

Nachweis von
Gelatinase- und Kollagenase-Aktivität sowie
von Matrix-Metalloproteinasen in der gingivalen
Sulkusflüssigkeit bei der Parodontitis des Hundes

Karolina Sophie Freiin von Tiesenhausen



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2019

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2019

© 2019 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus der Klinik für Kleintiere (Chirurgie) der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

**Nachweis von Gelatinase- und Kollagenase-Aktivität sowie von
Matrix-Metalloproteinasen in der gingivalen Sulkusflüssigkeit bei
der Parodontitis des Hundes**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Karolina Sophie Freiin von Tiesenhausen

Tierärztin aus Tübingen

Gießen 2019

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

PD Dr. Susanne Aldinger

Tag der Disputation: 11. Juli 2019

*„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muß sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen das Möglichste getan hat.“*

(Johann Wolfgang von Goethe)

Gewidmet meiner Familie

„Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Karolina Sophie Freiin von Tiesenhausen

A. Inhaltsverzeichnis

A.	Inhaltsverzeichnis.....	V
B.	Abkürzungsverzeichnis.....	X
C.	Abbildungsverzeichnis.....	XIII
D.	Tabellenverzeichnis.....	XXII
E.	Einleitung	1
F.	Literaturübersicht	3
1	Anatomie der Mundhöhle, der Gingiva, der Zähne, des Zahnhalteapparates und des gingivalen Sulkus	3
1.1	Anatomie der Mundhöhle.....	3
1.1.1	Vergleichende Anatomie der Zähne der Haussäugetiere	4
1.1.1.1	Nomenklatur	6
1.1.2	Anatomie der Hundezähne	7
1.1.2.1	Aufbau des Hundegebisses	7
1.1.2.2	Okklusion im Hundegebiss	9
1.1.2.3	Dentition.....	9
1.1.3	Anatomie des Zahnhalteapparates	10
1.1.4	Gingivaler Sulkus	12
2.	Parodontale Erkrankungen	14
2.1	Die Entstehung einer Parodontalerkrankung	14
2.1.1	Bakterielle Plaque.....	14
2.1.2	Zahnstein	15
2.1.3	Die Rolle der Bakterien bei einer parodontalen Erkrankung	16
2.1.4	Die Rolle des Immunsystems bei einer parodontalen Erkrankung.....	17
2.2	Gingivitis und Parodontitis des Hundes	19
2.2.1	Gingivitis	19
2.2.2	Parodontitis.....	20
2.2.3	Prophylaxe Maßnahmen und Therapie parodontaler Erkrankungen	25
2.3	Beziehung zwischen Parodontalerkrankungen und systemischen Erkrankungen	26
3	Die Rolle von Proteasen bei der Parodontitis	30
3.1	Matrix-Metalloproteinasen.....	30

3.1.1	Einteilung, Aufbau und Funktion der Matrix-Metalloproteinasen	31
3.1.2	Regulierung der Matrix-Metalloproteinasen-Aktivität	37
3.1.2.1	Aktivierung der MMPs	38
3.1.2.2	Inhibierung der MMPs	39
3.1.3	Die Rolle der Matrix-Metalloproteinasen in der Pathogenese der Parodontitis	40
3.1.3.1	Matrix-Metalloproteinasen und ihre Bedeutung bei parodontalen Erkrankungen in der Humanmedizin	41
3.1.3.2	Die Rolle der Matrix-Metalloproteinasen bei der Parodontitis des Hundes	45
3.2	Serinproteasen	46
3.2.1	Cathepsin G	46
3.2.2	Elastase	47
3.2.3	Serinproteasen bei der Parodontitis des Hundes	47
G.	Eigene Untersuchungen	49
4.	Material und Methoden	49
4.1	Material	49
4.1.1	Lösungen und Puffer	49
4.1.2	Hersteller und Bezugsquellen verwendeter Materialien und Geräte	49
4.1.3	Hersteller und Bezugsquellen verwendeter Medikamente	51
4.2	Methoden	52
4.2.1	Patientengut	52
4.2.2	Anamnese, klinische Untersuchung und Blutuntersuchung	53
4.2.3	Anästhesie	54
4.2.4	Spezielle klinische und radiologische Untersuchung der Mundhöhle	54
4.2.4.1	Spezielle klinische Untersuchung der Mundhöhle mit Erhebung des Parodontalstatus	54
4.2.4.2	Radiologische Untersuchung der Mundhöhle	56
4.2.4.3	Einteilung der Parodontalerkrankung in Grade	57
4.2.5	Probenentnahme, Lagerung und Transport	60
4.2.6	Probenaufbereitung und Untersuchung	62
4.2.6.1	Aktivitätsassay	62
4.2.6.2	ELISA	65
4.2.7	Statistische Auswertung Aktivitätsassay	70

4.2.7.1	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen dem Schweregrad einer parodontalen Erkrankung und der Enzymaktivität	70
4.2.7.2	Statistische Auswertung bezüglich der Zusammenhänge zwischen Patientengruppe und Kontrollgruppe	71
4.2.7.3	Statistische Auswertung bezüglich der Einteilung der Zähne in Grade der Parodontalerkrankung und der messbaren Enzymaktivität.....	72
4.2.7.4	Statistische Auswertung bezüglich der Übereinstimmung des ermittelten klinischen und radiologischen Grades der Parodontalerkrankung für alle Zähne	73
4.2.7.5	Statistische Auswertung bezüglich der Übereinstimmung der Enzymaktivität an zwei Probenentnahmestellen	73
H.	Ergebnisse	74
5.	Ergebnisse der klinischen Untersuchungen.....	74
6.	Ergebnisse der radiologischen Untersuchungen	76
7.	Ergebnisse der statistischen Auswertung der Aktivitätsassays.....	77
7.1	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen dem Schweregrad einer parodontalen Erkrankung und der Enzymaktivität	77
7.2	Statistische Auswertung bezüglich der Zusammenhänge zwischen Patientengruppe und Kontrollgruppe	80
7.2.1	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität aller Zähne der Patientengruppe und der Kontrollgruppe nach Zahn	80
7.2.2	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität aller Zähne der Patientengruppe und der Kontrollgruppe unabhängig vom Zahn	83
7.2.3	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität der Patientengruppe und der Kontrollgruppe	85
7.2.4	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität aller Hunde der Patientengruppe mit mindestens einem Zahn mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung und aller Hunde der Kontrollgruppe	87
7.2.4.1	Statistische Auswertung bezüglich des Einflusses von Alter und Körpermasse auf die Enzymaktivität.....	89
7.3.	Statistische Auswertung bezüglich der Einteilung der Zähne in Grade der Parodontalerkrankung und der messbaren Enzymaktivität.....	91
7.4	Statistische Auswertung bezüglich der Übereinstimmung des ermittelten klinischen und radiologischen Grades der Parodontalerkrankung für alle Zähne.....	99
7.5	Statistische Auswertung bezüglich der Übereinstimmung der Enzymaktivität an zwei Probenentnahmestellen	100

8.	Ergebnisse der deskriptiven Auswertung der ELISA-Untersuchungen	102
8.1	Deskriptive Auswertung der Beziehung zwischen MMP-Gehalt und Grad der Parodontalerkrankung	102
8.2	Deskriptive Auswertung der Gehalte der verschiedenen MMPs bei Grad 1 und 2 einer Parodontalerkrankung.....	104
8.3	Deskriptive Auswertung des MMP-Gehalts bei parodontal gesunden Zähnen im Vergleich zu parodontal erkrankten Zähnen und in der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.....	105
I.	Diskussion.....	108
9.	Allgemeines	108
9.1	Studienaufbau.....	109
9.1.1	Auswahl der zu untersuchenden Zähne und Lokalisationen am Zahn.....	111
9.1.2	Probengewinnung.....	112
9.1.3	Klinische und radiologische Untersuchung	113
9.2	Labordiagnostische Untersuchungen	115
9.2.1	Messung der Aktivität von Kollagenasen und Gelatinasen	115
9.2.2	Aktivitätsassay	116
9.3	Statistische Untersuchungen zur Enzymaktivität	118
9.3.1	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen dem Schweregrad einer parodontalen Erkrankung und der Enzymaktivität	118
9.3.2	Statistische Auswertung bezüglich der Zusammenhänge zwischen Patientengruppe und Kontrollgruppe	118
9.3.2.1	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität aller Zähne der Patientengruppe und der Kontrollgruppe nach Zahn	118
9.3.2.2	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität aller Zähne der Patientengruppe und der Enzymaktivität aller Zähne der Kontrollgruppe	119
9.3.2.3	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität der Patientengruppe und der Kontrollgruppe	120
9.3.2.4	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität aller Hunde der Patientengruppe mit mindestens einem Zahn mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung und der Enzymaktivität aller Hunde der Kontrollgruppe	120
9.3.3	Statistische Auswertung bezüglich der Einteilung der Zähne in Grade der Parodontalerkrankung und der messbaren Enzymaktivität.....	122
9.3.4	Statistische Auswertung bezüglich der Übereinstimmung der Enzymaktivität an zwei Probenentnahmestellen	124

9.4	Nachweis von MMPs	125
9.4.1	ELISA.....	126
9.4.1.1	Deskriptive Auswertung der ELISA-Untersuchungen	126
9.5	Einordnung der eigenen Untersuchungsergebnisse im Vergleich mit anderen Studien zur Parodontitis des Hundes.....	129
9.6	Fazit.....	130
9.7	Klinische Schlussfolgerung	131
J.	Zusammenfassung	134
K.	Summary	136
L.	Literaturverzeichnis.....	138
M.	Anhang	154
10.	Untersuchungsergebnisse	154
10.1	Signalement und Ergebnisse der klinischen Untersuchung der Hunde	154
10.2	Darstellung der Enzymaktivitäten der unterschiedlichen Hundezähne in den Aktivitätsassays	178
10.3	Ergebnisse der Aktivitätsmessungen und klinisch-radiologischen Untersuchungen	207
10.4	Ergebnisse der statistischen Auswertung der Aktivitätsassays.....	227
10.5	MMP-Gehalt der jeweiligen Proben	246
N.	Danksagung	248

B. Abkürzungsverzeichnis

°	Grad
°C	Grad Celsius
#	Nummer
%	Prozent
α	Signifikanzniveau
a1	palatinale Probenentnahmestelle am Zahn 104
a2	bukkale Probenentnahmestelle am Zahn 104
ADAMs	A Disintegrin And Metalloproteinase
ADAMTs	ADAM with Thrombospondin type-1 motif
ALT	Alaninaminotransferase
APMA	4-Aminophenylquecksilberacetat
AUT	Österreich
b	Probenentnahmestelle am Zahn 108
BiAS	Biometrische Analyse von Stichproben
bzw.	beziehungsweise
c	Probenentnahmestelle am Zahn 409
C	Caninus
C (Befundbogen)	calculus (Zahnstein)
CA	Kalifornien
CaCl ²	Calciumchlorid
CH	Schweiz
CRP	C-reaktives Protein
d	Probenentnahmestelle am Zahn 404
DTT	Dithiothreitol
DQ	Dye-quenched (Farbstoff gelöscht)
e1	palatinale Probenentnahmestelle am Zahn 204
e2	bukkale Probenentnahmestelle am Zahn 204
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
Er:YAG-Laser	Erbium-Yttrium-Aluminium-oxid-Granat-Laser
EZM	Extrazelluläre Matrix
f	Probenentnahmestelle am Zahn 208

F (Befundbogen)	Furkationsbefall
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Probenentnahmestelle am Zahn 309
G (Befundbogen)	Gingivitis
GA	Georgia (Bundesstaat)
GCF	gingival crevicular fluid (gingivale Sulkusflüssigkeit)
ggf.	gegebenenfalls
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
h	Probenentnahmestelle am Zahn 304
H	Hund (= Patient)
I	Inzisivus
IL	Illinois (Bundesstaat)
IRL	Irland
J.	Jahr(e)
K	Kontrolltier
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
lg	Logarithmus
M	Molar
M (Befundbogen)	mobility (Mobilität)
M.	Monat(e)
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm
mg/kg/d	Milligramm pro Kilogramm und Tag
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger RNA (ribonucleic acid bzw. Ribonukleinsäure)
MT-MMPs	membrane-type MMPs (membrangebundene MMPs)
µl	Mikroliter
n	Menge der natürlichen Zahlen
NaCl	Natriumchlorid
NEM	N-Ethylmaleinimid

ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
nm	Nanometer
NY	New York (Bundesstaat)
OD	Optische Dichte
P	Prämolar
P (Befundbogen)	probing depth
PCMB	4-Chlormercuribenzoessäure
PCPE	Type I collagen C-proteinase enhancer protein
PCR	polymerase chain reaction
PD	periodontal disease (Parodontalerkrankung)
PHEN	Phenanthrolin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pro-MMP	Proform eines MMPs
R (Befundbogen)	Gingivarezession
r	Korrelationskoeffizient
r_s	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman
RECK	Reversion inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs
RLU	relative light units bzw. Fluoreszenzintensität
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
s	Sekunden
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SEM	standard error of the mean (Mittelwert mit Standardfehler)
spp.	Spezies
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TIMPs	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TFPI-2	Tissue factor pathway inhibitor 2
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	TRIS Hydrochlorid
Triton X-100	4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol
USA	United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika)
z.B.	zum Beispiel

C. **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1:	Beispiel für den Aufbau eines MMP mit einfacher Hämopexin-Domäne, als Schema dargestellt (nach EGEBLAD und WERB, 2002).....	36
Abbildung 2a:	Parodontalsonde (Aesculap) in Gebrauch, Messung der Tiefe der parodontalen Tasche.....	55
Abbildung 2b:	Parodontalsonde (Aesculap) in Gebrauch, Veranschaulichung der Tiefe der parodontalen Tasche durch Halten der Sonde oberhalb der Gingiva	55
Abbildung 3:	Entnahme gingivaler Sulkusflüssigkeit bukkal am Zahn 104 mittels Papierspitze	61
Abbildung 4:	Kreisdiagramm zur Einteilung der Gebisse der untersuchten Hunde nach Grad der Parodontalerkrankung (n=56).....	75
Abbildung 5:	Kreisdiagramm zur klinischen Einteilung der Patientenzähne nach Grad der Parodontalerkrankung (n=360)	75
Abbildung 6:	Kreisdiagramm zur radiologischen Einteilung der Patientenzähne nach Grad der Parodontalerkrankung (n=360).....	76
Abbildung 7:	Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen relativer Enzymaktivität im Gelatineassay und den Graden der Parodontalerkrankung (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum.	77
Abbildung 8:	Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Gelatineassay in RLU (relative light units) und den Graden der Parodontalerkrankung (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum.	78
Abbildung 9:	Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen relativer Enzymaktivität im Kollagenassay und den Graden der Parodontalerkrankung (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum.	79

- Abbildung 10: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Kollagenassay in RLU (relative light units) und den Graden der Parodontalerkrankung (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum. 79
- Abbildung 11: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen relativer Enzymaktivität im Gelatineassay von Patienten und Kontrollen nach Zahn (n=Anzahl an Zähnen, also für H ist n=36; für K ist n=20). H steht für Patienten, K für Kontrollen und die Buchstaben a1-h jeweils für den beobachteten Zahn. Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum. 80
- Abbildung 12: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen relativer Enzymaktivität im Kollagenassay von Patienten und Kontrollen nach Zahn (n=Anzahl an Zähnen, also für H ist n=36; für K ist n=20). H steht für Patienten, K für Kontrollen und die Buchstaben a1-h jeweils für den beobachteten Zahn. Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum. 81
- Abbildung 13: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Gelatineassay in RLU (relative light units) von Patienten und Kontrollen nach Zahn (n=Anzahl an Zähnen, also für H ist n=36; für K ist n=20). H steht für Patienten, K für Kontrollen und die Buchstaben a1-e2 jeweils für den beobachteten Zahn. Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum. 82
- Abbildung 14: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Kollagenassay in RLU (relative light units) von Patienten und Kontrollen nach Zahn (n=Anzahl an Zähnen, also für H ist n=36; für K ist n=20). H steht für Patienten, K für Kontrollen und die Buchstaben a1-e2 jeweils für den beobachteten Zahn. Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum. 83

- Abbildung 15: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen relativer Enzymaktivität im Gelatineassay bei Patienten gegenüber Kontrollen (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum..... 84
- Abbildung 16: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen relativer Enzymaktivität im Kollagenassay bei Patienten gegenüber Kontrollen (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum..... 84
- Abbildung 17: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen relativer Enzymaktivität im Gelatineassay bei Patienten gegenüber Kontrollen (n=Anzahl an Patienten). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum..... 85
- Abbildung 18: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen relativer Enzymaktivität im Gelatineassay bei Patienten mit mindestens einem Zahn mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung (ermittelt aus dem schlechtesten Befund aus klinischer und radiologischer Untersuchung) gegenüber Kontrollen (n=Anzahl an Patienten). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum. 88
- Abbildung 19: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Gelatineassay in RLU (relative light units) bei Patienten mit mindestens einem Zahn mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung (ermittelt aus dem schlechtesten Befund aus klinischer und radiologischer Untersuchung) gegenüber Kontrollen (n=Anzahl an Patienten). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum..... 89
- Abbildung 20: Balkendiagramme für die Darstellung der Beziehung zwischen relativer Enzymaktivität im Gelatineassay bei den verschiedenen klinischen Graden der Parodontalerkrankung an den Zähnen a1, e1, e2 und c (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung. 91

- Abbildung 21: Balkendiagramm für die Darstellung der Beziehung zwischen relativer Enzymaktivität im Kollagenassay bei den verschiedenen klinischen Graden der Parodontalerkrankung am Zahn e1 (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung..... 92
- Abbildung 22: Balkendiagramme für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Gelatineassay in RLU (relative light units) bei den verschiedenen klinischen Graden der Parodontalerkrankung an den Zähnen a1, d, e1 und e2 (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung..... 93
- Abbildung 23: Balkendiagramme für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Kollagenassay in RLU (relative light units) bei den verschiedenen klinischen Graden der Parodontalerkrankung an den Zähnen a1, d, e1 und e2 (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung..... 94
- Abbildung 24: Balkendiagramme für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Gelatineassay in RLU (relative light units) bei den verschiedenen radiologischen Graden der Parodontalerkrankung an den Zähnen d, e1 und h (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung..... 95
- Abbildung 25: Balkendiagramme für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Kollagenassay in RLU (relative light units) bei den verschiedenen radiologischen Graden der Parodontalerkrankung an den Zähnen d und e1 (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung..... 96

- Abbildung 26: Balkendiagramme für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Gelatineassay in RLU (relative light units) bei den verschiedenen Graden der Parodontalerkrankung (orientierend am schlechtesten Wert aus klinischer und radiologischer Untersuchung) an den Zähnen d, e1 und e2 (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung..... 97
- Abbildung 27: Balkendiagramme für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Kollagenassay in RLU (relative light units) den verschiedenen Graden der Parodontalerkrankung (orientierend am schlechtesten Wert aus klinischer und radiologischer Untersuchung) an den Zähnen d und e1 (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung..... 98
- Abbildung 28: Balkendiagramme für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Gelatineassay in RLU (relative light units) bei den verschiedenen Graden der Parodontalerkrankung nach Hund bzw. Gebiss (orientierend an dem schlechtesten Zahn des gesamten Gebisses) für die Zähne d und e2 (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung..... 99
- Abbildung 29: Balkendiagramm für die Darstellung der Übereinstimmung von klinischem und radiologischem Parodontalstatus nach Zahn (n=Anzahl an Zähnen und beträgt je Balken 56). Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung. Die Buchstaben a1-h stehen jeweils für den beobachteten Zahn..... 100
- Abbildung 30: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen relativer Enzymaktivität im Gelatineassay (linksseitig dargestellt) und im Kollagenassay (rechtsseitig dargestellt) von den Zähnen a (a1 und a2) sowie den Zähne e (e1 und e2) (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum. 101

- Abbildung 31: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Gelatineassay (linksseitig dargestellt) und im Kollagenassay (rechtsseitig dargestellt) in RLU (relative light units) von den Zähnen a (a1 und a2) sowie den Zähne e (e1 und e2) (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum..... 101
- Abbildung 32: Balkendiagramme für die Darstellung der Beziehung zwischen MMP-Gehalt in ng/ml (Nanogramm pro Milliliter) und den verschiedenen Graden der Parodontalerkrankung (ermittelt aus dem schlechtesten Befund aus klinischer und radiologischer Untersuchung; n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung..... 103
- Abbildung 33: Balkendiagramm für die Darstellung der Beziehung zwischen MMP-Gehalt in ng/ (Nanogramm pro Milliliter) bei Zähnen mit Grad 1 einer Parodontalerkrankung (ermittelt aus dem schlechtesten Befund aus klinischer und radiologischer Untersuchung; n=Anzahl an Zähnen) und den verschiedenen untersuchten MMPs. Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung. 104
- Abbildung 34: Balkendiagramm für die Darstellung der Beziehung zwischen MMP-Gehalt in ng/ (Nanogramm pro Milliliter) bei Zähnen mit Grad 2 einer Parodontalerkrankung (ermittelt aus dem schlechtesten Befund aus klinischer und radiologischer Untersuchung; n=Anzahl an Zähnen) und den verschiedenen untersuchten MMPs. Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung. 104
- Abbildung 35: Kastengrafiken für die vergleichende Darstellung der Beziehung zwischen MMP-Gehalt in ng/ml (Nanogramm pro Milliliter) und den Graden 0 sowie 1-4 der Parodontalerkrankung (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum. 105

Abbildung 36: Kastengrafiken für die Darstellung der Beziehung zwischen MMP-Gehalt in ng/ml (Nanogramm pro Milliliter) bei Patientenzähnen (unabhängig vom Grad der Parodontalerkrankung) im Vergleich zu Kontrollzähnen (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum.	106
Abbildung 37: Dentaler Befundbogen mit Zahndiagramm für den erwachsenen Hund nach TUTT (2006) modifiziert	157
Abbildung 38: Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden H1-H8.....	178
Abbildung 39: Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden H9-H16.....	179
Abbildung 40: Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden H17-H24.....	180
Abbildung 41: Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden H25-H32.....	181
Abbildung 42: Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden H33-H36 und K1-K4	182
Abbildung 43: Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden K5-K14	183
Abbildung 44: Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden K15-K22	184
Abbildung 45: Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden H1-H8.....	185
Abbildung 46: Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden H9-H16	186
Abbildung 47: Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden H17-H24	187
Abbildung 48: Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden H25-H32	188
Abbildung 49: Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden H32-H36 und K1-K4	189

Abbildung 50:	Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden K5-K14	190
Abbildung 51:	Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden K15-K22	191
Abbildung 52:	Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden H1-H8	192
Abbildung 53:	Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden H9-H16	193
Abbildung 54:	Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden H17-H24	194
Abbildung 55:	Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden H25-H32	195
Abbildung 56:	Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden H32-H36 und K1-K4	196
Abbildung 57:	Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden K5-K14	197
Abbildung 58:	Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden K14-K22	198
Abbildung 59:	Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden H1-H8	199
Abbildung 60:	Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden H9-H16	200
Abbildung 61:	Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden H16-H24	201
Abbildung 62:	Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden H25-H32	202
Abbildung 63:	Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden H33-H36 und K1-K4	203
Abbildung 64:	Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden K5-K14	204
Abbildung 65:	Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden K15-K22	205

Abbildung 66: Legende zu den in den Abbildungen 38-65 verwendeten Zeichen,
diese repräsentieren die Zähne a1-h..... 206

D. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Einteilung ausgewählter MMPs nach ihrer Substratspezifität (BOSMAN und STAMENKOVIC, 2003; VISSE und NAGASE, 2003)	32
Tabelle 2:	Auflistung und Einteilung der bisher bei Wirbeltieren nachgewiesenen Matrix-Metalloproteinasen (EGEBLAD und WERB, 2002; ALLDINGER, 2009).....	33
Tabelle 3:	Legende zu Abbildung 1.....	36
Tabelle 4:	Gradeinteilung der furkalen Freilegung (nach EICKHOFF, 2005; GORREL, 2006).....	56
Tabelle 5:	Radiologischer Parodontalindex (nach EICKHOFF, 2005; MIHALJEVIĆ, 2010).....	57
Tabelle 6:	Einteilung der Parodontalerkrankung nach Schweregrad (WOLF et al., 2005; EICKHOFF, 2005; AVDC, 2016)	59
Tabelle 7:	Übersicht über die untersuchten Hunde.....	154
Tabelle 8:	Aufstellung der klinischen Untersuchungsergebnisse der beprobten Zähne	158
Tabelle 9:	Auflistung der Enzymaktivitäten und des Parodontalstatus nach beprobtem Zahn.....	207
Tabelle 10:	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen dem Schweregrad einer parodontalen Erkrankung nach Zahn und der maximalen Gelatinase-Aktivität, relative Werte	227
Tabelle 11:	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen dem Schweregrad einer parodontalen Erkrankung nach Zahn und der maximalen Kollagenase-Aktivität, relative Werte.....	227
Tabelle 12:	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen dem Schweregrad einer parodontalen Erkrankung nach Zahn und der maximalen Gelatinase-Aktivität, absolute Werte	228
Tabelle 13:	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen dem Schweregrad einer parodontalen Erkrankung nach Zahn und der maximalen Kollagenase-Aktivität, absolute Werte.....	228

Tabelle 14:	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der relativen Enzymaktivität aller Zähne der Patientengruppe und der Kontrollgruppe nach Zahn.....	229
Tabelle 15:	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der absoluten Enzymaktivität aller Zähne der Patientengruppe und der Kontrollgruppe nach Zahn.....	230
Tabelle 16:	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der relativen Gelatinaseaktivität aller Zähne der Patientengruppe und der Kontrollgruppe unabhängig vom Zahn.....	231
Tabelle 17:	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der relativen Kollagenaseaktivität aller Zähne der Patientengruppe und der Kontrollgruppe unabhängig vom Zahn.....	231
Tabelle 18:	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der absoluten Gelatinaseaktivität aller Zähne der Patientengruppe und der Kontrollgruppe unabhängig vom Zahn.....	231
Tabelle 19:	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der absoluten Kollagenaseaktivität aller Zähne der Patientengruppe und der Kontrollgruppe unabhängig vom Zahn.....	231
Tabelle 20:	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der relativen Gelatinaseaktivität der Patientengruppe und der Kontrollgruppe.....	232
Tabelle 21:	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der relativen Kollagenaseaktivität der Patientengruppe und der Kontrollgruppe.....	232
Tabelle 22:	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der absoluten Gelatinaseaktivität der Patientengruppe und der Kontrollgruppe.....	232
Tabelle 23:	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der absoluten Kollagenaseaktivität der Patientengruppe und der Kontrollgruppe.....	232
Tabelle 24:	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der relativen Gelatinaseaktivität aller Hunde der Patientengruppe mit mindestens einem Zahn mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung und aller Hunde der Kontrollgruppe.....	233

Tabelle 25:	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der relativen Kollagenaseaktivität aller Hunde der Patientengruppe mit mindestens einem Zahn mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung und aller Hunde der Kontrollgruppe.....	233
Tabelle 26:	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der absoluten Gelatinaseaktivität aller Hunde der Patientengruppe mit mindestens einem Zahn mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung und aller Hunde der Kontrollgruppe.....	233
Tabelle 27:	Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der absoluten Kollagenaseaktivität aller Hunde der Patientengruppe mit mindestens einem Zahn mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung und aller Hunde der Kontrollgruppe.....	233
Tabelle 28:	Statistische Auswertung bezüglich des Einflusses des Alters auf die relative Enzymaktivität.....	234
Tabelle 29:	Statistische Auswertung bezüglich des Einflusses der Körpermasse auf die relative Enzymaktivität.....	234
Tabelle 30:	Statistische Auswertung bezüglich des Einflusses des Alters auf die absolute Enzymaktivität.....	234
Tabelle 31:	Statistische Auswertung bezüglich des Einflusses der Körpermasse auf die absolute Enzymaktivität.....	234
Tabelle 32:	Statistischer Zusammenhang zwischen klinischem Grad der Parodontalerkrankung nach Zahn und relativer Enzymaktivität	235
Tabelle 33:	Statistischer Zusammenhang zwischen radiologischem Grad der Parodontalerkrankung nach Zahn und relativer Enzymaktivität	236
Tabelle 34:	Statistischer Zusammenhang zwischen Gesamt-Grad der Parodontalerkrankung nach Zahn (orientierend am schlechtesten Befund aus klinischer und radiologischer Untersuchung) und relativer Enzymaktivität	237
Tabelle 35:	Statistischer Zusammenhang zwischen Grad der Parodontalerkrankung nach Hund (orientierend am schlechtesten Befund Einzelzahnbefund eines Gebisses) und relativer Enzymaktivität	238

Tabelle 36:	Statistischer Zusammenhang zwischen klinischem Grad der Parodontalerkrankung nach Zahn und absoluter Enzymaktivität	239
Tabelle 37:	Statistischer Zusammenhang zwischen radiologischem Grad der Parodontalerkrankung nach Zahn und absoluter Enzymaktivität	240
Tabelle 38:	Statistischer Zusammenhang zwischen Gesamt-Grad der Parodontalerkrankung nach Zahn (orientierend am schlechtesten Befund aus klinischer und radiologischer Untersuchung) und absoluter Enzymaktivität	241
Tabelle 39:	Statistischer Zusammenhang zwischen Grad der Parodontalerkrankung nach Hund (orientierend am schlechtesten Befund Einzelzahnbefund eines Gebisses) und absoluter Enzymaktivität	242
Tabelle 40:	Statistische Auswertung bezüglich der Übereinstimmung des ermittelten klinischen und radiologischen Grades der Parodontalerkrankung für alle Zähne	243
Tabelle 41:	Statistische Auswertung bezüglich der Übereinstimmung der relativen Enzymaktivität an zwei Probenentnahmestellen.....	244
Tabelle 42:	Statistische Auswertung bezüglich der Übereinstimmung der absoluten Enzymaktivität an zwei Probenentnahmestellen.....	245
Tabelle 43:	Tabelle zu den Gehalten an MMP-2, -3, -8 und -9 der verschiedenen Proben.....	246

E. Einleitung

Die Mundhöhle dient in erster Funktion der Nahrungsaufnahme. Dem Aufnehmen, Zerkleinern und Einspeichern des Futters (KÖNIG et al., 2012; THOMÉ, 2004). Daneben hat sie eine Vielzahl weiterer Aufgaben, wie Kommunikation und Erfassen der Umwelt, sie dient der Verteidigung bei Auseinandersetzungen und der Fellpflege (FAHRENKRUG, 2007). All diese Aufgaben können nur bei intakter Mundhöhlengesundheit erfolgen. In einer Studie von KYLLAR und WITTER (2005) zeigen über 80% der adulten Hunde eine Erkrankung im Bereich der Mundhöhle. 60% der adulten Hunde haben eine Parodontitis. Es handelt sich bei der Parodontitis um die häufigste Mundhöhlenerkrankung beim Hund. Die Gesundheit der Maulhöhle ist auch für das Wohlbefinden und die systemische Gesundheit der Tiere von enormer Bedeutsamkeit (FAHRENKRUG, 2007; KYLLAR und WITTER, 2005; NIEMIEC, 2013).

Die Parodontitis ist eine Erkrankung des Zahnhalteapparates, welche bei ausbleibender Therapie progressiv verläuft und zur Lockerung der Zähne und somit zu Schmerzen und Leiden führt (GORREL, 2006). Ihre Bedeutung wird vom Besitzer häufig unterschätzt, da viele Tiere trotz hochgradiger oraler Befunde eine ungestörte Nahrungsaufnahme zeigen und Halitosis von vielen Tierbesitzern nicht als ernst zu nehmendes Symptom erkannt wird (GORREL, 2006). Bei der Parodontitis handelt es sich um ein polyfaktorielles entzündliches Geschehen, welches primär durch Bakterien bedingt ist (GORREL, 2006). Im Fortschreiten kommt es durch die wirtseigene Abwehr zum Abbau von Kollagen und zur Osteolyse (NIEMIEC, 2013). Es gibt verschiedenen Arten von Parodontitiden (chronisch, aggressiv, nekrotisierend, etc.) (EICKHOFF, 2005). In der vorliegenden Arbeit ist mit Parodontitis, wenn nicht anders ausgewiesen, die chronische Form gemeint.

Die Parodontitis ist in der Humanmedizin eine weit erforschte Erkrankung, in der Tiermedizin gibt es bislang wenige Studien. Das Interesse an ihrer Erforschung hat auf Grund von wirtschaftlichem Interesse und der komplexen medizinischen Versorgung von Haustieren, vor allem Hund und Katze, in den letzten Jahren zugenommen. Zudem wurde eine Beziehung zwischen parodontalen Erkrankungen und anderen Organerkrankungen festgestellt (CULLINAN et al., 2009).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Aktivität von Gelatinasen und Kollagenasen wie z.B. den Matrix-Metalloproteinasen in der gingivalen Sulkusflüssigkeit sollen Aufschluss darüber geben, ob bei erkrankten Individuen im

Vergleich zu gesunden bzw. bei verschiedenen Stadien der Erkrankung eine unterschiedliche Aufregulierung der Proteasen vorliegt. Diese Aufregulierung wird vermutet, da hier Gewebe um- bzw. abgebaut wird (LEE et al., 1995; KUBOTA et al., 1996; TERVAHARTIALA et al., 2000; MARCACCINI et al., 2009).

In dieser Studie sollen die gelatinolytische und kollagenolytische Aktivität mittels Aktivitätsassay sowie das Vorliegen und der Gehalt von ausgewählten Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) in der gingivalen Sulkusflüssigkeit bei zahngesunden Hunden und bei, in unterschiedlichen Graden, an Parodontitis erkrankten Hunden mittels ELISA untersucht werden. Eine entsprechende Untersuchung liegt in der Veterinärmedizin bisher nicht vor.

Wenn die Aufregulierung der MMPs im pathophysiologischen Zusammenhang nachgewiesen werden kann, ist dies eine Stelle der Pathogenese, an der eine übermäßige Aktivität von MMPs mit geeigneten Methoden gezielt gehemmt werden könnte. Ein Fernziel dieser Arbeit könnte es also sein eine therapeutische Anwendung durch die gewonnenen Erkenntnisse zu verbessern.

F. Literaturübersicht

1 Anatomie der Mundhöhle, der Gingiva, der Zähne, des Zahnhalteapparates und des gingivalen Sulkus

1.1 Anatomie der Mundhöhle

Die Mundhöhle dient beim Hund wie bei uns Menschen der Nahrungsaufnahme, -zerkleinerung und -einspeichelung (THOMÉ, 2004; KÖNIG et al., 2011). Sie ist der erste Abschnitt des Verdauungstraktes, an den sich die Schlundkopfhöhle, als die Verbindung zur Speiseröhre, anschließt (THOMÉ, 2004; KÖNIG et al., 2011). Am Kauvorgang beteiligt sind neben den Zähnen auch die Zunge, die Speicheldrüsen, die Kaumuskulatur und das Kiefergelenk (KÖNIG et al., 2011).

Die Form und die Größe der Mundhöhle sind rasseotypisch. Bei kurzköpfigen (*brachycephalen*) Hunderassen ist sie kurz und breit, bei langköpfigen (*dolichocephalen*) Hunderassen lang und schmal. Die Mundöffnung hingegen stellt sich rasseübergreifend auf Grund der Zugehörigkeit zur Ordnung der Raubtiere als groß dar (THOMÉ, 2004).

Man unterteilt die Mundhöhle in die eigentliche Mundhöhle (*Cavum oris proprium*) und den Vorhof (*Vestibulum oris*). Diese kommunizieren lediglich interdental und im Bereich hinter den letzten Backenzähnen (EVANS und DE LAHUNTA, 2013; SALOMON, 2015). Der Vorhof ist in Lippen- und Backenvorhof unterteilt und befindet sich dementsprechend zwischen Lippen bzw. Backen und dem Zahnfleisch samt Zähnen (THOMÉ, 2004; EVANS und DE LAHUNTA, 2013). Die eigentliche Mundhöhle ist der Teil, welcher von den Zahnbögen des Ober- und Unterkiefers begrenzt wird (THOMÉ, 2004). In ihr befindet sich die Zunge, welche die eigentliche Mundhöhle in geschlossenem Zustand fast vollständig ausfüllt (THOMÉ, 2004; EVANS und DE LAHUNTA, 2013). Die Begrenzung der Mundhöhle wird zum einen knöchern gebildet durch die Mandibula, sowie die Maxilla mit den Fortsätzen des Gaumenbeins (*Os palatinum*) und des Zwischenkieferbeins (*Os incisivum*), zum anderen durch weichgewebige Strukturen wie den weichen Gaumen, die Zunge und den sublingualen Mundhöhlenboden (EVANS und DE LAHUNTA, 2013).

Die knöchernen Anteile werden von der gut durchbluteten, mehrschichtigen Mundschleimhaut bedeckt (THOMÉ, 2004; LIEBICH, 2010; KÖNIG et al., 2011; SALOMON, 2015). Im Bereich der Zähne werden die Alveolarfortsätze der Kieferknochen von einem mehrschichtigen, geringgradig verhornten Zahnfleisch

(*Gingiva*), einer Modifikation der Mundschleimhaut, bedeckt. Die *Gingiva* ist, wie auch die Mundschleimhaut, drüsenlos und blassrosa oder teilweise bis vollständig pigmentiert. Durch straffe kollagene Fasern besteht eine enge Verbindung zwischen ihrer Mukosa und dem Periost der Alveolarfortsätze und dem Zement der Zähne (ELLENBERGER und BAUM, 1943; THOMÉ, 2004; LIEBICH, 2010; KÖNIG et al., 2011; SALOMON, 2015). Es besteht eine unbegrenzte Wundheilung (ELLENBERGER und BAUM, 1943; SALOMON, 2015).

Beim Hund findet die Speichelproduktion über die großen und die kleinen Speicheldrüsen statt. Zu den Großen gehören dabei die Ohrspeicheldrüse, die Unterkieferspeicheldrüse, die Unterzungenspeicheldrüsen und die dorsale Backendrüse, welche allerdings in den Vorhof mündet (THOMÉ, 2004; EVANS und DE LAHUNTA, 2013).

1.1.1 Vergleichende Anatomie der Zähne der Haussäugetiere

Die Summe der Zähne bildet das Gebiss. Die Gebissform steht in enger Beziehung zum Ernährungstypus (THOMÉ, 2004; SALOMON, 2015).

Der Kauvorgang wird passiv über die Zähne und aktiv über die Kaumuskulatur ausgeführt. Die Zähne innerhalb eines Gebisses besitzen je nach Funktion eine unterschiedliche Form, was als Heterodontie bezeichnet wird (ELLENBERGER und BAUM, 1943).

Anzahl, Form und Gruppierung der Zähne sind arttypisch (THOMÉ, 2004). Allen Arten gemein ist der Aufbau der Zähne, bestehend aus Krone, Wurzel und einem mehr oder weniger ausgeprägtem Hals (STASZYK, 2011; SALOMON, 2015). Die Krone ist der freie Abschnitt, welcher sichtbar in der Mundhöhle liegt und je nach Tierart eine unterschiedliche Länge aufweist. Der Hals wird von Zahnfleisch bedeckt und geht als Einschnürung in die Wurzel über, welche im knöchernen Zahnfach (Alveole) von Ober- und Unterkiefer oder Os incisivum liegt (ELLENBERGER und BAUM, 1943; THOMÉ, 2004; LIEBICH, 2010). Bei Tierarten ohne brachyodonte (kurzkronige) Zähne kann die Unterscheidung Krone – Hals – Wurzel nicht an Hand der Lage der Zahnanteile, sondern nur an Hand der Hartsubstanzen, aus denen sie aufgebaut sind, getroffen werden (STASZYK, 2011).

Die Lagebezeichnungen unterscheiden sich in der Mundhöhle von denen anderer Lokalisationen. Somit wird die dem Vestibulum oris zugewandte Fläche als *Facies vestibularis* (*labialis* oder *buccalis*) bezeichnet, die zum Cavum oris proprium gerichtete Fläche im Oberkiefer als palatinal, im Unterkiefer als lingual. Die

Kontaktfläche zum Gegenspieler wird als *Facies occlusalis* bezeichnet, die zum Nachbarzahn als *Facies contactus*, dabei wird die nach rostral gerichtete Fläche als mesial und die nach kaudal gerichtete Fläche als distal bezeichnet (THOMÉ, 2004; KÖNIG et al., 2011; STASZYK, 2011; SALOMON, 2015).

Die Zähne bestehen aus drei mineralisierten Materialien. Die Grundsubstanz jedes Zahnes ist das gelblich-weiße Zahnbein (*Dentinum*) (ELLENBERGER und BAUM, 1943). Dieses wird ein Leben lang von Odontoblasten in der Pulpahöhle produziert und ist eng verwandt mit Knochen (FAHRENKRUG, 2007; STASZYK, 2011). Dentin ist härter als Knochen. In ihm verlaufen Nervenkanälchen mit freien sensorischen Nervenendigungen und den Fortsätzen der Odontoblasten (FAHRENKRUG, 2007; STASZYK, 2011; SALOMON, 2015). Das Dentin bei Zahndurchbruch wird als Primärdentin bezeichnet, das später Richtung Pulpahöhle angelagerte Dentin ist bräunlicher, weniger stabil und wird Sekundärdentin genannt (SALOMON, 2015). Mit zunehmendem Alter wird immer mehr Sekundärdentin pulpahöhlenwärts gebildet und es kommt somit zu einer Verkleinerung der Pulpahöhle und der Zahn wird stabiler (FAHRENKRUG, 2007; KÖNIG et al., 2011). Das Dentin ist im freien Teil des Zahnes, der Zahnkrone, von rein weißem Zahnschmelz bedeckt (THOMÉ, 2004; SALOMON, 2015).

Der Schmelz bildet faltenartige Einkerbungen in das Dentin und bildet somit schmelzfaltige Zähne oder er sitzt dem Dentin bei schmelzhöckerigen Zähnen kappenartig auf (ELLENBERGER und BAUM, 1943; THOMÉ, 2004; SALOMON, 2015). Hierbei können zusätzlich schmelzeinhöckerige von schmelzmehrhöckerigen Zähnen unterschieden werden (ELLENBERGER und BAUM, 1943; THOMÉ, 2004). Der Zahnschmelz ist die härteste Substanz im Körper, er ist zellfrei und besteht aus Schmelzprismen, welche von Ameloblasten in der Fetalentwicklung und den ersten 12-16 Lebenswochen gebildet werden und ist somit nicht regenerationsfähig (FAHRENKRUG, 2007; LIEBICH, 2010; SALOMON, 2015). Der Schmelz ist vom Schmelzoberhäutchen überzogen (THOMÉ, 2004). Dieses ist besonders stabil und liegt als dünne Schicht der Schmelzoberfläche auf (SALOMON, 2015).

