsgewebe mit 1,16 um das 3,5-fache höher als in gesunder Gingiva. Der Unterschied zwischen den uPA-Konzentrationen ist hoch signifikant ($p < 0,002$).

Ebenso ergibt sich auch bei PAI-1-Konzentration ein hoch signifikanter Unterschied ($p < 0,002$) zwischen entzündeter und gesunder Mundschleimhaut. Die Mittelwerte bei PAI-1 unterscheiden sich um das 1,9-fache.

Beim intraindividuellen Vergleich konnte sowohl bei uPA als auch bei PAI-1 ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen gesunder und erkrankter Mundschleimhaut nachgewiesen werden. Dabei waren bei jedem der sieben Patienten die Werte im Granulationsgewebe deutlich höher als in gesunder Gingiva.

Es konnten weder bei uPA noch bei PAI-1 signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern festgestellt werden.

In gesunder Mundschleimhaut besteht ein gewisser gegensinniger Zusammenhang ($p < 0,05$) zwischen dem Patientenalter und den uPA bzw. PAI-1 Konzentration, da die Korrelation von Pearson die Werte $-0,59$ und $-0,54$ liefert. Allerdings liegen die Werte näher an $-0,5$ als an -1 und damit ist der Zusammenhang nicht sehr ausgeprägt. Vergleicht man die uPA- und die PAI-1-Werte der Proben aus dem Granulationsgewebe mit dem entsprechendem Patientenalter, so ergibt sich kein signifikanter Zusammenhang. Ebenso besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen den uPA- bzw. den PAI-1-Konzentrationen aus dem gesamten Patientenkollektiv und dem dazugehörenden Patientenalter.

Bei dem intraindividuellen Vergleich in gesunder Gingiva besteht ein Zusammenhang zwischen den uPA- und den PAI-1-Werten. Die Korrelation von Pearson liefert den Wert $r = 0,63$. Im Gegensatz dazu ergibt sich kein Zusammenhang zwischen den uPA- und PAI-1-Konzentrationen, weder in der Untersuchung des gesamten Patientenkollektivs noch bei der von Granulationsgewebe.

Angesichts

-der Häufigkeit der Erkrankung,

-der Länge der Behandlung und

-der unsicheren Prognose,

wäre es, auf Grund des engen Zusammenhangs, in jedem Fall hilfreich, die Parodontitis, oder das Risiko sie zu bekommen, frühzeitig zu erkennen und dem entgegenzuwirken.

So ist es möglich, durch die Bestimmung der uPA- und PAI-1- Konzentration den

Risikopatienten selektiv eine adjuvanten Therapie zukommen zu lassen, oder den Verlauf

bzw. die Effektivität der Behandlung zu kontrollieren.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist es sinnvoll, die Aussagen an einem größeren Patientenkollektiv zu verifizieren.

6. Literaturverzeichnis

1. Akahane T., Ishii M., Ohtani H., Nagura H., Toyota T.
Stromal expression of urokinase-type plasminogen aktivator receptor (uPAR) is associated with invasive growth in primary liver cancer
Liver 18, Munksgaard, Denmark: 414-419 (1998)
2. Beyhan, Ataseven
Genanalyse des Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA), Plasminogenaktivatorinhibitor-1 (PAI-1) und Urokinaserezeptor (uPAR) in Ovarialcarzinomzelllinien und –gewebe
Dissertation, TU-München, 1999
3. Böttcher B.
Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp und Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ1 beim Mammakarzinom Methodenvergleich, Korrelation zu etablierten und neuen Prognosefaktoren und prognostische Bedeutung
Dissertation, München 1999
4. Buduneli N., Buduneli E., Kardesler L., Lappin D., Kinane DF.
Plasminogen activator system in smokers and non-smokers with and without periodontal disease
Journal of Clinical Periodontology 32: 417-424 (2005)
5. Christensen L., Simonsen A., Heegaard C., Moestrup S., Andersen J., Andreasen P.
Immunohistochemical localiztation of urokinase-type plasminogen activator, typ-1 plasminogen-aktivator inhibitor, urokinase rezeptor and α_2 -macroglobolin receptor in human breast carcinomas
International journal of cancer 66: 441-452 (1996)

6. Dano K., Andreasen P., Grondahl-Hansen J., Kristensen P., Nielsen L., Skriver L.
Plasminogen activators, Tissue degradation and cancer
Advanced cancer research 44: 139-266 (1985)
7. Flemming T.
Parodontologie
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1993
8. Graeff H., Wilhelm O., Jänicke F., Schmitt M.
Tumorbiologie- orientierte Behandlungskonzepte
Gynäkol geburtshilfliche Rundsch 33 Suppl 1: 193-196 (1993)
9. Grondahl-Hansen, Christensen, Rosenquist
High levels of urokinase-type plasminogen in extracts of breast carcinomas are associated
with poor prognosis
Cancer research 53 :2513-2521 (1993)
10. Hellwig E., Klimek J., Attin T.
Einführung in die Zahnerhaltung Auflage 2
Urban & Fischer Verlag München 1999
11. Hetz G., Parodontitis und allgemeiner Gesundheitszustand
Zahnärztliche Mitteilungen Nr. 5 (2004)
Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, Köln
12. Hsu C.
Untersuchungen der tumorassoziierten Proteasen Urokinase Plasminogen Aktivator
(uPA) und Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI-1) in Mammakarzinomen
Dissertation, Hamburg 1996

13. Hundsdorfer B.
Verteilung und prognostische Bedeutung von uPA und PAI-1 beim
Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle
Dissertation, München 2000
14. Kettembeil S.
Den Krebs in die Zange nehmen
TUM- Mitteilungen 4:24-26 (1994/95)
15. Kosungi T., Huang G., Nakamura M., Koja S., Nong H.
Identification of a plasminogen activator derived from nasopharyngeal carcinoma
European Archives of Oto-Rhino-Laryngology 247: 374-378 (1990)
16. Kristensen P., Larsson L., Nielsen L., Grondahl-Hansen J., Anreasen P., Dano K.
Human endothelial cells contain one typ of plasminogen aktivator
FEBS letters Vol. 168, number1: 33-36 (1984)
17. Löffler G., Pertides P.
Biochemie und Pathobiochemie, 5. Auflage
Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York 1997
18. Nakanishi K., Kawai T., Torikata C., Aurues T., Ikeda T.
Urokinase-type plasminogen activator, ist inhibitor, and ist receptor in patients with upper
urinary tract carcinoma
American Cancer Society 82, no.4: 724-732 (1998)
19. Naoshi Sato
Parodontalchirurgie Klinischer Atlas
Quintessenz Verlags GmbH, Berlin 2002

20. Nekarda H., Schlegel P., Schmitt M., Stark M., Mueller J.D., Fink U., Siewert J.R.
Strong prognostic impact of tumor associated urokinase-typ plasminogen aktivator in completely resected adenocarcinoma of the esophagus
Clinical cancer research 4: 1755-1763 (1998)
21. Nekarada H., Schmitt M., Ulm K., Wenninger A., Vogelsang H., Becker K., Roder J.D., Fink U., Siewert J.R.
Prognostic Impact of urokinase-typ plasminogen aktivator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer
Cancer research 54 : 2900-2907 (1994)
22. Papadimitriou S., Tsantarliotou M., Makris G., Papaioannou N., Batzios Ch., Kokolis N., Dessiris A.
A clinical study of plasminogen activator activity in gingival tissue in dogs with gingivitis and periodontitis
Research in Veterinary Science 80: 189-193 (2006)
23. Pedersen H., Grodahl-Hansen J., Francis D., Osterlind K., Hansen H.-H., Dano K., Brüner R.
Urokinase and plasminogen activator inhibitor type I in pulmonary adenocarcinoma
Cancer research 54 : 120-123 (1994)
24. Pereyra-Alfonso S., Haedo A., Bal de Kier Joffe E.
Correlation between urokinase-type plasminogen activator production and the metastasizing ability of two murine mammary adenocarcinomas
International journal of cancer 42:59-63 (1988)
25. Pschyrembel
Medizinisches Wörterbuch, 257. Auflage
Nikol Verlagsgesellschaft mbH, Hamburg 1994