Das Dentin ist im Bereich der Zahnwurzel von gelblich-braunem Zahnzement bedeckt. Dieses ähnelt der Knochensubstanz, ist jedoch nicht durchblutet oder innerviert und wird von den Zementoblasten gebildet (LINDHE und KARRING, 1999; THOMÉ, 2004). Das primäre Zement wird zusammen mit der Zahnwurzel gebildet, das sekundäre Zement wird im Lauf des Lebens auf der Wurzeloberfläche gebildet

und dient der Reparatur von Defekten (LINDHE und KARRING, 1999). Das Zement geht über die Wurzelhaut, *Ligamentum periodontale*, eine enge Verbindung mit der Alveolarwand ein (ELLENBERGER und BAUM, 1943). Es dient der Verankerung des Zahns in der knöchernen Alveole und gehört somit zum Zahnhalteapparat (FAHRENKRUG, 2007).

Im Inneren des Zahns befindet sich die durch das Dentin gebildete Pulpahöhle (*Cavum dentis*). Dies ist ein Hohlraum, welcher mit lockerem Bindegewebe, Blutgefäßen und Nervenfasern ausgefüllt ist. Zur Wurzelspitze hin verjüngt sich die Pulpahöhle und bildet einen Wurzelkanal, welcher nach apikal hin geöffnet den Aus- bzw. Eintritt von Nerven und Gefäßen ermöglicht (ELLENBERGER und BAUM, 1943; THOMÉ, 2004; STASZYK, 2011). Bei den meisten Tierarten ist die Pulpahöhle zunächst weit, mit fortschreitendem Alter kommt es zur Bildung von Sekundärdentin und Verkleinerung der Pulpahöhle, sodass nur noch ein feiner Wurzelkanal bleibt oder die gesamte Pulpahöhle von Dentin ausgefüllt ist (ELLENBERGER und BAUM, 1943). Die Nerven treten außerdem, in feinen Nervenkanälen liegend, in das Dentin über (KÖNIG et al., 2011). Im Laufe des Lebens kommt es zu einer unterschiedlich starken Abnutzung der verschiedenen Mineralschichten (ELLENBERGER und BAUM, 1943).

1.1.1.1 Nomenklatur

In der Tiermedizin werden die Zähne mit Hilfe des Zahnschemas nach Triadan (1972) und Floyd (1991) benannt (STASZYK, 2011). Das Zahnschema nach Triadan und Floyd benutzt eine Abfolge von je drei Ziffern, um einen Zahn zu benennen. Die erste Ziffer bezeichnet den Kieferquadranten. Die Zahl „1“ steht für den rechten Oberkiefer, die Zahl „2“ für den linken Oberkiefer, die Zahl „3“ für den linken Unterkiefer und die Zahl „4“ für den rechten Unterkiefer. Die folgenden zwei Ziffern stehen für den jeweiligen Zahn und bezeichnen mit 01 jeweils den ersten Schneidezahn. Im Zahnbogen nach distal wird dann fortlaufend gezählt. Bei den Milchzähnen verwendet man an Stelle der Ziffern 1-4 die Ziffern 5-8 für die Kieferquadranten (STASZYK, 2011). Das Schema dient sowohl der Befunderhebung als auch der Dokumentation.

1.1.2 Anatomie der Hundezähne

1.1.2.1 Aufbau des Hundegebisses

Bei der Tierart Hund gibt es große rassetypische Unterschiede, welche sich nicht nur auf die Form des Gebisses beziehen, sondern auch auf die Anzahl und die Stellung der Zähne. So kann die Mundhöhle kurz sein, mit eng stehenden Zähnen (brachycephale Tiere), sehr lang (dolichocephale Tiere) oder auch durchschnittlich (mesozephale Tiere) (THOMÉ, 2004). Bei den brachycephalen Rassen kommt es häufig zu Zahnfehlstellungen wie Kulissenbildung (Querstellung der Zähne), vor allem im Bereich der P3 und P4, teilweise fehlen Zähne auch vollständig (THOMÉ, 2004; GORREL, 2006).

Das Gebiss des Hundes besteht aus schmelzhöckerigen Zähnen mit kurzer Krone und langer Wurzel mit abgeschlossenem Wachstum, was als Brachyodontie bezeichnet wird (THOMÉ, 2004). Hunde haben ein heterodontes Gebiss, man unterscheidet je nach Gebissregion und Funktion die Schneidezähne, die Eckzähne und die vorderen und hinteren Mahlzähne (SALOMON, 2015).

Die Schneidezähne (*Dentes incisivi*) (I1-I3) sind in jedem Quadranten als Dreiergruppe vorhanden. Sie liegen am weitesten rostral im Os incisivum der Maxilla bzw. in der Mandibula. Sie lassen sich deutlich in Zahnkrone, Zahnhals und Wurzel gliedern. Die Größe der Inzisiven nimmt von mesial nach distal zu, die des Os incisivum sind größer, als die Unterkieferschneidezähne. Die Schneidezähne sind in ihrer Krone mehr oder weniger gelappt (BEZUIDENHOUT, 2003; THOMÉ, 2004; SALOMON, 2015). Der dritte Schneidezahn im Oberkiefer ist annähernd dreieckig geformt und seine Wurzelspitze reicht nah an die Nasenhöhle (BEZUIDENHOUT, 2003; THOMÉ, 2004).

Die Eckzähne (*Dentes canini*) (C) sind die längsten Zähne, die im Gebiss vorkommen. Beim Hund sind sie kräftig ausgebildet und werden als Fangzähne bezeichnet (SALOMON, 2015). Es fehlt die ausgeprägte Einziehung im Bereich des Zahnhalses. Sie sind einwurzelig, wobei die Wurzeln deutlich länger sind als die Kronen und mit ihren Spitzen bis über die Alveolen des ersten und zweiten Prämolaren hinweg reichen (THOMÉ, 2004; SALOMON, 2015). Die Oberkiefereckzähne sind etwas kräftiger und ihre Wurzeln sind lediglich durch eine zarte Knochenlamelle von der Nasenhöhle getrennt (BEZUIDENHOUT, 2003; THOMÉ, 2004). Die Zahnkronen zeigen eine geringgradig bogenförmige Krümmung nach distal. Die Eckzähne des Unterkiefers gleiten bei Kieferschluss in das Diastema

zwischen drittem Inzisivus und Caninus des Oberkiefers (BEZUIDENHOUT, 2003; THOMÉ, 2004).

Vier Prämolaren (*Dentes praemolares*) (P1 bis P4) kommen beim Hund in jedem Quadranten in Ober- und Unterkiefer vor. Diese Zähne zeigen eine deutliche Gliederung in Krone, Basalwulst (Cingulum) und kräftige Wurzeln (THOMÉ, 2004). Die Prämolaren nehmen von mesial nach distal an Größe zu (SALOMON, 2015). Die ersten Prämolaren haben eine geringe Größe und sind einwurzelig. Die weiter distal befindlichen zweiten und dritten Prämolaren des Ober- und Unterkiefers und auch die vierten Prämolaren des Unterkiefers sind zweiwurzelig. Sie zeigen eine seitliche Abflachung, nehmen somit eine längsovale Form an und besitzen eine dreihöckrige Krone. Der vierte Prämolare des Oberkiefers besitzt drei Wurzeln, welche mesiobukkal, distobukkal und mesiopalatinal liegen. Seine Krone besitzt dementsprechend drei Höcker. Er ist der kräftigste Zahn im Hundegebiss (THOMÉ, 2004).

Bei Hunden befinden sich auf jeder Seite des Oberkiefers zwei Molaren (*Dentes molares*) (M1, M2), im Unterkiefer auf jeder Seite je drei Molaren (M1 bis M3). Die Molaren nehmen nach distal an Größe ab (THOMÉ, 2004; SALOMON, 2015). Der M1 im Unterkiefer ist ein kräftiger Zahn. Er hat zwei Wurzeln und trägt einen größeren mesialen und einen kleineren distalen Höcker. Dagegen ist der M2 des Unterkiefers von deutlich geringerer Größe, aber ebenfalls zweiwurzelig. Der darauffolgende M3 ist noch kleiner ausgeprägt, besitzt nur eine Wurzel und hat keinen Gegenspieler im Oberkiefer (THOMÉ, 2004). Der M1 des Oberkiefers ist kräftig ausgeprägt und hat drei Wurzeln. Der palatinale Anteil bildet eine Okklusionsfläche. Der distal folgende M2 ist kleiner, dreiwurzelig und mit einer flachhöckrigen Kaufläche ausgestattet (THOMÉ, 2004).

Als funktionelle Zähne werden die Reißzähne und die Fangzähne bezeichnet. Diese machen das Carnivorengebiss aus. Sie sind in jedem Fall erhaltungswürdig. Die Reißzähne werden von dem vierten Prämolaren im Oberkiefer und dem ersten Molaren im Unterkiefer als Antagonisten gebildet (ELLENBERGER und BAUM, 1943). Es handelt sich um tuberkulosektorale Zähne, welche die Grundlage für das schneidende (sekodont) Gebiss des Hundes bilden. Bei Kieferschluss gleitet der Oberkieferreißzahn über die bukkale Fläche des Unterkieferreißzahns und kann dabei die Beutestücke zerkleinern, was der Vorbereitung des Schluckaktes dient

(SALOMON, 2015). Die kräftigen Eckzähne werden auch als Fangzähne bezeichnet und dienen dem Beutefang bzw. dem Ergreifen der Nahrung.

Hunde haben 42 Zähne im adulten Gebiss. Das Gebiss ist bilateral symmetrisch aufgebaut, die Zahnformel setzt sich je Kieferhälfte wie folgt zusammen:

$$\frac{3 I \quad 1 C \quad 4 P \quad 2 M}{3 I \quad 1 C \quad 4 P \quad 3 M} = 42 \text{ Zähne}$$

(SALOMON, 2015; THOMÉ, 2004).

1.1.2.2 Okklusion im Hundegebiss

Physiologischerweise zeigt das Hundegebiss eine Anisognathie. Der Unterkieferzahnbogen ist schmaler als der Oberkieferzahnbogen was zur Folge hat, dass bei Kieferschluss die palatinale Fläche der Oberkieferzähne entlang der vestibularen Fläche der Unterkieferzähne entlanggleitet. Dies äußert sich vor allem im Bereich der Reißzähne, wo es zu schneidenden Kaubewegungen kommt, indem die palatinale Fläche des vierten Oberkiefer Prämolaren beim Kauvorgang in Kontakt mit der bukkalen Fläche des ersten Molaren im Unterkiefer steht. Man spricht von einem sekodonten Gebiss. Die Kaubewegung ist allein vertikal (THOMÉ, 2004; SALOMON, 2015).

Die physiologische Okklusion besteht in einem Scherenbiss. Dabei stehen bei geschlossenem Kiefer die labialen Flächen der Unterkieferschneidezähne hinter den palatinalen Flächen der Oberkieferschneidezähne. Der Eckzahn im Unterkiefer trifft genau in die Lücke zwischen Oberkiefer Eckzahn und dem dritten Schneidezahn. Der erste Seitenzahn ist der erste Prämolare im Unterkiefer. Die vorderen Prämolaren stehen auch bei Kieferschluss nicht in Kontakt. Die Prämolaren von Ober- und Unterkiefer sind so angeordnet, dass ein Zahn aus dem Oberkiefer in den Bereich zwischen zwei Zähnen des Unterkiefers beißt (BEZUIDENHOUT, 2003; THOMÉ, 2004).

Der M1 des Oberkiefers okkludiert zum Teil mit dem M1 und mit dem M2 im Unterkiefer. Der M3 bleibt ohne Antagonisten (THOMÉ, 2004).

1.1.2.3 Dentition

Haussäugetiere sind diphyodont, sie bilden zwei Generationen an Zähnen aus. Es kommt zu einem einmaligen Wechsel der jugendlichen Milchzähne (*Dentes decidui*) zu den bleibenden Zähnen (*Dentes permanentes*) des Ersatzgebisses, welches als Ersatz für die Milchzähne dient oder auch Zähne enthält, welche nur einmalig durchbrechen (ELLENBERGER und BAUM, 1943; THOMÉ, 2004; SALOMON,

2015). Schneidezähne, Eckzähne und die vorderen Backenzähne haben, bis auf den ersten Prämolaren, alle Vorläufer im Milchgebiss. Die Molaren haben keine Vorläufer im Milchgebiss (THOMÉ, 2004; SALOMON, 2015).

Das Milchgebiss des Haushundes besteht aus 28 Zähnen, welche feiner und spitzer sind als die permanenten Zähne (THOMÉ, 2004; EICKHOFF, 2012; SALOMON, 2015). Die Wurzeln sind insgesamt schwächer. Zahndurchbruch und -wechsel erfolgen schrittweise und rassespezifisch, allerdings bestehen auch individuelle Unterschiede. Bei kleineren Hunderassen kommt es später zum Zahnwechsel und dieser ist häufiger mit Problemen wie Milchzahnpersistenz verbunden (THOMÉ, 2004; EICKHOFF, 2012). Das Milchgebiss ist als Kauapparat voll funktionstüchtig und durch seine geringere Zahnanzahl den kleineren Kieferverhältnissen angepasst (THOMÉ, 2004; SALOMON, 2015). Die Milchzähne dienen als Platzhalter für die bleibenden Zähne (SALOMON, 2015).

Die Zahnformel im Milchgebiss lautet wie folgt:

$$\frac{3 I \quad 1 C \quad 3 P}{3 I \quad 1 C \quad 3 P} = 28 \text{ Zähne}$$

$$3 I \quad 1 C \quad 3 P$$

(KÖNIG et al., 2011).

1.1.3 Anatomie des Zahnhalteapparates

Der Begriff Zahnhalteapparat oder *Parodontium* bezeichnet alle Strukturen, die der Verankerung des Zahnes in der Alveole dienen. Er setzt sich aus dem Zahnfleisch, dem parodontalen Ligament, dem Wurzelzement und dem periostausgekleideten Zahnfach des Alveolarknochens zusammen (GORREL, 2006; LIEBICH, 2010; SALOMON, 2015).

Das Wurzelzement dient als zahneigene Struktur der Verankerung des Zahns im Zahnfach (FAHRENKRUG, 2007). Eine genauere Beschreibung erfolgte bereits in Kapitel 1.1.1. Der Parodontalspalt (Desmodontalspalt) ist lokalisiert zwischen dem Wurzelzement des Zahnes und dem Alveolarknochen. Dieser Spalt verschmälert sich durch die lebenslange Zementproduktion mit zunehmendem Alter. Im Parodontalspalt befindet sich das Parodont, welches je nach Author als Ligamentum periodontale (STASZYK, 2011), als Desmodont (BUCHER und WARTENBERG, 1997) oder als Periodontium oder Wurzelhaut (LIEBICH, 2010) bezeichnet wird.

Die Wurzelhaut besteht aus Bindegewebe, Fibroblasten, Nerven und parodontalen Blutgefäßen (BUDDECKE, 1981). Die Fasern des Bindegewebes werden Sharpey-Fasern (*Fibrae cementoalveolares*) genannt (BUDDECKE, 1981; SALOMON, 2015).

Die Sharpey-Fasern sind sowohl im Wurzelzement als auch in der Lamina dura des Alveolarknochens und der Gingiva verankert (BUDDECKE, 1981; BUCHER und WARTENBERG, 1997; FAHRENKRUG, 2007). Diese Fasern werden durch pluripotente Fibroblasten, Osteoblasten und Zementoblasten gebildet und untereinander dreidimensional vernetzt. Die eingelagerten pluripotenten Fibroblasten dienen der Regeneration, der intensive Stoffwechsel ist altersabhängig und wird durch die Kauaktivität angeregt (BUDDECKE, 1981; SALOMON, 2015). Die Wurzelhaut ist der einzige dynamische Bestandteil des Zahnhalteapparates. Sie dient der Aufhängung des Zahns in der Alveole und ermöglicht eine geringgradige Beweglichkeit des Zahnes in seinem Zahnfach (LINDHE und KARRING, 1999; GORREL, 2006; FAHRENKRUG, 2007; LIEBICH, 2010; STASZYK, 2011; SALOMON, 2015). Man bezeichnet die Art der Aufhängung auch als desmodontales Attachment (GORREL, 2006).

Der faserige Anteil des Zahnhalteapparates besteht zum größten Teil aus kollagenen Fasern und Oxytalanfasern (BUDDECKE, 1981). Die kollagenen Fasern bestehen hauptsächlich aus Kollagen Typ I und nur bis zu 20% aus Kollagen Typ III (BUCHER und WARTENBERG, 1997). Außerdem bilden parodontale Blutgefäße einen wichtigen Anteil, sie dienen der Druckdämpfung, um Kaukräfte abzuleiten und haben nutritive Eigenschaften (LIEBICH, 2010; STASZYK, 2011). Es besteht ein hohes Vermögen zur Reparation und Regeneration (STASZYK, 2011). Durch die Beteiligung von freien Nervenendigungen können Druck und Schmerz wahrgenommen werden (LIEBICH, 2010).

Der Alveolarknochen ist dünnwandig und becherförmig in die Kiefer eingelassen. Die Wand ist durchlöchert und erlaubt somit den Durchtritt von Blutgefäßen (LIEBICH, 2010; STASZYK, 2011). Radiologisch spricht man auch von der Lamina dura. Der Alveolarknochen unterliegt permanenten Umbauprozessen, um sich der tatsächlichen Zahnposition anzupassen, welche sich durch die physiologische Zahnbewegung ständig wandelt (STASZYK, 2011; SALOMON, 2015). Der Alveolarknochen entsteht bei der Zahnentwicklung und wird resorbiert bei Zahnverlust (LINDHE und KARRING, 1999).

Die Gingiva ist eine Differenzierung der Mundschleimhaut. Man unterscheidet einen freien und einen befestigten Anteil. Der befestigte Anteil weist eine Stippelung auf seiner Oberfläche auf (LINDHE und KARRING, 1999). Er geht über kollagene Faserzüge eine enge Verbindung mit dem Periost der knöchernen Alveole ein. Die

befestigte Gingiva liegt wie eine Manschette um den Zahnhals und sitzt im Bereich der Schmelzzementgrenze (THOMÉ, 2004; FAHRENKRUG, 2007; LIEBICH, 2010; STASZYK, 2011; SALOMON, 2015). Im Bereich der mukogingivalen Grenze geht sie in die freie Gingiva und die lose Mundschleimhaut über (LINDHE und KARRING, 1999; FAHRENKRUG, 2007). Normalerweise ist sie korallenfarben und ihr Rand scharf abgegrenzt.

1.1.4 Gingivaler Sulkus

Die Gingiva liegt wie eine Manschette um den Zahnhals (BUDDECKE, 1981; THOMÉ, 2004; LIEBICH, 2010; STASZYK, 2011). Durch die manschettenartige Verbindung besteht ein Abschluss gegen die Mundhöhle, außerdem besteht eine mikrobielle Abwehrfunktion. Durch den hohen Anteil an Blutgefäßen in der Gingiva, stellt sich diese als besonders regenerationsfähig dar (STASZYK, 2011).

Zwischen Gingiva und Zahn befindet sich zirkulär als kleine Vertiefung der gingivale Sulkus (*Sulcus gingivae*). Er wird begrenzt von der Zahnoberfläche mit Saumepithel, dem oralen Gingivaepithel und dem am Boden des Sulkus befindlichen oralen Sulkusepithel (BUDDECKE, 1981; STASZYK, 2011; SALOMON, 2015). Der gingivale Sulkus ist beim Hund physiologischerweise weniger als 3 mm tief. Liegt keine Plaque vor oder es wird regelmäßig Zahnpflege betrieben, kann die Sulkustiefe 0 mm betragen (NIEMIEC, 2013).

Die Sulkusflüssigkeit oder Krevikularflüssigkeit entsteht durch den Übertritt von Plasma aus den gingivalen Blutgefäßen in den Sulkus (BUDDECKE, 1981; STASZYK, 2011). Diese Flüssigkeit ist kontinuierlich im Fluss und hat zum einen Spülfunktion, zum anderen enthält sie immunologisch aktive Substanzen, wie Immunglobuline und Leukozyten, welche der parodontalen Abwehr dienen. Die Sulkusflüssigkeit enthält andererseits Substrate, welche Mikroorganismen als Energiequelle dienen und fördert somit die Plaqueentstehung (BUDDECKE, 1981). Physiologischerweise wird keine oder kaum gingivale Sulkusflüssigkeit produziert (BUDDECKE, 1981; STASZYK, 2011). Bei mechanischen und mikrobiellen Reizungen kommt es zu einem vermehrten Blutfluss durch die gingivalen Gefäße und durch die Permeabilitätssteigerung zu einem Anstieg der Menge an Sulkusflüssigkeit. Diese erhält den Charakter eines entzündlichen Exsudates (BUDDECKE, 1981). Die Zunahme der Menge an Sulkusflüssigkeit wird in der Humanmedizin als Kriterium zur Messung des Schweregrades einer parodontalen

Erkrankung genutzt. Bei Erkrankungen des Parodontiums kommt es zusätzlich zur Vertiefung des gingivalen Sulkus (STASZYK, 2011).

2. Parodontale Erkrankungen

2.1 Die Entstehung einer Parodontalerkrankung

Der Begriff „Parodontalerkrankung“ bezeichnet entzündliche, durch bakterielle Plaque hervorgerufene Erkrankungen des Zahnhalteapparates (GORREL, 2006). Es handelt sich dabei um eine Krankheit mit hoher Prävalenz, an welcher in der Hundepopulation bis zu 60% der Tiere leiden (KYLAR und WITTER, 2005). Damit handelt es sich um die häufigste orale Erkrankung des Hundes (HAMP et al., 1984; HARVEY, 2005; GORREL, 2006; MARSHALL et al., 2014).

Die Parodontalerkrankung ist eine multifaktorielle Erkrankung (VAN DYKE und DAVE, 2005; GORREL, 2006). Die Erkrankung kommt weder allein durch die Anwesenheit einer großen Menge an Bakterien noch durch die Anwesenheit bestimmter Bakterienarten bzw. deren Stoffwechselprodukte zustande, sondern es handelt sich dabei um die Folge der Immunreaktion des Wirtes auf das Vorhandensein parodontopathogener Erreger (KINANE und LINDHE, 1999). Der Überbegriff „Parodontalerkrankung“ umfasst zwei klinische Formen: Dies sind die Gingivitis, als Frühstadium der Erkrankung, welche sich verschlechtern und zur zweiten Form, der Parodontitis, fortschreiten kann (HARVEY, 2005). Warum es bei manchen Individuen zu einem Fortschreiten der Gingivitis in eine Parodontitis kommt und bei anderen nicht ist noch nicht vollständig geklärt (KINANE und LINDHE, 1999). Es handelt sich bei der Entwicklung einer parodontalen Erkrankung um ein komplexes Geschehen, bei der die Interaktion zwischen Wirt und den plaquebildenden Bakterien und die Empfänglichkeit des Wirts für die Erkrankung eine Rolle spielen. Diese kann erhöht sein durch eine vorliegende Immunschwäche, eine genetische Prädisposition oder Mangelernährung, Stress oder auch altersbedingt (KINANE und LINDHE, 1999; LOESCHE und GROSSMANN, 2001; HARVEY, 2005; VAN DYKE und DAVE, 2005; GORREL, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2012). Es gibt Studien, die in einer Kolonie von Beagle Hunden trotz gleicher Umweltbedingungen starke Unterschiede in der Verteilung und dem Schweregrad einer parodontalen Erkrankung zeigen (PAGE und SCHROEDER, 1976; SORENSEN et al., 1980). Dies spricht für eine unterschiedliche individuelle Empfänglichkeit für diese Erkrankung.

2.1.1 Bakterielle Plaque

Zur Ansammlung und Vermehrung der Bakterien in der Maulhöhle herrschen ideale Bedingungen, da es hier warm, feucht und dunkel ist. Außerdem zeigt die

Zahnoberfläche keine Erneuerung und somit ist die Bakterienpopulation in ihrem Wachstum darauf ungestört (HARVEY, 2005). Bakterielle Plaque belagert als Biofilm die Zahnoberfläche (GORREL, 2006). Sie besteht vorwiegend aus Bakterien und deren Stoffwechselprodukten sowie Speichelbestandteilen (GORREL, 2006). Man unterscheidet supragingivale Plaque und subgingivale Plaque (GORREL, 2006). Zunächst lagert sich Plaque nur supragingival an, bei ausbleibender Entfernung der Plaque z.B. durch häusliche Zahnpflege breitet sie sich nach subgingival aus (GORREL, 2006). Die supragingival befindlichen Bakterien ernähren sich aus Futterpartikeln, welche sich in der Maulhöhle befinden (GORREL, 2006). Die subgingivalen Bakterien hingegen beziehen ihre Nährstoffe aus dem Blut des Wirts und dem parodontalen Gewebe im Bereich des gingivalen Sulkus (GORREL, 2006). Es sind diese Bakterien, die für die Entstehung einer Parodontalerkrankung verantwortlich sind (LOESCHE und GROSSMANN, 2001).

Der Zahn wird innerhalb von Minuten nach einer Zahnreinigung von Plaque besiedelt (GORREL, 2006). Die bakteriellen Stoffwechselprodukte ermöglichen eine weitere Anlagerung von Bakterien (GORREL, 2006). Die ungestörte Plaqueakkumulation allein führt aber nicht zum Abbau parodontaler Strukturen (HAMP et al., 1984). Eine Parodontitis kann verhindert werden, indem die Zähne regelmäßig von Plaque befreit werden, dies kann durch eine professionelle Zahnreinigung, bestimmte Nahrungsmittel oder das häusliche Zähneputzen geschehen (LINDHE et al., 1975; HAMP et al., 1984; NIEMIEC, 2013). Wenn regelmäßiges Zähneputzen nicht durchgeführt wird, entwickeln die Hunde schnell eine Gingivitis (LINDHE et al., 1975; MARSHALL et al., 2014). Durch die Gesunderhaltung der Gingiva kann das Entstehen einer parodontalen Erkrankung verhindert werden (GORREL, 2006).

2.1.2 Zahnstein

Plaque kann sich zu Zahnstein kalzifizieren, dies findet sowohl supra- als auch subgingival statt (GORREL, 2006). Der Speichel bei Hunden ist alkalischer als bei Menschen, daher kommt es schneller zur Zahnsteinbildung (SCHROEDER, 1965; HAMP et al., 1984; HARVEY, 2005; KYLLAR und WITTER, 2005). Die raue Oberfläche des Zahnsteins selbst ist nicht auslösend für eine parodontale Erkrankung (GORREL, 2006). Sie erleichtert aber die Anlagerung weiterer bakterieller Plaques (SCHROEDER, 1965; HAMP et al., 1984; GORREL, 2006). LOESCHE und GROSSMANN (2001) stellen im Gegenzug sogar die Hypothese auf,

dass die Bildung von Zahnstein eine Verteidigungsstrategie des Wirts darstellt, um bakterielle Lipopolysaccharide von der Gewebsinvasion abzuhalten.

HAMP und Mitarbeiter (1984) entdecken in ihrer Studie Zahnstein bei 83,3% der Hunde sowie mit steigendem Alter eine Zunahme der Zahnsteinmenge. Das Ausmaß an Zahnstein und Parodontitis weisen jedoch nicht immer eine positive Korrelation auf. Häufig sind aber Lokalisationen mit Zahnstein und Parodontitis übereinstimmend (SCHROEDER, 1965; HAMP et al., 1984).

Das Ausmaß an Zahnstein wird mit den Graden 0-3 beurteilt. Als Grad 0 wird dabei ein Zahn ohne Zahnstein festgelegt. Grad 1 ist ein Zahn mit einer geringgradigen Menge Zahnstein, welcher sich supragingival befindet. Bei Grad 2 liegt mittelgradig Zahnstein supragingival vor oder geringgradig Zahnstein subgingival. Grad 3 sagt aus, dass hochgradig Zahnstein supra- und subgingival vorliegt (EICKHOFF, 2005).

2.1.3 Die Rolle der Bakterien bei einer parodontalen Erkrankung

Bei der Ätiologie einer parodontalen Erkrankung gibt es zwei Hypothesen, die spezifische und die unspezifische Plaquehypothese. Bei der zuerst aufgestellten unspezifischen Plaquehypothese wird angenommen, dass die Menge der Bakterien und ihrer Ausscheidungsprodukte, also die Biomasse, zu der Entwicklung einer Parodontalerkrankung führt (THEILADE, 1986). Mit der Feststellung, dass nicht jede Gingivitis in einer Parodontitis endet, geht die Postulierung der spezifischen Plaquehypothese einher. Bei dieser wird davon ausgegangen, dass nur einige bestimmte anaerobe Keime zu einer Parodontalerkrankung führen und dies auch nur, wenn der Wirt empfänglich ist (THEILADE, 1986; LOESCHE und GROSSMANN, 2001).

Das Keimspektrum ist zu Beginn der bakteriellen Besiedlung der Zahnoberfläche vor allem durch Gram-positive aerobe Keime, zunächst vor allem Kokken, später auch Stäbchen, geprägt (THEILADE et al., 1966; HARVEY, 2005). Supragingival können vor allem Streptokokken (*Streptococcus sanguis*) und Actinomyceten (*Actinomyces viscosus*) aus der Plaque isoliert werden (LOESCHE und GROSSMANN, 2001; GORREL, 2006; POLKOWSKA et al., 2014). Mit der Zeit kommt es zur Ansammlung weiterer Plaques, die Zusammensetzung der Bakterienflora ändert sich, der Sauerstoff wird verbraucht und es kommt subgingival im Bereich des gingivalen Sulkus zu einer Vermehrung von mikroaerophilen bis hin zu Gram-negativen anaeroben Bakterien (THEILADE et al., 1966; LOESCHE und GROSSMANN, 2001). Das Verhältnis aerobe zu anaeroben Bakterien verschiebt sich zu Gunsten der

anaeroben Bakterien (GORREL, 2006). Der Wechsel von Gram-positiver zu Gram-negativer Keimflora legt den Grundstein für die Parodontitis (THEILADE et al., 1966; LOESCHE und GROSSMANN, 2001; HARDHAM et al., 2005).

In der Veterinärmedizin werden beim Hund vor allem schwarz pigmentierte anaerobe Bakterien aus parodontalen Taschen isoliert, allen voran Katalase-positive Porphyromonas Spezies, welche als auslösende Keime für eine parodontale Erkrankung bekannt sind (ISOGAI et al., 1989; HARDHAM et al., 2005). Es handelt sich um einen Gram-negativen Keim. In einer Studie von HARDHAM und Mitarbeitern (2005) können als schwarz pigmentierte anaerobe Keime aus dem gingivalen Sulkus von an Parodontitis erkrankten Hunden am häufigsten Porphyromonas salivosa, denticanis und gulae identifiziert werden. Die Ergebnisse stimmen mit denen von ISOGAI und Mitarbeitern (1989) überein, die Porphyromonas spp. mit parodontalen Erkrankungen des Hundes in Verbindung bringen. Diese Keime verfügen über bestimmte Mechanismen, um sich dem Immunsystem des Wirts zu entziehen. Sie erhalten Nährstoffe aus der gingivalen Sulkusflüssigkeit (GORREL, 2006). Porphyromonas gingivalis, der wichtigste pathogene Keim bei der humanen Parodontitis, findet sich beim Hund hingegen nicht (HARDHAM et al., 2005). Zu den am häufigsten bei der Parodontitis des Hundes isolierten anaeroben Keimen gehören außerdem Prevotella spp., Fusobacterium spp., und Spirochäten (GORREL, 2006).

Im Gegensatz zu den vorgenannten Studien steht die Aussage von POLKOWSKA und Mitarbeitern (2014), die bei einer Parodontitis aus der parodontalen Tasche am häufigsten Staphylococcus spp. und Streptococcus spp. isolieren. Sicher ist, dass es sich bei einer parodontalen Erkrankung um eine polymikrobielle Infektion handelt (LOESCHE und GROSSMANN, 2001; POLKOWSKA et al., 2014).

2.1.4 Die Rolle des Immunsystems bei einer parodontalen Erkrankung

Die Entstehung und das Voranschreiten einer parodontalen Erkrankung sind zwar primär abhängig von der Anwesenheit der bakteriellen Plaque und ihrer Virulenz, aber es ist die wirtseigene Immunreaktion, die zur Gewebeschädigung führt (KINANE und LINDHE, 1999; VAN DYKE und SERHAN, 2003). Aus einer Gingivitis muss keine Parodontitis hervorgehen (LINDHE et al., 1975; HAMP et al., 1984; MARSHALL et al., 2014), allerdings entsteht eine Parodontitis nie ohne Gingivitis (HARVEY, 2005).

Als erste Reaktion des Immunsystems auf die Anwesenheit parodontopathogener Keime kommt es zur chemotaktischen Anlockung von Neutrophilen (KINANE und LINDHE, 1999; SCHROEDER und LISTGARTEN, 2000; VAN DYKE und SERHAN, 2003). Das Vorhandensein von Bakterien auf der Zahnoberfläche führt somit selbst in gesundem Zahnfleisch zur Anwesenheit von Neutrophilen (SCHROEDER und LISTGARTEN, 2000). Es ist noch nicht geklärt ob der Wirt allgemein auf die Anwesenheit der bakteriellen Lipopolysaccharide reagiert oder auf die Anwesenheit spezifischer Keime und derer Stoffwechselprodukte (LOESCHE und GROSSMANN, 2001). Je mehr Plaque sich sammelt, desto mehr Neutrophile liegen vor. Die Neutrophilen bilden und entlassen Entzündungsmediatoren, welche zu einer Vasodilatation führen und die Entzündungsreaktion in Gang setzen (KINANE und ATTSTRÖM, 2005). Es bildet sich eine Gingivitis. Als Verteidigungsmechanismen gegen die Anwesenheit der Bakterien werden Antikörper gebildet, die Zahl der Neutrophilen steigt, die Umsetzungsrate des gingivalen Epithels wird erhöht und es kommt zur verstärkten Perfusion (SCHROEDER und LISTGARTEN, 2000; SCHENKEIN, 2006). Dadurch steigt der Sauerstoffgehalt im Gewebe und verhindert die Invasion anaerober Bakterien. Diese können zwar im Gewebe nachgewiesen werden, führen aber nicht zu Gewebsnekrosen (LOESCHE und GROSSMANN, 2001).

Kommt es zur Einschränkung der wirtseigenen Verteidigungsstrategien, wie einer Vasokonstriktion, z.B. im Rahmen von Stress, und somit zu einem verminderten Sauerstoffgehalt im Gewebe, können sich die anaeroben Keime anreichern und zur Parodontitis führen (LOESCHE und GROSSMANN, 2001). Nicht-mikrobielle Umweltbedingungen können über eine Modulation des Immunsystems das Entstehen einer parodontalen Erkrankung begünstigen (SCHENKEIN, 2006). Im entzündeten Gewebe finden sich bei einer fortgeschrittenen Parodontitis dominierend B-Lymphozyten und Plasmazellen (SCHROEDER und LISTGARTEN, 2000; KINANE und ATTSTRÖM, 2005; SCHENKEIN, 2006).

Im Rahmen der Entzündungsreaktion werden wirtseigene Zellen wie Fibroblasten zur Zytokinproduktion angeregt. Es kommt zur Aktivierung der latenten Formen von Proteasen wie den Matrix-Metalloproteinasen, diese führen über Kollagenabbau zur Sulkusvertiefung und zur Bildung der parodontalen Tasche (SORSA et al., 1992; LOESCHE und GROSSMANN, 2001). Die Osteoklastenaktivierung führt zum Knochenabbau (ISHIKAWA et al., 2007). Der Zahn verliert seine Anhaftung im

Kiefer, wird locker und fällt letztlich aus. Dieser Vorgang ist mit Schmerzen verbunden (GORREL, 2006). Der Knochenabbau kann bis zur pathologischen Kieferfraktur oder zur Bildung oronasaler Fisteln führen (HARVEY, 2005; WHYTE et al., 2013).

Auch die Bakterien bilden Verteidigungsmechanismen aus. Sie verfügen über verschiedene Mechanismen dem Immunsystem zu entgehen und die Entzündung aufrecht zu erhalten. So können viele Bakterien in die umgebenden Gewebe eindringen und sich dort dem Immunsystem entziehen (SCHENKEIN, 2006). Die Bakterien werden auf diese Weise nicht vernichtet, sondern führen zu einer chronischen Infektion (LOESCHE und GROSSMANN, 2001).

Die Parodontitis ist als ein Ergebnis der Überreaktion der wirtseigenen Immunabwehr zu werten (VAN DYKE und SERHAN, 2003; VAN DYKE und DAVE, 2005; SCHENKEIN, 2006). Parodontale Erkrankungen sind spezifische chronische Infektionen, welche in Anwesenheit und durch Überwuchs spezifischer subgingivaler Keime, vor allem Gram-negativer Anaerobier, entstehen und ermöglicht werden durch die Empfänglichkeit des Wirtes, welche durch genetische Prädispositionen, Leukozytendefekte oder andere Modulationen des Immunsystems, z.B. Stress, schlechte orale Hygiene oder Alter, bedingt werden (KINANE und LINDHE, 1999; LOESCHE und GROSSMANN, 2001; VAN DYKE und SERHAN, 2003). Es kommt zum Gewebsabbau auf Grund der Unfähigkeit des Immunsystems die Infektion zu besiegen (KINANE und LINDHE, 1999; VAN DYKE und SERHAN, 2003).

2.2 Gingivitis und Parodontitis des Hundes

Es gibt vier Stadien der parodontalen Erkrankung (PD 1-4). Das erste Stadium, also Grad 1 einer parodontalen Erkrankung, ist die Gingivitis. Das zweite Stadium ist die geringgradige Parodontitis, das dritte ist die mittelgradige Parodontitis und das vierte Stadium die hochgradige Parodontitis (AVDC, 2016).

2.2.1 Gingivitis

Die Gingivitis ist eine Entzündung des Zahnfleisches. Die Graduierung einer Gingivitis erfolgt nach Schweregrad. Gingivitis Grad 0 bezeichnet dabei einen Zahn ohne sichtbare Veränderungen der Gingiva, also mit klinisch unauffälligem Zahnfleisch (LOE, 1967). Gingivitis Grad 1 bedeutet, dass keine Blutung bei Sondierung des gingivalen Sulkus auftritt, der Zahnfleischrand aber geringgradig gerötet und geschwollen ist (LOE, 1967; GORREL, 2006). Bei Grad 2 liegt eine mittelgradige Schwellung und Rötung des Zahnfleisches vor und es kommt bei

vorsichtiger Sondierung des gingivalen Sulkus zur Blutung (LOE, 1967; HARVEY, 2005; GORREL, 2006). Grad 3 bedeutet, dass eine hochgradige Zahnfleischentzündung mit rotem bis rot-blauem Zahnfleisch vorliegt und es spontan zur Blutung der Gingiva, sowie zu Ulzerationen kommt (LOE, 1967; GORREL, 2006). Bei einer Gingivitis bleibt die Entzündungsreaktion ausschließlich auf das Weichteilgewebe beschränkt, es findet kein Attachmentverlust statt, damit bleibt die Tiefe des gingivalen Sulkus unverändert (GORREL, 2006). Die Gingivitis ist gekennzeichnet durch Rötung, Schwellung und teilweise durch Blutung des Zahnfleisches (HARVEY, 2005). Die Rötung findet auf Grund der Gefäßdilatation im Rahmen der Entzündung statt. Die Blutung entsteht durch Ulzeration im Bereich des gingivalen Sulkus. Es handelt sich bei der Gingivitis um einen reversiblen Prozess (HARVEY, 2005; NIEMIEC, 2013). Durch eine strenge Zahnhygiene kann das Zahnfleisch sich wieder vollständig erholen (THEILADE et al., 1966; HARVEY, 2005).

In einer Studie von KORTEGAARD und Mitarbeitern (2014) zeigen alle der untersuchten Versuchshunde eine Gingivitis mit Blutung bei Sondierung, unabhängig vom Lebensalter.

2.2.2 Parodontitis

Eine Parodontitis kann durch das Fortschreiten einer unbehandelten Gingivitis entstehen (GORREL, 2006). Es handelt sich um eine Entzündung der parodontalen Gewebe, exklusive der Gingiva (HARVEY, 2005). Laut MARSHALL und Mitarbeitern (2014) ist der Schweregrad der Gingivitis unterschiedlich stark bei den an Parodontitis leidenden Zähnen und der Grad der Gingivitis ist kein Maßstab für die Geschwindigkeit, in der die Erkrankung zur Parodontitis fortschreitet. Die Entwicklung einer Gingivitis zu einer Parodontitis ist irreversibel (GORREL, 2006; NIEMIEC, 2013). Der Abbau des Zahnhalteapparates ist gekennzeichnet durch Abbau der kollagenen Haltefasern, diese werden zum einen durch bakterielle Enzyme, zum anderen durch wirtseigene Enzyme, welche als Reaktion auf die herrschende Entzündung entlassen werden, abgebaut (BIRKEDAL-HANSEN, 1993). Im Rahmen der herrschenden Entzündung kommt es zum Abbau des Zahnhalteapparates und zum alveolaren Knochenabbau (GORREL, 2006). Wird diese schmerzhafte Entzündung nicht unterbrochen und der Knochenabbau schreitet weiter fort, kann es zur pathologischen Fraktur kommen (GORREL, 2006; WHYTE et al., 2013).

Außerdem sorgen Entzündungsmediatoren für Erkrankungen anderer Organe (MARCACCINI et al., 2009).

Die Parodontitis ist durch Attachmentverlust gekennzeichnet (HARVEY, 2005; GORREL, 2006; NIEMIEC, 2013). Mittels Parodontalsonde wird die Tiefe des gingivalen Sulkus gemessen, welcher physiologischerweise bei einem Hund 1-3 mm beträgt, abhängig von der Größe des Hundes, und vom freien Rand der Gingiva bis auf Höhe des Sulkusbodens reicht (GORREL, 2006). Die Schmelz-Zement-Grenze befindet sich unter physiologischen Bedingungen genau apikal der freien Gingiva (NIEMIEC, 2013). Das bedeutet, dass sie sich in etwa auf Höhe des physiologischen Sulkusbodens befindet (NIEMIEC, 2013). Durch Parodontitis kommt es durch Abbau der parodontalen Strukturen zur Vertiefung des Sulkus und zur Ausbildung der parodontalen Tasche (GORREL, 2006). Es entsteht ein Attachmentverlust. Attachmentverlust ist das Hauptsymptom einer Parodontitis und ermöglicht eine Einschätzung des vorliegenden Schweregrades (NIEMIEC, 2013).

Es gibt zwei Arten von Attachmentverlust (NIEMIEC, 2013). Zum einen kann sich der Attachmentverlust als gingivale Rezession äußern (NIEMIEC, 2013). Dabei bleibt die Tiefe des gingivalen Sulkus gleich, es bilden sich keine Taschen aus, aber die Gingiva und das Parodont ziehen sich nach apikal zurück, die Wurzeloberfläche liegt frei. Gingivarezession plus die parodontale Taschentiefe ergeben die Menge an Attachmentverlust (GORREL, 2006). Zum anderen kann sich der Attachmentverlust als parodontale Tasche äußern, wobei sich die Tiefe des gingivalen Sulkus erhöht (NIEMIEC, 2013). Der Attachmentverlust wird gemessen von der Schmelz-Zement-Grenze zum Boden der Tasche und ist unabhängig von der Gingiva (EICKHOFF, 2005; NIEMIEC, 2013). Die Taschentiefe hingegen wird gemessen vom freien Rand der Gingiva bis zum Boden der Tasche (EICKHOFF, 2005). Daher kommt es bei z.B. Gingivahyperplasie zu einer Überschätzung des Attachmentverlustes (EICKHOFF, 2005). Bei Gingivahyperplasie muss die überschüssige Gingiva von der gemessenen Taschentiefe abgezogen werden, um den Attachmentverlust zu berechnen (NIEMIEC, 2013). Die Messung des Attachmentverlustes ergibt genauere Befunde zum Zustand des parodontalen Ligaments, als die Messung der Taschentiefe (GORREL, 2006). Eine Gingivahyperplasie ist ein Zustand, bei dem sich die Zellen der Gingiva numerisch vermehren und es so zum Überwuchs der Gingiva kommt (EICKHOFF, 2005). Es bilden sich Pseudozahnfleischtaschen aus (GORREL, 2006).

Ein Abbau alveolären Knochens im Rahmen einer Parodontalerkrankung im Bereich der Wurzelaufzweigung mehrwurzeliger Zähne bezeichnet man als Furkationsbefall (GORREL, 2006). Der Furkationsbefall kann mittels Parodontalsonde untersucht werden, dabei wird die Parodontalsonde schräg bis horizontal in den Bereich der Furkation eingeführt. An Hand der Tiefe des Eindringens der Sonde bzw. der Deutlichkeit des Ertastens der Furkation wird der Furkationsbefall in Grad 0-3 eingeteilt (EICKHOFF, 2005; GORREL, 2006).

Der Attachmentverlust kann zur Lockerung und schließlich zum Verlust des betroffenen Zahns führen (HAMP et al., 1984; GORREL, 2006; NIEMIEC, 2013). Die Beweglichkeit der Zähne kann mittels Mobilitätsindex in verschiedene Grade eingeteilt werden. Nach AVDC (2016) bezeichnet Grad 0 eine physiologische Mobilität, welche bis zu 0,2 mm betragen kann. Nach GORREL (2006) bezeichnet Grad 1 eine erhöhte Mobilität in horizontaler Richtung von mehr als 0,2 mm und maximal 1,0 mm. Bei Grad 2 ist die Mobilität in horizontaler Richtung auf mehr als 1,0 mm erhöht. Bei Grad 3 besteht bei einwurzeligen Zähnen sowohl eine horizontale, als auch eine vertikale Beweglichkeit, welche maßgeblich erhöht ist. Bei mehrwurzeligen Zähnen ist jegliche Beweglichkeit von mehr als 1,0 mm als Grad 3 anzusehen (GORREL, 2006).

Neben der klinischen Untersuchung ist zum Nachweis einer parodontalen Erkrankung außerdem die radiologische Untersuchung der Kiefer erforderlich (ARZI und VERSTRAETE, 2009). Es werden die Höhe des Alveolarkammes, die Abgrenzbarkeit der Lamina dura und die Weite des Parodontalspaltes beurteilt (MIHALJEVIĆ, 2010; GAWOR, 2013). Zusätzlich können das Dentin im Bereich von Wurzel und Krone, sowie die Pulpahöhle und der periapikale Bereich betrachtet werden (MIHALJEVIĆ, 2010). Außerdem wird auf weitere Auffälligkeiten geachtet. Bei der Parodontitis kommt es je nach Schweregrad zur Abnahme der Höhe des Alveolarkammes und ggf. Vergrößerung des Parodontalspaltes, außerdem kann es zu einer Sklerosierung oder einer undeutlicheren Abgrenzbarkeit der Lamina dura und einer Ankylosierung kommen (MIHALJEVIĆ, 2010; GAWOR, 2013). Eine Knochenresorption kann außerdem im Bereich der Wurzelfurkation vorkommen (MIHALJEVIĆ, 2010; GAWOR, 2013). Knochenabbau kann horizontal oder vertikal sein (MIHALJEVIĆ, 2010; GAWOR, 2013). Liegt eine hochgradige Parodontitis vor, können auch endodontale Schäden entstehen (MIHALJEVIĆ, 2010; GAWOR, 2013). Zudem können Osteomyelitiden entstehen (GAWOR, 2013).

Die Parodontitis ist eine dynamische Infektion (GORREL, 2006). Es wechseln sich schubweise Phasen mit aktiver Gewebszerstörung und Phasen der Ruhe ab (SOCRANSKY et al., 1984; HOFFMANN und GAENGLER, 1996; GORREL, 2006). In den akuten Phasen kommt es zur Vertiefung der parodontalen Taschen (GORREL, 2006). Liegt Attachmentverlust ohne eine Gingivitis vor, handelt es sich bei dem Attachmentverlust um eine Folge einer vorhergehenden Parodontitis (HARVEY, 2005).

Die Parodontitis kommt in der Hundepopulation mit einer hohen Prävalenz vor, in einer Studie von KYLLAR und WITTER (2005) zeigen 60% der Hunde Parodontitis, in einer Studie von HAMP und Mitarbeitern (1984) sind es 63,3%. KORTEGAARD und Mitarbeiter (2014) dokumentieren bereits 20% der ein- bis zwei-jährigen Hunde mit Attachmentverlust und somit einer Parodontitis. In einer Studie von HAMP und Mitarbeitern (1984) zeigen bereits 37% der Hunde unter zwei Jahren Hinweise auf das Vorliegen einer Parodontitis.

Bei Hunden entwickelt sich eine parodontale Erkrankung schneller und schwerwiegender als beim Menschen. Dies liegt vermutlich an der Zusammensetzung des Speichels. Aus diesem Grund schreitet sie bei Hunden fünfmal schneller fort als bei Menschen (GAD, 1968). Auch genetische Faktoren können eine parodontale Erkrankung begünstigen (z.B. Polymorphismen bestimmter Gene). Dies ist allerdings bisher nur bei Menschen bewiesen (KINANE und ATTSTRÖM, 2005; SCHENKEIN, 2006).

Bei kleineren Hunderassen kommt es schneller und schwerwiegender zu einer parodontalen Erkrankung (HAMP et al., 1984; KYLLAR und WITTER, 2005; KORTEGAARD et al., 2014; MARSHALL et al., 2014). Auch Zahnverlust durch Parodontitis kommt bei kleineren Rassen häufiger vor (HAMP et al., 1984). Dies liegt an der kleineren Kiefergröße, die Zähne stehen enger, es sammelt sich vermehrt Plaque zwischen den Zähnen (MARSHALL et al., 2014). Vor allem Pudel sind zu einem hohen Anteil betroffen (HAMP et al., 1984; HOFFMANN und GAENGLER, 1996).

Das Risiko, eine parodontale Erkrankung zu entwickeln, ist für brachyzephe Hunde größer, als für meso- oder dolichozepe Tiere (LOBPRISE, 2006). Dies liegt ebenfalls an den kleineren Kiefern, in denen es schneller zu einer Plaqueansammlung kommt und dieser schlechter beseitigt werden kann. Außerdem neigen brachyzephe Tiere vermehrt zu Zahnfehlstellungen oder

Milchzahnpersistenz, welche ebenfalls eine Plaqueansammlung begünstigen (NIEMIEC, 2013).

Je älter ein Tier ist, desto schneller und schwerwiegender erkrankt es an Parodontitis (HAMP et al., 1984; KYLLAR und WITTER, 2005; MARSHALL et al., 2014). Mit zunehmendem Alter steigt auch die Geschwindigkeit, mit der die Parodontitis fortschreitet (GAD, 1968; HOFFMANN und GAENGLER, 1996; MARSHALL et al., 2014). Hierfür wird eine Wandlung des Immunsystems im Alter vermutet (MARSHALL et al., 2014). In einer Studie von HAMP und Mitarbeitern (1984) zeigen fast 100% der 12-14 Jahre alten Hunde Anzeichen einer parodontalen Erkrankung, womit die hohe Prävalenz in der Hundepopulation verdeutlicht wird. In einer Studie von HOFFMANN und GAENGLER (1996) zeigen 100% der Pudel über 4 Jahren mindestens einen Zahn mit Parodontitis.

Die Geschwindigkeit, mit der die Parodontitis voranschreitet, ist bei jedem Zahn unterschiedlich, weswegen MARSHALL und Mitarbeiter (2014) die Hypothese aufstellen, dass jede parodontale Läsion in einer eigenen Geschwindigkeit fortschreitet.

In vielen Studien wird versucht eine Aufstellung zu machen, welche Zähne am schnellsten und am schwerwiegendsten an einer Parodontitis erkranken. Hier gibt es allerdings hochgradige Unterschiede, so dass auch rassebedingte Unterschiede vermutet werden (MARSHALL et al., 2014). MARSHALL und Mitarbeiter (2014) beschreiben die Inzisiven, den vierten Prämolaren und ersten Molaren im Unterkiefer als die Zähne, welche am häufigsten eine Parodontitis entwickeln. Geringere Inzidenzen bestehen hingegen an den Canini, den rostralen Prämolaren und den zweiten und dritten Molaren. Diese Aussage passt zu den Ergebnissen einer Studie von HAMP und Mitarbeitern (1984), steht allerdings im Gegensatz zu einer Studie von HOFFMANN und GAENGLER (1996), nach der die Canini am häufigsten von einer Parodontitis betroffen sind. In einer Studie von MARSHALL und Mitarbeitern (2014) zeigen sich am vierten Prämolaren im Unterkiefer vor allem der distale Anteil bukkal und der mesiale Anteil des ersten Molaren bukkal betroffen und es wird vermutet, dass dies auf Grund von Überlagerung stattfindet. KYLLAR und WITTER (2005) zeigen in ihrer Studie, dass an den Seitenzähnen vor allem die bukkalen Aspekte von einer Parodontitis betroffen sind, wobei es in der Studie von MARSHALL und Mitarbeitern (2014) an den Inzisiven vor allem die lingualen und palatinalen Flächen der Zähne sind.

Die Plaqueansammlung beginnt zunächst im Oberkiefer, im Bereich der Molaren und des vierten Prämolaren. Dies liegt vermutlich daran, dass hier die Speicheldrüsen münden (MARSHALL et al., 2014). Es gibt keine Unterschiede zwischen linker und rechter Kieferhälfte oder zwischen männlichen und weiblichen Tieren, aber wohl zwischen Ober und Unterkiefer (LINDHE et al., 1975; KYLLAR und WITTER, 2005). Außerdem wird die Plaqueansammlung lingual durch die Zungenbewegung gehemmt. Plaque sammelt sich eher bukkal und labial an, weil dort die Selbstreinigung durch das anliegende Weichteilgewebe gehemmt wird (KYLLAR und WITTER, 2005).

Eines der häufigsten Symptome weshalb die Hunde zu einer Zahnbehandlung vorgestellt werden ist Halitosis (HAMP et al., 1984; KYLLAR und WITTER, 2005). Diese entsteht durch Schwefelverbindungen, die von Gram-negativen Bakterien beim Gewebeabbau entstehen (NIEMIEC, 2013). Die Stärke des Mundgeruchs korreliert positiv mit dem Schweregrad der Parodontitis (NIEMIEC, 2013). Die entstehenden Schwefelverbindungen verschärfen die bestehende Parodontitis, indem sie die Gefäßpermeabilität erhöhen und die Aktivität von Kollagenasen fördern. Außerdem hemmen sie die Wundheilung und die Aktivität der Fibroblasten (NIEMIEC, 2013).

2.2.3 Prophylaxe Maßnahmen und Therapie parodontaler Erkrankungen

Eine wirksame Prophylaxe Maßnahme, um die Entstehung und das Fortschreiten einer parodontalen Erkrankung zu verhindern, ist eine gute Mundhygiene. Diese besteht in täglichem Zähneputzen durch die Besitzer und die Gabe von Futtermitteln, welche den Kauvorgang anregen, um die Plaqueakkumulation zu verhindern bzw. zu reduzieren. Die alleinige Fütterung von Trockenfutter ist nicht ausreichend, um eine Plaqueakkumulation zu verhindern, sie verzögert diese allerdings (ALLMUCA, 2015). Auf Grund der hohen Prävalenz der parodontalen Erkrankung sollen Hunde regelmäßig darauf untersucht werden (HARVEY, 2005). Dies wird in einer Studie von MARSHALL und Mitarbeitern (2014) verdeutlicht, in der es keinen Zahn gibt, welcher an jeder beprobten Stelle unauffällig ist und damit als gesund klassifiziert werden kann. Viele Symptome einer parodontalen Erkrankung werden vom Besitzer übersehen oder nicht ernst genommen und das führt zu einer Verschlechterung des Zustands der Tiere. Neben Mundgeruch ist das häufigste Symptom weswegen die Tiere zu einer Zahnbehandlung vorgestellt werden, Zahnstein, unter welchem 80%-83,3% der Hunde leiden (HAMP et al., 1984; KYLLAR und WITTER, 2005).

Bei bereits bestehender parodontaler Erkrankung ist eine Zahnbehandlung in Allgemeinanästhesie indiziert. Bei einer professionellen Zahnbehandlung werden die Zähne im Bereich der Krone mittels Ultraschallscaler gereinigt. Subgingivale Beläge werden mit einer subgingivalen Kürette (tiefe Kürettage) entfernt. Um eine Anlagerung von Plaque zu vermeiden, müssen freiliegende Wurzeloberflächen geglättet und poliert werden. Auch Zahnkrone und Zahnhals müssen aus diesem Grund poliert werden (GORREL, 2006). Außerdem muss hyperplastische Gingiva, die zu einer Bildung von Pseudozahnfleischtaschen führt, mittels Gingivektomie entfernt werden, um Schmutznischen zu verhindern. Bei bereits vorhandenem horizontalen Knochenabbau kann eine sogenannte Lappenplastik durchgeführt werden (NIEMIEC, 2013). Allerdings macht dieses Verfahren nur Sinn, wenn der Besitzer einer regelmäßigen häuslichen Zahnpflege zustimmt und dieser auch nachkommt, da ansonsten regelmäßige Narkosen zur professionellen Zahnpflege nötig sind (GORREL, 2006). Da die Veränderungen im Rahmen der Parodontitis irreversibel sind und der Knochenabbau nicht rückgängig gemacht werden kann, bleibt häufig nur die Exaktion betroffener Zähne (NIEMIEC, 2013). Nachdem der Zahn extrahiert ist, können die Gewebe sich wieder erholen, da mit dem erkrankten Zahn auch die bakterielle Besiedlung dessen Oberfläche fehlt (HARVEY, 2005).

2.3 Beziehung zwischen Parodontalerkrankungen und systemischen Erkrankungen

In den vergangenen Jahren ist das Interesse an der Erforschung parodontaler Erkrankungen stark gestiegen, was daran liegt, dass eine Verbindung zwischen den Parodontalerkrankungen und systemischen Erkrankungen, welche eine hohe Prävalenz in der Bevölkerung haben, festgestellt wird. Ob dieser Zusammenhang auf gemeinsamen Risikofaktoren beruht oder ob es einen Kausalzusammenhang gibt, lässt sich zumeist auf Grund der Verschiedenheit der Studien nicht eindeutig klären (IACOPINO et al., 2001; CULLINAN et al., 2009).

Ausgehend von der bakteriellen Besiedlung der Mundhöhle kommt es zu einer Bakteriämie mit metastatischer Verbreitung von bakteriellen Stoffwechselprodukten. Dies verläuft zumeist symptomlos oder es führt kurzzeitig zu subfebrilen Temperaturerhöhungen. Allerdings kann es auch zu einer Absiedlung von Bakterien oder deren Stoffwechselprodukten in andere Organe kommen, was verschiedene systemische Erkrankungen hervorrufen kann (THODEN VAN VELZEN et al., 1984). Bei den parodontalen Erkrankungen dient die Mundhöhle als Reservoir für Bakterien,

sie hält die chronische Entzündung aufrecht. Die Verbindung zwischen parodontalen und systemischen Erkrankungen besteht auf Grund der Chronizität der Entzündung (PAGE et al., 1998; BOSNJAK et al., 2001).

Bisher gibt es humanmedizinische Studien, welche einen Zusammenhang zwischen Parodontalerkrankungen und Diabetes mellitus, kardiovaskulären Erkrankungen wie Endokarditis und Myokardinfarkt, Atemwegserkrankungen und Untergewicht bei Frühgeborenen sowie vielen weiteren Erkrankungen beschreiben (BOSNJAK et al., 2001; CULLINAN et al., 2009; AMEET et al., 2013).

Betrachtet man den Zusammenhang zwischen den beschriebenen systemischen Erkrankungen und den Parodontalerkrankungen, fallen gemeinsame Risikofaktoren auf. Dabei handelt es sich z.B. um Alter, Rauchen, Stress und Übergewicht (GROSSI et al., 1994; CULLINAN et al., 2009). Diese Risikofaktoren sind zum Teil modifizierbar. Manche Menschen entwickeln eine parodontale Erkrankung oder eine kardiovaskuläre Erkrankung, andere nicht. Dies liegt auch an den nicht modifizierbaren Risikofaktoren und an der Reaktion des Immunsystems. In einer Studie von PAGE und Mitarbeitern (1998) werden als Ursache Polymorphismen für Zytokine wie Tumornekrosefaktor-alpha und Interleukin-1-beta Genen, also genetische Prädispositionen, beschrieben. CULLINAN und Mitarbeiter (2009) beschreiben die Möglichkeit von Kreuzreaktionen gegenüber bakteriellen und humanen Proteinen als mögliche Ursache des unterschiedlichen Ansprechens des Individuums auf Risikofaktoren.

In einer Studie von AMEET und Mitarbeitern (2013) wird angeführt, dass es sich bei den parodontalen Erkrankungen selbst um modifizierbare Risikofaktoren z.B. für kardiovaskuläre Erkrankungen handelt, aber dass kein Kausalzusammenhang zwischen den beiden Erkrankungen hergestellt werden kann. Laut Studien von KINANE und Mitarbeitern (2001) sowie FOWLER und Mitarbeitern (2001) ist das Risiko eine kardiovaskuläre Erkrankung zu erleiden bei Menschen mit einer Parodontalerkrankung doppelt so hoch wie bei parodontal gesunden Menschen.

Mehrere Studien beschreiben eine bidirektionale Beziehung zwischen Diabetes mellitus und einer parodontalen Erkrankung (KINANE et al., 2001; CULLINAN et al., 2009). Eine Studie von LOE (1993) beschreibt parodontale Erkrankungen sogar als sechst häufigste Komplikation des Diabetes und zeigt, dass es bei Diabetikern mit Parodontitis zu signifikant höherem Knochenverlust und Attachmentverlust in allen Altersklassen kommt. Das Vorliegen eines Diabetes mellitus stellt einen höheren

Risikofaktor dar an einer parodontalen Erkrankung zu erleiden, als das Alter, und liegt bei 2,9-fach gegenüber Nicht-Diabetikern. Ist der Diabetes schlecht eingestellt, ist das Risiko an einer parodontalen Erkrankung zu erkranken doppelt so hoch (LOE, 1993). Eine Parodontitis kann einen bestehenden Diabetes verschlimmern, da es die Einstellung des Blutzuckerwertes erschwert (KINANE et al., 2001).

Zu diesem Thema gibt es ebenfalls zahlreiche veterinärmedizinische Studien. In einer Studie von GLICKMAN und Mitarbeitern (2009) wird eine signifikante Beziehung zwischen dem Schweregrad einer parodontalen Erkrankung und dem daraus folgenden Risiko einer kardialen Erkrankung aufgezeigt. Es wird die Behauptung aufgestellt, dass es auf Grund der hohen Prävalenz von Herzerkrankungen und auch parodontalen Erkrankungen möglich ist, dass prophylaktische Zahnbehandlungen wichtige Auswirkungen auf die allgemeine Gesundheit haben (GLICKMAN et al., 2009; WHYTE et al., 2014). Im Gegensatz dazu wird in einer Studie von PEDDLE und Mitarbeitern (2009) kein Zusammenhang zwischen Parodontalerkrankungen bzw. einer Zahnbehandlung und bakterieller Endokarditis gefunden und daher wird von einer prophylaktischen Antibiotikabehandlung bei einer Zahnbehandlung abgeraten. An 44 Zwerg- und Toy-Pudeln zeigen PAVLICA und Mitarbeiter (2008) in einer post mortem Studie einen Zusammenhang zwischen dem Schweregrad parodontaler Erkrankungen und der Häufigkeit pathologischer Veränderungen an Herz, Nieren und Leber.

GLICKMAN und Mitarbeiter (2011) dokumentieren in ihrer Studie einen signifikanten Zusammenhang zwischen chronischer azotämischer Nierenerkrankung und parodontalen Erkrankungen. Mit steigendem Schweregrad der Parodontalerkrankung nimmt auch das Risiko für eine chronische azotämische Nierenerkrankung zu (GLICKMAN et al., 2011). Damit gehen GLICKMAN und Mitarbeiter konform mit NABI und Mitarbeitern (2014), in deren Studie steigende Schweregrade einer Parodontalerkrankung positiv mit steigenden Schweregraden des Nierenversagens korrelieren. Es wird in beiden Arbeitsgruppen die Hypothese aufgestellt, dass die Prophylaxe und Behandlung von Zahnerkrankungen zu einer Prävention des Fortschreitens von Nierenversagen bzw. chronischen Nierenerkrankungen dienen kann (GLICKMAN et al., 2011; NABI et al., 2014).

Außerdem zeigen verschiedene Studien Zusammenhänge zwischen parodontalen Erkrankungen und veränderten Blutwerten. So weisen RAWLINSON und Mitarbeiter (2011) in ihrer Studie nach, dass der Schweregrad des Attachmentverlustes bei einer

Parodontitis mit einem signifikanten Anstieg von c-reaktivem Protein (CRP) verknüpft ist und es zu einer signifikanten Reduktion von CRP nach einer Zahnbehandlung kommt. In einer Studie von WHYTE und Mitarbeitern (2014) besteht eine positive Korrelation zwischen Thrombozytopenie und der Menge an Plaquebelägen auf den Zähnen sowie dem Schweregrad der Parodontalerkrankung und einem Anstieg der Alaninaminotransferase (ALT).

3 Die Rolle von Proteasen bei der Parodontitis

Bei der Parodontitis kommt es zum Abbau parodontaler Strukturen wie den kollagenen Haltefasern, unter anderem durch Proteasen (BIRKEDAL-HANSEN, 1993). Metalloproteinasen sind die wichtigsten zirkulierenden kollagenolytischen Proteasen (MARCACCINI, 2009). Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind die wichtigsten Proteinasen in der Umsetzung parodontalen Gewebes unter physiologischen, sowie unter pathologischen Bedingungen (UITTO, 2003). Serinproteinasen sind ebenfalls an der Umsetzung parodontalen Gewebes beteiligt, sie haben ein weites Spektrum an Substraten, unter anderem Kollagen (UITTO, 2003). MMPs und Serinproteinasen sind die Proteasen, welche hauptsächlich für den Gewebeabbau bei Parodontitis verantwortlich sind (INGMAN et al., 1996).

3.1 Matrix-Metalloproteinasen

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) oder Matrixine sind Enzyme, welche als wichtige Funktion den Abbau extrazellulärer Matrix innehaben (STERNLICHT und WERB, 2001). Sie sind sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Umständen die wichtigsten Enzyme in der Umgestaltung parodontalen Gewebes (UITTO et al., 2003).

Die MMPs gehören zur Überfamilie der Metzincine (BODE et al., 1993). Zunächst werden sie an Hand ihrer Substratspezifität in vier Gruppen eingeteilt: Kollagenasen, Gelatinasen, Matrilysine sowie Stromelysine (EGEBLAD und WERB, 2002; BOSMAN und STAMENKOVIC, 2003). Auf Grund von Überlappungen bei der Substratspezifität geht man dazu über eine systematische Nummerierung vorzunehmen (MCCAWLEY und MATRISIAN, 2001; EGEBLAD und WERB, 2002). Man unterscheidet außerdem in MMPs, welche in den Extrazellulärraum sezerniert werden und in membrangebundene MMPs (STERNLICHT und WERB, 2001).

MMPs werden von einer Vielzahl von Zellen produziert und sind sowohl an physiologischen wie pathologischen Vorgängen beteiligt (STERNLICHT und WERB, 2001; BOSMAN und STAMENKOVIC, 2003). Sie werden auf multiplen Ebenen reguliert: Bei der Transkription, durch Inhibitoren sowie Aktivatoren (STERNLICHT und WERB, 2001). Zu den endogenen Inhibitoren der MMPs zählen die „Tissue Inhibitors of Metalloproteinases“ (TIMPs) und α 2-Makroglobulin (NAGASE et al., 2006). Ein Gleichgewicht zwischen MMPs und ihren Inhibitoren ist für physiologische Vorgänge essentiell (NAGASE et al., 2006).

Insgesamt sind beim Menschen 23 MMPs bekannt, bei anderen Vertebraten und Nicht-Vertebraten sind es noch mehr (VISSE und NAGASE, 2003; NAGASE et al., 2006).

3.1.1 Einteilung, Aufbau und Funktion der Matrix-Metalloproteinasen

Matrix-Metalloproteinasen sind eine Unterfamilie der Metalloproteinasen. Dies sind proteolytische Enzyme, genauer gesagt Endopeptidasen (STERNLICHT und WERB, 2001). Neben den Metalloproteinasen unterscheidet man an Hand ihrer katalytischen Eigenschaften bei den Endopeptidasen weiter zwischen Serin-, Cystein- und Aspartylproteinasen (STERNLICHT und WERB, 2001). Abhängig von Sequenzunterschieden teilt man die Metalloproteinasen in fünf Superfamilien ein, wobei die MMPs zu der Metzincin-Superfamilie gehören (STERNLICHT und WERB, 2001).

Der Superfamilie der Metzincine ist gemein, dass sie aus einem Zinkbindemotiv und einem Met-turn aufgebaut ist (BODE et al., 1993). Beim Met-turn handelt es sich um eine unterhalb des katalytischen Zentrums befindliche konservierte Methioninschleife (BODE et al., 1993; STÖCKER et al., 1995; STERNLICHT und WERB, 2001). Das Zinkbindemotiv besteht aus drei Histidinresten, welche eine hochkonservierte Aminosäuresequenz bilden. Diese bindet im aktiven Zentrum ein Zinkion (JIANG und BOND, 1992; BODE et al., 1993). Dieses ist für die katalytische Aktivität der Metzincine verantwortlich (STÖCKER et al., 1995). Die Abfolge des Zinkbindemotivs lautet „HEBXHXBGBXHZ“ (JIANG und BOND, 1992; BODE et al., 1993; STÖCKER et al., 1995). Dabei stehen die Ziffern H für einen Histidinrest, E für Glutaminsäure, B für einen hydrophoben Rest, X für einen variablen Rest, G für Glycin und Z für eine familienspezifische Aminosäure (STÖCKER et al., 1995). Die Metzincine werden nach der Ziffer Z weiter unterteilt in vier Multigenfamilien: Die Serralysine, die Astacine, die Adamalysine und die MMPs (BODE et al., 1993; STÖCKER, 1993; STÖCKER et al., 1995).

Wie bereits erwähnt unterscheidet man die MMPs zunächst an Hand ihrer Substratspezifitäten in Gelatinasen, Kollagenasen, Stromelysine und Matrilysine (EGEBLAD und WERB, 2002; BOSMAN und STAMENKOVIC, 2003) (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Einteilung ausgewählter MMPs nach ihrer Substratspezifität (BOSMAN und STAMENKOVIC, 2003; VISSE und NAGASE, 2003)

Kollagenasen	MMP-1, -8, -13, -18
Gelatinasen	MMP-2, -9
Stromelysine	MMP-3, -10, -11
Matrilysine	MMP-7, -26

Auf Grund zahlreicher Überschneidungen der Substratspezifitäten und der zunehmenden Zahl an Substraten werden sie heute nach ihrer Struktur bzw. dem Aufbau ihrer Domänen eingeteilt (EGEBLAD und WERB, 2002; STAMENKOVIC, 2003). Jedes MMP erhält eine Ziffer, chronologisch nach dem Zeitpunkt der Erstbeschreibung (EGEBLAD und WERB, 2002). Viele Autoren verwenden allerdings auch heute noch die Einteilung nach der Substratpräferenz.

Abhängig von ihrer Struktur und den vorliegenden Domänen werden die MMPs in acht Gruppen eingeteilt, wovon drei membrangebunden sind und fünf sezerniert (EGEBLAD und WERB, 2002; VISSE und NAGASE, 2003) (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Auflistung und Einteilung der bisher bei Wirbeltieren nachgewiesenen Matrix-Metalloproteinasen (EGEBLAD und WERB, 2002; ALLDINGER, 2009)

MMP	Strukturklasse	Substrate (Auswahl)
1	Einfache Hämopexin-Domäne	Gelatine, Kollagen (Typ 1-3, 7, 8, 10 und 11), Fibronectin, basisches Myelinprotein, Vitronectin, Aggrekan, Laminin
2	Gelatine-bindend	Gelatine, Kollagen (Typ 1, 3, 4, 5, 7, 10, 11 und 14), Fibronectin, basisches Myelinprotein, Elastin, etc.
3	Einfache Hämopexin-Domäne	Gelatine, Kollagen (Typ 2, 3, 4, 5 und 9), basisches Myelinprotein, Elastin, Fibronectin, Laminin, Vitronectin
7	Minimale Domäne	Kollagen Typ 1, 2, 3, 4, 5, Gelatine, basisches Myelinprotein, Elastin, Fibronectin, Laminin, Vitronectin
8	Einfache Hämopexin-Domäne	Kollagen (Typ 1,2 und 3), Aggrekan
9	Gelatine-bindend	Gelatine, Kollagen Typ (4, 5, 7, 10, 11 und 14), Elastin, basisches Myelinprotein, Laminin, Vitronectin, etc.
10	Einfache Hämopexin-Domäne	Gelatine, Kollagen (Typ 3, 4 und 5), Elastin, Fibronectin, Aggrekan
11	Furin-aktiviert und sezerniert	Gelatine, Fibronectin, Laminin
12	Einfache Hämopexin-Domäne	Gelatine, Kollagen (Typ 1 und 4), basisches Myelinprotein, Elastin, Fibronectin
13	Einfache Hämopexin-Domäne	Gelatine, Kollagen (Typ 1, 2, 3, 4, 5, 9, 10 und 11), Fibronectin, Aggrekan, etc.
14	Typ 1-Transmembran	Gelatine, Kollagen (Typ 1, 2 und 3), Fibronectin, Laminin, etc.
15	Typ 1-Transmembran	Fibronectin, Laminin, Aggrekan, etc.
16	Typ 1-Transmembran	Gelatine, Kollagen (Typ 1 und 3), Fibronectin, Vitronectin
17	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-verankert	Gelatine
18	Einfache Hämopexin-Domäne	Kollagen (Typ 1) (Ratte)
19	Einfache Hämopexin-	Gelatine, Kollagen (Typ 1 und 4), Laminin, Entaktin,

	Domäne	Aggrekan
20	Einfache Hämopexin-Domäne	Amelogenin, Aggrekan
21	Vitronektin-ähnliche Einschübe	unbekannt
22	Einfache Hämopexin-Domäne	Gelatine, Casein
23	Typ 2-Transmembran	Gelatine
24	Typ 1-Transmembran	Gelatine, Fibronektin, Chondroitin-Sulfat-Proteoglykan
25	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-verankert	Gelatine, Kollagen (Typ 4), Fibronektin, Chondroitin-Sulfat-Proteoglykan
26	Minimale Domäne	Gelatine, Kollagen (Typ 4), Fibronektin, Vitronektin
27	Einfache Hämopexin-Domäne	unbekannt
28	Furin-aktiviert und sezerniert	Casein

Die Matrixine sind aus verschiedenen Domänen aufgebaut. Eine sichere Zuordnung zur Familie der MMPs kann erfolgen, wenn die Prodomäne mit „Cystein-Switch“ und die katalytische Region mit Zinkbindemotiv vorhanden sind (VAN WART und BIRKEDAL-HANSEN, 1990; VISSE und NAGASE, 2003). Eine Ausnahme bildet MMP-23, bei dem der „Cystein-Switch“ fehlt (VISSE und NAGASE, 2003).

Die MMPs mit dem einfachsten Aufbau bestehen mindestens aus Signalregion (Prä-Domäne), Propeptidregion (Pro-Domäne) und katalytischer Region (BOSMAN und STAMENKOVIC, 2003; STAMENKOVIC, 2003). Dazu gehören MMP-7 und -26 (STAMENKOVIC, 2003). Durch Einfügen weiterer Domänen entstehen unterschiedliche Spezifitäten (NAGASE und WOESSNER, 1999). Zahlreiche MMPs besitzen zusätzlich eine Hämopexin Domäne (BOSMAN und STAMENKOVIC, 2003; STAMENKOVIC, 2003) (siehe Abbildung 1). Außerdem können Besonderheiten in der katalytischen Region bestehen wie Einschübe von drei Fibronektinen oder das Vorhandensein einer Transmembran-Domäne (BOSMAN und STAMENKOVIC, 2003, STAMENKOVIC, 2003).

Die n-terminale Signalregion, die Prä-Domäne, wird noch intrazellulär abgespalten und dient der Translokation an das endoplasmatische Retikulum, wo die Translation erfolgt (STERNLICHT und WERB, 2001).

Daraufhin folgt die Propeptid-Domäne bestehend aus ca. 80 Aminosäuren in einer konservierten Sequenz PRCGXPD, welche den „Cystein-Switch“ enthält und die Latenz des Proenzym aufrechterhält (VAN WART und BIRKEDAL-HANSEN, 1990; NAGASE und WOESSNER, 1999).

Auf die Propeptid-Domäne folgt die bereits beschriebene katalytische Domäne mit Zinkbindemotiv und Methioninschleife, welche aus ca. 170 Aminosäuren besteht (NAGASE und WOESSNER, 1999). Die katalytische Domäne enthält außerdem ein strukturelles Zink-Ion und zwei bis drei Kalzium-Ionen, welche der Stabilisierung des Moleküls dienen und für die enzymatische Funktion nötig sind (NAGASE und WOESSNER, 1999). Die katalytische Domäne ist der Teil der MMPs, welcher für die Substratpräferenz mitverantwortlich ist (STERNLICHT und WERB, 2001). Sie dient außerdem der Substratbindung (OVERALL, 2001). Als Besonderheit besitzen die Gelatinasen MMP-2 und -9 innerhalb der katalytischen Domäne drei Wiederholungen eines Fibronectin-Typ-2-Moduls (OVERALL, 2001). Diese dienen der Substratbindung von Gelatine und Kollagen (MURPHY et al., 1994; STEFFENSEN et al., 1995; OVERALL, 2001).

Auf die katalytische Domäne folgt bei allen MMPs, exklusive MMP-7, -23 und -26, am C-terminalen Ende die Hämapexin-Domäne mit ca. 210 Aminosäuren (STERNLICHT und WERB, 2001). Diese dient der Substratbindung und der Stabilisierung der Bindung von aktiven MMPs mit ihren Inhibitoren, den Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (OVERALL, 2001). Sie ist essenziell für die Bindung und Spaltung von Kollagenen (MURPHY et al., 1992; BODE, 1995; OVERALL, 2001). MMP-23 besitzt statt einer Hämapexin-Domäne eine cysteinreiche Sequenz, sowie eine Immunglobulin-ähnliche Domäne (VISSE und NAGASE, 2003; NAGASE et al., 2006). Die Hämapexin-Domäne ist gemeinsam mit der katalytischen Domäne wesentlich bedeutsam für die Spaltung dreifach-helikaler interstitieller Kollagene (BODE, 1995). Zwischen katalytischer Domäne und Hämapexin-Domäne befindet sich eine prolinreiche Linker Domäne, welche in ihrer Länge variieren kann und zu Stabilisierung und kollagenolytischer Aktivität der MMPs beiträgt (KNÄUPER et al., 1997) (siehe Abbildung 1 und Tabelle 3).

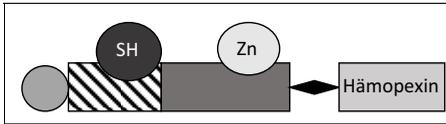
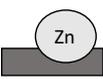


Abbildung 1: Beispiel für den Aufbau eines MMP mit einfacher Hämopexin-Domäne, als Schema dargestellt (nach EGEBLAD und WERB, 2002).

Tabelle 3: Legende zu Abbildung 1

	Signalregion (Prä-Domäne)
	Propeptidregion (Pro-Domäne) mit Thiol-Gruppe
	Katalytische Region mit Zinkatom
	„hinge“-Region oder prolinreiche Linker Domäne
	Hämopexin-Domäne

MMPs sind intrazelluläre Proteinasen. Die meisten sind löslich, können aber auch an die Zellmembran binden. Wie weiter oben beschrieben liegen drei MMP-Klassen stationär membrangebunden (membrane-type MMPs, MT-MMPs) vor. Hier liegt entweder ein Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol Anker vor oder eine Transmembran-Domäne, welche diese Proteinase an die Zellmembran bindet. Man unterscheidet bei den MMPs mit Transmembran-Domäne Typ 1 und 2, je nach Positionierung des aminoterminalen Endes (SOMERVILLE et al., 2003).

MMPs können gemeinsam alle Proteine der extrazellulären Matrix (EZM) abbauen (BOSMAN und STAMENKOVIC, 2003). Hauptsächlich dienen MMPs der Spaltung extrazellulärer Matrix, sie besitzen jedoch die Fähigkeit auch viele Moleküle, welche nicht der extrazellulären Matrix angehören, zu spalten (SOMERVILLE, 2003). Eine Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen werden durch MMPs gesteuert.

Zu den physiologischen Vorgängen bei denen MMPs aktiv sind, zählen Wundheilung, Ovulation, Involution von Uterusgewebe nach der Geburt, Wachstum, Angiogenese, Apoptose und viele weitere Prozesse (MCCAWLEY und MATRISIAN,

2001; LOUKOPOULOS et al., 2003; PAGE-MCCAW et al., 2007; SIEFERT und SARKAR, 2012). Beim Abbau der extrazellulären Matrix werden Wachstumsfaktoren und weitere biologisch aktive Substanzen freigesetzt, die ohne die Tätigkeit der MMPs nicht ihre Wirkung entfalten könnten (BOSMAN et al, 2003; SOMERVILLE, 2003). In einem adulten Organismus besteht unter normalen Bedingungen wenig MMP Aktivität (BOSMAN et al, 2003).

Bei einem pathologischen Geschehen ist das Gleichgewicht zwischen Gewebeaufbau- und -abbau gestört, hierbei überwiegt die Aktivität der MMPs der ihrer Inhibitoren (BREW et al., 2000). Beschrieben sind hier in humanmedizinischen Studien neben der Parodontitis auch andere Erkrankungen wie die rheumatoide Arthritis, Tumorerkrankungen, Nephritis, Myokardinfarkt und zahlreiche vaskuläre Veränderungen wie Aneurysmen und Arteriosklerose (MCCAWLEY und MATRISIAN, 2001; PAGE-MCCAW et al., 2007; SIEFERT und SARKAR, 2012). In veterinärmedizinischen Studien ist ebenfalls eine Korrelation zwischen gesteigertem MMP-Gehalt und verschiedenen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, der Keratokonjunktivitis, der dilatativen Kardiomyopathie und verschiedenen tumorösen Geschehen sowie Enzephalitiden beschrieben (LOUKOPOULOS et al., 2003; ALLDINGER, 2009; BORNBAUM, 2012).

3.1.2 Regulierung der Matrix-Metalloproteinasen-Aktivität

Die Regulierung der MMP-Aktivität findet auf verschiedenen Ebenen statt. Die Transkription der Gene, welche für MMPs codieren, ist der erste Schritt (STAMENKOVIC, 2003). Ohne Transkription liegen keine aktivierbaren Pro-Formen vor (NAGASE und WOESSNER, 1999). Die Transkription wird durch Wachstumsfaktoren, Hormone und weitere biologisch aktive Moleküle gesteuert (BREW et al, 2000).

Eine andere Ebene der Regulierung ist die schrittweise Überführung der inaktiven Pro-Form in die aktive Form, also die eigentliche Aktivierung (STAMENKOVIC, 2003; VISSE und NAGASE, 2003). Außerdem besteht die Möglichkeit der Inhibierung der aktiven Form durch hemmende Substanzen oder Moleküle (NAGASE und WOESSNER, 1999; STAMENKOVIC, 2003). Zudem wird bei MMPs aus polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten die Aktivität durch die Freilassung aus den Granula gesteuert (BIRKEDAL-HANSEN, 1993).

Bei den bereits aktiv sezernierten MMPs kommt eine Steuerung der Aktivität nur über Transkription und Inhibierung in Frage (VISSE und NAGASE, 2003).

3.1.2.1 Aktivierung der MMPs

Matrixine werden als Prä-Pro-Enzyme synthetisiert, die meisten werden als Zymogene sezerniert (NAGASE und WOESSNER, 1999). Das bedeutet sie liegen extrazellulär zunächst als inaktive Proenzyme vor. Um aktiviert zu werden muss die Prodomäne proteolytisch abgespalten werden. Diese enthält eine Cysteinsulfhydrylgruppe in einem konservierten Motiv (VAN WART und BIRKEDAL-HANSEN, 1990). Das Cystein liegt beim inaktiven Proenzym gebunden an das Zink aus der katalytischen Domäne vor und hält somit die Latenz des Proenzym aufrecht. Die Aktivierung der Proenzyme erfolgt über den sogenannten „Cystein-Switch“. Die Bindung zwischen Cystein und Zink wird gelöst und das Proenzym wird aktiviert. Ein Wassermolekül dient als Ersatz für die abgespaltene Thiol-Gruppe und erlaubt somit die Entstehung einer Peptidbindung zwischen MMP und Substrat (VAN WART und BIRKEDAL-HANSEN, 1990).

Die Mehrzahl an pro-MMPs wird, wie oben beschrieben, in der Zelle sezerniert und erst außerhalb der Zelle aktiviert. Allerdings bestehen Ausnahmen. Bestimmte MMPs werden membrangebunden oder bereits intrazellulär aktiviert (STERNLICHT und WERB, 2001).

Zu den MMPs, welche membrangebunden aktiviert werden gehört MMP-2 (VISSE und NAGASE, 2003). Die Pro-Form von MMP-2 wird von MT-MMPs aktiviert (VISSE und NAGASE, 2003). Dies erfolgt bei MMP-14 auf besondere Weise unter Ausbildung eines Komplexes zwischen MMP-14 und TIMP-2, welches pro-MMP-2 gebunden hat (NAGASE und WOESSNER, 1999; STERNLICHT und WERB, 2001; VISSE und NAGASE, 2003). Die Aktivierung von pro-MMP-2 entsteht durch eine Bindung zwischen der Hämopexin-Domäne von pro-MMP-2 und der C-terminalen Domäne von MMP-14 (NAGASE und WOESSNER, 1999; STERNLICHT und WERB, 2001; SOMERVILLE et al., 2003).

Die intrazelluläre Aktivierung findet bei den sezernierten MMPs -11 und -28 durch Furin statt (PEI und WEISS, 1995). Diese MMPs besitzen am C-terminalen Ende eine Furin-erkennende-Sequenz. Die MT-MMPs verfügen über ein vergleichbares Motiv in der Prodomäne und werden daher zumeist ebenfalls intrazellulär aktiviert und in ihrer aktiven Form sezerniert (PEI und WEISS, 1995). Die Steuerung erfolgt vermutlich mittels endogener Inhibitoren (PEI und WEISS, 1995; NAGASE und WOESSNER, 1999; VISSE und NAGASE, 2003).