26. Romanos G., Deppe H., Ertl T., Gutknecht N., Purucker P.
Atlas der chirurgischen Laserzahnheilkunde
Urban & Fischer Verlag München, Jena 1999
27. Schmitt M., Jänicke F., Chucholowski N., Goretzki L., Moniwa N., Schüren E., Wilhelm O., Graeff H.
Biological and clinical relevance of the tumorassociated serine protease uPA
In: Wagener C.(Hrsg): Molecular diagnostics of cancer
Springer Verlag, Berlin, 1993
28. Umeda T., Eguchi Y., Okino K., Kodama M., Hattori T.
Cellular localization of urokinase-typ plasminogen activator, its inhibitors, and their mRNAs in breast cancer tissues
Journal of Pathology 183: 388-397 (1997)
29. Weiß C.
Basiswissen Medizinische Statistik
Springer Verlag, Berlin, 2002

7. Anhang

7.1 Abkürzungen

ATF	aminoterminales Fragment
BSA	Rinderserumalbumin
ELISA	Enzyme-liked Immunoassay
HCl	Salzsäure
HMW-uPA	high molecular weight-uPA
Ile	Isoleucin
K	Kontrollprobe
LMW-uPA	low molecular weight-uPA
LW	Leerwert
Lys	Lysin
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
P	Proben
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1
PBS	Puffer
PK	Kontrollprobe
Pro-uPA	enzymatisch inaktive Vorstufe des uPA
S	Standardprobe
SD	Standardabweichung
St	Standardverdünnung
T	Gewebeprobe

TBS	Tris Buffered Saline
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
uPA	Plasminogen –Aktivator vom Urokinasetyp

7.2 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Mengen-Gewicht-Relation zum Gewebeaufschluß nach Herstellerangaben
- Tabelle 2: Mischungsverhältnis für die 9 Standardkonzentrationen
- Tabelle 3: Plattenbelegung für die Proteinbestimmung
- Tabelle 4: Verteilung von uPA (ng/mg) in Granulationsgewebe und in gesunder Mundschleimhaut. (n=58)
- Tabelle 5: Verteilung von PAI-1 (ng/mg) in Granulationsgewebe und in gesunder Mundschleimhaut. (n=56)
- Tabelle 6: Verteilung von uPA (ng/mg) in Granulationsgewebe und in gesunder Mundschleimhaut. (n=7)
- Tabelle 7: Verteilung von uPA (ng/mg) auf die einzelnen Proben. (n=7)
- Tabelle 8: Verteilung von PAI-1 (ng/mg) auf die einzelnen Proben. (n=7)
- Tabelle 9: Verteilung von PAI-1 (ng/mg) in Granulationsgewebe und in gesunder Mundschleimhaut. (n=7)
- Tabelle 10: Vergleich von den uPA Werten zwischen den männlichen und den weiblichen Patienten in gesunder Mundschleimhaut (n=22)

- Tabelle 11: Vergleich von den uPA Werten zwischen den männlichen und den weiblichen Patienten in entzündeter Mundschleimhaut (n=36)
- Tabelle 12: Vergleich von den PAI-1 Werten zwischen den männlichen und den weiblichen Patienten in gesunder Mundschleimhaut (n=20)
- Tabelle 13: Vergleich von den PAI-1 Werten zwischen den männlichen und den weiblichen Patienten in entzündeter Mundschleimhaut (n=36)
- Tabelle 14: Vergleich von uPA in gesunder Mundschleimhaut und dem Patientenalter (n=18)
- Tabelle 15: Vergleich von uPA in Granulationsgewebe und dem Patientenalter (n=36)
- Tabelle 16: Vergleich von PAI-1 in gesunder Mundschleimhaut und dem Patientenalter (n=16)
- Tabelle 17: Vergleich von uPA in Granulationsgewebe und dem Patientenalter (n=36)
- Tabelle 18: Vergleich von uPA und Patientenalter (n=54)
- Tabelle 19: Vergleich von PAI-1 mit dem Patientenalter (n=52)