Die Aktivierung der Proenzyme ist ein wichtiger regulatorischer Schritt (NAGASE und VISSE, 2006). Sie kann auf weiteren Wegen erfolgen, z.B. durch die Proteasen Plasmin und Cathepsin G, durch Strukturänderung, durch aktivierte MMPs und in vitro auch durch Behandlung mit bestimmten Chemikalien oder Hitze (VAN WART und BIRKEDAL-HANSEN, 1990; TERVAHARTIALA et al., 1996; SOMERVILLE et al., 2003; VISSE und NAGASE, 2003).

3.1.2.2 Inhibierung der MMPs

Zu den Inhibitoren der MMPs zählen die „Tissue Inhibitors of Metalloproteinases“ (TIMPs) und α 2-Makroglobulin (NAGASE et al., 2006). Ein Gleichgewicht zwischen MMPs und ihren Inhibitoren ist für physiologische Vorgänge essenziell (NAGASE et al., 2006). Veränderungen im TIMP-Spiegel beeinflussen direkt die Aktivität der MMPs (VISSE und NAGASE, 2003).

Die TIMPs sind die wichtigsten Inhibitoren der MMPs, alle MMPs werden durch sie in unterschiedlichem Ausmaß inhibiert (BAKER et al., 2002; STAMENKOVIC, 2003; NAGASE et al., 2006). Es handelt sich um endogene Inhibitoren, die die MMPs im Verhältnis 1:1 binden (BREW et al., 2000; STAMENKOVIC, 2003; VISSE und NAGASE, 2003). Bislang sind vier TIMPs bei Wirbeltieren bekannt (BREW et al., 2000; BAKER et al., 2002). Sie werden sezerniert, liegen aber auch gebunden an membrangebundene MMPs vor (BAKER et al., 2002). TIMPs üben ihre hemmende Funktion im Gewebe aus (BAKER et al., 2002). Es sind Moleküle mit einer Größe von ca. 21 kDa, welche aus ca. 184-194 Aminosäuren aufgebaut sind (BAKER et al., 2002; NAGASE et al., 2006). Sie bestehen aus einer C- und einer N-terminalen Region, wobei die N-terminale Region der Bindung der MMPs dient (BAKER et al., 2002; NAGASE et al., 2006).

Zusammen können die TIMPs alle MMPs hemmen (BAKER et al., 2002). Es gibt Unterschiede zwischen den Affinitäten der verschiedenen TIMPs zu den verschiedenen MMPs (BREW et al., 2000). Neben der Bindung und Inhibierung der MMPs besitzen die TIMPs weitere Eigenschaften. TIMP-3 inhibiert z.B. auch ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase) und ADAMTs (ADAM with Thrombospondin type-1 motif) (BAKER et al., 2002; STAMENKOVIC, 2003; NAGASE et al., 2006). Die Aktivierung von pro-MMP-2 erfolgt über einen Komplex aus TIMP-2 und MMP-14 (NAGASE und WOESSNER, 1999; VISSE und NAGASE, 2003). TIMPs dienen außerdem der Inhibierung der Angiogenese bei Tumorwachstum, der Inhibierung der Metastasierung sowie der Zellinvasion (NAGASE und WOESSNER, 1999). Die

Sequenzunterschiede zwischen den TIMPs erklären ihre divergierenden Funktionen (BREW et al., 2000).

α 2-Makroglobulin ist ein Molekül mit einer Größe von ca. 725 kDa, welches im Plasma vorliegt und hier den wichtigsten Inhibitor der MMPs darstellt (BAKER et al., 2002; NAGASE et al., 2006). Es hemmt auch andere Endoproteinasen wie ADAMs (BAKER et al., 2002). Hauptsyntheseort ist die Leber (BAKER et al., 2002). Die Inhibierung erfolgt über eine Endozytose des Matrixins in das Innere des α 2-Makroglobulin Moleküls (NAGASE et al., 2006).

Es gibt zahlreiche weitere MMP-Inhibitoren. MMP-Inhibitoren mit gewissen Sequenz Ähnlichkeiten zur N-terminalen Region von TIMPs sind unter anderem Thrombospondin-1 und -2, Netrine und PCPE (type I collagen C-proteinase enhancer protein) (BAKER et al., 2002). TFPI-2 (tissue factor pathway inhibitor 2) ist ein Serin-Proteinase-Inhibitor (BAKER et al., 2002). RECK (reversion inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) ist bisher der einzig bekannte membrangebundene Inhibitor der MMPs (STAMENKOVIC, 2003). Er zeigt inhibitorische Wirkung gegen MMP-2, -9 und -14 und kommt in zahlreichen menschlichen Geweben vor (BAKER et al., 2002). Es wird vermutet, dass RECK noch weitere biologische Funktionen hat (BAKER et al., 2002). Überexpression von RECK in Tumorzelllinien führt zu einem Abfall der MMP-9 Aktivität und zum Absinken des invasiven Potenzials der Tumorzellen (BAKER et al., 2002).

3.1.3 Die Rolle der Matrix-Metalloproteinasen in der Pathogenese der Parodontitis

Matrix-Metalloproteinasen dienen dem Umbau und Abbau von Gewebe. Bei der Parodontitis kommt es durch sie zum Kollagenabbau (LEE et al., 1995; MARCACCINI et al., 2009). Die Parodontitis ist eine Erkrankung, welche indirekt durch Bakterien ausgelöst wird (ISHIKAWA, 2007). Die im Verlauf auftretende Gewebeerstörung ist jedoch bedingt durch die wirtseigene Immunreaktion (KINANE und LINDHE, 1999; VAN DYKE und SERHAN, 2003; ISHIKAWA, 2007).

Bakterien, ihre Enzyme und Toxine sind in der Lage, wirtseigene Zellen zur Expression von gewebeabbauenden Enzymen zu veranlassen (BIRKEDAL-HANSEN, 1993; DAHAN et al., 2001; LOESCHE und GROSSMANN, 2001). Im Rahmen der Parodontitis entsteht als Antwort auf die bakterielle Besiedlung ein entzündliches Geschehen, in dem wirtseigene Zellen wie Neutrophile und Lymphozyten zur Sezernierung von Entzündungsmediatoren angeregt werden

(ISHIKAWA, 2007). Die Entzündungsmediatoren bedingen die Aktivierung und Entlassung von Matrix-Metalloproteinasen aus wirtseigenen Zellen (BIRKEDAL-HANSEN, 1993; DAHAN et al., 2001). Die MMPs führen in der Folge über Kollagenabbau zur Vertiefung des gingivalen Sulkus und zur Bildung der parodontalen Tasche (SORSA et al., 1992; LOESCHE und GROSSMANN, 2001). Im Rahmen des Entzündungsgeschehens kommt es zum Abbau des Zahnhalteapparates und zum alveolaren Knochenabbau (GORREL, 2006; ISHIKAWA, 2007). Die fortschreitende Gewebeerstörung ist bedingt durch die körpereigene Abwehr (ISHIKAWA, 2007).

Wenige Studien haben sich bisher mit der Rolle der MMPs bei der Parodontitis des Hundes befasst. Es gibt jedoch zahlreiche Studien, die sich mit ihrer Rolle bei der Parodontitis des Menschen beschäftigen.

3.1.3.1 Matrix-Metalloproteinasen und ihre Bedeutung bei parodontalen Erkrankungen in der Humanmedizin

Matrix-Metalloproteinasen sind die wichtigsten Enzyme in der Umgestaltung von parodontalen Geweben unter physiologischen, als auch pathologischen Umständen (UITTO et al., 2003). MMPs sind in gesundem und erkranktem parodontalen Gewebe in unterschiedlichem Ausmaß und unterschiedlicher Form zu finden.

Es zeigt sich eine erhöhte Aktivität von MMP-1, -2, -3, -8, -9 und -13 in Proben aus humaner gingivaler Sulkusflüssigkeit parodontal erkrankter Patienten (SOELL et al., 2002; POZO et al., 2005; BILDT et al., 2008; HERNANDEZ RIOS et al., 2009). In einer Studie von BILDT und Mitarbeitern (2008) ist die MMP Aktivität im GCF (gingival crevicular fluid) bei Parodontitis 250-fach erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe.

In Studien von MÄKELÄ und Mitarbeitern (1994) sowie BILDT und Mitarbeitern (2008) ist bei Parodontitis der Gehalt an MMP-2 in GCF erhöht, dahingegen ist dieser in anderen Studien bei Parodontitis niedriger als bei Gingivitis und der Kontrollgruppe (MAESO et al., 2007; RAI et al., 2008). Der Gehalt an MMP-1, -2, -3, -8, -9, -13, -14 ist in gingivaler Sulkusflüssigkeit bei Parodontitis Patienten erhöht (MÄKELÄ et al., 1994; INGMAN et al., 1996; SOELL et al., 2002; BEKLEN et al., 2006; MAESO et al., 2007; BILDT et al., 2008; RAI et al., 2008; MARCACCINI et al., 2010; KINNEY et al., 2014; LEPPILAHTI et al., 2014; POPAT et al., 2014; GUL et al., 2016).

In einer Studie von SOELL und Mitarbeitern (2002) zeigt sich mittels ELISA in gingivaler Sulkusflüssigkeit und Gewebswasserproben bei Patienten mit Parodontitis im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ein signifikanter Anstieg von MMP-1, -2, -3 und -9 einhergehend mit einer signifikant erhöhten Aktivität, welchem ein signifikantes Absinken der TIMP-1 Konzentration gegenübersteht. Die Prozentzahl an aktiven MMPs ergibt keine signifikanten Unterschiede zwischen Parodontitisgruppe und Kontrollgruppe (SOELL et al., 2002). Es wird geschlussfolgert, dass ein Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs für den Abbau parodontaler Strukturen bei der Parodontitis verantwortlich ist (SOELL et al., 2002). Zu der gleichen Schlussfolgerung kommen zahlreiche weitere Autoren und weisen zudem einen Anstieg des TIMP-1 Gehaltes nach Parodontalbehandlung nach (POZO et al., 2005; MAESO et al., 2007; MARCACCINI et al., 2010; POPAT et al., 2014). Dem gegenüber steht die Aussage von EJEIL und Mitarbeitern (2003), die in ihrer Studie einen signifikanten Anstieg von TIMP-1 bei Vorliegen einer Parodontitis nachweisen. Das bestätigen auch KUBOTA und Mitarbeiter (1996), die in ihrer Studie bei Patienten mit Parodontitis in Gingivabiopтатаen mittels RT-PCR einen signifikant erhöhten Gehalt an MMP-1, -3, -8 und TIMP-1 mRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe darstellen. Der Gehalt an TIMP-2 ist in gingivaler Sulkusflüssigkeit bei Parodontitis signifikant reduziert (POZO et al., 2005). Im Gegensatz dazu steht die Aussage von MARCACCINI und Mitarbeitern (2010), die einen erhöhten Gehalt an TIMP-2 nachweisen. Diese Meinung vertreten auch MESCHIARI und Mitarbeiter (2013) für TIMP-2 im Speichel.

POZO und Mitarbeiter (2005) kommen zu dem Schluss, dass die übermäßige MMP Aktivität, die Aktivierung der latenten MMPs und die Reduktion der TIMPs zum Abbau der parodontalen Strukturen bei einer Parodontitis führen. Bei Patienten mit Parodontitis kann die aktive Form von MMP-2, -8 und -9 nachgewiesen werden (KOROSTOFF et al., 2000; POZO et al., 2005; BILDТ et al., 2008). POZO und Mitarbeiter (2005) können die aktive Form von MMP-9 nur bei Patienten mit Parodontitis nachweisen, in dieser Gruppe ist außerdem die aktive Form von MMP-8 signifikant erhöht. Auch MARCACCINI und Mitarbeiter (2010) zeigen einen erhöhten Gehalt der aktiven Form von MMP-9 in der gingivalen Sulkusflüssigkeit von Patienten mit Parodontitis. BILDТ und Mitarbeiter weisen ebenfalls einen erhöhten Gehalt an aktivem MMP -8 und -9 sowie zudem an MMP-2 im GCF von Parodontitis Patienten

nach. RAI und Mitarbeiter (2008) können die aktive Form von MMP -2 in der Kontrollgruppe dagegen nicht nachweisen.

Mit steigendem Schweregrad der Parodontitis kommt es im GCF zu einem Anstieg der MMP Aktivität, diese erhöhte MMP Aktivität zeigt nach Parodontalbehandlung einen Rückgang auf normale Werte (POZO et al., 2005).

Das Verhältnis aktiver Kollagenasen zur Gesamtmenge an Kollagenasen ist bei einer aktiven Parodontitis signifikant erhöht und es liegen die meisten aktiven Proben vor, bei Gingivitis hingegen die meisten latenten (LEE et al., 1995). Die Kollagenaseaktivität in gingivaler Sulkusflüssigkeit von Probanden mit aktiver Parodontitis (progressiv fortschreitendem Gewebsabbau) ist 5-6-mal höher und es liegen 1,5-mal so viele aktive Kollagenasen vor als bei einer Gingivitis oder passiven Parodontitis (Parodontalabbau aus vorhergehender Parodontitis) (LEE et al., 1995). Auch KINNEY und Mitarbeiter (2014) zeigen in ihrer Studie, dass im GCF von Patienten mit progressiver bzw. aktiver Parodontitis MMP-8 und -9 signifikant höher sind als bei Patienten mit stationärer Parodontitis.

KOROSTOFF und Mitarbeiter (2000) weisen die aktive Form von MMP-2 im Speichel nur bei Patienten mit Parodontitis nach. UITTO und Mitarbeiter (1990) stellen in einer Studie fest, dass bei Patienten mit Parodontitis der Gehalt an Kollagenasen, sowie ihre Aktivität im Speichel erhöht ist und diese zumeist in ihrer aktiven Form vorliegen. In humanem Speichel sind die Spiegel an MMP-2, -8, -9 bei Parodontitis erhöht und sinken nach Parodontalbehandlung (UITTO et al., 1990; MÄKELÄ et al., 1994; RAI et al., 2008; KINNEY et al., 2011; MESCHIARI et al., 2013). Außerdem ist die Kollagenaseaktivität bei Patienten mit Parodontitis signifikant erhöht und die Kollagenasen liegen zumeist in ihrer aktiven Form vor (UITTO et al., 1990). KINNEY und Mitarbeiter (2011) postulieren, dass ein hoher Gehalt an MMP-8 und -9 im Speichel mit einer progressiven Parodontitis korreliert, wobei ein niedriger Gehalt mit einer passiven Parodontitis korreliert.

In Mundspülproben von Patienten mit Parodontitis sind die Werte an MMP-2 und -9 erhöht und es können aktive Formen nachgewiesen werden (MÄKELÄ et al., 1994).

Nach Parodontalbehandlung sinken die Spiegel an MMP-1, -2, -8, -9 in oralen Flüssigkeiten (MÄKELÄ et al., 1994; MARCACCINI et al., 2009; MARCACCINI et al., 2010; KINNEY et al., 2011; MESCHIARI et al., 2013; KINNEY et al., 2014; POPAT et al., 2014; GUL et al., 2016). Die MMP-Spiegel sind bei Parodontitis Patienten auch im Plasma erhöht und zeigen nach Parodontalbehandlung einen Rückgang

(MARCACCINI et al., 2009; MESCHIARI et al., 2013). MESCHIARI und Mitarbeiter (2013) zeigen eine erhöhte Aktivität von MMP-9 bei Patienten mit Parodontitis und ein Absinken nach Parodontalbehandlung.

In Proben aus humaner Mundschleimhaut und im Blutplasma parodontal erkrankter Patienten zeigen sich eine erhöhte Aktivität von MMP-2,-3,-8 und -9 (KUBOTA et al., 1996; MARCACCINI et al., 2009). MESCHIARI und Mitarbeiter (2013) weisen ebenfalls erhöhte Spiegel an MMP-8 und -9 im Plasma von Parodontitis Patienten nach.

Bei Parodontitis finden sich in der Gingiva mehr MMP-8 und -13 exprimierende Zellen als in gesunder Gingiva (TERVAHARTIALA et al., 2000). KUBOTA und Mitarbeiter (2008) zeigen in ihrer Studie eine Aufregulierung der Genexpression für MMP-1, -3, -9 und -13 und TIMP-1 und -4 in der Gingiva bei Patienten mit Parodontitis. Eine statistische Signifikanz liegt allerdings nur bei MMP-1 und TIMP-4 vor. Der Gehalt an MMP-1 ist bei Parodontitis in der Gingiva erhöht (EJEIL et al., 2003; BILDT et al., 2008). Der Gehalt an MMP-9 und -13 sowie an TIMP -1 ist ebenfalls erhöht (EJEIL et al., 2003). OVERALL und Mitarbeiter (1987) stellen eine positive Korrelation zwischen Kollagenaseaktivität in Gingivaproben in vivo und dem Schweregrad der Gingivitis fest. Mit steigendem Schweregrad der Entzündung steigt der Anteil aktiver kollagenolytischer Enzyme. LEE und Mitarbeiter kommen zu den gleichen Erkenntnissen in humaner Sulkusflüssigkeit. Wohingegen BILDT und Mitarbeiter (2008) in Gingiva und auch im parodontalen Ligament eine höhere Gesamtkativität der MMPs in der Kontrollgruppe aufzeigen.

BILDT und Mitarbeiter (2008) untersuchen parodontales Ligament von Parodontitis Patienten und weisen einen erhöhten Gehalt an aktivem MMP-1, -2 und -8 in der gesunden Kontrollgruppe nach.

Die Feststellung der Quelle der MMPs ist außerdem Bestandteil multipler Studien (OVERALL et al., 1987; UITTO et al., 1990; LEE et al., 1995; SORSA et al., 1995). Polymorphkernige neutrophile Granulozyten stellen die Hauptquelle für Kollagenasen im Speichel dar (UITTO et al., 1990). MMP-8 als dominierende Kollagenase in Plaque entspringt ebenfalls polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (SORSA et al., 1995). Die kollagenolytische Aktivität bei Parodontitis stammt von wirtseigenen Neutrophilen und ist nicht bakteriellen Ursprungs (OVERALL et al., 1987; LEE et al., 1995).

3.1.3.2 Die Rolle der Matrix-Metalloproteinasen bei der Parodontitis des Hundes

Es gibt bisher wenige Untersuchungen zur Beteiligung der MMPs an der Parodontitis des Hundes.

KAISER und Mitarbeiter (2014) untersuchen die Expression von MMP-2, -3, -8 und -9 sowie von TIMP-1 und -2 mittels Immunhistologie in der Gingiva des Hundes und stellen fest, dass bei Parodontitis die Expression der untersuchten MMPs erhöht ist und die der TIMPs tendenziell vermindert. Es wird geschlussfolgert, dass die Parodontitis auf Grund einer reduzierten Inhibierung der MMPs durch die TIMPs entsteht.

KRYSHTALSKYJ und Mitarbeiter (1986) untersuchen in der gingivalen Sulkusflüssigkeit von zwei Beaglen mit künstlich erzeugter Parodontitis die kollagenolytische Aktivität und die klinischen Parameter. In Bereichen mit Parodontitis ist der Gehalt an aktivem Enzym signifikant erhöht gegenüber den Bereichen mit Gingivitis und dem Kontrollbereich. Hier überwiegen die latenten Enzyme. Die kollagenolytische Aktivität ist signifikant höher an klinisch erkrankten Lokalisationen im Vergleich zu Kontrollbereichen. Hier ist außerdem die Aktivität von Kollagenase-Inhibitoren signifikant erniedrigt und die Produktion der Sulkusflüssigkeit erhöht. Es besteht eine Korrelation zwischen dem klinischen Attachmentverlust und der Menge an gingivaler Sulkusflüssigkeit und dem Vorhandensein aktiver Enzyme darin.

SCHWARZ und Mitarbeiter (2007) untersuchen histologisch und immunhistologisch die Reaktion parodontalen Gewebes bei fünf Beagle Hunden mit natürlich erworbener Parodontitis nach Parodontalbehandlung mit einem Er:YAG-Laser (Erbium-Yttrium-Aluminium-oxid-Granat-Laser). MMP-8 kann im Entzündungszellinfiltrat nachgewiesen werden. Die Proben mit weit apikal reichendem Entzündungszellinfiltrat und Alveolarknochenabbau zeigen ein verstärktes immunhistologisches Signal für MMP-8. Proben mit Neubildung von Zement und parodontalem Ligament zeigen im Gegensatz dazu ein abgeschwächtes immunhistologisches Signal für MMP-8.

In einer Studie von KIM und Mitarbeitern (2013) werden mittels Zymografie MMP-2 und -9 in der Gingiva von Beagle-Hunden mit Parodontitis nachgewiesen. Nach oraler Applikation einer subantimikrobiellen Dosis von 1-2 mg/kg/d Doxycyclin sinken MMP-2 und -9 signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. Es wird geschlussfolgert,

dass eine Dosierung von 2 mg/kg/d Doxycyclin verwendet werden kann, um eine klinische Verbesserung einer parodontalen Erkrankung zu erreichen.

In einer Studie von PAULA-SILVA und Mitarbeitern (2010) wird die Expression von MMP-1, -2, -8 und -9 bei der experimentell erzeugten apikalen Parodontitis und nach verschiedenen Wurzelkanalbehandlungstechniken mittels Immunhistologie untersucht. Eine Wurzelkanalbehandlung von Zähnen mit apikaler Parodontitis unter Verwendung von Calciumhydroxid als Füllmaterial führt zu einer Reduktion im Gehalt von MMP-2, -8 und -9 gegenüber unbehandelten Zähnen und Zähnen, welche eine Wurzelkanalbehandlung in einer einzelnen Sitzung erhalten haben. Die Arbeitsgruppe folgert, dass Calciumhydroxid eine vorteilhafte Funktion in der RepARATION von Gewebe innehat und zu einer Reduktion der MMP-Synthese führt.

3.2 Serinproteasen

Serinproteasen sind Endopeptidasen, welche in ihrem katalytischen Zentrum ein Serin-Aminosäurerest vorliegen haben (UITTO et al., 2003). Sie werden von neutrophilen Granulozyten gebildet und entlassen (KUNIMATSU et al., 1993; UITTO et al., 2003). Sie dienen dem Abbau extrazellulärer Matrix, sowie der Regulation von Entzündungsreaktionen (UITTO et al., 2003). Sie besitzen ein breites Substratspektrum. Elastase und Cathepsin G bauen unter anderem Kollagen ab (UITTO et al., 2003). Cathepsin G ist außerdem an der Aktivierung von pro-MMP-8 beteiligt (TERVAHARTIALA et al., 1996; UITTO et al., 2003).

3.2.1 Cathepsin G

Patienten mit Gingivitis bzw. Parodontitis zeigen deutlich erhöhte Cathepsin G Spiegel im Speichel im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe und zahnlosen Patienten. Außerdem zeigt sich ein Anstieg der Enzymmenge mit steigendem Schweregrad der Erkrankung. Der stärkste Anstieg der Enzymmenge wird zwischen Patienten mit gesunden Zähnen und Patienten mit Gingivitis festgestellt (PEDERSON et al., 1995).

KUNIMATSU und Mitarbeiter (1993) untersuchen die Aufgabe von Cathepsin G beim Abbau parodontaler Strukturen in humaner gingivaler Sulkusflüssigkeit bei Patienten mit Gingivitis und Parodontitis. Das Cathepsin G stammt aus neutrophilen Granulozyten und ist in der Lage, Kollagen zu spalten. Es zeigt sich eine Korrelation zwischen dem Schweregrad der Parodontitis und der Menge an Cathepsin G. Nach durchgeführter Parodontalbehandlung sinkt die Menge an Cathepsin G wieder ab. TERVAHARTIALA und Mitarbeiter (1996) stellen ebenfalls eine erhöhte Aktivität bei

Patienten mit Parodontitis im Vergleich zu gesunden Patienten fest. Cathepsin G ist direkt über Kollagenspaltung, als auch indirekt, über die Aktivierung anderer Kollagenasen wie z.B. pro-MMP-8 oder die Erhöhung der Aktivität von Elastase, an der Zerstörung parodontaler Strukturen beteiligt (TERVAHARTIALA et al., 1996).

3.2.2 Elastase

PEDERSON und Mitarbeiter (1995) stellen mittels ELISA fest, dass Patienten ohne Zähne, sowie Patienten mit gesunden Zähnen deutlich niedrigere Spiegel an Elastase im Speichel aufweisen, als Patienten mit Gingivitis bzw. Parodontitis. Außerdem zeigt sich ein Anstieg der Enzymmenge mit dem Schweregrad der Erkrankung (PEDERSON et al., 1995). TERVAHARTIALA und Mitarbeiter (1996) stellen in ihren Untersuchungen fest, dass die Aktivität von Elastase durch Cathepsin G erhöht wird und Elastase am Abbau parodontaler Strukturen beteiligt ist. UITTO und Mitarbeiter (1996) zeigen, dass Elastase bei ca. 85% der Patienten mit Parodontitis erhöht ist und eine signifikante Korrelation zwischen der Elastase Aktivität und der Zahl an parodontalen Taschen mit einer Tiefe von mehr als 6 mm und dem Grad der Gingivitis besteht. Elastase stellt sich als kein guter Indikator für Gingivitis dar. Bei gesunden Patienten sind die Elastase Werte niedrig, bei Zahnlosen niedriger (UITTO et al., 1996). Nach einer Parodontalbehandlung sinken die Werte auf Werte ähnlich denen gesunder Patienten (UITTO et al., 1996). In einer Studie an gingivaler Sulkusflüssigkeit stellen ELEY und COX (1996) fest, dass sich erhöhte Gehalte an Elastase bei Patienten mit Attachmentverlust und signifikant erhöhte Werte an Lokalisationen mit rasant fortschreitender Parodontitis ergeben. Durch Parodontalbehandlung sinken die Elastase Werte signifikant. Dies bestätigen auch CHEN und Mitarbeiter (2000), welche neben Elastase auch MMP-8 im GCF von Parodontitis Patienten untersuchen. Der Gehalt beider Enzyme sinkt nach Parodontalbehandlung signifikant, MMP-8 sinkt stärker als Elastase. Elastase und MMP-8 Werte korrelieren signifikant miteinander (CHEN et al., 2000).

3.2.3. Serinproteasen bei der Parodontitis des Hundes

In einer Studie von RENVERT und Mitarbeitern (1998) wird an Beaglen mit experimentell erworbener Parodontitis die Korrelation von ansteigenden Elastase Werten und zunehmendem Attachmentverlust mit statistischer Signifikanz nachgewiesen. Der Zeitpunkt mit dem höchstem Attachmentverlust entspricht dem Zeitpunkt mit der höchsten Elastase-ähnlichen Aktivität. Je länger die Ligaturen in Position sind, desto mehr nimmt der Attachmentverlust zu. In gesunden

Lokalisationen und Lokalisationen mit Gingivitis zeigen sich durchgehend niedrige Enzymaktivität.

G. Eigene Untersuchungen

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Lösungen und Puffer

Pufferlösung:

50 mM Tris-HCl pH 7,4

200 mM NaCl

10 mM CaCl²

0,02% Triton X-100

DQ-Reaktionspuffer:

150 mM NaCl

50 mM Tris pH 7,4

5mM CaCl²

4.1.2 Hersteller und Bezugsquellen verwendeter Materialien und Geräte

Acteon Germany GmbH, Mettmann

pspix, PSP-Scanner (Filmgröße 0-3)

Aesculap AG, Tuttlingen

Parodontalsonde (Parodontometer DB874R)

Comet AG, Liebfeld, CH

X-Ray Collimator Type Collimat M

Fujifilm, Düsseldorf

Speicherfolien (IP) ST-VI (Standardtyp) IP Kassetten Typ C und D

Genorise Scientific, Berwyn, IL, USA

Enzym-Aktivitäts-Assay Nori Canine MMP-2 ELISA Kit (Catalog # GR115003)

Enzym-Aktivitäts-Assay Nori Canine MMP-3 ELISA Kit (Catalog # GR115030)

Enzym-Aktivitäts-Assay Nori Canine MMP-9 ELISA Kit (Catalog # GR115034)

GraphPad Software, La Jolla, CA, USA

GraphPad Prism 7.00

Greiner Bio One International GmbH, Kremsmünster, AUT

96 Well-Mikroplatte (microplate, PS, F-bottom, non-binding, schwarz, #655900)

Heraeus Holding GmbH, Hanau

Gefrierschrank Herafreeze HFU 686

Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen

Zentrifuge Mikro 22R Typ C1110

iM3 Dental Limited, Stamullen, Co. Meath, IRL

Revolution 4 DC (Dentalröntgengerät)

Merck KGaA, Darmstadt

MMP-9 (MMP-9, Active, Recombinant 0,1mg/ml, Calbiochem # PFO24)

Oraflow Inc., Smithtown, NY, USA

PerioPaper Strips (gingival fluid collection strips) #593520

Philips, Hamburg

PCR Eleva (Computed Radiography-System)

PCR Eleva Cosimax CR Folienleser

RayBiotech, Norcross, GA, USA

Enzym-Aktivitäts-Assay „RayBio Canine MMP-8 ELISA Kit“ (Catalog # ELC-MMP8)

Sirona Dental Systems GmbH, Bensheim

Heliodent (Dentalröntgengerät)

Tecan Group Ltd., Männedorf, CH

Mikroplattenlesegerät TECAN Infinite M200 PRO

Mikroplattenlesegerät TECAN SPARK

Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich

DQ-Gelatine (DQ™ Gelatin From Pig Skin, Fluorescein Conjugate (Invitrogen™) # D12054, 1 mg/ml)

DQ-Kollagen (DQ™ Collagen, type I From Bovine Skin, Fluorescein Conjugate (Invitrogen™) # D12060, 1 mg/ml)

4.1.3 Hersteller und Bezugsquellen verwendeter Medikamente

Albrecht, Aulendorf

Isoflo®

B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Atropinsulfat (Atropin Sulfuricum 0,5 mg/ml)

Sterofundin®, Lösung zur intravenösen Infusion, 1/1 E

Ecuphar GmbH, Greifswald

Diazepam (Ziapam 5 mg/ml)

medistar Arzneimittelvertrieb GmbH, Ascheberg

Ketamin (Ketamin 10%)

Xylazin (Xylazin 2% Bernburg)

4.2 Methoden

4.2.1 Patientengut

Die Gruppen der untersuchten Patienten bestehen aus über 12 Monate alten Hunden jeglichen Gewichts und Geschlechts, sowie jeglicher Rasse. Ausgeschlossen sind Tiere, die in der präanästhetischen Untersuchung als nicht narkosefähig eingestuft werden, in den letzten drei Monaten eine Zahnsanierung erhalten haben oder in den letzten sieben Tagen systemisch eine antibiotische, entzündungshemmende (NSAIDs oder Kortikosteroide) oder immunsuppressive Therapie erhalten haben oder dauerhaft unter immunsuppressiver Therapie stehen. Weiterhin ist als Ausschlusskriterium das Vorliegen einer systemischen entzündlichen, infektiösen oder immunbedingten Erkrankung zu sehen. Außerdem das Vorliegen tumoröser oder akuter traumatischer Veränderungen der Mundhöhle. Chronische Zahnfrakturen, dentale oder skelettale Malokklusion, Hypo- bzw. Hyperdontie werden nicht als Ausschlusskriterien angesehen.

Alle Patienten, die an der Studie partizipieren, sind in der allgemeinen klinischen Untersuchung unauffällig, in der labordiagnostischen Untersuchung sind die Entzündungsparameter im Referenzbereich.

Es werden insgesamt 56 Hunde untersucht (Übersicht siehe Tabelle 7 im Anhang). Bei dem untersuchten Patientengut handelt es sich um zehn Mischlinge, sechs Beagle, sechs Labrador Retriever, fünf Golden Retriever, fünf Deutsche Schäferhunde, drei Bernhardiner, zwei Berner Sennenhunde, zwei Jack Russel Terrier, zwei Rauhaardackel und 15 weitere Rassen. Das Alter der untersuchten Hunde beträgt 1–11 Jahre mit einem durchschnittlichen Alter von 4,2 Jahren. Das durchschnittliche Körpergewicht beträgt 21,97 kg. Zehn Tiere sind männlich-kastriert, vier weiblich-kastriert, 21 männlich unkastriert und 21 weiblich unkastriert.

Vor Beginn der Untersuchungen werden zwei Gruppen gebildet. Die Patientengruppe wird aus Hunden gebildet, die in der Zahnabteilung der Klinik für Kleintiere, Chirurgie, der Justus-Liebig-Universität zu einer Parodontal- oder sonstigen Zahnbehandlung vorgestellt werden. Bei diesen Patienten liegt nach Gesamtbeurteilung des Gebisses eine Parodontalerkrankung Grad 1 bis 4 vor. Dies bedeutet, dass dem Gebiss insgesamt bei der Untersuchung Grad 1 bis 4 einer Parodontalerkrankung zugeordnet wird, wobei es sich bei Grad 1 um Patienten mit ausschließlich Gingivitis und Grad 4 Patienten mit hochgradiger Parodontitis handelt. Die Kontrollgruppe wird nach Anzeige und Genehmigung durch das Regierungspräsidium Gießen gebildet

und läuft unter dem Geschäftszeichen V54 – 19 c 20 15 h 01 GI 18/17 Nr. G 25/2017. Diese Gruppe besteht aus Tieren, die durch klinische und radiologische Untersuchung als parodontitisfrei (Parodontalerkrankung Grad 0) befundet werden und aus anderen Gründen als zur Parodontalbehandlung (z.B. Röntgenuntersuchung, orthopädische Untersuchung) anästhesiert werden. Bei diesen Tieren ist jeder untersuchte Zahn frei von Anzeichen einer parodontalen Erkrankung, es liegt also bei jedem Zahn eine Parodontalerkrankung Grad 0 vor, sodass dem Gebiss und damit dem Tier insgesamt Grad 0 einer Parodontalerkrankung zugeteilt wird.

Die Größe der beiden Gruppen wird mittels statistischer Verfahren durch Herrn Dr. Klaus Failing, Leiter der AG Biomathematik und Datenverarbeitung der Justus-Liebig-Universität in Gießen festgelegt. Es wird hierzu das Statistikprogramm „BiAS. für Windows, Biometrische Analyse von Stichproben, Version 9.08, Modul Studienplanung“ (ACKERMANN, 2010) verwendet. Für die Patientengruppe wird ein Umfang von mindestens 30 Patienten ermittelt und für die Kontrollgruppe ein Umfang von maximal 20 Patienten.

Die Hunde werden nüchtern (letzte Nahrungsaufnahme 8-12 Stunden vor Vorstellung) vorgestellt.

4.2.2 Anamnese, klinische Untersuchung und Blutuntersuchung

Bei allen Probanden wird zunächst eine Anamnese durchgeführt, gefolgt von einer klinischen und labordiagnostischen Untersuchung.

In der Anamnese werden die Besitzer nach dem Allgemeinbefinden des Tieres gefragt. Es wird dokumentiert welche Symptome dem Besitzer aufgefallen sind wie zum Beispiel ein verändertes Futteraufnahmeverhalten. Weitere Fragen richten sich nach dem verabreichten Futter, ob bereits früher eine Zahnsanierung durchgeführt wurde, ob Zahnpflege betrieben wird und ob und zu welchem Zeitpunkt das Tier Medikamente erhalten hat und bekannte Erkrankungen bestehen. Es wird nach der Art der Haltung und dem Verwendungszweck gefragt.

Es wird eine allgemeine klinische Untersuchung durchgeführt, um die Narkosefähigkeit des Tieres festzustellen und das Vorliegen akuter bzw. chronischer entzündlicher, infektiöser oder immunbedingter Erkrankung auszuschließen. Zur labordiagnostischen Untersuchung gehören eine Hämatologie und eine Klinische Chemie.

4.2.3 Anästhesie

Bei unauffälliger Anamnese und allgemeiner klinischer Untersuchung sowie Blutuntersuchung erfolgen die Probenentnahme, die klinische und radiologische Untersuchung der Mundhöhle sowie die Erhebung des Parodontalstatus unter Allgemeinanästhesie.

Das Protokoll der Narkose richtet sich nach dem aus der Studie von KAISER und Mitarbeitern (2014). Die Narkose erfolgt intravenös über einen Venenverweilkatheter, der in die Vena cephalica antebrachii bzw. in die Vena saphena lateralis gelegt wird. Hierfür erhält der Hund intravenös 0,5 mg/kg Körpergewicht Diazepam (Ziapam 5 mg/ml; Ecuphar, Greifswald) und 0,025 mg/kg Körpergewicht Atropinsulfat (Atropin Sulfuricum 0,5 mg/ml; B. Braun Melsungen AG, Melsungen) zur Prämedikation. Direkt im Anschluss an die Prämedikation erhält der Hund zur Einleitung der Narkose 3,3 mg/kg Körpergewicht Ketamin (Ketamin 10%; medistar Arzneimittelvertrieb GmbH, Ascheberg) und 0,3 mg/kg Körpergewicht Xylazin (Xylazin 2% Bernburg; medistar Arzneimittelvertrieb GmbH, Ascheberg). Die Narkoseerhaltung erfolgt bei Bedarf nach orotrachealer Intubation inhalativ mittels Isofluran (Isoflo®, Albrecht, Aulendorf) in einer Konzentration von 2 Volumenprozent in Kombination mit Sauerstoff. Eine Infusion mit Vollelektrolytlösung (Sterofundin®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) mit einer Infusionsgeschwindigkeit von 10 ml/kg/h wird dem Hund während der Narkose verabreicht (KAISER et al., 2014). Es finden ein Monitoring, sowie bei Bedarf eine Beatmung der Hunde statt.

4.2.4 Spezielle klinische und radiologische Untersuchung der Mundhöhle

4.2.4.1 Spezielle klinische Untersuchung der Mundhöhle mit Erhebung des Parodontalstatus

Die klinische Untersuchung der Mundhöhle wird nach den Vorgaben von GORREL (2006) und dem American Veterinary Dental College (AVDC, 2016) durchgeführt.

Zur Erhebung des Parodontalstatus untersucht die Doktorandin klinisch die Anzahl der vorhandenen Zähne, das Ausmaß an Zahnstein, das Vorliegen von Gingivitis, Gingivarezession oder Gingivahyperplasie, sowie die Zahnfleischtaschentiefe bzw. die Zahnfleischadhäsion an verschiedenen Stellen um jeden Zahn, den Furkationsbefall und die Mobilität der einzelnen Zähne (siehe Tabelle 8 im Anhang). Außerdem wird auf weitere Auffälligkeiten geachtet, wie Frakturen, Zubildungen und Attrition bzw. Abrasion. Die Dokumentation der Untersuchungsergebnisse erfolgt

unter Zuhilfenahme eines Befundbogens (siehe Abbildung 37 im Anhang), welcher durch die Doktorandin modifiziert wurde (Dentaler Befundbogen mit Zahndiagramm für den erwachsenen Hund nach TUTT (2006)). Die Zähne werden mit Hilfe des Zahnschemas nach Triadan (1972) und Floyd (1991) benannt und auf ihr Vorhandensein geprüft (STASZYK, 2011). Überzählige oder fehlende Zähne werden notiert.

Das Ausmaß an Zahnstein (im Befundbogen in Abbildung 37 mit „C“ für *calculus* dargestellt) wird nach EICKHOFF (2005) mit den Graden 0-3 bezeichnet. Das Vorhandensein einer Gingivitis (im Befundbogen mit „G“ dargestellt) wird in Grade 0-3 eingeteilt orientierend an den Vorgaben von LOE (1967) und GORREL (2006).

Die Zahnfleischtaschentiefe (im Befundbogen mit „P“ für *probing depth* dargestellt) wird mittels Parodontalsonde (Parodontometer DB874R, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) gemessen. Bei der verwendeten Sonde handelt es sich um eine stumpfe Sonde mit einer Skalierung in 2-mm-Schritten (siehe Abbildungen 2 a und b). Die Sonde wird ohne Druck vom freien Rand der Gingiva zum Boden der Tasche eingeführt. Die parodontale Taschentiefe wird in dieser Studie an mehreren Stellen um jeden Zahn gemessen, da die Tiefe an verschiedenen Stellen eines Zahnes abweichen kann.

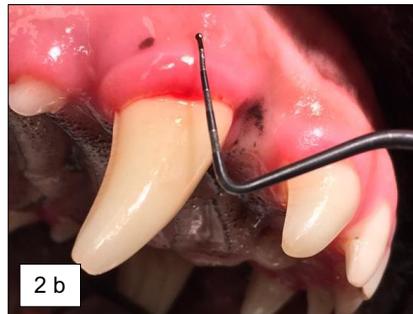


Abbildung 2a: Parodontalsonde (Aesculap) in Gebrauch, Messung der Tiefe der parodontalen Tasche

Abbildung 2b: Parodontalsonde (Aesculap) in Gebrauch, Veranschaulichung der Tiefe der parodontalen Tasche durch Halten der Sonde oberhalb der Gingiva

An jedem Zahn werden außerdem das Ausmaß an Gingivarezession (im Befundbogen mit „R“ und einem Minuszeichen vor der Ziffer dargestellt), sowie das Ausmaß an Gingivahyperplasie (im Befundbogen mit „R“ und einem Pluszeichen vor der Ziffer dargestellt) in Millimetern festgehalten.

Der Furkationsbefall (im Befundbogen mit „F“ dargestellt) wird ebenfalls mittels Parodontalsonde untersucht und wird in verschiedene Grade eingeteilt (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Gradeinteilung der furkalen Freilegung (nach EICKHOFF, 2005; GORREL, 2006)

Grad 0	Die Furkation liegt nicht frei
Grad 1	Mittels Parodontalsonde kann die Furkation ertastet werden, es besteht eine geringgradige Freilegung der Furkation
Grad 2	Mittels Parodontalsonde kann in die Furkation eingegangen werden, ein Durchführen der Sonde ist nicht möglich, es besteht eine mittelgradige Freilegung der Furkation
Grad 3	Die Parodontalsonde kann vollständig durch die Furkation hindurchgeführt werden, es besteht eine hochgradige Freilegung der Furkation

Die Beweglichkeit der Zähne (im Befundbogen mit „M“ für Mobilität dargestellt) kann mittels Mobilitätsindex in die Grade 0 bis 3 eingeteilt werden (GORREL, 2006; AVDC, 2016).

4.2.4.2 Radiologische Untersuchung der Mundhöhle

Zur radiologischen Untersuchung werden Einzelzahnaufnahmen der zu beprobenden Zähne mit dem Dentalröntgengerät angefertigt. Teilweise werden zur Übersicht zusätzlich Aufnahmen des gesamten Gebisses am stationären Röntgengerät angefertigt.

Am stationären Röntgengerät (Kollimator der Firma Comet-AG, Liebefeld, CH) werden die Aufnahmen der Ober- und Unterkieferseitenzähne extraoral in einer Schrägprojektion von ca. 45° angefertigt (MIHALJEVIĆ, 2010). Die Platten befinden sich dabei jeweils auf dem Röntgentisch. Mittels eingelegter Aufnahmen in Halbwinkeltechnik werden die Incisiven und Canini dargestellt (MIHALJEVIĆ, 2010). Der Film-Fokus-Abstand beträgt bei allen Aufnahmen 1,00 m. Es kommt ein

Computed Radiography-System (PCR Eleva) der Firma Philips, Hamburg mit Speicherfolien (IP) ST-VI (Standardtyp), und IP Kassetten Typ C und D der Firma Fujifilm (Düsseldorf) zur Anwendung. Das Auslesen der Speicherfolien erfolgt mit dem CR Folienleser PCR Eleva Cosimax der Firma Philips, Hamburg.

Am Dentalröntgengerät (Heliodent, Sirona Dental Systems GmbH, Bensheim und Revolution 4 DC, iM3 Dental Limited, Stamullen, Co. Meath, IRL) werden mittels intraoraler Parallelwinkeltechnik Aufnahmen der Unterkieferreißzähne angefertigt, die anderen Zähne werden mittels intraoraler Halbwinkeltechnik dargestellt (MIHALJEVIĆ, 2010). Als Seitenzeichen dient eine Büroklammer auf der rechten Seite. Die Röntgenfilme werden ausgelesen mittels PSP-Scanner (pspix, Acteon Germany GmbH, Mettmann, Filmgröße 0-3).

Die Beurteilung der radiologischen Befunde wird nach den Vorgaben von MIHALJEVIĆ (2010) (siehe Tabelle 5) durchgeführt und erfolgt durch die Doktorandin. Eine Darstellung der radiologischen Einteilung der Zähne nach Grad der Parodontalerkrankung findet sich im Anhang in Tabelle 9.

Tabelle 5: Radiologischer Parodontalindex (nach EICKHOFF, 2005; MIHALJEVIĆ, 2010)

Parodontal-Index	Knochenabbau in Prozent der Wurzellänge	Knochenabbau
0	0	unauffällig
1	Weniger als 25	geringgradig
2	25-50	mittelgradig
3	Mehr als 50	hochgradig

4.2.4.3 Einteilung der Parodontalerkrankung in Grade

Der Schweregrad einer parodontalen Erkrankung bezieht sich auf den einzelnen untersuchten Zahn. An den unterschiedlichen Zähnen eines Patienten können also unterschiedliche Grade der Parodontalerkrankung auftreten (WOLF et al., 2005; AVDC, 2010; NIEMIEC, 2013). Allen Zähnen wird sowohl klinisch als auch radiologisch ein Grad der Parodontalerkrankung zugeteilt. Die Zähne werden gemäß Tabelle 6 klassifiziert und die Ergebnisse sind in Tabelle 9 im Anhang gelistet. Besteht eine Diskrepanz zwischen dem zugeteilten klinischen und radiologischen Grad der Parodontalerkrankung orientiert sich der Gesamtbefund pro Zahn an dem

jeweils schlechteren Wert. Zusätzlich wird das Gebiss als Gesamtbild nach dem schlechtesten Befund aller vorhandenen Zähne beurteilt, da der Tiereinfluss auf den einzelnen Zahn nicht ausgeschlossen werden kann.

Tabelle 6: Einteilung der Parodontalerkrankung nach Schweregrad (WOLF et al., 2005; EICKHOFF, 2005; AVDC, 2016)

Schweregrad der Parodontalerkrankung	Klinische Untersuchung	Radiologische Untersuchung
Grad 0 Normalbefund	Keine Anzeichen von Gingivitis oder Parodontitis (Sondierungstiefe 1-3 mm)	Normalbefund
Grad 1 Gingivitis	Gingivitis ohne Attachmentverlust, die Höhe und Struktur des Alveolarkammes stellen sich unauffällig dar (Sondierungstiefe über 2 mm)	Normalbefund
Grad 2 Geringgradige Parodontitis	Messung durch Sondierung mittels Parodontalsonde ergibt unter 25 % Attachmentverlust (Sondierungstiefe bis 5 mm); maximal Furkationsbefall Grad 1 bei mehrwurzligen Zähnen	Geringgradiger horizontaler Knochenverlust: Unter 25 % Attachmentverlust bei Bestimmung der Entfernung des Alveolarkammes zur Zement-Schmelz-Grenze im Verhältnis zur Wurzellänge
Grad 3 Mittelgradige Parodontitis	25-50 % Attachmentverlust bei Messung durch Sondierung mittels Parodontalsonde (Sondierungstiefe bis 7 mm); Furkationsbefall Grad 2 bei mehrwurzligen Zähnen	Mittelgradiger horizontaler Knochenverlust: 25-50 % Attachmentverlust bei Bestimmung der Entfernung des Alveolarkammes zur Zement-Schmelz-Grenze im Verhältnis zur Wurzellänge
Grad 4 Hochgradige Parodontitis	Über 50 % Attachmentverlust bei Messung durch Sondierung mittels Parodontalsonde (Sondierungstiefe über 7 mm); Furkationsbefall Grad 3 bei mehrwurzligen Zähnen	Hochgradiger horizontaler Knochenverlust: Über 50 % Attachmentverlust bei Bestimmung der Entfernung des Alveolarkammes zur Zement-Schmelz-Grenze im Verhältnis zur Wurzellänge

4.2.5 Probenentnahme, Lagerung und Transport

Die Probanden werden chronologisch durchnummeriert. Patienten der Parodontitisgruppe werden mit dem Buchstaben „H“ für Hund und einer fortlaufenden Nummer von 1-36 betitelt, Patienten der Kontrollgruppe hingegen mit dem Buchstaben „K“ für Kontrolle und einer fortlaufenden Nummer von 1-20. Es werden nicht alle Zähne beprobt, sondern nur eine definierte Teilmenge. Bei allen Patienten werden dazu Proben der gingivalen Sulkusflüssigkeit an den Fang- und Reißzähnen entnommen. Bei der Lokalisation für die Probenentnahme wird nicht zwischen Probanden aus Kontroll- oder Parodontitisgruppe unterschieden. Die Probenentnahme findet jeweils palatinal und bukkal an den Zähnen 104 und 204, distobukkal an den Zähnen 108 und 208, lingual an den Zähnen 304 und 404 und distolingual an den Zähnen 309 und 409 statt. Die Entnahmestellen erhalten jeweils einen Buchstaben ggf. mit Ziffer zur Markierung. Die Lokalisation palatinal am Zahn 104 wird mit „a1“, bukkal am Zahn 104 mit „a2“, die Lokalisation am Zahn 108 mit „b“, palatinal am Zahn 204 mit „e1“, bukkal am Zahn 204 mit „e2“, am Zahn 208 mit „f“, am Zahn 304 mit „h“, am Zahn 309 mit „g“, am Zahn 404 mit „d“ und am Zahn 409 mit „c“ markiert.

Für die Probenentnahme wird der zu untersuchende Zahn zunächst getrocknet (MARCACCINI, 2010). Dann wird jeweils eine Papierspitze (PerioPaper Strips (gingival fluid collection strips) #593520 der Firma Oraflow Inc., Smithtown, NY, USA) für die Zeit von ca. 30 Sekunden ohne Druck in den gingivalen Sulkus eingeführt um gingivale Sulkusflüssigkeit (gingival crevicular fluid, GCF) aufzunehmen (siehe Abbildung 3). Die Papierspitzen können 0-1,2 µl Flüssigkeit absorbieren. Papierspitzen, welche mit Blut oder Speichel kontaminiert sind, werden entsorgt (MARCACCINI, 2010). Die Papierspitzen mit GCF werden sofort einzeln in ein Eppendorf Gefäß mit 4° Celsius temperierter 100 µl Pufferlösung, bestehend aus 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ und 0,02% Triton X-100, verbracht und für ca. 30 Minuten bei 4°C gekühlt (POZO et al., 2005). Die Eppendorfgefäße werden mit der weiter oben beschriebenen Markierung (z.B. „H1a2“ für Patient 1 der Parodontitisgruppe, Zahn 104 bukkal) gekennzeichnet.



Abbildung 3: Entnahme gingivaler Sulkusflüssigkeit bukkal am Zahn 104 (Lokalisation a2) mittels Papierspitze

Für die Probenentnahme müssen keine Schmerzmittel appliziert werden, da die Entnahme der gingivalen Sulkusflüssigkeit nicht schmerzhaft ist. Eine Verletzung des Gewebes kann auf Grund der weichen Beschaffenheit der Papierspitzen ausgeschlossen werden.

Nach Ablauf von ca. 30 Minuten werden die Papierspitzen aus der Pufferlösung entnommen und die Eppendorfgefäße, welche nun die Pufferlösung und die darin gelöste GCF enthalten, mit 13.000 rpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert (SONG et al., 2003). Im Anschluss wird der Überstand in ein weiteres Eppendorfgefäß pipettiert und bei -80°C eingefroren (SONG et al., 2003). Auch diese Eppendorfgefäße werden mit der weiter oben beschriebenen Markierung (z.B. „H1a2“) gekennzeichnet. Außerdem erhält jedes Eppendorfgefäß einen Aufkleber mit dem Namen des Besitzers, dessen Anschrift und den Angaben zum Tier.

Die Probenentnahmen werden in der Klinik für Kleintiere, Chirurgie durchgeführt und die Probenbearbeitung und -lagerung finden im Institut für Veterinär Anatomie der Justus-Liebig-Universität Gießen statt.

Die bei -80°C gefrorenen Proben werden, um die Kühlkette einzuhalten, auf Trockeneis in das Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart transportiert. Am Zielort werden die Proben ebenfalls bei -80°C eingefroren und bis zu ihrer weiteren Verarbeitung durch die Doktorandin gelagert.

4.2.6 Probenaufbereitung und Untersuchung

Im Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart werden zum einen das Vorliegen proteolytischer Aktivität, zum anderen das Vorliegen und der Gehalt an ausgewählten Matrix-Metalloproteinasen in der zuvor entnommenen und aufbereiteten gingivalen Sulkusflüssigkeit bestimmt. Es wird versucht einen Zusammenhang zwischen der Aktivität sowie dem Gehalt der Matrix-Metalloproteinasen und dem ermittelten Parodontalbefund der Probanden zu bestimmen.

4.2.6.1 Aktivitätsassay

Zunächst werden alle Proben auf ihre proteolytische Aktivität hin untersucht. Dies erfolgt mittels eines Aktivitätsassays. Hierfür wird jede Probe, unter Einsatz von Gelatine als Substrat und in einer anderen Messung unter Einsatz von Kollagen als Substrat, untersucht. Der Einsatz von Kollagen als Substrat dient dazu Kollagenasen, wie z.B. MMP-8, nachzuweisen, der Einsatz von Gelatine dient dazu Gelatinasen, wie z.B. MMP-2, -3 und -9, nachzuweisen. Eine weitere Eingrenzung der Protease ist nicht möglich.

Die nativen DQ-Substrate, hier DQ-Gelatine und DQ-Kollagen, sind mit einem gequenchem Fluorophor (FITC) gekoppelt (MOLECULAR PROBES INC., 2001; JEDESZKO et al., 2008). Die enge Bindung der Farbstoffmoleküle führt auf Grund des Resonanz-Energie-Transfers dazu, dass die nativen DQ-Substrate „quenched“ sind, das bedeutet es besteht eine Fluoreszenzauslöschung (JEDESZKO et al., 2008). Die Abkürzung „DQ“ steht dabei für dye quenched, also Farbstoff gelöscht. Durch Hydrolyse kommt es zur Spaltung des Substrats und damit auch zur Trennung der Farbstoffmoleküle, die Fluoreszenzauslöschung wird aufgehoben und die Fluoreszenz wird sicht- und messbar. Die Intensität der Fluoreszenz ist dabei proportional zur proteolytischen Aktivität (MOLECULAR PROBES INC., 2001; JEDESZKO et al., 2008). Je höher die Fluoreszenzintensität, desto stärker die proteolytischen Eigenschaften bzw. die Proteaseaktivität. Bei dem in diesen Versuchen verwendeten Farbstoff liegt die Anregungswellenlänge bei 495 nm und die Emissionswellenlänge bei 515 nm (MOLECULAR PROBES INC., 2001).

Zur Vorbereitung der Aktivitätsassays werden die Proben zunächst aufgetaut. Es wird ein DQ-Reaktionspuffer aus 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,4 und 5mM CaCl² hergestellt.

4.2.6.1.1 Aktivitätsassay mit Gelatine

Die DQ-Gelatine (DQ™ Gelatin From Pig Skin, Fluorescein Conjugate (Invitrogen™) # D12054, 1 mg/ml) der Firma Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, wird in 1 ml doppelt destilliertem Wasser gelöst um eine Lösung von 1mg/ml zu erhalten (MOLECULAR PROBES INC., 2001). Es werden jeweils 30 µl Probe pro Well einer 96 Well-Mikroplatte (microplate, PS, F-bottom, non-binding, schwarz #655900, Greiner Bio One International GmbH, Kremsmünster, AUT) pipettiert. Die Proben werden unverdünnt gemessen. Pro Ansatz werden jeweils 115 µl DQ-Reaktionspuffer mit 5 µl DQ-Gelatine als Mastermix hergestellt. Dieser Mastermix wird mit der Probe vermischt, sodass das Volumen pro Well bei 150 µl liegt. Die Probe wird sofort im Mikroplattenlesegerät TECAN Infinite M200 PRO (Tecan Group Ltd., Männedorf, CH) bei 37°C mit dem Programm „DQ gelatine assay.mdfx“ gemessen. Die Proben werden mit einer Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge von 495 bzw. -525 nm bei einer Temperatur im Bereich von 36,5-37,5°C analysiert. Die Messungen erfolgen alle 30 Minuten für maximal 18 Stunden. Das Vorgehen erfolgt nach persönlicher Mitteilung von Dr. Angelika Hausser, Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart.

Positivkontrollen

Vor Beginn der Untersuchung der eigenen Proben wird MMP-9 (MMP-9, Active, Recombinant 0,1mg/ml, Calbiochem # PFO24, Merck KGaA, Darmstadt) als Positivkontrolle beim Gelatinaseassay eingesetzt. Dazu wird das MMP-9 1:100 in DQ-Reaktionspuffer verdünnt, es entsteht eine Konzentration von 1ng MMP-9/µl. Es werden dann 10 µl der Verdünnung, also 10 ng MMP-9 mit 20 µl DQ-Reaktionspuffer als Positivkontrolle verwendet. Bei der Positivkontrolle wird in die restlichen Wells der Platte jeweils 200 µl Wasser als Verdunstungsschutz pipettiert.

Diese Positivkontrolle dient der Orientierung und Einordnung der eigenen Ergebnisse, da es bisher in der Literatur keine Angaben zu durchgeführten Aktivitätsassays von Sulkusflüssigkeit bei Hunden gibt und daher keine Vergleichswerte vorliegen.

Negativkontrollen

Als Negativkontrolle wird DQ-Reaktionspuffer eingesetzt.

4.2.6.1.2 Aktivitätsassay mit Kollagen

Zur Durchführung des Aktivitätsassays mit Kollagen wird wie bei dem Aktivitätsassay mit Gelatine vorgegangen. Das DQ-Kollagen (DQ™ Collagen, type I From Bovine

Skin, Fluorescein Conjugate (Invitrogen™) # D12060, 1 mg/ml) der Firma Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, wird in 1 ml doppelt destilliertem Wasser gelöst um eine Lösung von 1mg/ml zu erhalten (MOLECULAR PROBES INC., 2001). Bei diesem Versuchsaufbau werden allerdings, auf Grund höherer Aktivität, pro Well jeweils nur 15 µl Probe eingesetzt und mit dem Mastermix bestehend aus 133 µl DQ-Reaktionspuffer mit nur 2 µl DQ-Kollagen vermischt. Es entsteht wieder ein Volumen von 150 µl pro Well. Der weitere Versuchsablauf entspricht dem des Gelatineassays.

Positivkontrollen

Auf Grund der Erfahrungen im Gelatineassay und auf Grund dessen, dass sehr hohe Aktivitäten in den Proben erwartet werden, wird keine Positivkontrolle mehr durchgeführt.

Negativkontrollen

Entspricht dem Vorgehen beim Gelatineassay.

4.2.6.1.3 Auswertung der Ergebnisse aus den Aktivitätsassays

Die erhaltenen Werte aus den Aktivitätsassays werden aus der Excel-Tabelle übernommen und mit dem Programm „GraphPad Prism 7.00“ (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) dargestellt.

Es werden Tabellen mit den Einzelwerten der Messergebnisse (absolute Werte) einer Probe bzw. eines Zahns, also die Fluoreszenzintensität in RLU (= relative light units), zu jedem Zeitpunkt der Messung für jede Probe eines Probanden erstellt. Die Werte werden außerdem in einer Messkurve dargestellt, wobei auf der x-Achse die Zeit in Sekunden und auf der y-Achse die Fluoreszenzintensität in RLU gezeigt werden. So wird für jeden Probanden ein eigenes Diagramm erstellt (siehe Abbildungen 38-65 im Anhang). Die Codierung kann jeweils der Legende entnommen werden (siehe Abbildung 66 im Anhang).

Verwendung relativer und absoluter Werte

Zur besseren Vergleichbarkeit des Fluoreszenzanstiegs zu unterschiedlichen Messzeitpunkten und der Messkurven, werden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich zu den absoluten Werten, auch die relativen Werte in der Auswertung verwendet.

Zum Erhalt des relativen Wertes wird der Ausgangswert der Fluoreszenz zum Zeitpunkt Null auf „1“ gesetzt. Alle nachfolgenden Werte werden so umgerechnet, dass jeder Wert zu einem bestimmten Zeitpunkt durch den eigentlichen Wert zum Zeitpunkt Null dividiert wird und somit der Quotient gebildet. Der Quotient wird dann zu dem Zeitpunkt eingesetzt. Das bedeutet, dass der eigentliche Wert zum Zeitpunkt

2 durch den eigentlichen Wert zum Zeitpunkt 1 geteilt wird, um somit den relativen Wert zum Zeitpunkt 2 zu erhalten. Die Verwendung relativer Werte ist möglich, da es sich um verhältnisskalierte Merkmale handelt. Bei Darstellung der relativen Werte in einer Tabelle oder Messkurve wird statt der Fluoreszenzintensität in RLU zu jedem Zeitpunkt der Messung die Ratio angegeben. Die absoluten Werte hingegen zeigen die tatsächliche Höhe der Fluoreszenz und somit die tatsächliche proteolytische Aktivität.

4.2.6.2 ELISA

Zusätzlich werden von ausgewählten Proben der Sulkusflüssigkeit Enzyme Linked Immunoabsorbent Assays (ELISAs) durchgeführt. Hiermit kann die vorhandene Protease, also das MMP, nicht aber ihre Aktivität, nachgewiesen werden. Es wird die Gesamtkonzentration an MMP-2, MMP-3, MMP-8 und MMP-9 in der Probe ermittelt. Auf Grund einer limitierten Menge an Probe können nicht alle Proben mittels ELISA untersucht werden.

4.2.6.2.1 Durchführung ELISA

Ein ELISA ist ein Antikörperbasiertes Nachweisverfahren. Das Vorhandensein des fragten Enzyms kann durch eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen werden (ANTIBODIES-ONLINE GMBH, 2013). Bei den durchgeführten ELISAs handelt es sich um quantitative Sandwich ELISAs, es wird ein Antigen zwischen zwei Antikörpern gemessen (ANTIBODIES-ONLINE GMBH, 2013; GENORISE SCIENTIFIC, INC., 2016; RAYBIOTECH, INC., 2018). Auf diese Weise können auch niedrige Antigengehalte nachgewiesen werden (ANTIBODIES-ONLINE GMBH, 2013).

Die verwendete Mikroplatte ist mit einem Antikörper, welcher spezifisch für das nachzuweisende MMP ist, überzogen. Die zu untersuchende Probe, hier verdünnte kanine gingivale Sulkusflüssigkeit, wird dazugegeben. Das in der Probe vorhandene, nachzuweisende MMP wird von dem vorhandenen Antikörper gebunden. Ungebundene Lösung wird abgewaschen (GENORISE SCIENTIFIC, INC., 2016; RAYBIOTECH, INC., 2018). Im nächsten Schritt wird ein Detektionsantikörper aufgetragen, dabei handelt es sich um einen zweiten primären und unmarkierten Antikörper (ANTIBODIES-ONLINE GMBH, 2013; GENORISE SCIENTIFIC, INC., 2016; RAYBIOTECH, INC., 2018). Dieser ist spezifisch für das nachzuweisende MMP und dient der Bindung des ersten primären Antikörpers. Hiermit ist das Sandwich vervollständigt (ANTIBODIES-ONLINE GMBH, 2013). Wieder wird

ungebundene Lösung abgewaschen und dann ein Detektionsreagenz zugegeben, wobei es sich um einen markierten Antikörper handelt, der an den zweiten primären Antikörper bindet (ANTIBODIES-ONLINE GMBH, 2013; GENORISE SCIENTIFIC, INC., 2016; RAYBIOTECH, INC., 2018). Dieser katalysiert die enzymatische Farbreaktion (ANTIBODIES-ONLINE GMBH, 2013). Es findet wieder eine Waschung statt und eine Substratlösung wird zugegeben (GENORISE SCIENTIFIC, INC., 2016; RAYBIOTECH, INC., 2018).

Das farblose Substratreagenz startet die Enzymreaktion (ANTIBODIES-ONLINE GMBH, 2013). Es kommt durch enzymatische Spaltung der Substratreagenz zu einer Farbreaktion, bei der die Intensität der Färbung proportional zur Menge an gebundenem, nachzuweisendem MMP ist (ANTIBODIES-ONLINE GMBH, 2013; GENORISE SCIENTIFIC, INC., 2016; RAYBIOTECH, INC., 2018). Nach längerem Einwirken würde das Reagenz komplett gespalten und alle Proben hätten folglich die gleiche optische Dichte. Daher wird die Farbreaktion nach einer gewissen Zeit und bei Sichtbarwerden guter Kontraste durch Zugabe einer Stopp-Lösung unterbrochen. Dabei wird das Enzym zerstört (ANTIBODIES-ONLINE GMBH, 2013). Die Farbintensität wird photometrisch bei entsprechender Wellenlänge in dem Mikroplattenlesegerät TECAN SPARK (Tecan Group Ltd., Männedorf, CH) gemessen (ANTIBODIES-ONLINE GMBH, 2013; GENORISE SCIENTIFIC, INC., 2016; RAYBIOTECH, INC., 2018). Die Funktionsweise der MMP-2, -3 und -9 ELISAs unterscheidet sich geringgradig von der des MMP-8 ELISA und wird im Folgenden erklärt. Bei den MMP-2, -3 und -9 ELISAs wird die Zeit für den Versuch im Vergleich zum konventionellen ELISA um die Hälfte reduziert (GENORISE SCIENTIFIC, INC., 2016).

4.2.6.2.2 Vorgehen zur Ermittlung des Verdünnungsgrades der eigenen Proben

Aus der auf Raumtemperatur gebrachten Probe „H3f“ wird bei dem ersten Versuchsdurchlauf eine Verdünnungsreihe hergestellt um den Detektionsbereich des MMP-8 ELISAs zu ermitteln und festzustellen bei welcher Verdünnung MMP-8 nachgewiesen werden kann. Dieses Vorgehen ist nötig, da es bisher in der Literatur keine Angaben zu durchgeführten ELISAs von kaniner GCF gibt und daher keine Vergleichswerte vorliegen. An den erhaltenen Ergebnissen sollen sich auch die Verdünnungen für die anderen ELISAs orientieren.

Die Verdünnung der eigenen Probe erfolgt versuchsweise in Zweischritten von 1:20 bis 1:2560. Die Verdünnungsreihe wird als Doppelansatz mittels ELISA-Methode untersucht. Es zeigt sich, dass MMP-8 nur bei einer Verdünnung von 1:20 noch nachgewiesen werden kann. Nur bei dieser Verdünnung ist die gemessene optische Dichte der eigenen Probe noch so hoch, dass sie in der Kurve des mitgelieferten MMP-8-Standards abgelesen werden kann und somit der MMP-Gehalt berechenbar ist. Bei einer Verdünnung 1:20 werden im Mittel in der Probe 2,56 ng/ml MMP-8 nachgewiesen. Bei höheren Verdünnungen konnte kein MMP-8 mehr nachgewiesen werden. Für die weiteren Messungen werden die Proben daher 1:20 verdünnt. Das hat zur Folge, dass nicht alle untersucht werden können, da nicht mehr ausreichend Probenmaterial vorliegt.

4.2.6.2.3 MMP-8 ELISA

Zur Bestimmung der MMP-8 Gesamtkonzentration aus der gingivalen Sulkusflüssigkeit der Probanden wird der Enzym-Aktivitäts-Assay „RayBio Canine MMP-8 ELISA Kit“ (Catalog # ELC-MMP8) der Firma RayBiotech, Norcross, GA, USA verwendet und nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die 96 Wells der Mikrotiterplatte sind an der Oberfläche mit Antikörpern gegen kanines MMP-8 beschichtet. Aus dem mitgelieferten MMP-8 Standard wird zu Beginn eine Verdünnungsreihe von 50 ng/ml bis 0,069 ng/ml hergestellt. Dabei erfolgen sechs Verdünnungsschritte, wobei bei jedem Schritt eine dreifache Verdünnung erfolgt. Die Verdünnungsreihe des Standards wird als Doppelbestimmung eingesetzt. Das Verdünnungsmittel ohne MMP-8 stellt dabei den Nullwert dar. Von jeder Verdünnungsstufe werden 100 µl in ein Well pipettiert.

Die eigenen Proben werden in den weiteren ELISA-Messungen in einem Verhältnis von 1:20 verdünnt und jeweils 100 µl der Verdünnung in die Wells gegeben. Das weitere Vorgehen erfolgt nach den Angaben des Herstellers. Direkt im Anschluss an die Zugabe der Stopp-Lösung wird mit Hilfe eines Fluoreszenz-Platten-Lesers die Substratumsetzung photometrisch bei 450 nm gemessen. Die ermittelte MMP-8 Konzentration ist proportional zur ermittelten Farbintensität. Die Sensitivität des Tests beträgt im Mittel 0,07 ng/ml.

4.2.6.2.4 MMP-2 ELISA

Zur Bestimmung der absoluten MMP-2 Konzentration aus der gingivalen Sulkusflüssigkeit der Hunde wird der Enzym-Aktivitäts-Assay Nori Canine MMP-2

ELISA Kit (Catalog # GR115003) der Firma Genorise Scientific, Berwyn, IL, USA verwendet und nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Die 96 Wells der Mikrotiterplatte sind an der Oberfläche mit Antikörpern gegen kanines MMP-2 beschichtet. Aus dem mitgelieferten MMP-2 Standard wird zu Beginn eine Verdünnungsreihe von 16 ng/ml bis 0,25 ng/ml hergestellt. Diese wird als Doppelbestimmung eingesetzt. Die Verdünnungslösung allein stellt dabei den Nullwert dar.

Die auf Raumtemperatur gebrachten Proben werden in einem Verhältnis von 1:10 bzw. 1:20 (abhängig von der noch vorhandenen Restmenge an Probe) verdünnt und jeweils 100 µl verdünnter Probe in die Wells gegeben. Das Vorgehen wird nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Direkt im Anschluss an die Zugabe der Stopp-Lösung wird mit Hilfe eines Fluoreszenz-Platten-Lesers TECAN Spark die Substratumsetzung photometrisch bei 450 nm und der Referenz Wellenlänge 540 nm gemessen. Der Fluoreszenz-Platten-Leser bildet automatisch die Differenz zwischen der Wellenlänge von 450 und 540 nm und korrigiert somit optische Ungenauigkeiten der Platte. Die Sensitivität des Tests beträgt im Mittel 0,05 ng/ml. Die MMP-2 Konzentrationen sind proportional zur gemessenen Farbintensität.

4.2.6.2.5 MMP-3 und -9 ELISA

Zur Bestimmung der absoluten MMP-3 Konzentration aus der gingivalen Sulkusflüssigkeit der Hunde wird der Enzym-Aktivitäts-Assay Nori Canine MMP-3 ELISA Kit (Catalog # GR115030) der Firma Genorise Scientific, Berwyn, IL, USA verwendet und nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Die 96 Wells der Mikrotiterplatte sind an der Oberfläche mit Antikörpern gegen kanines MMP-3 beschichtet. Aus dem mitgelieferten MMP-3 Standard wird zu Beginn eine Verdünnungsreihe von 1,8 ng/ml bis 0.0281 ng/ml hergestellt. Diese wird als Doppelbestimmung eingesetzt. Der Verdünner stellt dabei den Nullwert dar. Die auf Raumtemperatur gebrachten Proben werden in einem Verhältnis von 1:10 bzw. 1:20 verdünnt und jeweils 100 µl der verdünnten Probe in die Wells gegeben.

Zur Bestimmung der absoluten MMP-9 Konzentration aus der gingivalen Sulkusflüssigkeit der Hunde wird der Enzym-Aktivitäts-Assay Nori Canine MMP-9 ELISA Kit (Catalog # GR115034) der Firma Genorise Scientific, Berwyn, IL, USA verwendet und nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die 96 Wells der Mikrotiterplatte sind an der Oberfläche mit Antikörpern gegen kanines MMP-9 beschichtet.

Aus dem mitgelieferten MMP-9 Standard wird zu Beginn eine Verdünnungsreihe von 2 ng/ml bis 0.031 ng/ml hergestellt. Diese wird als Doppelbestimmung eingesetzt. Der Verdüner stellt dabei den Nullwert dar. Die auf Raumtemperatur gebrachten Proben werden in einem Verhältnis von 1:20 verdünnt und jeweils 100 µl der verdünnten Probe in die Wells gegeben.

Das weitere Vorgehen ist, entsprechend den Angaben des Herstellers, für MMP-3 und -9 gleich. Direkt im Anschluss an die Zugabe der Stopp-Lösung wird mit Hilfe eines Fluoreszenz-Platten-Lesers TECAN Spark die Substratumsetzung photometrisch bei 450 nm und der Referenz Wellenlänge 540 nm gemessen. Der Fluoreszenz-Platten-Leser bildet automatisch die Differenz zwischen der Wellenlänge von 450 und 540 nm und korrigiert somit optische Ungenauigkeiten der Platte. Die MMP-3 und -9 Konzentrationen sind proportional zur ermittelten Farbtintensität. Die Sensitivität des Tests beträgt für MMP-3 im Mittel 0,006 ng/ml und für MMP-9 Mittel 0,0008 ng/ml.

4.2.6.2.6 Auswertung der Ergebnisse aus den ELISA-Untersuchungen

Die im TECAN Spark erhaltenen Messergebnisse werden in einer Excel-Tabelle dargestellt. Die Werte aus der Exceltabelle werden übernommen und mit dem Programm „GraphPad Prism 7.00“ (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) dargestellt und bearbeitet.

Die einzelnen Untersuchungsergebnisse, also die optischen Dichten (=OD), werden zunächst in einer Tabelle dargestellt. Zur genauen Bestimmung des jeweiligen MMP-Gehaltes der Probe wird aus den Doppel-Werten der Standard Reihe eine Standard Kurve erstellt. Dies erfolgt indem der MMP-Gehalt in ng/ml auf der x-Achse aufgezeichnet wird und die OD bei 450-540 nm für MMP-2, -3 und -9 und bei 450 nm für MMP-8 auf der y-Achse. Die aufgezeichneten Punkte werden so verbunden, dass eine sigmoidale, logistische Regressionskurve mit 4 Parametern entsteht. Die Berechnung des MMP-Gehalts der Probe in ng/ml kann unter Zuhilfenahme der Standardkurve erfolgen. Hier wird der Gehalt an MMP in ng/ml der entsprechenden OD interpoliert. Der MMP-Gehalt kann dann von der Kurve abgelesen werden. Auf Grund der Verdünnung der Proben muss allerdings die Konzentration an MMP, die von der Kurve abgelesen wird, noch mit dem jeweils verwendeten Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Damit überhaupt der MMP-Gehalt berechnet werden kann, muss die OD der Proben in dem Bereich der OD des Standards liegen

und zwar oberhalb derer der Nullprobe. Liegt die OD der eigenen Probe unterhalb der OD der Nullprobe des Standards können keine MMPs nachgewiesen werden. Die errechneten Werte für den jeweiligen MMP-Gehalt einer Probe sind in Tabelle 43 im Anhang festgehalten.

Die deskriptive Auswertung erfolgt unter Verwendung von Box-and-Whisker-Plots sowie Balkendiagrammen (siehe Abbildungen 32-36), welche mit dem Programm „GraphPad Prism 7.00“ (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) erstellt werden.

4.2.7 Statistische Auswertung Aktivitätsassay

Die statistische Auswertung der Daten erfolgt in Zusammenarbeit mit der AG Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität in Gießen unter Verwendung des Statistikprogrammpaketes BMDP/Dynamic, Release 8.1 (DIXON, 1993). Es werden sowohl die relativen als auch die absoluten Messwerte verwendet.

Die grafischen Darstellungen werden mit dem Programm „GraphPad Prism 7.00“ (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) erstellt. Es werden Box-and-Whisker-Plots sowie Balkendiagramme mit Mittelwert und Standardabweichung verwendet (siehe Abbildungen 7-31).

Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) wird berechnet und der zugehörige p-Wert mit der asymptotischen Methode ermittelt. Es wird das globale Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ verwendet. Das heißt, Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ werden als statistisch signifikant angesehen, Ergebnisse mit $p \leq 0,01$ als sehr signifikant und Ergebnisse mit $p \leq 0,001$ als statistisch hoch signifikant. Mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (r_s) wird der Zusammenhang zweier nicht linearer Merkmale beschrieben.

Bei Berechnungen, die unabhängig vom einzelnen Zahn (a1-h) erfolgen, werden vor Beginn der Messungen für die Zähne a und e die Mittelwerte aus a1 und a2 sowie aus e1 und e2 gebildet, daher reduziert sich die Anzahl der Zähne (n) entsprechend. Wenn nicht anders ausgewiesen handelt es sich beim festgestellten Grad einer Parodontalerkrankung um den Gesamt-Befund, d.h. der Grad orientiert sich für jeden Zahn am schlechtesten Befund aus klinischer und radiologischer Untersuchung.

4.2.7.1 Untersuchung der Zusammenhänge zwischen dem Schweregrad einer parodontalen Erkrankung und der Enzymaktivität

Die Rechnung dient der Überprüfung der Hypothese „mit steigendem Schweregrad einer Parodontalerkrankung steigt auch die enzymatische Aktivität“.

Zur Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität und den fünf Schweregraden einer Parodontalerkrankung aller Patientenzähne (n=288) wird zunächst mit dem Programm BMDP6D eine Darstellung der Zusammenhänge zwischen den Merkmalen Grad der Parodontalerkrankung und messbare Enzymaktivität mittels Punktwolke durchgeführt. Auf Grund des Vorliegens nicht-linearer Zusammenhänge wird im Anschluss mit dem Programm BMDP3D der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) und der zugehörige p-Wert (in Bezug auf die Abweichung vom Wert 0) berechnet.

4.2.7.2 Statistische Auswertung bezüglich der Zusammenhänge zwischen Patientengruppe und Kontrollgruppe

Untersuchung der Hypothese „Patienten haben höhere Enzymaktivitäten, als Kontrolltiere“

Mit dem Programm BMDP3D wird mittels Wilcoxon-Mann-Whitney Test ein Zwei-Gruppen-Vergleich durchgeführt und der p-Wert mittels Hilfswert berechnet. Auf Grund der rechtsschiefen Verteilung der Werte, kann kein t-Test durchgeführt werden.

- Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität aller Zähne a1 (n=36) der Patientengruppe und der Enzymaktivität aller Zähne a1 (n=20) der Kontrollgruppe. So wird auch für alle Zähne a2-h verfahren.
- Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität aller Zähne der Patientengruppe (n=288) und der Enzymaktivität aller Zähne der Kontrollgruppe (n=160) (unabhängig vom einzelnen Zahn und Hund; Mittelwertbildung für die Zähne a und e).
- Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität der Patientengruppe (n=36) und der Kontrollgruppe (n=20) (unabhängig vom einzelnen Zahn, abhängig vom Hund). Vor Durchführung des Wilcoxon-Mann-Whitney Tests wird der Median der Enzymaktivitäten an den Zähnen eines jeden Hundes per Transformation berechnet.
- Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität aller Hunde der Patientengruppe mit mindestens einem Zahn mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung (n=14) und der Enzymaktivität aller Hunde der Kontrollgruppe (n=20). Vor Durchführung des Wilcoxon-Mann-Whitney Tests wird für die Kontrollgruppe der Median der Enzymaktivitäten an den Zähnen eines jeden Hundes per Transformation berechnet und für die

Patientengruppe der Median der Enzymaktivitäten an den Zähnen mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung eines jeden Hundes per Transformation berechnet.

4.2.7.2.1 Statistische Auswertung bezüglich des Einflusses von Alter und Körpermasse auf die Enzymaktivität

Bei der Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität aller Hunde der Patientengruppe mit mindestens einem Zahn mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung (n=14) und der Enzymaktivität aller Hunde der Kontrollgruppe (n=20) wird im Anschluss die Fragestellung geprüft, ob Alter oder Körpermasse einen Einfluss auf die Enzymaktivität haben. Hierbei wird mit dem Programm BMDP2V gearbeitet und eine einfaktorielle Kovarianzanalyse durchgeführt mit den Kovariablen Alter und Körpermasse. Die einfaktorielle Kovarianzanalyse dient neben der Prüfung des Gruppenunterschieds der Überprüfung eines zusätzlichen linearen Trends des Alters und der Körpermasse.

4.2.7.3 Statistische Auswertung bezüglich der Einteilung der Zähne in Grade der Parodontalerkrankung und der messbaren Enzymaktivität

Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität und der Einteilung der einzelnen Zähne nach Schweregrad 0-4 einer Parodontalerkrankung. Es werden nur Patientenzähne untersucht. Es werden alle Zähne a1 untersucht nach dem Zusammenhang ihres Grades der Parodontalerkrankung und der Enzymaktivität. Es wird geprüft, ob für die unterschiedlichen Zähne die Hypothese „mit steigendem Grad der Parodontalerkrankung steigt die Enzymaktivität“ bestätigt werden kann. So wird auch für alle Zähne a2-h verfahren.

Der Grad der Parodontalerkrankung wird in dieser Untersuchung folgendermaßen bestimmt:

- klinisch, Grade 0-4 der Parodontalerkrankung
- radiologisch, Grade 0-4 der Parodontalerkrankung
- nach Gesamtbefund, Grade 0-4 der Parodontalerkrankung (orientierend an dem schlechtesten Befund aus klinischer und radiologischer Untersuchung)
- nach Zugehörigkeit zum Gebiss mit einer Parodontalerkrankung Grade 1-4

Zunächst wird mit dem Programm BMDP6D eine Darstellung der Zusammenhänge zwischen den beiden Merkmalen (Enzymaktivität und Grad der Parodontalerkrankung) mittels Punktwolke durchgeführt. Auf Grund des Vorliegens nicht-linearer Zusammenhänge wird im Anschluss mit dem Programm BMDP3D der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) und der zugehörige p-Wert (in Bezug auf die Abweichung vom Wert 0) berechnet.

4.2.7.4 Statistische Auswertung bezüglich der Übereinstimmung des ermittelten klinischen und radiologischen Grades der Parodontalerkrankung für alle Zähne

Es wird zunächst mit dem Programm BMDP6D eine Darstellung der Zusammenhänge zwischen dem klinischen und dem radiologischen Grad der Parodontalerkrankung aller Zähne a1 mittels Punktwolke durchgeführt. Anschließend wird mit dem Programm BMDP3D der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) und der zugehörige p-Wert (in Bezug auf die Abweichung vom Wert 0) berechnet. So wird auch für alle Zähne a2-h verfahren.

4.2.7.5 Statistische Auswertung bezüglich der Übereinstimmung der Enzymaktivität an zwei Probenentnahmestellen

Mit dem Programm BMDP6D wird eine Darstellung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität an zwei Probenentnahmestellen mittels Punktwolke durchgeführt. Es handelt sich hierbei um die Darstellung der Zusammenhänge zwischen den Lokalisationen a1 mit a2 sowie e1 mit e2. Auf Grund dessen, dass es in der nicht-logarithmierten Darstellung zu einer starken Überlagerung der Werte kommt, wird hier eine doppelt logarithmierte Darstellung verwendet, um die Stauchung aufzuheben und die Berechnung erfolgt mit dem transformierten Datensatz. Es werden der Korrelationskoeffizient (r) und der p-Wert ermittelt.

H. Ergebnisse

5. Ergebnisse der klinischen Untersuchungen

Die Daten von 56 Hunden werden in die Untersuchung eingeschlossen. Entsprechend dem Patientengut der Klinik für Kleintiere, Chirurgie, der Justus-Liebig-Universität handelt es sich um eine heterogene Gruppe bezogen auf das Alter, die Rasse, das Gewicht sowie das Geschlecht der Tiere. In Tabelle 7 im Anhang ist eine Übersicht der untersuchten Hunde gegeben.

Die Hunde werden in dieser Studie nach dem Zustand ihres Gebisses in zwei Großgruppen eingeteilt. Um dem Gebiss einen Gesamtbefund (Grad der Parodontalerkrankung von 0-4) zuzuteilen, werden alle Zähne des Hundes untersucht. Der Gesamtbefund orientiert sich am schlechtesten Einzelzahnbefund. Die Kontrollgruppe besteht aus 20 Tieren, welche ein gesundes Gebiss aufweisen. Sie besitzen nur Zähne mit einem Parodontalindex von 0. Die Patientengruppe besteht aus 36 Tieren, also Hunde mit Gingivitis oder Parodontitis. Innerhalb der Patientengruppe gibt es vier Untergruppen, je nach Schweregrad der Parodontalerkrankung (Grad 1-4).

Demnach ergibt sich bei den 20 Tieren der Kontrollgruppe ein klinischer Normalbefund, das entspricht einer Parodontalerkrankung Grad 0. Bei zwei Hunden wird eine Gingivitis, also eine Parodontalerkrankung Grad 1, festgestellt. Bei 19 Hunden zeigt sich eine beginnende Parodontitis, also eine Parodontalerkrankung Grad 2 und bei sechs Patienten eine mittelgradige Parodontitis, welche als Parodontalerkrankung Grad 3 klassifiziert ist. Bei neun Patienten wird eine fortgeschrittene Parodontitis oder eine Parodontalerkrankung Grad 4 festgestellt (siehe Abbildung 4).

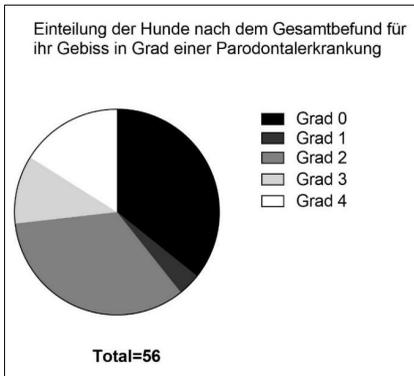


Abbildung 4: Kreisdiagramm zur Einteilung der Gebisse der untersuchten Hunde nach Grad der Parodontalerkrankung (n=56)

Da jeder Zahn innerhalb einer Mundhöhle in unterschiedlichem Maße von einer Parodontalerkrankung betroffen sein kann, wird in dieser Studie nicht der Patient als Ganzes, sondern vielmehr jeder Zahn als Einzelnes betrachtet und die Untersuchungen erfolgen vor allem auf Zahnebene.