7.3 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Die Sekundärstruktur des Pro-uPA [6, S. 144]
- Abbildung 2: Schematische Darstellung des Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexes
- Abbildung 3: Plattenbelegung für den ELISA-Test (LW: Leerwert S: Standardprobe PK: Kontrollprobe T: zu testende Gewebeprobe)

- Abbildung 4: Eichkurve
- Abbildung 5: Vergleich von uPA in gesunder Mundschleimhaut und in Granulationsgewebe (n=58)
- Abbildung 6: Vergleich von PAI-1 in gesunder Mundschleimhaut und in Granulationsgewebe (n=56)
- Abbildung 7: Vergleich von den uPA Werten zwischen den männlichen und den weiblichen Patienten in gesunder Mundschleimhaut (n=22)
- Abbildung 8: Vergleich von den uPA Werten zwischen den männlichen und den weiblichen Patienten in entzündeter Mundschleimhaut (n=36)
- Abbildung 9: Vergleich von den PAI-1 Werten zwischen den männlichen und den weiblichen Patienten in gesunder Mundschleimhaut (n=20)
- Abbildung 10: Vergleich von den PAI-1 Werten zwischen den männlichen und den weiblichen Patienten in entzündeter Mundschleimhaut (n=36)
- Abbildung 11: Vergleich von uPA in gesunder Mundschleimhaut und dem Patientenalter (n=18)
- Abbildung 12: Vergleich von uPA in Granulationsgewebe und dem Patientenalter (n=36)
- Abbildung 13: Vergleich von PAI-1 in gesunder Mundschleimhaut und dem Patientenalter (n=16)
- Abbildung 14: Vergleich von PAI-1 in Granulationsgewebe und dem Patientenalter (n=36)
- Abbildung 15: Vergleich zwischen uPA und PAI-1 in gesunder Mundschleimhaut (n=20)

Abbildung 16: Vergleich von uPA und PAI-1 in Granulationsgewebe
(n= 36)

Abbildung 17: Vergleich von uPA und PAI-1, alle Proben (n= 56)

7.4. Formeln

Der Pearson'sche Korrelationskoeffizient r: $r = \frac{S_{xy}}{S_x \times S_y}$ [27, S.77]

S_{xy} Kovarianz

S_x, S_y Standardabweichungen

Die Kovarianz S_{xy} : $S_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y})}{n - 1}$ [27, S.75]

\bar{x}, \bar{y} Mittelwerte der Merkmale x bzw. y

8. Lebenslauf

- 1973 Geboren am 19. Dezember in Klausenburg /Rumänien als zweites von zwei Kindern von Attila Szigethy, Dipl. Ingenieur, und Elsa Szigethy, geb. Theiß, Dipl. Ingenieurin.
- 1980 Deutsche Grundschule in Klausenburg
- 1984 Deutsches Gymnasium in Klausenburg
- 1990 Realschule Geretsried, Abschluß: mittlere Reife
- 1991 Asam-Gymnasium München
- 1995 Abitur
- 1995 Zivildienst im Jugendwohnheim Salesianum München
- 1996 Zahnmedizinstudium an der LMU-München
- 2001 Eheschließung mit Andrea Theiß, geb. Winnerlein, Physiotherapeutin
- 2002/03 Staatsexamen
- 2003 Assistenzzeit in der Praxis Dr. Neumann, München
- 2005 Assistenzzeit in der Praxis Dr. Greiner, München

9. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Deppe für die Überlassung des Themas und für die kritische Durchsicht.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeiterinnen der klinischen Forschergruppe der Frauenklinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München (Leitung: Univ.-Prof. Dr. med. M. Kiechle), besonders Fr. C. Schnelldörfer für die freundliche Unterstützung bei der Aufbereitung der Proben.

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. Stefan Wagenpfeil aus dem Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München für die hilfreichen Tipps bei der Auswertung.

Schließlich danke ich den Assistenten der Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München (Direktor: Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. H. H. Horch), Herrn Priv. Doz. Dr. med. C. Folwaczny aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Ludwigs-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. R. Hickel), Fr. Dr. Gillich, Herrn Dr. Neumann und Herrn Dr. Black für die Unterstützung bei der Entnahme der Patientenproben.