Nach klinischer Untersuchung erhalten Grad 0 die 200 Zähne der Kontrollgruppe, sowie 69 Zähne von Patienten. 217 Zähne werden mit Grad 1, 54 werden mit Grad 2 beurteilt. Acht Zähne erhalten den Grad 3, sowie zwölf wird der Grad 4 einer Parodontalerkrankung zugeteilt (siehe Abbildung 5).

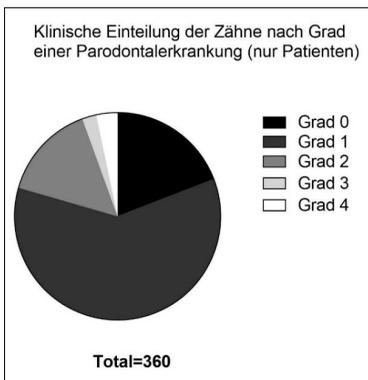


Abbildung 5: Kreisdiagramm zur klinischen Einteilung der Patientenzähne nach Grad der Parodontalerkrankung (n=360)

6. Ergebnisse der radiologischen Untersuchungen

An Hand der radiologischen Untersuchung werden ebenfalls die Grade 0-4 einer Parodontalerkrankung pro Zahn verteilt (siehe Abbildung 6). Grad 0 erhalten die 200 Zähne der Kontrollgruppe und 47 von Patienten. 160 Zähne werden mit Grad 1, 132 mit Grad 2 beurteilt. 18 Zähne erhalten den Grad 3, sowie drei den Grad 4 einer Parodontalerkrankung.

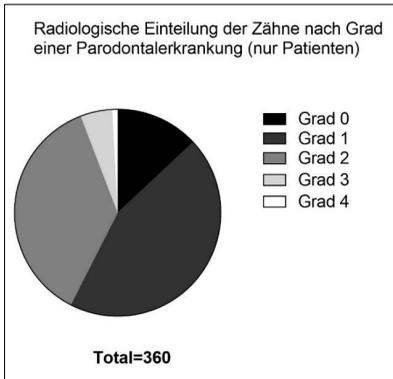


Abbildung 6: Kreisdiagramm zur radiologischen Einteilung der Patientenzähne nach Grad der Parodontalerkrankung (n=360)

Der letztendliche Parodontalbefund für jeden Zahn orientiert sich am schlechteren Befund aus klinischer oder radiologischer Untersuchung. Das ergibt Grad 0 für die 200 Zähne der Kontrollgruppe, sowie 44 von Patienten. 135 Zähne werden mit Grad 1, 147 werden mit Grad 2 beurteilt. 21 Zähne erhalten den Grad 3 und 13 wird Grad 4 einer Parodontalerkrankung zugeteilt.

7. Ergebnisse der statistischen Auswertung der Aktivitätsassays

7.1 Untersuchung der Zusammenhänge zwischen dem Schweregrad einer parodontalen Erkrankung und der Enzymaktivität

Zwischen dem Schweregrad einer Parodontalerkrankung (schlechtester Wert aus klinischer und radiologischer Untersuchung nach Zahn) lässt sich sowohl mit der maximalen relativen Aktivität im Gelatineassay ($p=0,0307$), sowie mit der maximalen absoluten Aktivität im Gelatineassay ($p<0,0001$) ein statistisch signifikanter Zusammenhang feststellen (siehe Abbildungen 7 und 8 sowie Tabellen 10 und 12 im Anhang).

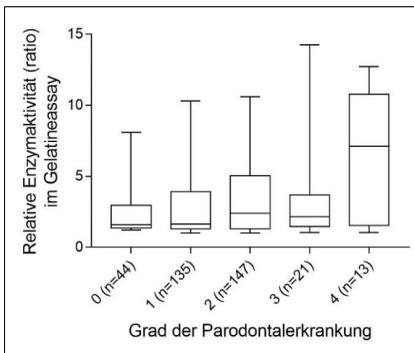


Abbildung 7: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen relativer Enzymaktivität im Gelatineassay und den Graden der Parodontalerkrankung (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum.

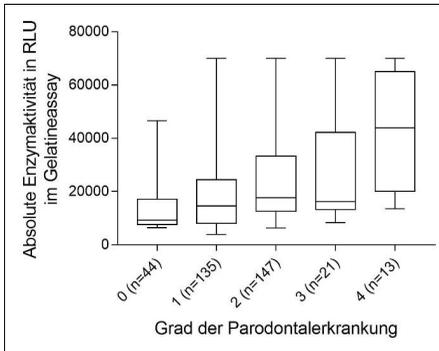


Abbildung 8: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Gelatineassay in RLU (relative light units) und den Graden der Parodontalerkrankung (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum.

Zwischen dem Schweregrad einer Parodontalerkrankung (schlechtester Wert aus klinischer und radiologischer Untersuchung nach Zahn) lässt sich sowohl mit der maximalen relativen Aktivität im Kollagenassay ($p=0,0021$), sowie mit der maximalen absoluten Aktivität im Kollagenassay ($p=0,0003$) ein statistisch signifikanter Zusammenhang feststellen (siehe Abbildungen 9 und 10 sowie Tabellen 11 und 13 im Anhang).

Die aufgestellte Hypothese „mit steigendem Schweregrad einer Parodontalerkrankung steigt auch schrittweise die enzymatische Aktivität“ wird somit bestätigt. Es erfolgt hier keine Unterscheidung der einzelnen „Zahnarten“.

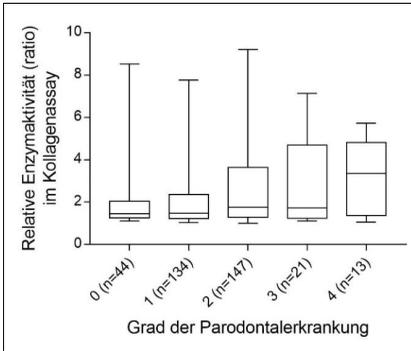


Abbildung 9: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen relativer Enzymaktivität im Kollagenassay und den Graden der Parodontalerkrankung (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum.

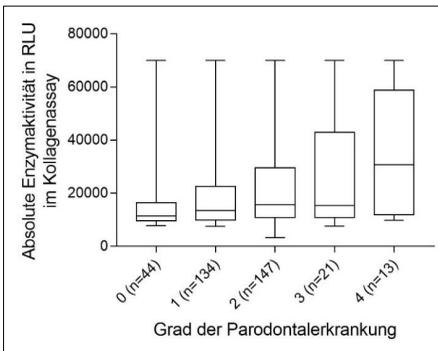


Abbildung 10: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Kollagenassay in RLU (relative light units) und den Graden der Parodontalerkrankung (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum.

7.2 Statistische Auswertung bezüglich der Zusammenhänge zwischen Patientengruppe und Kontrollgruppe

7.2.1 Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität aller Zähne der Patientengruppe und der Kontrollgruppe nach Zahn

Es erfolgt die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität aller Zähne a1 (n=36) der Patientengruppe und der Enzymaktivität aller Zähne a1 (n=20) der Kontrollgruppe. Im Anschluss wird auch für alle Zähne a2-h so verfahren.

Zwischen der maximalen relativen Aktivität im Gelatineassay der Patientenzähne und der Kontrollzähne bestehen statistisch signifikante Unterschiede für die Zähne a1 ($p=0,0006$), a2 ($p=0,0003$), b ($p=0,0013$), c ($p=0,0022$), e1 ($p=0,001$), e2 ($p=0,0006$), f ($p=0,0059$), g ($p=0,0419$) und h ($p=0,0011$) (siehe Abbildung 11 sowie Tabelle 14 im Anhang). Die Kontrollzähne weisen eine niedrigere Aktivität als die Zähne der Patienten auf. Für den Zahn d konnte in dieser Studie kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden.

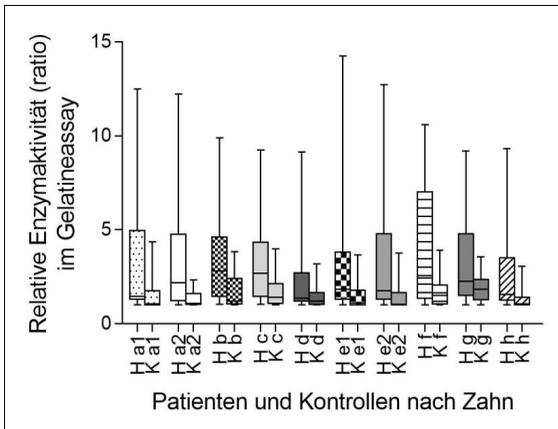


Abbildung 11: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen relativer Enzymaktivität im Gelatineassay von Patienten und Kontrollen nach Zahn (n=Anzahl an Zähnen, also für H ist n=36; für K ist n=20). H steht für Patienten, K für Kontrollen und die Buchstaben a1-h jeweils für den beobachteten Zahn. Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum.

Zwischen der maximalen relativen Aktivität im Kollagenassay der Patientenzähne und der Kontrollzähne bestehen statistisch signifikante Unterschiede für die Zähne a1 ($p=0,0093$), a2 ($p=0,0003$), e1 ($p=0,024$) und e2 ($p=0,0056$). Die Kontrollzähne

weisen dabei eine niedrigere Aktivität auf als die Patientenzähne (siehe Abbildung 12 sowie Tabelle 14 im Anhang). Für die Zähne b, c, d, f, g und h konnten in dieser Studie keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (siehe Abbildung 12). Die Kontrollzähne d, f und g zeigen entgegen der Erwartung höhere Enzymaktivitäten als die Patientenzähne.

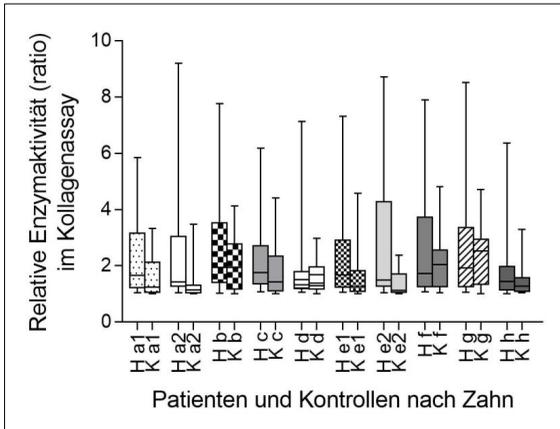


Abbildung 12: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen relativer Enzymaktivität im Kollagenassay von Patienten und Kontrollen nach Zahn (n=Anzahl an Zähnen, also für H ist n=36; für K ist n=20). H steht für Patienten, K für Kontrollen und die Buchstaben a1-h jeweils für den beobachteten Zahn. Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum.

Zwischen der maximalen absoluten Aktivität im Gelatineassay der Patientenzähne und der Kontrollzähne besteht ein statistisch signifikanter Unterschied für den Zahn d ($p=0,0159$). Die Enzymaktivität der Kontrollzähne liegt hier wider Erwarten höher als die der Patientenzähne. Für die Zähne a1, a2, b, c, e1, e2, f, g und h konnten in dieser Studie keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (siehe Abbildung 13 sowie Tabelle 15 im Anhang). Die Patientenzähne a1, a2, b, e2 und h weisen gegenüber den Kontrollzähnen eine höhere Enzymaktivität auf.

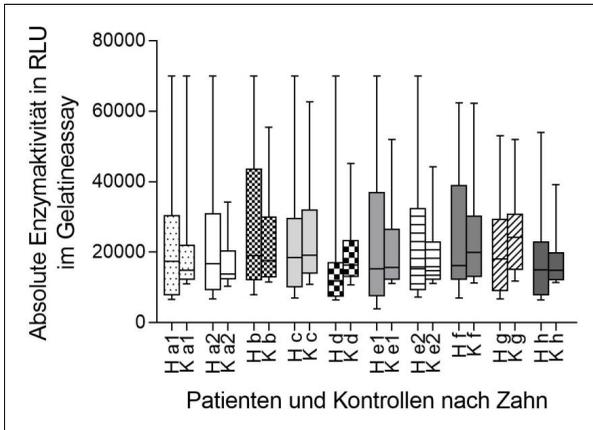


Abbildung 13: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Gelatineassay in RLU (relative light units) von Patienten und Kontrollen nach Zahn (n=Anzahl an Zähnen, also für H ist n=36; für K ist n=20). H steht für Patienten, K für Kontrollen und die Buchstaben a1-e2 jeweils für den beobachteten Zahn. Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum.

Zwischen der maximalen absoluten Aktivität im Kollagenassay der Patientenzähne und der Kontrollzähne besteht ein statistisch signifikanter Unterschied für den Zahn e2 ($p=0,0385$). Die Patientenzähne e2 weisen gegenüber den Kontrollzähnen e2 eine höhere Enzymaktivität auf. Für die Zähne a1, a2, b, c, d, e1, f, g und h konnten in dieser Studie keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (siehe Abbildung 14 sowie Tabelle 15 im Anhang). Die Enzymaktivität der Patientenzähne a1, a2, c, e1 und e2 ist höher als die der entsprechenden Kontrollzähne.

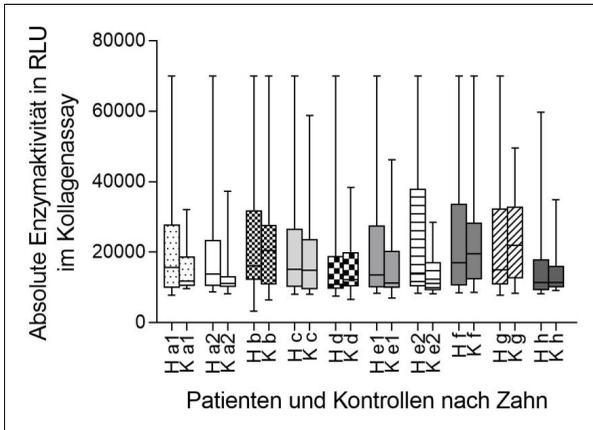


Abbildung 14: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Kollagenassay in RLU (relative light units) von Patienten und Kontrollen nach Zahn (n=Anzahl an Zähnen, also für H ist n=36; für K ist n=20). H steht für Patienten, K für Kontrollen und die Buchstaben a1-e2 jeweils für den beobachteten Zahn. Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum.

7.2.2 Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität aller Zähne der Patientengruppe und der Kontrollgruppe unabhängig vom Zahn

Es erfolgt die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität aller Zähne der Patientengruppe (n=288) und der Enzymaktivität aller Zähne der Kontrollgruppe (n=160).

Mit den vorliegenden Daten zeigt sich ein statistisch hoch signifikanter Unterschied zwischen dem gemessenen Maximalwert relativer Gelatinaseaktivität ($p < 0,0001$) von Patienten und Kontrolltieren, sowie zwischen der maximalen relativen Aktivität im Kollagenassay ($p = 0,0002$) von Patienten und Kontrolltieren (siehe Abbildungen 15 und 16 sowie Tabellen 16 und 17 im Anhang). Die Enzymaktivität der Patienten ist in beiden Fällen höher als die der Kontrolltiere.

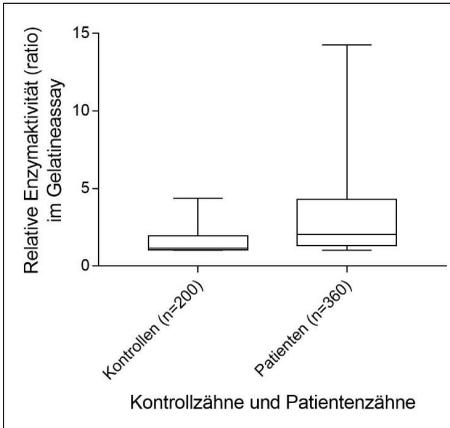


Abbildung 15: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen relativer Enzymaktivität im Gelatineassay bei Kontrollen gegenüber Patienten (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum.

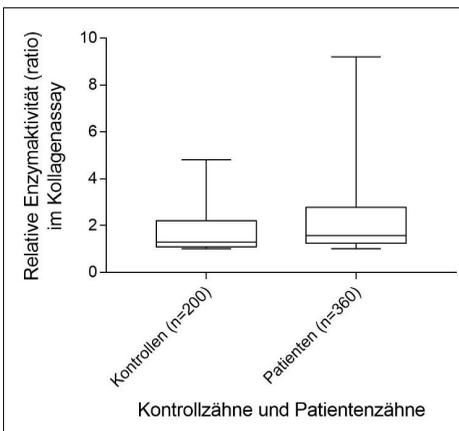


Abbildung 16: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen relativer Enzymaktivität im Kollagenassay bei Kontrollen gegenüber Patienten (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum.

Es lässt sich in dieser Studie kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der maximalen absoluten Aktivität im Gelatineassay, sowie der maximalen absoluten Aktivität im Kollagenassay von Patienten und Kontrolltieren feststellen (siehe Tabellen 18 und 19 im Anhang).

7.2.3 Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität der Patientengruppe und der Kontrollgruppe

Es erfolgt die Überprüfung des Zusammenhangs zwischen der Enzymaktivität der Hunde aus der Patientengruppe (n=36) und der Hunde aus der Kontrollgruppe (n=20).

Zwischen der maximalen relativen Aktivität im Gelatineassay von Patienten und Kontrolltieren besteht ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,0001$). Die Enzymaktivität der Patientengruppe ist höher als die der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 17 und Tabelle 20 im Anhang).

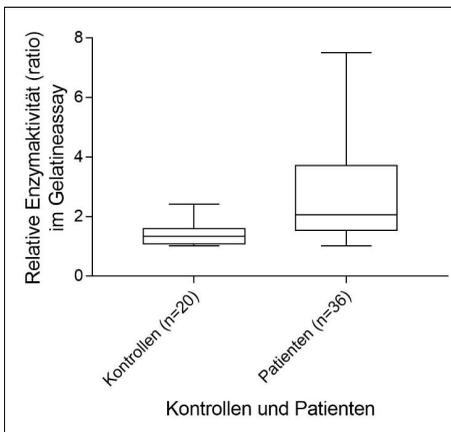


Abbildung 17: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen relativer Enzymaktivität im Gelatineassay bei Kontrollen gegenüber Patienten (n=Anzahl an Patienten). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum.

Dahingegen lässt sich in dieser Studie kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der maximalen relativen Aktivität im Kollagenassay von Patienten und Kontrolltieren feststellen (siehe Tabelle 21 im Anhang). In dieser Studie lassen sich außerdem weder ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der maximalen absoluten Aktivität im Gelatineassay von Patienten und Kontrolltieren

noch zwischen der maximalen absoluten Aktivität im Kollagenassay von Patienten und Kontrollieren feststellen (siehe Tabellen 22 und 23 im Anhang).

7.2.4 Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität aller Hunde der Patientengruppe mit mindestens einem Zahn mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung und aller Hunde der Kontrollgruppe

Es erfolgt die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität aller Hunde der Patientengruppe mit mindestens einem Zahn mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung (n=14) und der Enzymaktivität aller Hunde der Kontrollgruppe (n=20). Dies geschieht, um festzustellen, ob ein Unterschied in der Enzymaktivität von Zähnen mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung aus einem insgesamt gesunden Maul besteht gegenüber Zähnen mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung aus einem Maul indem sich ansonsten auch parodontal erkrankte Zähne befinden.

Zwischen der maximalen relativen Aktivität im Gelatineassay von Zähnen mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung der Patienten (ermittelt aus dem schlechtesten Wert aus klinischer und radiologischer Untersuchung nach Zahn) und den Zähnen der Kontrolltiere besteht ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,0013$). Die Enzymaktivität der Patientenzähne mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung ist höher als die Enzymaktivität der Zähne der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 18 sowie Tabelle 24 im Anhang).

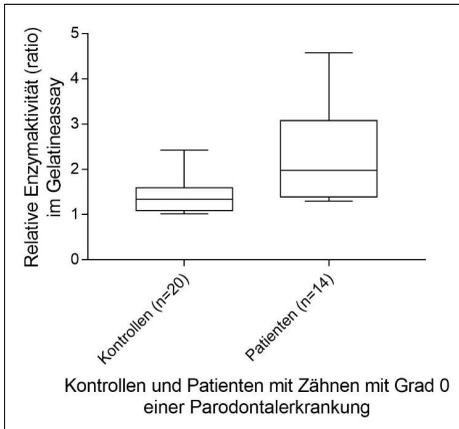


Abbildung 18: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen relativer Enzymaktivität im Gelatineassay bei Kontrollen gegenüber Patienten mit mindestens einem Zahn mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung (ermittelt aus dem schlechtesten Befund aus klinischer und radiologischer Untersuchung) (n=Anzahl an Patienten). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum.

Zwischen der maximalen absoluten Aktivität im Gelatineassay von Zähnen mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung der Patienten (ermittelt aus dem schlechtesten Wert aus klinischer und radiologischer Untersuchung nach Zahn) und den Zähnen der Kontrolltiere besteht ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,0057$) (siehe Abbildung 19 und Tabelle 26 im Anhang). Hier ist der Effekt umgekehrt zu den erwarteten Ergebnissen und die Aktivität der Kontrollen ist signifikant erhöht gegenüber der Enzymaktivität der Patienten.

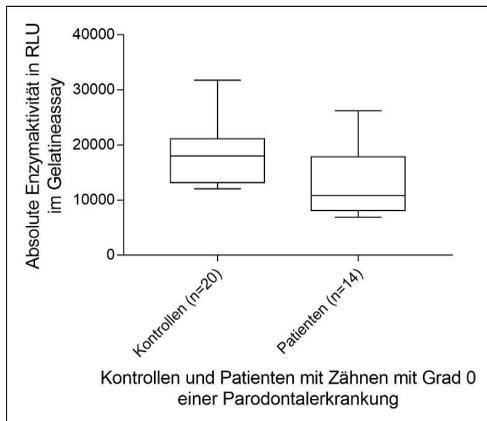


Abbildung 19: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Gelatineassay in RLU (relative light units) bei Kontrollen gegenüber Patienten mit mindestens einem Zahn mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung (ermittelt aus dem schlechtesten Befund aus klinischer und radiologischer Untersuchung) (n=Anzahl an Patienten). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum.

Im Kollagenassay lassen sich in dieser Studie zwischen der maximalen Aktivität von Zähnen mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung der Patienten (ermittelt aus dem schlechtesten Wert aus klinischer und radiologischer Untersuchung nach Zahn) und den Zähnen der Kontrolltiere, weder mit relativen, noch mit absoluten Werten, statistisch signifikante Zusammenhänge feststellen (siehe Tabellen 25 und 27 im Anhang).

7.2.4.1 Statistische Auswertung bezüglich des Einflusses von Alter und Körpermasse auf die Enzymaktivität

Es zeigen sich unter Verwendung der vorliegenden Daten keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen Alter und der kollagenolytischen oder gelatinolytischen Aktivität von Hunden der Patientengruppe mit mindestens einem Zahn mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung (n=14) und von Hunden der Kontrollgruppe (n=20) (siehe Tabellen 28 und 30 im Anhang). Auch zeigen sich zwischen Körpermasse und der Aktivität von Gelatinasen oder Kollagenasen von Hunden der Patientengruppe mit mindestens einem Zahn mit Grad 0 einer

Parodontalerkrankung (n=14) und von Hunden der Kontrollgruppe (n=20) keine statistisch signifikanten Zusammenhänge (siehe Tabellen 29 und 31 im Anhang).

7.3. Statistische Auswertung bezüglich der Einteilung der Zähne in Grade der Parodontalerkrankung und der messbaren Enzymaktivität

Zwischen dem klinischen Grad einer Parodontalerkrankung nach Zahn und der maximalen relativen Aktivität im Gelatineassay besteht ein statistisch signifikanter positiver Zusammenhang für die Zähne a1 ($p=0,051$), e1 ($p=0,0002$) und e2 ($p=0,0429$) (siehe Abbildung 20 und Tabelle 32 im Anhang). Das bedeutet für die Zähne a1, e1 und e2 mit steigendem Grad der Parodontalerkrankung steigt auch die Enzymaktivität. Für den Zahn c ($p=0,0087$) besteht ein statistisch signifikanter negativer Zusammenhang (siehe Abbildung 20 und Tabelle 32 im Anhang). Der Effekt ist also umgekehrt zu den erwarteten Ergebnissen.

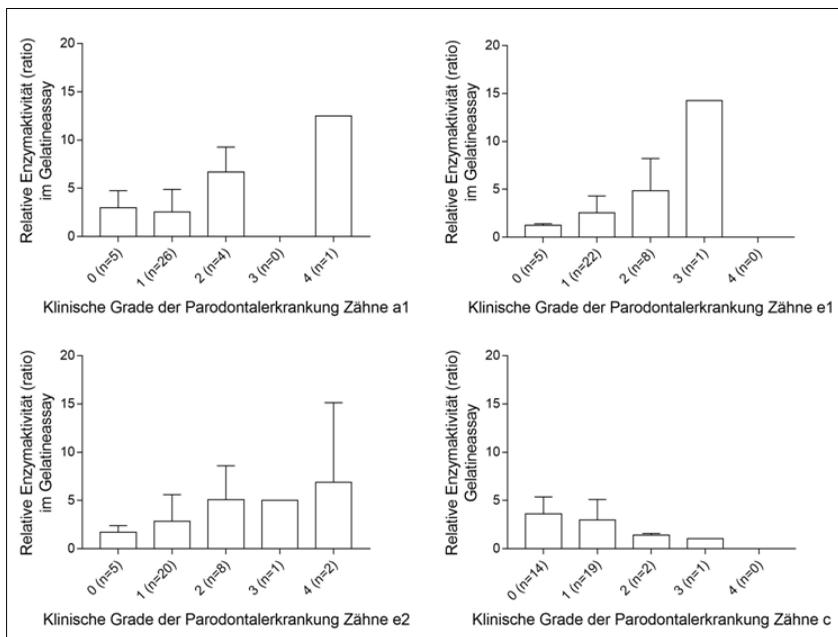


Abbildung 20: Balkendiagramme für die Darstellung der Beziehung zwischen relativer Enzymaktivität im Gelatineassay bei den verschiedenen klinischen Graden der Parodontalerkrankung an den Zähnen a1, e1, e2 und c (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung.

Zwischen dem klinischen Grad einer Parodontalerkrankung nach Zahn und der maximalen relativen Aktivität im Kollagenassay besteht ein statistisch signifikanter

positiver Zusammenhang für den Zahn e1 ($p=0,0014$) (siehe Abbildung 21 und Tabelle 32 im Anhang).

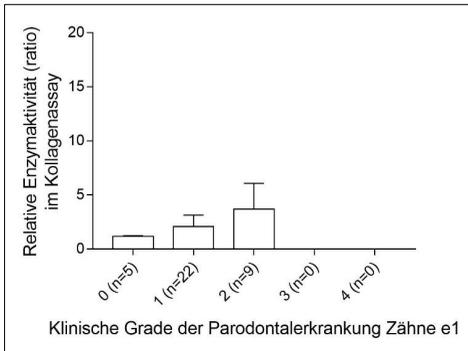


Abbildung 21: Balkendiagramm für die Darstellung der Beziehung zwischen relativer Enzymaktivität im Kollagenassay bei den verschiedenen klinischen Graden der Parodontalerkrankung am Zahn e1 (n =Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung.

Es lassen sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge nachweisen zwischen dem radiologischen Grad einer Parodontalerkrankung nach Zahn und der maximalen relativen Aktivität im Gelatine- und im Kollagenassay (siehe Tabelle 33 im Anhang). Des Weiteren lassen sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge nachweisen zwischen dem Grad einer Parodontalerkrankung nach Zahn (orientierend am schlechtesten Wert aus klinischer und radiologischer Untersuchung) und der maximalen relativen Aktivität im Gelatine- und im Kollagenassay (siehe Tabelle 34 im Anhang). Ebenfalls lassen sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge nachweisen zwischen dem Grad einer Parodontalerkrankung nach Hund bzw. Gebiss (orientierend an dem schlechtesten Zahn des gesamten Gebisses) und der maximalen relativen Aktivität im Gelatine- und im Kollagenassay (siehe Tabelle 35 im Anhang).

Zwischen dem klinischen Grad einer Parodontalerkrankung nach Zahn und der maximalen absoluten Aktivität im Gelatineassay besteht ein statistisch signifikanter positiver Zusammenhang für die Zähne a1 ($p=0,0145$), d ($p=0,0045$), e1 ($p=0,0017$) und e2 ($p=0,0014$) (siehe Abbildung 22 und Tabelle 36 im Anhang).

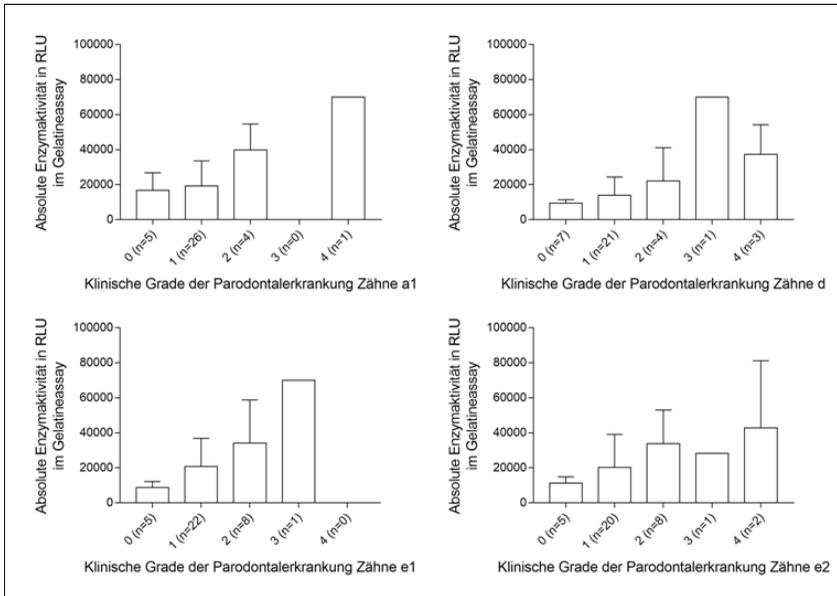


Abbildung 22: Balkendiagramme für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Gelatineassay in RLU (relative light units) bei den verschiedenen klinischen Graden der Parodontalerkrankung an den Zähnen a1, d, e1 und e2 (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung.

Zwischen dem klinischen Grad einer Parodontalerkrankung nach Zahn und der maximalen absoluten Aktivität im Kollagenassay besteht ein statistisch signifikanter positiver Zusammenhang für die Zähne a1 ($p=0,0272$), d ($p=0,0006$), e1 ($p=0,0006$) und e2 ($p=0,0318$) (siehe Abbildung 23 und Tabelle 36 im Anhang).

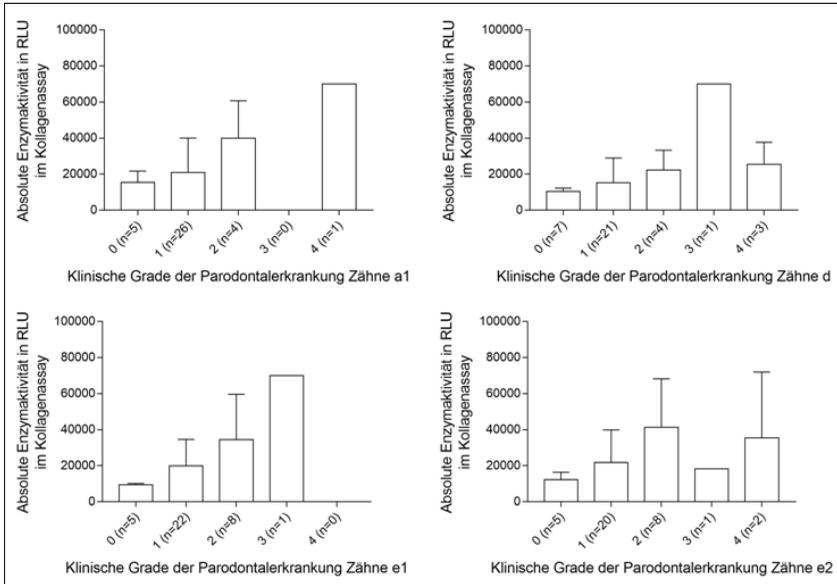


Abbildung 23: Balkendiagramme für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Kollagenassay in RLU (relative light units) bei den verschiedenen klinischen Graden der Parodontalerkrankung an den Zähnen a1, d, e1 und e2 (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung.

Zwischen dem radiologischen Grad einer Parodontalerkrankung nach Zahn und der maximalen absoluten Aktivität im Gelatineassay besteht ein statistisch signifikanter positiver Zusammenhang für die Zähne d ($p=0,0189$), e1 ($p=0,0166$) und h ($p=0,0015$) (siehe Abbildung 24 und Tabelle 37 im Anhang).

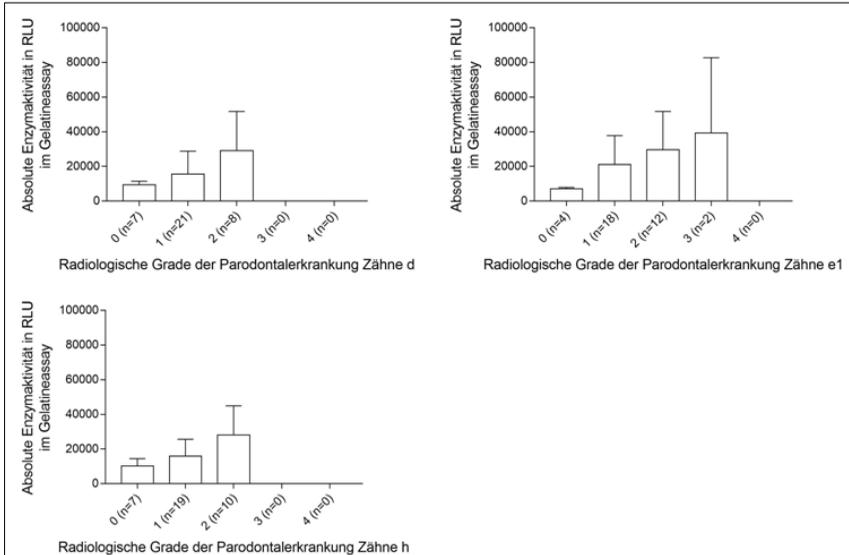


Abbildung 24: Balkendiagramme für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Gelatineassay in RLU (relative light units) bei den verschiedenen radiologischen Graden der Parodontalerkrankung an den Zähnen d, e1 und h (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung.

Zwischen dem radiologischen Grad einer Parodontalerkrankung nach Zahn und der maximalen absoluten Aktivität im Kollagenassay besteht ein statistisch signifikanter positiver Zusammenhang für die Zähne d ($p=0,0055$) und e1 ($p=0,0486$) (siehe Abbildung 25 und Tabelle 37 im Anhang).

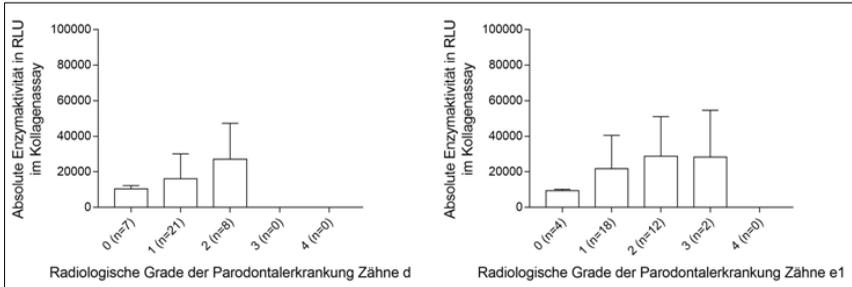


Abbildung 25: Balkendiagramme für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Kollagenassay in RLU (relative light units) bei den verschiedenen radiologischen Graden der Parodontalerkrankung an den Zähnen d und e1 (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung.

Zwischen dem Grad einer Parodontalerkrankung nach Zahn (orientierend am schlechtesten Wert aus klinischer und radiologischer Untersuchung) und der maximalen absoluten Aktivität im Gelatineassay besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang für die Zähne d ($p=0,0019$), e1 ($p=0,0073$) und e2 ($p=0,0018$) (siehe Abbildung 26 und Tabelle 38 im Anhang).

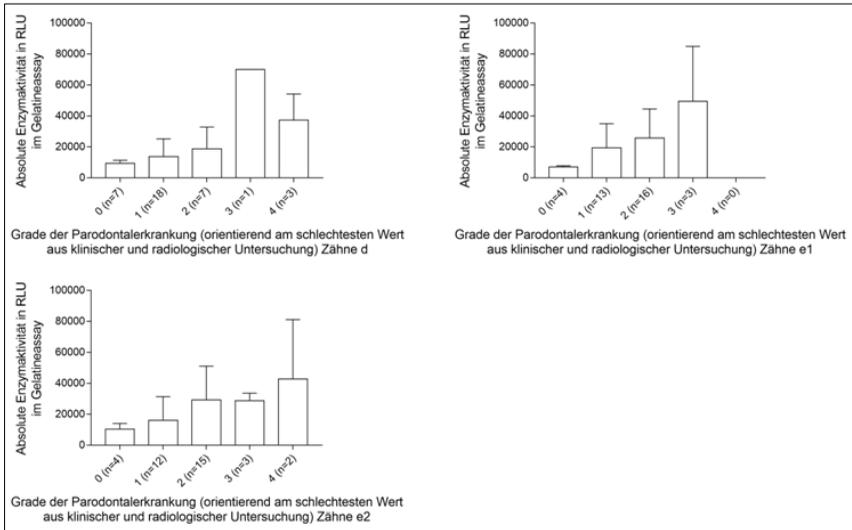


Abbildung 26: Balkendiagramme für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Gelatineassay in RLU (relative light units) bei den verschiedenen Graden der Parodontalerkrankung (orientierend am schlechtesten Wert aus klinischer und radiologischer Untersuchung) an den Zähnen d, e1 und e2 (n =Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung.

Zwischen dem Grad einer Parodontalerkrankung nach Zahn (orientierend am schlechtesten Wert aus klinischer und radiologischer Untersuchung) und der maximalen absoluten Aktivität im Kollagenassay besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang für die Zähne d ($p=0,0007$) und e1 ($p=0,0241$) (siehe Abbildung 27 und Tabelle 38 im Anhang).

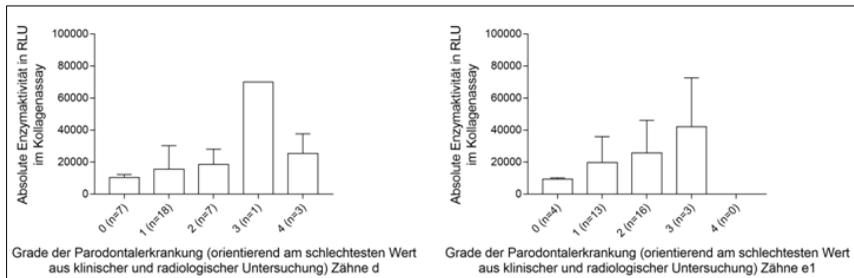


Abbildung 27: Balkendiagramme für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Kollagenassay in RLU (relative light units) den verschiedenen Graden der Parodontalerkrankung (orientierend am schlechtesten Wert aus klinischer und radiologischer Untersuchung) an den Zähnen d und e1 (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung.

Zwischen dem Grad einer Parodontalerkrankung nach Hund bzw. Gebiss (orientierend an dem schlechtesten Zahn des gesamten Gebisses) und der maximalen absoluten Aktivität im Gelatineassay besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang für die Zähne d ($p=0,0365$) und e2 ($p=0,0094$) (siehe Abbildung 28 und Tabelle 39 im Anhang).

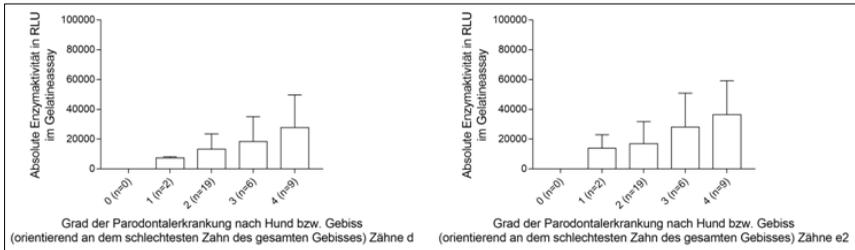


Abbildung 28: Balkendiagramme für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Gelatineassay in RLU (relative light units) bei den verschiedenen Graden der Parodontalerkrankung nach Hund bzw. Gebiss (orientierend an dem schlechtesten Zahn des gesamten Gebisses) für die Zähne d und e2 (n =Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung.

Dahingegen lassen sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge nachweisen zwischen dem Grad einer Parodontalerkrankung nach Hund bzw. Gebiss (orientierend an dem schlechtesten Zahn des gesamten Gebisses) und der maximalen absoluten Aktivität im Kollagenassay (siehe Tabelle 39 im Anhang).

7.4 Statistische Auswertung bezüglich der Übereinstimmung des ermittelten klinischen und radiologischen Grades der Parodontalerkrankung für alle Zähne

Zwischen dem klinischen und radiologischen Grad einer Parodontalerkrankung besteht eine statistisch signifikante positive Korrelation für die Zähne: a1 ($p<0,0001$), a2 ($p=0,0001$), b ($p=0,0007$), d ($p<0,0001$), e1 ($p=0,0328$), e2 ($p=0,0318$), f ($p=0,0017$) und h ($p=0,0023$) (siehe Abbildung 29 und Tabelle 40 im Anhang). Hingegen lässt sich für die Zähne c und g eine statistisch signifikante positive Korrelation mit den vorliegenden Daten nicht nachweisen.

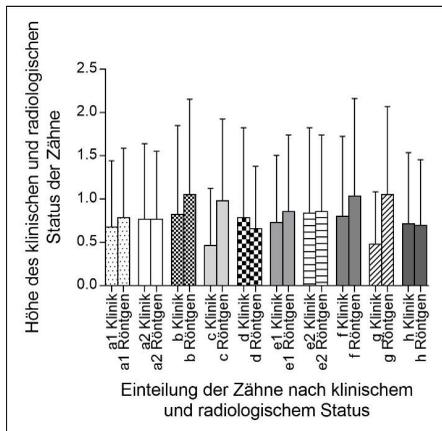


Abbildung 29: Balkendiagramm für die Darstellung der Übereinstimmung von klinischem und radiologischem Parodontalstatus nach Zahn (n=Anzahl an Zähnen und beträgt je Balken 56). Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung. Die Buchstaben a1-h stehen jeweils für den beobachteten Zahn.

7.5 Statistische Auswertung bezüglich der Übereinstimmung der Enzymaktivität an zwei Probenentnahmestellen

Es besteht ein statistisch signifikanter positiver Zusammenhang zwischen der maximalen relativen Aktivität im Gelatineassay und den Probeentnahmestellen a1 und a2 ($p < 0,001$) bzw. e1 und e2 ($p < 0,001$), sowie für die maximale absolute Aktivität im Gelatineassay und den Probeentnahmestellen a1 und a2 ($p = 0,03$) bzw. e1 und e2 ($p = 0,018$) (siehe Abbildungen 30 und 31 links sowie Tabellen 41 und 42 im Anhang).

Es besteht ein statistisch signifikanter positiver Zusammenhang zwischen der maximalen relativen Aktivität im Kollagenassay und den Probeentnahmestellen a1 und a2 ($p = 0,002$) bzw. e1 und e2 ($p = 0,011$), sowie für die maximale absolute Aktivität im Kollagenassay und den Probeentnahmestellen a1 und a2 ($p = 0,003$) bzw. e1 und e2 ($p = 0,019$) (siehe Abbildungen 30 und 31 rechts sowie Tabellen 41 und 42 im Anhang).

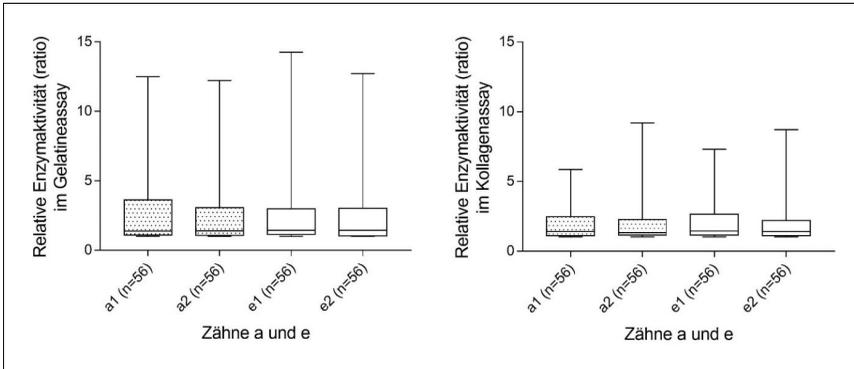


Abbildung 30: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen relativer Enzymaktivität im Gelatineassay (linksseitig dargestellt) und im Kollagenassay (rechtsseitig dargestellt) von den Zähnen a (a1 und a2) sowie den Zähne e (e1 und e2) (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum.

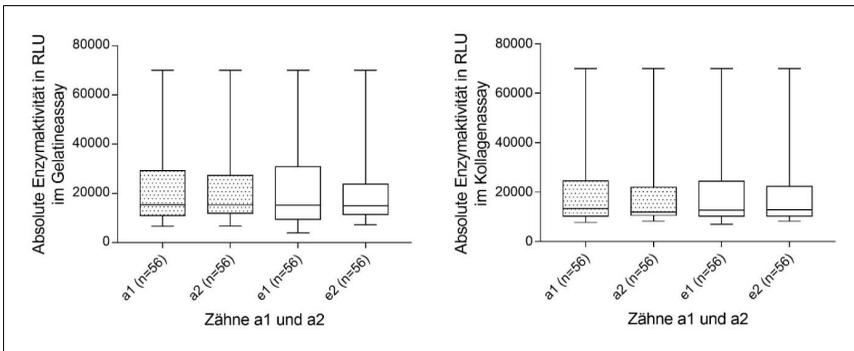


Abbildung 31: Kastengrafik für die Darstellung der Beziehung zwischen absoluter Enzymaktivität im Gelatineassay (linksseitig dargestellt) und im Kollagenassay (rechtsseitig dargestellt) in RLU (relative light units) von den Zähnen a (a1 und a2) sowie den Zähne e (e1 und e2) (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum.

8. Ergebnisse der deskriptiven Auswertung der ELISA-Untersuchungen

Auf Grund der niedrigen Fallzahlen der vorliegenden Untersuchungen mittels ELISA erfolgt statt einer statistischen, eine deskriptive Auswertung.

In den vorliegenden Proben können mit Hilfe des ELISA sowohl bei Zähnen von Tieren aus der Kontrollgruppe als auch aus der Patientengruppe MMP-2, -3 und -9 nachgewiesen werden. MMP-8 wird nur in der Patientengruppe untersucht. Die Werte können in Tabelle 43 im Anhang eingesehen werden.

8.1 Deskriptive Auswertung der Beziehung zwischen MMP-Gehalt und Grad der Parodontalerkrankung

In Abbildung 32 und Tabelle 43 im Anhang wird ersichtlich, dass MMP-8 gegenüber den anderen untersuchten MMPs mit einem deutlich höheren Gehalt in ng/ml in den untersuchten Proben nachgewiesen werden kann. Die Werte sind gegenüber MMP-9 ca. 20-fach, gegenüber MMP-3 ca. 52-fach und gegenüber MMP-2 ca. 9-fach höher. Die Vermutung, dass es mit steigendem Grad der Parodontalerkrankung zu einem Anstieg im MMP-Gehalt kommt, kann auf Basis der vorliegenden Daten für keines der untersuchten MMPs bestätigt werden.

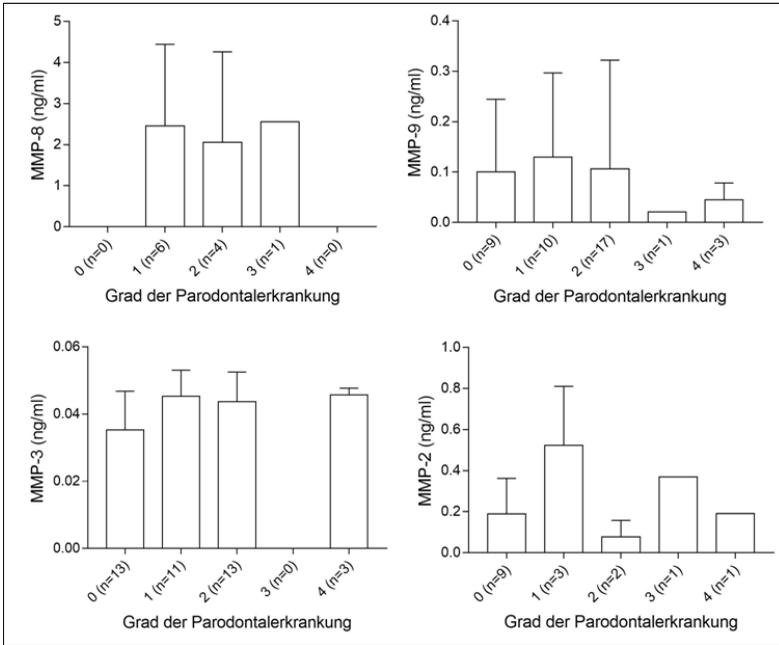


Abbildung 32: Balkendiagramme für die Darstellung der Beziehung zwischen MMP-Gehalt in ng/ml (Nanogramm pro Milliliter) und den verschiedenen Graden der Parodontalerkrankung (ermittelt aus dem schlechtesten Befund aus klinischer und radiologischer Untersuchung; n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung.

8.2 Deskriptive Auswertung der Gehalte der verschiedenen MMPs bei Grad 1 und 2 einer Parodontalerkrankung

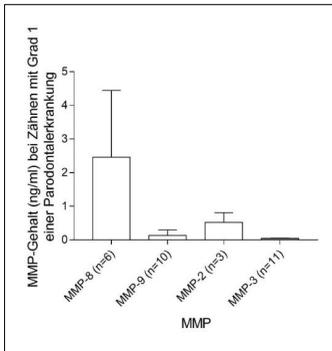


Abbildung 33: Balkendiagramm für die Darstellung der Beziehung zwischen MMP-Gehalt in ng/ (Nanogramm pro Milliliter) bei Zähnen mit Grad 1 einer Parodontalerkrankung (ermittelt aus dem schlechtesten Befund aus klinischer und radiologischer Untersuchung; n=Anzahl an Zähnen) und den verschiedenen untersuchten MMPs. Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung.

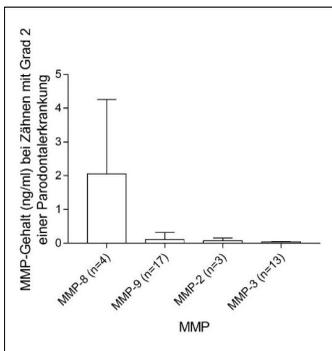


Abbildung 34: Balkendiagramm für die Darstellung der Beziehung zwischen MMP-Gehalt in ng/ (Nanogramm pro Milliliter) bei Zähnen mit Grad 2 einer Parodontalerkrankung (ermittelt aus dem schlechtesten Befund aus klinischer und radiologischer Untersuchung; n=Anzahl an Zähnen) und den verschiedenen untersuchten MMPs. Dargestellt werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung.

In den Abbildungen 33 und 34 wird ersichtlich, dass der Gehalt an MMP-8 sowohl bei Zähnen mit Grad 1 als auch bei Zähnen mit Grad 2 einer Parodontalerkrankung im Vergleich zu den anderen untersuchten MMPs am höchsten ist. Bei Zähnen mit Grad 1 einer Parodontalerkrankung ist als nächstes MMP-2 repräsentiert und bei Zähnen mit Grad 2 einer Parodontalerkrankung MMP-9.

8.3 Deskriptive Auswertung des MMP-Gehalts bei parodontal gesunden Zähnen im Vergleich zu parodontal erkrankten Zähnen und in der Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe

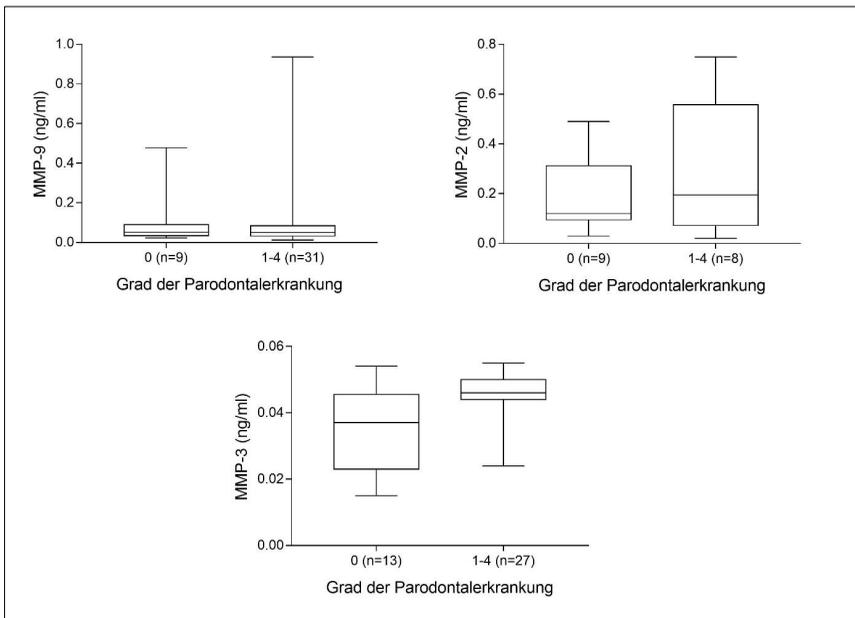


Abbildung 35: Kastengrafiken für die vergleichende Darstellung der Beziehung zwischen MMP-Gehalt in ng/ml (Nanogramm pro Milliliter) und den Graden 0 sowie 1-4 der Parodontalerkrankung (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum.

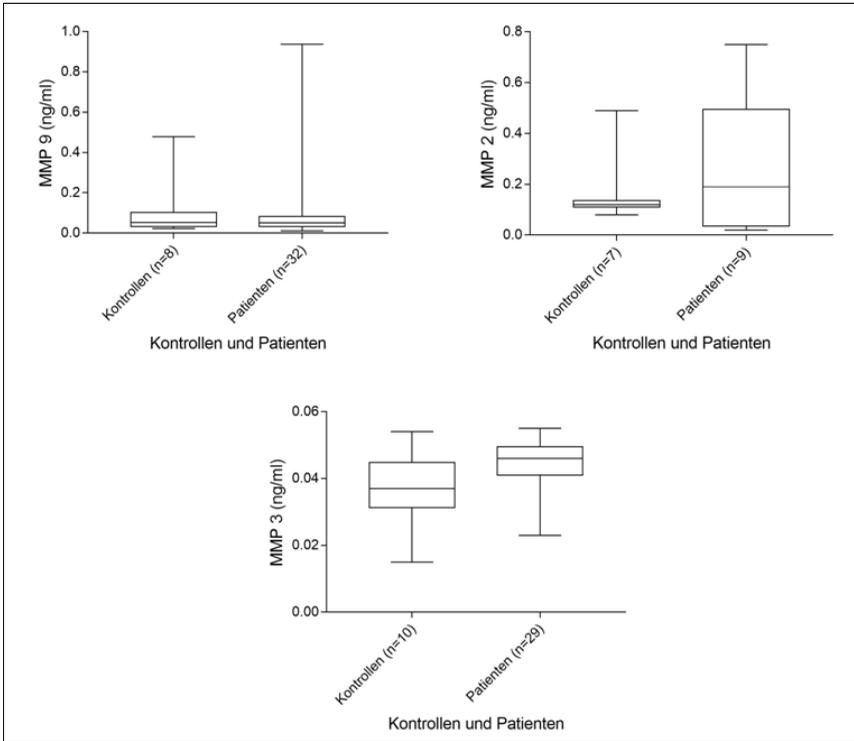


Abbildung 36: Kastengrafiken für die Darstellung der Beziehung zwischen MMP-Gehalt in ng/ml (Nanogramm pro Milliliter) bei Kontrollzähnen im Vergleich zu Patientenzähnen (unabhängig vom Grad der Parodontalerkrankung) (n=Anzahl an Zähnen). Dargestellt werden der Median, das erste und dritte Quartil, sowie Minimum und Maximum.

Abbildung 35 zeigt den Vergleich zwischen dem MMP-Gehalt bei gesunden Zähnen (sowohl Patienten-, als auch Kontrollzähne mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung) gegenüber dem MMP-Gehalt bei kranken Zähnen (Zähne mit Grad 1-4 einer Parodontalerkrankung). In Abbildung 36 geht es um den Vergleich des MMP-Gehaltes zwischen Kontrollzähnen und Patientenzähnen (Grad 1-4 einer Parodontalerkrankung). Hierbei zeigt sich, dass für MMP-2 und -3 die Aussage, dass es bei erkrankten Zähnen bzw. Patientenzähnen zu höheren MMP-Gehalten kommt, als bei gesunden Zähnen bzw. Kontrollzähnen, zutrifft. Hier ist zwischen Zähnen erkrankten Zähnen bzw. Patientenzähnen gegenüber Zähnen mit Grad 0 einer

Parodontalerkrankung bzw. Kontrollzähnen ein Anstieg im MMP-Gehalt ersichtlich. Für MMP-9 zeigt sich der MMP-Gehalt bei den gesunden Zähnen bzw. Kontrollzähnen minimal höher als bei den erkrankten Zähnen bzw. Patientenzähnen. Für MMP-8 lässt sich auf Grund des Fehlens von untersuchten Zähnen mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung bzw. Kontrollzähnen keine Aussage zu dieser Fragestellung treffen.

I. Diskussion

9. Allgemeines

In der Humanmedizin gibt es bereits zahlreiche Studien zu Abbauvorgängen, die bei der Parodontitis ablaufen sowie zu den dabei beteiligten Enzymen. Dabei handelt es sich vorwiegend um Matrix-Metalloproteinasen. Diese wurden mittels verschiedener Verfahren z.B. Immunfluorometrie (LEPPILAHTI et al., 2014), Zymografie (POZO et al., 2005; BILDT et al., 2008), Western Blot (KOROSTOFF et al., 2000; BILDT et al., 2008) und ELISA (MARCACCINI et al., 2010; MESCHIARI et al., 2013) sowie in unterschiedlichen Geweben und Flüssigkeiten (z.B. in gingivaler Sulkusflüssigkeit (MÄKELÄ et al., 1994; SOELL et al., 2002), Speichel (KOROSTOFF et al., 2000), Gingiva (EJEIL et al., 2003; BILDT et al., 2008) und Blutplasma (MARCACCINI et al., 2009)) nachgewiesen. Darüber hinaus gibt es Studien, die sich mit dem Verhalten der Enzyme beschäftigen und einen Unterschied zwischen dem Vorkommen latenter und aktiver Enzyme aufzeigen (LEE et al., 1995; POZO et al., 2005). Dem Gros dieser Studien ist gemein, dass sie eine erhöhte Anzahl bzw. eine gesteigerte Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen beim Vorliegen einer Parodontitis dokumentieren (MÄKELÄ et al., 1994; KUBOTA et al., 1996; SOELL et al., 2002; EJEIL et al., 2003; BEKLEN et al., 2006; KUBOTA et al., 2008; RAI et al., 2008; HERNÁNDEZ RÍOS et al., 2009). In der Tiermedizin sind diese Zusammenhänge bisher wenig erforscht. Es gibt nur vereinzelte Untersuchungen zur Rolle der MMPs bei der Parodontitis des Hundes (KRYSHITALSKYJ et al., 1986; SCHWARZ et al., 2007; KIM et al., 2013; KAISER et al., 2014; REIMANN et al., 2019). Um die Vorgänge beim Hund näher zu beleuchten, befasst sich die vorliegende Arbeit mit der Hypothese, dass ein Zahn mit steigendem Grad einer Parodontalerkrankung einen Anstieg der enzymatischen Aktivität von Kollagenasen und Gelatinasen aufweist und die enzymatische Aktivität an Zähnen mit einer Parodontalerkrankung insgesamt höher ist als bei gesunden Zähnen. Diese Untersuchungen werden an gingivaler Sulkusflüssigkeit durchgeführt. Zum Nachweis von MMPs in gingivaler Sulkusflüssigkeit beim Menschen sind in der Literatur unterschiedliche Verfahren (wie ELISA, Western Blot und Zymografie (MÄKELÄ et al., 1994; POZO et al., 2005; RAI et al., 2008)) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde der Nachweis von MMPs mittels ELISA durchgeführt und der Nachweis enzymatischer Aktivität von Kollagenasen und Gelatinasen mit Hilfe der Spektrofluorometrie (Aktivitätsassay).

Auf Grund des Mangels an Studien auf diesem Gebiet aus dem Bereich der Veterinärmedizin werden im Folgenden vor allem Vergleiche mit der Humanmedizin aufgezeigt.

9.1 Studienaufbau

Bei den verwendeten Probanden handelt es sich um das Patientengut der Klinik für Kleintiere, Chirurgie, der Justus-Liebig-Universität Gießen und somit um eine heterogene Gruppe an Hunden bezüglich Rasse, Alter und Geschlecht. Ein Einfluss auf Zahnhygiene, Fütterung oder Haltung ist demnach nicht gegeben.

Bei Verwendung des Patientenguts einer universitären Tierklinik bestehen jedoch realistischere Verhältnisse im Vergleich zu Studien an Versuchstieren (KRYSHALSKYJ et al., 1986; KIM et al., 2013). Diese werden häufig an Beaglen oder anderen homogenen Gruppen gleichrassiger Hunde durchgeführt (SCHWARZ et al., 2007; PAULA-SILVA et al., 2010). Dies birgt den Nachteil, dass das Vorhandensein eventueller rassespezifischer Besonderheiten nicht ausgeglichen wird. Bei Verwendung von Versuchstieren bestehen neben gleichen Haltungsbedingungen für alle Tiere der Gruppe auch das gleiche Fütterungsregime und es handelt sich somit um eine homogene Versuchsgruppe. Bei der Verwendung von Versuchstieren besteht die Möglichkeit, die Tiere am Ende der Studie zu euthanasieren und die Untersuchungen an Sektionsmaterial vorzunehmen (KRYSHALSKYJ et al., 1986; PAULA-SILVA et al., 2010). In der vorliegenden Studie wird gingivale Sulkusflüssigkeit lebender Patienten entnommen. Im Vergleich zur Verwendung von Patienten mit künstlich erzeugter Parodontitis wie in der Studie von KRYSHALSKYJ und Mitarbeitern (1986) liegt bei Verwendung des Patientenguts einer Tierklinik wie im Fall dieser Doktorarbeit eine natürlich erworbene Parodontitis vor. Bei Hunden mit schwerwiegender Parodontalerkrankung kann die Probenentnahme erschwert sein, da eine blutungsfreie Entnahme der Sulkusflüssigkeit angestrebt wird. Durch die Neigung zu Spontanblutungen im Rahmen einer hochgradigen Gingivitis bzw. zur Blutung bei Sondierung bei mittelgradiger Gingivitis muss demnach bei der Probenentnahme vorsichtig vorgegangen werden, um kontaminierte Proben zu vermeiden, da diese ggf. verworfen werden müssen.

In der vorliegenden Studie sind die Tiere der Kontrollgruppe zwar ebenfalls von unterschiedlicher Rasse, allerdings handelt es sich im Gegensatz zur Patientengruppe, mit Tieren von 1–11 Jahren und einem durchschnittlichen Alter von

4,2 Jahren, durchweg um junge Hunde mit einem Alter von 1-2 Jahren. Zwar steigt nachgewiesenermaßen der Schweregrad einer Parodontalerkrankung mit zunehmendem Alter (HAMP et al., 1984; KYLLAR und WITTER, 2005; MARSHALL et al., 2014), jedoch ist es bereits bei jungen Hunden schwierig Gebisse zu finden, welche nur gesunde Zähne enthalten, sodass das Tier damit in die Kontrollgruppe aufgenommen werden kann. Viele junge Patienten zeigen bereits Anzeichen einer Gingivitis an mindestens einem Zahn. Das bestätigen auch KORTEGAARD und Mitarbeiter (2014), die in ihrer Studie bei 20% der ein- bis zwei-jährigen Hunde Attachmentverlust und somit bereits eine Parodontitis nachweisen können. HAMP und Mitarbeiter (1984) finden ebenfalls bei 37% der Hunde unter zwei Jahren Hinweise auf das Vorliegen einer Parodontitis. Bei den in der vorliegenden Studie verwendeten Kontrolltieren handelt es sich vor allem um mittelgroße bis große Hunde ab 15 kg Körpergewicht, wohingegen die Patientengruppe aus Hunden jeglicher Größe besteht. Es ist nachgewiesen, dass bei kleineren Rassen schneller eine parodontale Erkrankung entsteht und diese schwerwiegender ist (HAMP et al., 1984; KYLLAR und WITTER, 2005; KORTEGAARD et al., 2014; MARSHALL et al., 2014). Dies bestätigen auch die Erfahrungen des Untersuchers. Da jedoch bei der Kontrollgruppe nur zahngesunde Hunde eingeschlossen sind, wird auf diese Gruppe zurückgegriffen.

Die Ein- und Ausschlusskriterien für die untersuchten Hunde sind angelehnt an entsprechende humanmedizinische Studien (BEKLEN et al., 2006; MARCACCINI et al., 2009). Durch die Forderung nach einer unauffälligen Blutuntersuchung ist es zum Teil schwierig, Patienten für die Kontrollgruppe zu akquirieren, da viele junge Hunde geringgradige Veränderungen in der Blutuntersuchung, wie z.B. eine geringgradige Leukozytose zeigen.

Ein weiterer Nachteil bei Verwendung von Hunden aus dem Patientengut gegenüber Versuchstieren ist, dass die Durchführung longitudinaler Studien erschwert ist, da die Besitzer ihren Hund in der Regel nicht zweimal in kurzen Abständen einer Narkose aussetzen wollen. Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich daher nicht um eine longitudinale Studie. Es werden nur zu einem Zeitpunkt Proben der gingivalen Sulkusflüssigkeit entnommen. BIRKEDAL-HANSEN (1993) trifft die Aussage, dass eine einzelne Messung der Sulkusflüssigkeit wenig bis keine Aussagekraft hat, da es sich bei der Parodontitis um ein aktives Geschehen handelt mit stark variierenden Ergebnissen in kurzer Zeit. Um das komplexe Geschehen bei einer

Parodontalerkrankung wiederzugeben scheinen Verlaufsstudien sinnvoll zu sein, sind jedoch unter Verwendung von klinischen Patienten nur schwer realisierbar. Viele der humanmedizinischen Studien beschäftigen sich mit der Entwicklung des MMP-Gehalts und der MMP-Aktivität vor und nach einer Parodontalbehandlung (MÄKELÄ et al., 1994; MARCACCINI et al., 2009; MARCACCINI et al., 2010; KINNEY et al., 2011; MESCHIARI et al., 2013; KINNEY et al., 2014; POPAT et al., 2014; GUL et al., 2016). Dies wird aus oben genannten Gründen nicht durchgeführt. Eine Probenentnahme von Sulkusflüssigkeit am wachen Tier ist im Gegensatz zur Humanmedizin nicht möglich.

9.1.1 Auswahl der zu untersuchenden Zähne und Lokalisationen am Zahn

Aus Tierschutzgründen werden zu Gunsten der Narkosedauer nur eine Teilmenge an Zähnen beprobt. Je größer diese Teilmenge ist, desto näher kommen die erworbenen Informationen an die Realität heran, aber je mehr Zähne untersucht werden, desto länger ist auch die Narkosedauer (KORTEGAARD et al., 2014). Obwohl die Zeit für die Probenentnahme pro Zahn nur gering ist, so ist doch eine Beprobung aller Zähne in Narkose unrealistisch. Zur Beprobung werden in der vorliegenden Arbeit deshalb die funktionell wichtigsten Zähne ausgewählt, die Eck- und Reißzähne (ELLENBERGER und BAUM, 1943). Die jeweils zu beprobende Stelle am Zahn wurde danach ausgewählt, welche Stelle erfahrungsgemäß am stärksten von einer Parodontalerkrankung betroffen ist. Betrachtet man verschiedene Studien, so bestehen starke Unterschiede bezüglich der am stärksten von einer Parodontalerkrankung betroffenen Zähne sowie den am stärksten betroffenen Lokalisationen am Zahn (HAMP et al., 1984; HOFFMANN und GAENGLER, 1996; KYLLAR und WITTER, 2005; MARSHALL und Mitarbeiter, 2014).

So wie bei der Untersuchung der parodontalen Taschentiefe an multiplen Stellen um einen Zahn unterschiedliche Werte auftreten können, so kann auch die unterschiedliche Zusammensetzung der gingivalen Sulkusflüssigkeit an den verschiedenen Lokalisationen um einen Zahn nicht ausgeschlossen werden. An Lokalisationen mit hochgradigen Veränderungen ist eine höhere Aktivität der Proteasen oder ein höherer Gehalt dieser denkbar. Andererseits entsteht die Sulkusflüssigkeit durch den Übertritt von Plasma aus den gingivalen Blutgefäßen in den Sulkus (BUDDECKE, 1981; STASZYK, 2011) und ist kontinuierlich im Fluss (BUDDECKE, 1981). Daher ist auch denkbar, dass sie an allen Lokalisationen die gleiche Zusammensetzung hat. Dieser Fragestellung wurde in dieser Studie im

Bereich der Oberkiefer Eckzähne nachgegangen. Hierbei werden sowohl palatinal als auch bukkal Proben der gingivalen Sulkusflüssigkeit entnommen. Es kann mittels statistischer Auswertung kein Unterschied zwischen den beiden Probenentnahmestellen festgestellt werden. Dies bedeutet, dass es zumindest an diesen Zähnen scheinbar keine Rolle spielt, ob die Probe bukkal oder palatinal entnommen wird. Ob dies für alle Zähne in der Mundhöhle des Hundes gilt, muss durch weitere Untersuchungen evaluiert werden.

In den meisten Studien wird das Gebiss nach Schweregrad einer parodontalen Erkrankung eingeteilt (MAESO et al., 2007; RAI et al., 2008; MARCACCINI et al., 2009). In der vorliegenden Studie werden einzelne Zähne nach diesem Kriterium eingeteilt. Dies entspricht den Erkenntnissen von WOLF und Mitarbeitern (2005), dass jeder Zahn einen unterschiedlichen Grad der Parodontalerkrankung aufweisen kann. MARSHALL und Mitarbeiter (2014) beschreiben, dass jede parodontale Läsion in einer eigenen Geschwindigkeit fortschreitet und demnach jeder Zahn eine in sich geschlossene Einheit bildet.

9.1.2 Probengewinnung

Die Verwendung von Papierspitzen PerioPaper Strips® (Firma OraFlow Inc., Smithtown, NY, USA) zur Aufnahme von GCF orientiert sich an der Studie von MARCACCINI und Mitarbeitern (2010). Vorteilhaft gegenüber anderen Studien, bei denen z.B. Gewebeproben mittels Biopsie entnommen werden (KAISER et al., 2014), ist, dass es sich bei der Entnahme gingivaler Sulkusflüssigkeit mittels Papierspitze um ein nicht invasives, schmerzloses Verfahren handelt. Dies wird auch beim Menschen ohne Betäubung oder Schmerzmitteleinsatz durchgeführt (SOELL et al., 2002; HERNÁNDES RÍOS et al., 2009; MARCACCINI et al., 2010). Beim Tier kann auf eine Narkose allerdings nicht verzichtet werden, da der zu beprobende Bereich von Speichel befreit sein muss und die Papierspitze für 30 Sekunden im Sulkus verbleibt (MARCACCINI et al., 2010). Die Papierspitzen können laut Herstellerangaben 0-1,2 µl Flüssigkeit absorbieren (ORAFLOW INC., 2010). Das Filterpapier nimmt augenscheinlich in unserer Arbeit unterschiedliche Mengen an GCF auf. Subjektiv kommt es zu einer höheren Menge von GCF mit steigendem Grad der Parodontalerkrankung. Laut Literatur besteht ein Zusammenhang zwischen der Menge an GCF und dem Schweregrad einer parodontalen Erkrankung (BUDDECKE, 1981; KRYSHALSKYJ et al., 1986; STASZYK, 2011). Daraus ergibt sich die Fragestellung, ob die unterschiedlichen Mengen an aufgenommener

Sulkusflüssigkeit in der vorliegenden Studie auf den unterschiedlichen Schweregraden der Parodontalerkrankung beruhen oder auf Grund einer Kontamination mit Speichel oder Plaque. Für die Beprobung soll die Gingiva trocken und frei von Blut und Speichel sein (MARCACCINI et al., 2010), um eine Kontamination der Papierspitze auszuschließen. Eine Kontamination mit Plaque soll durch eine vorhergehende Kürettage ausgeschlossen werden, eine Kontamination mit Speichel durch Lufttrocknung des Zahns. Plaque und Speichel Kontamination führen in der Folge zu falsch hoch gemessenen Volumina des GCF (GRIFFITHS et al., 1992). Zum Ausschluss einer Kontamination mit Speichel kann eine Messung von Speichel-Amylase durchgeführt werden (GRIFFITHS et al., 1992). Dies erfolgt in dieser Arbeit nicht. Außerdem stellt es sich als schwierig dar, Zähne mit fortgeschrittener Gingivitis zu beproben, da es hier zu Blutungen der Gingiva bei Manipulation kommt.

Eine weitere Frage richtet sich danach, ob auf Grund der unterschiedlichen Menge an GCF, die in die Untersuchung einfließen, eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den einzelnen Zähnen überhaupt vollständig gewährleistet ist. Eine Möglichkeit für zukünftige Studien wäre es, wie in den Studien von SORSA und Mitarbeitern (1994) und MARCACCINI und Mitarbeitern (2010) die Menge an eingesetztem GCF zu vereinheitlichen. Unter Zuhilfenahme eines Periotron® (Firma OraFlow Inc., Smithtown, NY, USA), einem elektronischen Gerät, mit dem unter anderem die Menge an GCF quantifiziert wird, kann diese gemessen werden (GRIFFITHS et al., 1992; MARCACCINI et al., 2010). Bei gesunden Zähnen wird subjektiv weniger GCF von der Papierspitze aufgenommen. Ein sehr flacher Sulkus und damit eine schwer einlegbare Papierspitze oder tatsächlich geringere Mengen an GCF können hier vorliegen. Allerdings werden auch bei gesunden Zähnen mit dieser Methode MMPs nachgewiesen. Es besteht zudem die Gefahr, dass durch die Manipulation beim Einbringen des Filterpapiers mit sanfter Gewalt eine Beeinflussung der Ergebnisse erzeugt wird.

9.1.3 Klinische und radiologische Untersuchung

Alle Zähne eines Hundes werden in der vorliegenden Studie klinisch und radiologisch untersucht. Ihnen wird sowohl klinisch als auch radiologisch ein Grad der Parodontalerkrankung zugeteilt. Unterscheiden sich die beiden Befunde, so orientiert sich der Gesamtbefund des jeweiligen Zahns am schlechteren Ergebnis der beiden Verfahren. Am schlechtesten Einzelzahnbefund aller Zähne eines Hundes wiederum

orientiert sich die Einteilung des Patienten bzw. des Gebisses nach Grad der Parodontalerkrankung.

In dieser Studie wird untersucht, ob es eine Korrelation zwischen klinisch und radiologisch erhobenem Parodontalstatus gibt. Unter Verwendung der vorliegenden Daten besteht eine statistisch signifikante positive Korrelation zwischen dem klinisch und dem radiologisch erhobenen Grad einer Parodontalerkrankung für die Zähne a1, a2, b, d, e1, e2, f und h. Für die Zähne c und g kann kein statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Für den Zahn c besteht eine statistisch nicht signifikante positive Korrelation mit $r_s = 0,1079$, für den Zahn g mit $r_s = 0,1422$. Auf Grund der Nähe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman zu 0 besteht eigentlich kein wirklicher Zusammenhang zwischen Klinik und Röntgen. Eine mögliche Ursache hierfür kann die schwere Zugänglichkeit zu den beiden Zähnen in der kaudalen Mundhöhle für die klinische Untersuchung sein. Die Zunge verdeckt zusätzlich die Zähne von lingual. Es fällt auf, dass bei fehlender Übereinstimmung der klinischen und radiologischen Befunde der beiden Zähne regelmäßig ein um ein oder zwei Grade schlechterer radiologischer als klinischer Befund vorliegt. Die restlichen Zähne werden nicht unter dieser Fragestellung untersucht. Das bedeutet theoretisch, dass aus den Ergebnissen der klinischen Untersuchung bei manchen Zähnen auf die Ergebnisse der radiologischen Untersuchung geschlossen werden kann und umgekehrt. Allerdings wird in dieser Studie keine Blindung durchgeführt, die Doktorandin untersucht den Zahn sowohl klinisch als auch radiologisch und somit kann eine Beeinflussung auf das Ergebnis durch die Doktorandin aus der jeweils anderen Untersuchung nicht ausgeschlossen werden. Entsprechend der Ergebnisse von ARZI und VERSTRAETE (2009) muss davon ausgegangen werden, dass zur Erhebung des Gesamtstatus der kombinierte Befund aus klinischer und radiologischer Untersuchung am sinnvollsten ist.

Viele der erhobenen klinischen Parameter wie Taschentiefe, Furkationsbefall und Zahnlockerung sowie radiologischen Veränderungen können nicht zwischen akut auftretenden und zurückliegenden Veränderungen im Rahmen einer Parodontalerkrankung unterscheiden (KINNEY et al., 2007). Die Parodontitis ist eine dynamische Infektion (GORREL, 2006). Es wechseln sich schubweise passive Phasen und Phasen mit aktiver Gewebeerstörung ab (SOCRANSKY et al., 1984; HOFFMANN und GAENGLER, 1996; GORREL, 2006). In den akuten Phasen kommt es zur Vertiefung der parodontalen Taschen (GORREL, 2006). Liegt

Attachmentverlust ohne eine Gingivitis vor, handelt es sich bei dem Attachmentverlust um eine Folge einer vorhergehenden Parodontitis (HARVEY, 2005). Um eine aktive von einer passiven Parodontitis zu unterscheiden, benötigt man z.B. eine histologische Untersuchung des Gewebes (KAISER et al., 2014; REIMANN et al., 2019) oder den Nachweis aktiver Enzyme (LEE et al., 1995).

Ein Attachmentverlust ist das Hauptmerkmal einer Parodontitis und kann durch Nachweis von Gingivarezession, erhöhter Taschentiefe oder radiologisch durch Knochenabbau dargestellt werden (HARVEY, 2005). Alle Zähne müssen dahingehend an mehreren Lokalisationen untersucht werden.

In der human- und veterinärmedizinischen Literatur werden viele unterschiedliche Möglichkeiten der Zahnuntersuchung verwendet. Die einen Autoren untersuchen die Merkmale Blutung bei Sondierung, parodontale Taschentiefe und Anhaftungsverlust an sechs Stellen eines jeden Zahns (HERNANDEZ RIOS et al., 2009; MARCACCINI et al., 2010), die anderen lediglich an vier Stellen (POPAT et al., 2014) oder geben keine Auskunft über die Art der klinischen Untersuchung und ihre Befunde (SOELL et al., 2002). KYLLAR UND WITTER (2005) sehen eine Taschentiefe von 1-2,5 mm als Hinweis auf eine frühe Parodontitis, wohingegen GORREL (2006) eine Taschentiefe von 1-3 mm als physiologisch ansieht. HOFFMANN und GAENGLER (1996) bewerten bei PudeIn 3-5 mm Taschentiefe als geringgradige Parodontitis. In der vorliegenden Arbeit orientieren sich die Werte an den Angaben von GORREL (2006). Auch die Bildung der Studiengruppen erfolgt unterschiedlich. Während manche Autoren eine Unterteilung in eine Kontroll-, eine Gingivitis- und eine Parodontitisgruppe vornehmen (MAESO et al., 2007; RAI et al., 2008) unterscheiden andere lediglich zwischen einer Kontrollgruppe und einer Gruppe mit chronischer Parodontitis (MARCACCINI et al., 2010; POPAT et al., 2014). Trotz des Wissens um die Wichtigkeit einer radiologischen Untersuchung, verzichten einige Autoren darauf (MÄKELÄ et al., 1994; EJEIL et al., 2003; GUL et al., 2016).

9.2 Labordiagnostische Untersuchungen

9.2.1 Messung der Aktivität von Kollagenasen und Gelatinasen

Die Proben der gingivalen Sulkusflüssigkeit werden zwischen den einzelnen Versuchen mehrfach aufgetaut und wieder eingefroren und über einen längeren Zeitraum bei -80°C gelagert. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieses Vorgehen Einfluss auf die Aktivität der MMPs hat, allerdings treffen SOUZA-TARLA und Mitarbeiter (2005) die Aussage, dass wiederholtes Einfrieren und Auftauen von

Plasma Proben erst ab dem 7. und 9. Zyklus zu einem statistisch signifikanten Absinken der Aktivität von pro-MMP-9 führt. Bei MMP-9 und pro-MMP-2 hat wiederholtes Einfrieren keine Auswirkung. Lagerung der Plasma Proben bei -20°C oder -70°C für einen Monat führt ebenfalls nicht zu einer signifikanten Beeinflussung der MMP-2 und -9 Aktivitäten (SOUZA-TARLA et al., 2005). Es kann vermutet werden, dass es sich mit gingivaler Sulkusflüssigkeit ähnlich verhält.

Die Messungen finden über 18 Stunden statt. Es ist nicht vollständig ausgeschlossen, dass es in dieser Zeit zu einer Aktivierung von latenten Enzymen kommt und die Enzymaktivität als falsch hoch gemessen wird. Allerdings wird das Ausmaß der Aktivierung in der Literatur als geringgradig angegeben (LEE et al., 1995). Es kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass MMPs zum Zeitpunkt der Probenentnahme gar nicht frei im GCF vorkommen, sondern bei der Probenaufbereitung z.B. in der Zentrifuge eine Freisetzung von MMPs aus den Zellen erfolgt (BIRKEDAL HANSEN, 1993). ELEY und Mitarbeiter (1996) meinen hingegen, dass es bei der Untersuchung von Elastase zu niedrigeren Werten auf Grund des Zentrifugierens kommt, weil Zellen dadurch entfernt werden.

9.2.2 Aktivitätsassay

Mittels Aktivitätsassay kann die Aktivität von Proteasen gemessen werden. Die untersuchten Enzyme sind dabei abhängig vom eingesetzten Substrat. Um die Aktivität von Gelatinasen zu messen, muss Gelatine als Substrat eingesetzt werden, um die Aktivität von Kollagenasen zu messen, Kollagen. Eine weitere Differenzierung des Enzyms ist mit dieser Methode, unter alleiniger Verwendung von Gelatine oder Kollagen, nicht möglich. Neben MMPs kann es sich auch um andere Proteasen mit gleichem Substratspektrum, z.B. Serinproteasen handeln. Es kann sich um wirtseigene oder auch um bakterielle Proteasen handeln. In der vorliegenden Studie lassen die kollagenolytischen und gelatinolytischen Eigenschaften der untersuchten Enzyme die Vermutung zu, dass es entsprechend der Studie von KRYSHALSKYJ und Mitarbeitern (1986) Matrix-Metalloproteinasen sind. In einer Studie von MÄKELÄ und Mitarbeitern (1994) wird nachgewiesen, dass es sich bei den gelatinolytischen Enzymen im GCF um MMPs handelt und MMP-9 hierbei die wichtigste Rolle spielt. Zudem zeigen sie auf, dass die gelatinolytische Aktivität in der Mundhöhle hauptsächlich aus dem GCF stammt. Da MMPs die wichtigsten und häufigsten Proteasen bei der Parodontitis sind (UITTO et al., 2003; MARCACCINI et al., 2009) und diese in der vorliegenden Untersuchung im GCF mittels ELISA nachweisbar

sind, kann aus Sicht der Autorin davon ausgegangen werden, dass die gemessene Aktivität im Aktivitätsassay ebenfalls von MMPs stammt. Beweisen lässt sich dies durch den alleinigen Einsatz von Gelatine und Kollagen im Aktivitätsassay jedoch nicht.

Von welchen Proteasen die Aktivität herrührt, kann außerdem mittels entsprechender Inhibitoren wie z.B. Phenanthrolin (PHEN) als MMP-Inhibitor untersucht werden. Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) ist Serinprotease-Inhibitor (MARCACCINI et al., 2009). MMP-Inhibitoren sind Dithiothreitol (DTT), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) oder TIMPs (LEE et al., 1995). Im durchgeführten Aktivitätsassay ist nicht sicher auszuschließen, dass die gemessene Aktivität auch von bakteriellen Proteasen stammen könnte und es zu einer falschen Einschätzung der Aktivität wirtseigener Proteasen kommt (UITTO, 2003). Dies wäre nur sicher zu sagen, wenn die Untersuchungsmethode eine Unterscheidung zwischen bakterieller und wirtseigener Kollagenase treffen kann (OVERALL et al., 1987; LEE et al., 1995). Ob es sich um wirtseigene Proteasen handelt, lässt sich klären indem man die Spaltprodukte der Enzyme betrachtet, da wirtseigene Enzyme Kollagen im Verhältnis $\frac{3}{4}$ zu $\frac{1}{4}$ spalten (LEE et al., 1995).

Mittels Aktivitätsassay lässt sich zudem keine Unterscheidung zwischen dem Vorhandensein aktiver und latenter Enzyme machen.

Die Höhe der gemessenen Aktivität kann Hinweise darauf geben, ob es sich um einen Zahn in einer aktiven Phase einer parodontalen Erkrankung handelt, denn mit steigendem Entzündungsgrad steigt auch die Kollagenaseaktivität (OVERALL et al., 1987).

Bei Untersuchung der Proben der vorliegenden Studie im Aktivitätsassay fällt auf, dass die Aktivität in manchen Proben so hoch ist, dass sie über der Nachweisgrenze des Mikroplattenlesegeräts von ca. 70.000 RLU liegt. Bei diesen Proben wird zum Arbeiten der Grenzwert 70.000 RLU als höchster Wert angegeben. In Wahrheit kann jedoch die Aktivität noch deutlich darüber liegen.

Um die Aktivität darzustellen, haben wir uns in dieser Studie neben der Bestimmung der absoluten Aktivität zu der Bestimmung der relativen Aktivität entschieden. Es bestehen starke Unterschiede zwischen den erhobenen relativen und absoluten Werten der verschiedenen Proben. Proben, die absolut die höchste Aktivität aufweisen, haben nicht zwangsläufig den höchsten relativen Aktivitätszuwachs. Die absolute Aktivität ist abhängig von der untersuchten Menge an GCF. Die

Papierspitzen nehmen jedoch unterschiedlichen Mengen an GCF auf, sodass dies zu berücksichtigen ist. Daher halten wir es für sinnvoll beide Parameter zu untersuchen. Nach Kenntnis der Autorin ist dies bisher nicht in Studien der Aktivitätsmessung von Enzymen bei Parodontitis erfolgt.

9.3 Statistische Untersuchungen zur Enzymaktivität

9.3.1 Untersuchung der Zusammenhänge zwischen dem Schweregrad einer parodontalen Erkrankung und der Enzymaktivität

Die in dieser Studie aufgestellte und zu belegende Hypothese „mit steigendem Schweregrad einer Parodontalerkrankung steigt auch die enzymatische Aktivität“ kann an Hand der vorliegenden Daten bestätigt werden. Die Aussage gilt für alle Zähne unabhängig ihrer Art und betrachtet nur die Zugehörigkeit zum Schweregrad einer parodontalen Erkrankung. Es zeigt sich in den durchgeführten Untersuchungen, dass es sowohl mit Gelatine als auch mit Kollagen als eingesetztem Substrat zu einem Anstieg der enzymatischen Aktivität mit dem Anstieg des Schweregrades der parodontalen Erkrankung kommt. Dies konnte sowohl für die absolute Enzymaktivität als auch für den relativen Anstieg der Enzymaktivität gezeigt werden. Diese Ergebnisse entsprechen denen der Studie von OVERALL und Mitarbeitern (1987), die dies für die Kollagenaseaktivität in Gingivabiopaten ebenfalls postulieren. Es gibt nach Wissen der Autorin keine Studien, die einzelne Zähne untersuchen und eine Unterscheidung dieser zwischen Gingivitis und gering, mittel- oder hochgradig an einer Parodontitis erkrankt vornehmen. Die meisten Studien befassen sich lediglich mit dem Vergleich zwischen Parodontitis- und Kontrollgruppe (MARCACCINI et al., 2010; POPAT et al., 2014), eventuell noch zusätzlich mit der Gingivitisgruppe (MAESO et al., 2007; RAI et al., 2008).

9.3.2 Statistische Auswertung bezüglich der Zusammenhänge zwischen Patientengruppe und Kontrollgruppe

9.3.2.1 Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität aller Zähne der Patientengruppe und der Kontrollgruppe nach Zahn

Betrachtet man die Zähne unter der Fragestellung, ob bei Patienten höhere Enzymaktivitäten vorliegen, als bei Kontrolltieren, als Einzelnes und nach ihrer Art bzw. Position getrennt, so bestehen starke Unterschiede zwischen den einzelnen „Zahnarten“. Diese Unterschiede bestehen je nachdem, ob man die relative oder

absolute Enzymaktivität betrachtet oder ob man als Substrat Gelatine oder Kollagen einsetzt. Ein Einfluss der Position des Zahns im Maul auf die Enzymaktivität ist nicht auszuschließen. Nach Wissen der Autorin gibt es hierzu bislang keine Studien. Es gibt zwar zahlreiche Studien an Hunden, die untersuchen, welche Bereiche im Gebiss am stärksten von Parodontitis betroffen sind, allerdings gibt es hier auch starke Unterschiede zwischen den einzelnen Studien (HAMP et al., 1984; HOFFMANN und GAENGLER, 1996; MARSHALL et al., 2014). Keine der genannten Studien beschäftigt sich zudem mit der Enzymaktivität. Auch in der Humanmedizin sind der Autorin keine entsprechenden Studien bekannt.

9.3.2.2 Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität aller Zähne der Patientengruppe und der Enzymaktivität aller Zähne der Kontrollgruppe

Ebenfalls untersucht wird die Fragestellung, ob bei Patienten höhere Enzymaktivitäten vorliegen, als bei Kontrolltieren. Hierbei zeigt sich bei Betrachtung aller Zähne, dass der relative Anstieg der Enzymaktivität, sowohl im Gelatine-, als auch im Kollagenassay, bei den Zähnen der Patientengruppe signifikant höher ist als bei den Zähnen der Kontrollgruppe. Für die absolute Enzymaktivität lässt sich in unseren Untersuchungen keine derartige Aussage treffen.

In der vorgelegten Studie wird der einzelne Zahn individuell betrachtet und damit den Erkenntnissen von SOCRANSKY und Mitarbeitern (1984) Rechnung getragen, dass bei jedem Zahn die parodontale Erkrankung unterschiedlich fortschreitet. Bei den statistischen Auswertungen zur Enzymaktivität auf Zahnebene, wie z.B. bei den Untersuchungen zu den Zusammenhängen zwischen der Enzymaktivität aller Zähne nach Zahn getrennt, werden die zehn untersuchten bzw. beprobten Zähne eines Patienten unabhängig von der Zugehörigkeit zum Probanden betrachtet. Dies geschieht auch bei der Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität aller Zähne der Patientengruppe und der Enzymaktivität aller Zähne der Kontrollgruppe. Statistisch gesehen spricht man bei diesem Vorgehen von Pseudoreplikation, da die Abhängigkeit des einzelnen Zahns von anderen Zähnen im Gebiss bzw. vom Hund, dem sie entstammen nicht beachtet wird. Allerdings kann ein Einfluss des Probanden auf den einzelnen Zahn und damit auf die Messungen nicht ausgeschlossen werden. Dies ist bei der Betrachtung der Ergebnisse zu beachten und die beiden genannten Untersuchungen sind als explorativ anzusehen.

9.3.2.3 Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität der Patientengruppe und der Kontrollgruppe

Bei Betrachtung der Zähne auf Probandenebene zeigt sich, dass die relative Gelatinaseaktivität bei Hunden der Patientengruppe gegenüber Hunden der Kontrollgruppe statistisch signifikant erhöht ist. MÄKELÄ und Mitarbeiter (1994) weisen ebenfalls eine höhere relative Enzymaktivität von Gelatinasen bei Patienten mit Parodontitis gegenüber gesunden Patienten nach. In einer Studie von SOELL und Mitarbeitern (2002) zeigt sich ein Anstieg der enzymatischen Aktivität bei Patienten mit Parodontitis gegenüber gesunden Kontrollen von MMP-1, -2, -3 und -9. Diese können als MMP-9 (92-kDa Gelatinase) und MMP-2 (200-kDa Gelatinase) identifiziert werden. Auch bei POZO und Mitarbeitern (2005) und BILDT und Mitarbeitern (2008) ist die Aktivität bei Patienten mit Parodontitis gegenüber der Kontrollgruppe im GCF erhöht.

9.3.2.4 Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität aller Hunde der Patientengruppe mit mindestens einem Zahn mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung und der Enzymaktivität aller Hunde der Kontrollgruppe

Vergleicht man die Zähne mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung der Patienten mit den Zähnen der Kontrolltiere zeigt sich, dass bei den Patienten ein statistisch signifikant erhöhter relativer Anstieg der Enzymaktivität im Gelatineassay vorliegt. Dies steht im Gegensatz zu den Kontrolltieren. Folglich kann die Aussage getroffen werden, dass gesunde Zähne aus einer erkrankten Mundhöhle statistisch signifikant höhere relative Gelatinaseaktivität aufweisen, als gesunde Zähne aus gesunden Mundhöhlen. Mit „gesund“ werden damit die Zähne ohne Anzeichen einer Parodontalerkrankung bezeichnet. „Erkrankt“ sind die Zähne mit einer Parodontalerkrankung. Das gleiche gilt in Bezug auf die Mundhöhle. Betrachtet man hingegen jedoch die absolute Enzymaktivität im Gelatineassay von Kontrolltieren ist diese in unserer Studie gegenüber derer der Patienten statistisch signifikant erhöht. Eine Studie, die eine vergleichbare Fragestellung untersucht, liegt nach Information der Autorin nicht vor. Die gleichen Untersuchungen im Kollagenassay bringen hier keine statistisch relevanten Zusammenhänge hervor.

Aus den Untersuchungsergebnissen ergeben sich mehrere Diskussionspunkte. Zum einen wäre es denkbar, dass es bei gesunden Zähnen aus erkrankten Mundhöhlen zu höheren Aktivitäten kommt, als bei den Zähnen aus gesunden Mundhöhlen, da

mit einem Einfluss des Probanden gerechnet werden muss. Dieser Einfluss kann entweder lokal oder systemisch sein. Ein lokaler Einfluss könnte zum Beispiel durch Kontamination des GCF eines gesunden Zahns mit Speichel auftreten wie in der Studie von GRIFFITHS und Mitarbeitern (1992) beschrieben. Dem gegenüber stehen jedoch Studien, die zeigen, dass der Sulkus ein gegenüber der Mundhöhle abgeschlossener Raum ist (STASZYK, 2011). Die gingivale Sulkusflüssigkeit entsteht durch den Übertritt von Plasma aus den Blutgefäßen der Gingiva in den Sulkus (STASZYK, 2011). Damit ist anzunehmen, dass der GCF nicht unabhängig vom Individuum gesehen werden kann. Liegt bei einem Probanden eine systemische Entzündung vor, so wird diese vermutlich eine Beeinträchtigung des GCF vornehmen. Nach BRILL und BJÖRN (1959) lassen sich nach oraler Gabe von Fluoreszeinkapseln Spuren von Fluoreszein im gingivalen Sulkus nachweisen. Das gilt vor allem bei entzündetem Zahnfleisch. Bei systemischer Injektion von Fluoreszein in das Gefäßsystem, lassen sich ebenfalls Spuren von Fluoreszein im gingivalen Sulkus nachweisen (BRILL und KRASSE, 1958). Diese Studien zeigen demnach, dass eine systemische Beeinflussung zu einer Veränderung der Zusammensetzung des GCF führt. Zum anderen wäre es aber auch möglich, dass die gesunden Zähne von Patienten und Kontrollen in etwa die gleichen Aktivitäten aufweisen, gerade weil sie alle gesund sind und nur die physiologische Enzymaktivität im Rahmen des physiologischen Gewebeumbaus vorliegt. Denkbar ist aber auch, dass das Alter der Probanden einen Einfluss auf die enzymatische Aktivität hat und daher bei der Kontrollgruppe höhere Werte zu Stande kommen. Es handelt sich hierbei ausschließlich um junge Tiere mit einem Alter von bis zu zwei Jahren. Diese Erklärung macht allerdings nur Sinn, wenn man davon ausgeht, dass bei jungen Hunden höhere Enzymaktivitäten vorliegen, da sie eine höhere Umsatzrate des Gewebes haben. Es gibt allerdings nur wenige Studien, die sich mit dem Einfluss des Alters auf die Enzymaktivität im gingivalen Sulkus befassen. In der vorliegenden Studie werden der Einfluss von Alter und von Körpermasse auf die enzymatische Aktivität geprüft und es kann kein Zusammenhang festgestellt werden. In der Studie von BORDEN und Mitarbeitern (1977) hat das Alter zumindest keinen Einfluss auf die Entzündung der Gingiva und die Menge an GCF.

9.3.3 Statistische Auswertung bezüglich der Einteilung der Zähne in Grade der Parodontalerkrankung und der messbaren Enzymaktivität

Eine Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Zahnlokalisierung wird in der durchgeführten Untersuchung geprüft. Es wird die Fragestellung untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Parodontalerkrankung und somit der Enzymaktivität und der „Zahnart“ (Nummerierung a-h) beobachtet werden kann. Die Einteilung nach Grad der Parodontalerkrankung wird auf verschiedene Arten vorgenommen (klinisch, radiologisch, orientierend am Gesamtbefund aus klinischer und radiologischer Untersuchung und nach Hund). Für den Praktiker ist sicherlich die Betrachtung des Einzelzahns unter Orientierung am Gesamtbefund aus klinischer und radiologischer Untersuchung am sinnvollsten (ARZI und VERSTRAETE, 2009), da er nach diesen Befunden seine Therapieoptionen wählt und durchführt. Betrachtet man also den Zusammenhang zwischen der gemessenen relativen Enzymaktivität und der Einteilung der Zähne orientierend am Gesamtbefund aus klinischer und radiologischer Untersuchung, so zeigen sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge. Das bedeutet, dass mit den vorliegenden Daten bei keiner der untersuchten Zahnlokalisationen ein Anstieg der relativen Enzymaktivität mit steigendem Grad der Parodontalerkrankung nachgewiesen werden kann. Betrachtet man hingegen den Zusammenhang zwischen der gemessenen absoluten Gelatinaseaktivität und der Einteilung der Zähne orientierend am Gesamtbefund aus klinischer und radiologischer Untersuchung, so zeigen sich statistisch signifikante Zusammenhänge für die Zähne d, e1 und e2. Bei Einsatz von Kollagen als Substrat zeigen sich bei gleicher Fragestellung statistisch signifikante Zusammenhänge für die Zähne d und e1. Für diese Zahnlokalisationen (Eckzähne im linken Oberkiefer und rechten Unterkiefer) lässt sich folglich mit ansteigendem Grad der Parodontalerkrankung ein Anstieg der absoluten enzymatischen Aktivität nachweisen. Diese Aussage ist nicht damit gleichzusetzen, dass es bei diesen Zähnen am häufigsten zu einer Parodontitis kommt.

Insgesamt bestehen bei den Untersuchungsergebnissen starke Unterschiede zwischen den einzelnen Zahnlokalisationen je nachdem, ob man die relative oder absolute Enzymaktivität betrachtet oder ob man als Substrat Gelatine oder Kollagen einsetzt. Außerdem beeinflusst die Methode (klinische oder radiologische Untersuchung, Einteilung orientierend am Gesamtbefund aus klinischer und radiologischer Untersuchung oder Einteilung nach Hund) mit der dem Zahn ein

Parodontalstatus zugeordnet wird, die Ergebnisse. Teilweise wird bei einer „Zahnart“ bzw. -lokalisierung einer der Schweregrade der Parodontalerkrankung nur durch einen einzelnen Zahn repräsentiert z.B. bei Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem klinischen Grad der Parodontalerkrankung nach Zahn und der maximalen absoluten Aktivität im Gelatine- und Kollagenassay. Hier werden der klinische Grad 3 der Parodontalerkrankung bei den Zähnen a, d, e1 und e2 jeweils nur durch einen einzigen Zahn vertreten. Durch die niedrige Fallzahl fallen Ausreißer entsprechend schwer ins Gewicht. Betrachtet man alle Untersuchungsergebnisse, so bestehen insgesamt einige statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen Enzymaktivität und Schweregrad der Parodontalerkrankung nach Zahn. Hierbei sind vor allem die Zähne d, e1 und e2 vertreten.

An Hand der vorliegenden Daten, kann also die Aussage getroffen werden, dass es bei den Eckzähnen im linken Oberkiefer und rechten Unterkiefer mit steigendem Grad der Parodontalerkrankung entsprechend zu einem Anstieg der absoluten Enzymaktivität kommt. Diese Aussage ist nicht damit gleichzusetzen, dass diese Zähne am häufigsten zu einer Parodontitis neigen, auch wenn es Studien gibt, die dies untersuchen und belegen (HOFFMANN und GAENGLER, 1996). In der Studie von HOFFMANN und GAENGLER (1996) wird allerdings keine Unterscheidung zwischen den vier verschiedenen Canini durchgeführt. Zudem liegen Studien vor, die keinen Unterschied zwischen der Frequenz des Auftretens einer Parodontitis in der rechten und linken Kieferhälfte aufzeigen, aber wohl zwischen Ober- und Unterkiefer (LINDHE et al., 1975; KYLLAR und WITTER, 2005). In diesen Studien geht es aber nicht um die Untersuchung der Enzymaktivität. Nach Wissen der Autorin gibt es keine andere als die hier vorgelegte Arbeit, die die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Zahnlokalisierung prüft. Allerdings untersuchen verschiedene Autoren den Zusammenhang der Zahnart und der Anfälligkeit für eine Parodontitis (HAMP et al., 1984; HOFFMANN und GAENGLER, 1996; MARSHALL et al., 2014). Ob die Unterschiede tatsächlich auf Grund der Lokalisation des Zahns in der Mundhöhle vorkommen oder auf Grund seiner Form ist in den genannten Studien ebenfalls nicht untersucht.

Bei den eigenen Untersuchungen fällt auf, dass zwischen dem klinischen Grad der Parodontalerkrankung nach Zahn und der maximalen relativen Aktivität im Gelatineassay ein statistisch signifikanter negativer Zusammenhang für Zahn c besteht. Dieses Ergebnis muss kritisch betrachtet werden. Es liegt nur ein Zahn c mit

Grad 3 einer Parodontalerkrankung vor und die Aktivität liegt hier nur bei 1,04 RLU. Außerdem liegen viele Zähne mit Grad 0 oder 1 einer Parodontalerkrankung vor. Zudem sind viele der Zähne, welche klinisch als Grad 0 einer Parodontalerkrankung eingestuft werden, im Röntgen mit Grad 1 oder 2 einer Parodontalerkrankung eingestuft, es bestehen also für diese Zähne große Diskrepanzen zwischen der klinischen und radiologischen Einteilung nach Grad einer Parodontalerkrankung. Nur bei 36 von 56 Zähnen entsprechen sich die klinische und radiologische Einteilung. Dies unterstützt die Aussage, dass zwischen dem klinischen und radiologischen Grad einer Parodontalerkrankung für Zahn c eine statistisch nicht signifikante positive Korrelation mit $r_s = 0,1079$ besteht. Auf Grund der Nähe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman zu 0 besteht eigentlich kein wirklicher Zusammenhang zwischen Klinik und Röntgen für Zahn c. Für den Zahn c kann ansonsten kein Zusammenhang zwischen Parodontalstatus und Enzymaktivität nachgewiesen werden.

9.3.4 Statistische Auswertung bezüglich der Übereinstimmung der Enzymaktivität an zwei Probenentnahmestellen

In dieser Studie zeigt sich, dass es an den Zähnen a und e, an denen jeweils bukkal und palatinal bzw. lingual die Probenentnahme erfolgt, keine Unterschiede in der Enzymaktivität festgestellt werden können. Aus diesen Untersuchungsergebnissen lässt sich schließen, dass es unerheblich ist, an welcher der beiden Lokalisationen eine Probe der gingivalen Sulkusflüssigkeit entnommen wird. Dies gilt zumindest für die in dieser Studie untersuchten Zähne. Da die Sulkusflüssigkeit ständig im Fluss ist und eine Passage von Plasma aus den gingivalen Blutgefäßen darstellt (BUDDECKE, 1981; STASZYK, 2011), ist dieses Ergebnis nachvollziehbar, da somit an jeder Lokalisation innerhalb eines Sulkus mit der gleichen Enzymaktivität gerechnet werden kann. Allerdings ist auch denkbar, da jeder Zahn an verschiedenen Lokalisationen verschieden stark von einer parodontalen Erkrankung betroffen sein kann, dass es lokal zu unterschiedlichen Werten kommt. So dass in Bereichen mit schwerwiegender Parodontalerkrankung auch mehr Entzündungszellen und somit mehr aktive Enzyme lokalisiert sind. Eine unterschiedliche Menge an GCF an unterschiedlichen Lokalisationen eines Zahns ist zumindest nachgewiesen (ATTAR et al., 2018).

9.4 Nachweis von MMPs

Die Auswahl der untersuchten MMPs bei Vorliegen einer Parodontalerkrankung orientiert sich an den Untersuchungen aus dem Bereich der Humanmedizin (MÄKELÄ et al., 1994; KUBOTA et al., 1996; TERVAHARTIALA et al., 2000; SOELL et al., 2002; EJEIL et al., 2003; BEKLEN et al., 2006; KUBOTA et al., 2008; RAI et al., 2008) und der Tiermedizin (KAISER et al., 2014; REIMANN et al., 2019). MMPs sind die wichtigsten Enzyme, die bei einer Parodontitis aktiv werden (UITTO et al., 2003). Zusätzlich sind andere Enzyme am Abbau parodontaler Strukturen beteiligt wie z.B. Cathepsin G und Elastase (UITTO et al., 2003). Der Kollagenabbau erfolgt außerdem über Phagozytose (BIRKEDAL-HANSEN, 1993). In einer Studie von GUL und Mitarbeitern (2016) wird die Aussage getroffen, dass es auf Grund der Komplexität der Vorgänge bei einer Parodontitis nicht möglich ist, diese mit nur einem einzelnen Biomarker ausreichend widerzuspiegeln. Die Arbeitsgruppe schlägt vor, eine Kombination an Enzymen einzusetzen, nämlich MMP-8, Elastase und Sialidase.

Üblicherweise, wie auch in der vorliegenden Arbeit, wird die Gesamtmenge an MMPs gemessen, welche sich als Summe aus aktiven und latenten Enzymen ergibt. Interessant wäre aber auch die Unterscheidung latenter und aktiver Enzyme wie bei den Studien von KRYSHALSKYJ und Mitarbeitern (1986) sowie OVERALL und Mitarbeitern (1987) und LEE und Mitarbeitern (1995). In diesen Studien wird nachgewiesen, dass in schwach entzündeter Gingiva mehr latente als aktive Enzyme vorkommen und dass die aktive Parodontitis mit dem Vorhandensein aktiver Enzyme vergesellschaftet ist. Die Unterscheidung aktiver und latenter Enzyme kann durch die Verwendung eines MMP-Aktivators wie z.B. 4-Aminophenylquecksilberacetat (APMA) oder N-Ethylmaleinimid (NEM) erfolgen (LEE et al., 1995). Eine Aktivierung latenter Kollagenasen kann ebenfalls durch 4-Chlormercuribenzoessäure (PCMB) hervorgerufen werden. Diese aktiviert MMP-8 (OVERALL et al., 1987). In einer Studie von SOELL und Mitarbeitern (2002) ergibt die Prozentzahl an aktiven MMPs keine signifikanten Unterschiede zwischen der Parodontitisgruppe und der Kontrollgruppe, aber es zeigt sich eine erhöhte Gesamtaktivität der MMPs in der Parodontitisgruppe. Die Unterscheidung zwischen aktiven und latenten Proteasen wird in humanmedizinischen Studien mittels Zymografie durchgeführt (KOROSTOFF et al., 2000) und die Proteasen in einem weiteren Schritt mittels Western Blot als

MMPs identifiziert oder mittels Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) (UITTO et al., 1990).

MMPs können mittels einer Vielzahl unterschiedlicher Verfahren nachgewiesen werden z.B. mittels Immunfluorometrie (LEPPILAHTI et al., 2014), Western Blot (KOROSTOFF et al., 2000; POZO et al., 2005; BILDT et al., 2008), Zymografie (POZO et al., 2005; BILDT et al., 2008) und ELISA (MARCACCINI et al., 2010; MESCHIARI et al., 2013; KINNEY et al., 2014; POPAT et al., 2014). In der vorliegenden Studie werden die MMPs mittels ELISA nachgewiesen.

9.4.1 ELISA

Mittels ELISA ist der Nachweis und die Quantifizierung des gesuchten MMP möglich, allerdings kann keine Aussage über deren Aktivität gemacht werden und es kann keine Unterscheidung zwischen aktiven und latenten Enzymen getroffen werden. Es wird letztendlich der Gesamt-MMP-Gehalt gemessen. Es können in der vorliegenden Arbeit MMP-2, -3, -8 und -9 in gingivaler Sulkusflüssigkeit beim Hund mittels ELISA nachgewiesen und quantifiziert werden. Die MMPs können bei Patienten mit Gingivitis und bei Patienten mit unterschiedlichen Schweregraden einer Parodontitis sowie bei der gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Es können in dieser Arbeit nicht alle Proben mittels ELISA untersucht werden, da nach Durchführung der Aktivitätsbestimmung vereinzelt nicht mehr genug Probenmaterial vorliegt. Daher werden repräsentativ Proben für die Untersuchung mittels ELISA von der Kontrollgruppe und allen vier Gruppen der Patienten mit Parodontalerkrankung ausgewählt. Hierbei wird darauf geachtet Proben zu nehmen, welche im Aktivitätsassay keine, eine geringe, eine mittlere und eine hohe Aktivität zeigen. In zukünftigen Studien könnten alle Proben mittels ELISA untersucht werden, wenn sich die Untersuchung auf zwei MMPs beschränken würde.

9.4.1.1 Deskriptive Auswertung der ELISA-Untersuchungen

Auf Grund der geringen Anzahl der untersuchten Proben kann keine statistische Auswertung der Ergebnisse aus den ELISA-Untersuchungen erfolgen. Um die Untersuchungen dennoch zu beurteilen, erfolgt stattdessen eine grafische Darstellung der Ergebnisse und deskriptive Auswertung. Die Bewertung der Untersuchungsergebnisse muss unter Vorbehalt betrachtet werden, da auf Grund der niedrigen Fallzahlen einzelne sehr hohe oder sehr niedrige Werte stark ins Gewicht fallen. Es müssen Untersuchungen mit höheren Fallzahlen folgen, um eine statistische Auswertung durchführen zu können.

Die Vermutung, dass es mit steigendem Grad der Parodontalerkrankung zu einem stufenweisen Anstieg im MMP-Gehalt kommt, kann mit den vorliegenden Daten für keines der untersuchten MMPs bestätigt werden. Dies steht im Widerspruch zu der Studie von KAISER und Mitarbeitern (2014), die abhängig vom Schweregrad der Parodontitis einen Anstieg im Gehalt an MMP-2, -8 und -9 feststellen. Auch RAI und Mitarbeiter (2008) erkennen eine gesteigerte Expression an MMP-8 und -9 bei Patienten mit Parodontitis gegenüber Patienten mit Gingivitis sowie bei Patienten mit Gingivitis gegenüber einer Kontrollgruppe. Allerdings muss man festhalten, dass auf Grund der niedrigen Fallzahlen der Grad der Parodontalerkrankung mit dem zugehörigen MMP-Gehalt teilweise nur durch einen einzigen Zahn repräsentiert ist. Hierbei können natürlich Ausreißer vorkommen und es gibt keine Möglichkeit dies zu überprüfen. Außerdem werden bei MMP-8 keine Zähne mit Grad 0 und bei MMP-3 keine Zähne mit Grad 3 einer Parodontalerkrankung untersucht. Es sind insgesamt zu wenig Fallzahlen vorhanden. Ein Trend lässt sich nicht erkennen. Zudem muss man festhalten, dass in dieser Studie fünf Gruppen gegeneinander verglichen werden (Kontrollgruppe, Gingivitisgruppe, gering-, mittel- und hochgradige Parodontitisgruppe). Die meisten anderen Studien unterscheiden maximal drei Gruppen, wobei es sich dann um Parodontitis-, Gingivitis- und Kontrollgruppe handelt (MAESO et al., 2007; RAI et al., 2008).

Vergleicht man den Gehalt an MMP-8 sowohl bei Zähnen mit Grad 1 als auch bei Zähnen mit Grad 2 einer Parodontalerkrankung mit den anderen untersuchten MMPs, so erkennt man, dass der MMP-8-Gehalt in beiden Gruppen am höchsten ist. Bei Zähnen mit Grad 1 einer Parodontalerkrankung ist als nächstes MMP-3 repräsentiert und bei Zähnen mit Grad 2 einer Parodontalerkrankung MMP-9. Das lässt darauf schließen, dass MMP-8 bei einer Parodontitis im GCF die wichtigste Rolle spielt. Diese Aussage treffen auch SORSA und Mitarbeiter (2011) für MMP-8 im GCF und RAI und Mitarbeiter (2008) im Speichel. Im Gegensatz dazu stellen MARCACCINI und Mitarbeiter (2010) bei Patienten mit Parodontitis einen höheren Gehalt an MMP-9 gegenüber MMP-8 dar. Der durchschnittliche Gehalt von 2,1 ng/ml Probe an MMP-8 in den vorliegenden Untersuchungen ähnelt dem Wert von 3 ng/ml Probe in der Studie von MESCHIARI und Mitarbeitern (2013) im Speichel.

Die Aussage, dass es bei an einer Parodontalerkrankung mit Grad 1-4 erkrankten Zähnen zu insgesamt höheren MMP-Gehalten kommt, als bei gesunden Zähnen mit Grad 0, trifft unter Betrachtung der vorliegenden Daten für MMP-2 und -3 zu. Hier ist

zwischen Zähnen mit Grad 1-4 einer Parodontalerkrankung gegenüber Zähnen mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung ein Anstieg im MMP-Gehalt ersichtlich. Dabei handelt es sich bei Zähnen mit Grad 0 um Zähne von Hunden aus der Kontrollgruppe und der Patientengruppe. Für MMP-9 zeigt sich zwischen den Gehalten bei gesunden und erkrankten Zähnen in der vorliegenden Untersuchung der MMP-Gehalt bei den gesunden Zähnen minimal höher als bei den erkrankten Zähnen. Für MMP-8 lässt sich auf Grund des Fehlens von untersuchten Zähnen mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung keine Aussage zu der Fragestellung treffen. Es fehlt die Untersuchung von Zähnen der Kontrollgruppe auf ihren MMP-8-Gehalt.

Vergleicht man den MMP-Gehalt in ng/ml bei Patientenzähnen im Vergleich zu Kontrollzähnen wird ersichtlich, dass hier ähnliche Aussagen wie bei der vorherigen Fragestellung gemacht werden können, da sich die Fallzahlen nur geringgradig voneinander unterscheiden. Für MMP-2 und -3 trifft die Aussage „Patienten haben höhere MMP-Gehalte als Kontrollzähne“ zu. Diese Aussage treffen für MMP-2 auch MÄKELÄ und Mitarbeiter (1994) sowie BILDT und Mitarbeiter (2008) und für MMP-3 BEKLEN und Mitarbeiter (2006). Zum gleichen Schluss kommen auch SOELL und Mitarbeiter (2002). Diese können einen signifikanten Anstieg von MMP-2 und -3 mit einer signifikant erhöhten Aktivität bei Patienten mit Parodontitis gegenüber der Kontrollgruppe nachweisen. Dem entgegen stehen die Untersuchungsergebnisse von MAESO und Mitarbeitern (2007) und RAI und Mitarbeitern (2008), die in ihren Studien einen erniedrigten MMP-2-Gehalt bei Patienten gegenüber Kontrollen feststellen.

Für MMP-9 trifft die Aussage nicht zu, bzw. es lässt sich an Hand des Untersuchungsmaterials keine Bestätigung der Aussage formulieren. Die gezeigten Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollzähnen sind in der Abbildung minimal und der MMP-Gehalt ist bei den Kontrollzähnen sogar höher als bei den Patientenzähnen. Diese Aussage steht im Gegensatz zur Aussage von RAI und Mitarbeiter (2008), die in ihren Untersuchungen an GCF einen erhöhten Gehalt an MMP-9 bei Patienten gegenüber Kontrollen aufzeigen. Ursächlich für das vorliegende Messergebnis könnte eine Fehlmessung des Zahns K3a1 sein. Auffällig ist, dass bei diesem Zahn ein ca. 4-fach höherer MMP-9-Gehalt von 0,478 ng/ml nachgewiesen werden kann verglichen mit dem Mittelwert der übrigen Kontrollzähne 0,105 ng/ml. Zudem beträgt im Vergleich dazu der MMP-Gehalt von Zahn K3a2, also der bukkalen Lokalisation am rechten Oberkieferreckzahn des Probanden K3,

lediglich 0,114 ng/ml und liegt damit ungefähr auf Höhe des Mittelwerts der anderen Kontrollzähne. Der vergleichsweise hohe MMP-Gehalt von Zahn K3a1 passt auch nicht zu den Befunden der klinischen und radiologischen Untersuchung, welche ihn als gesunden Zahn einstufen. Diese vermutliche Fehlmessung des Zahns K3a1 führt auf Grund der niedrigen Fallzahlen bei dieser Untersuchung zu einer starken Auslenkung des Mittelwerts für den MMP-9-Gehalt der Kontrollzähne. Dieser liegt mit Betrachtung von Zahn K3a1 bei 0,107 ng/ml und ohne bei 0,053 ng/ml. Wird der Zahn K3a1 bei der Untersuchung nicht beachtet trifft die Aussage „Patienten haben höhere MMP-Gehalte als Kontrollzähne“ auch für MMP-9 zu.

Dass bei den Kontrolltieren überhaupt MMPs gemessen werden können, liegt daran, dass MMPs zum physiologischen Gewebeumsatz notwendig sind (UITTO et al., 2003; BEKLEN et al., 2006).

9.5 Einordnung der eigenen Untersuchungsergebnisse im Vergleich mit anderen Studien zur Parodontitis des Hundes

Im Vergleich zur Studie von KRYSHALSKYJ und Mitarbeitern (1986) werden in der vorliegenden Studie Patienten mit natürlich erzeugter Parodontitis verwendet. Dies hat den Vorteil, dass es sich um reale Verhältnisse handelt. Außerdem wird die Sulkusflüssigkeit intra vitam entnommen und die Patienten werden im Laufe der Studie nicht getötet. KRYSHALSKYJ und Mitarbeiter (1986) verwenden nur zwei Hunde, dabei handelt es sich um Beagle. Es gibt folglich große Unterschiede im Aufbau der beiden Studien, allerdings zeigen beide Studien, dass es in Bereichen mit Parodontitis zu einem erhöhten Gehalt Kollagenspaltender Enzyme kommt im Vergleich zum Kontrollbereich.

Auch KIM und Mitarbeiter (2013) weisen in ihrer Studie MMP-2 und -9 bei Vorliegen einer Parodontitis beim Hund nach, allerdings mittels Zymografie in der Gingiva. Ansonsten handelt es sich allerdings um einen anderen Ansatz der Studie. Es wird der Einsatz von subantimikrobiellen Dosen von Doxycyclin auf den MMP-Gehalt untersucht und somit nach einer zusätzlichen Behandlungsstrategie von Parodontitiden. In der vorliegenden Arbeit werden keine Untersuchungen zur Therapie parodontaler Erkrankungen durchgeführt

PAULA-SILVA und Mitarbeiter (2010) weisen neben MMP-2,-8 und -9, wie in der vorliegenden Studie, außerdem MMP-1 nach. Sie tun dies in Proben von periapikalem Gewebe an getöteten Hunden. Im Gegensatz zu der vorliegenden Studie, welche sich mit der chronischen Parodontitis befasst, handelt es sich in der

Studie von PAULA-SILVA und Mitarbeitern (2010) um eine experimentell erzeugte apikale Parodontitis. Die apikale Parodontitis unterscheidet sich in ihrer Genese von der chronischen Parodontitis. Sie entwickelt sich im Rahmen einer endodontalen Entzündung aus einer Pulpitis mit einhergehender Nekrose. In der Studie von PAULA-SILVA und Mitarbeitern (2010) wird die apikale Parodontitis durch iatrogene Eröffnung der Pulpa erzeugt. Nach 45 Tagen erfolgt ein radiologischer Nachweis einer apikalen Parodontitis.

Wie in der vorliegenden Studie können SCHWARZ und Mitarbeiter (2007) in ihrer Arbeit ebenfalls MMP-8 nachweisen. Dies erfolgt jedoch im Entzündungszellinfiltrat bei Zähnen mit natürlich erworbener Parodontitis bei fünf Beaglen. Bei dieser Untersuchung geht es vor allem um die parodontale Wundheilung nach Parodontalbehandlung mittels Er:YAG-Laser. Es werden Beagle post mortem verwendet. Im Gegensatz zu der vorliegenden Studie geht es in der Studie von SCHWARZ und Mitarbeitern (2007) um die Überprüfung eines Therapieerfolges nach Laserbehandlung und nicht um den rein methodischen MMP-Nachweis.

Auch KAISER und Mitarbeiter (2014) untersuchen die Expression von MMP-2, -3, -8 und -9 in ihrer Studie und stellen fest, dass bei Parodontitis die Expression der untersuchten MMPs erhöht ist. Dies erfolgt mittels Immunhistologie in der Gingiva des Hundes. Zwar unterscheidet sich diese Arbeit von der der Autorin in dem verwendeten Probenmaterial und der Untersuchungsmethode. Allerdings bestehen ansonsten viele Parallelen (Ein- und Ausschlusskriterien, Narkoseregime, Befundungsschema). KAISER und Mitarbeiter (2014) stellen einen Anstieg im Gehalt an MMP-2, -8 und -9 abhängig vom Schweregrad der Parodontalerkrankung fest. Ein erhöhter Gehalt an MMP-2 und -3 bei Vorliegen einer Parodontitis ist in der Studie der Autorin ebenfalls ersichtlich, aber auf Grund der niedrigen Fallzahlen für die ELISA-Untersuchungen kann unter Beachtung der vorliegenden Daten kein schrittweiser Anstieg im MMP-Gehalt mit steigendem Grad der Parodontalerkrankung nachgewiesen werden.

9.6 Fazit

Durch die niedrigen Fallzahlen bei Untersuchung der Proben mittels ELISA können keine statistischen Auswertungen vorgenommen werden. Es sind weitere Studien mit größeren Fallzahlen erforderlich, um die hier getroffenen Aussagen zu stützen. In der vorliegenden Arbeit handelt es sich lediglich um eine deskriptive Beurteilung der Ergebnisse.

Für zukünftige Studien könnten die Aktivitätsassays mit Inhibitoren und Aktivatoren durchgeführt werden, um bereits hier sicher sagen zu können, dass die beobachtete Aktivität von MMPs stammt. Eine Quantifizierung des MMP-Gehalts könnte dann mittels ELISA erfolgen.

9.7 Klinische Schlussfolgerung

Neben der Vorbeugung und Behandlung parodontaler Erkrankungen zur Vermeidung von Schmerzen und Zahnverlust, ist vor allem die Verhinderung systemischer Einflüsse parodontaler Erkrankungen wichtig. Die Erkenntnis, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen parodontaler und systemischer Erkrankungen mit hoher Prävalenz in der Bevölkerung gibt, hat dazu geführt, dass das Interesse an der Erforschung parodontaler Erkrankungen in den vergangenen Jahren stark angestiegen ist. Es gibt zahlreiche human- und veterinärmedizinische Studien, die aufzeigen, dass das Vorliegen einer Parodontalerkrankung negative Einflüsse auf die Gesundheit des Individuums hat (BOSNJAK et al., 2001; PAVLICA et al., 2008; CULLINAN et al., 2009; PEDDLE et al., 2009; GLICKMAN et al., 2011; AMEET et al., 2013; NABI et al., 2014; WHYTE et al., 2014).

Gerade im veterinärmedizinischen Bereich werden die Tierbesitzer nicht ausreichend über die systemischen Einflüsse parodontaler Erkrankungen aufgeklärt und ihnen wird die Wichtigkeit der Prophylaxe und Therapie dieser nicht eindrücklich erklärt. Der Leitspruch „Vorbeugung ist besser als Therapie“ sollte auch hier gelten und Tierbesitzer sollten frühzeitig darüber aufgeklärt werden, dass tägliches Zähneputzen und die Fütterung von Trockenfutter zur Gesunderhaltung der Zähne und zur Verhinderung der systemischen Einflüsse parodontaler Erkrankungen beitragen können (ALLMUCA, 2015). Gerade bei Tieren, die ohnehin schon an einer Herz-, Leber-, oder Nierenerkrankung leiden und daher einem erhöhten Gesundheits- und Narkoserisiko ausgesetzt sind. In der Veterinärmedizin ist eine narkosefreie Zahnbehandlung nicht wirklich möglich. Auch wenn das Angebot an narkosefreier Zahnreinigung ansteigt, muss hier eine adäquate Besitzeraufklärung dahingehend erfolgen, dass dies wenig sinnvoll ist, da nur eine kosmetische Behandlung stattfindet. Regelmäßige parodontale Behandlungen in Narkose sind zielführend in der Gesunderhaltung der Zähne (AVDC, 2019).

Die weitere Forschung zur Suche nach Medikamenten, die bei der Therapie parodontaler Erkrankungen helfen, ist sicherlich sinnvoll, aber auf Grund der multiplen Funktionen, die MMPs innehaben, ist zu diskutieren ob eine generelle

Inhibition der MMPs der richtige Weg ist (MCCAWLEY und MATRISIAN, 2001; LOUKOPOULOS et al., 2003; PAGE-MCCAW et al., 2007; SIEFERT und SARKAR, 2012). Sicherer wäre eine selektive Inhibition der MMPs. Hierzu ist noch viel Forschungsarbeit notwendig, bevor an einen klinischen Einsatz gedacht werden kann. Ein lokaler Einsatz von MMP-Inhibitoren mittels Einbringung in den gingivalen Sulkus wäre nach Meinung der Autorin sinnvoller, als deren systemischen Einsatz. Eine veterinärmedizinische Studie über den Einsatz einer subantimikrobiellen Dosis Doxycyclin oral zeigt eine signifikante Reduktion in der Aktivität von MMP-2 und-9 bei Hunden mit Parodontitis gegenüber der Kontrollgruppe. Zudem kann ein signifikanter Rückgang des Attachmentverlustes und der gingivalen Blutungsneigung aufgezeigt werden (KIM et al., 2013).

In der Veterinärmedizin fehlen zudem longitudinale Studien über die Auswirkung einer Parodontalbehandlung auf die Aktivität von Gelatinasen und Kollagenasen bzw. MMPs. Es gibt zahlreiche Studien aus der Humanmedizin, in denen in oralen Flüssigkeiten wie Speichel oder GCF ein Absinken der MMP-Menge nach Parodontalbehandlung nachgewiesen wird (UITTO et al., 1990; MÄKELÄ et al., 1994; RAI et al., 2008; MARCACCINI et al., 2009; KINNEY et al., 2011; MESCHIARI et al., 2013; KINNEY et al., 2014; POPAT et al., 2014; GUL et al., 2016). Dies wäre für die Veterinärmedizin wünschenswert, ist aber an Patienten nur schwer realisierbar.

Um MMPs in der Veterinärmedizin als Marker für Zähne zu verwenden, die anfällig gegenüber einer Parodontitis sind oder zur Verlaufskontrolle einer bestehenden Parodontalerkrankung unter Therapie, muss noch viel Forschungsarbeit geleistet werden. MMPs und ihre Funktionen sind komplex, die Pathogenese einer Parodontalerkrankung ebenfalls, daher hält die Autorin die Verwendung eines einzelnen Enzyms als Marker nicht zielführend und bezieht sich hierbei auf die Studie von GUL und Mitarbeitern (2016). Eine Kombination aus der Messung von Enzymen, der radiologischen und klinischen Untersuchung, inklusive Messung der Menge an gingivaler Sulkusflüssigkeit wäre eine denkbare Lösung für diese Problematik. Auf Grund dessen, dass bei wachen Hunden eine Probenentnahme nicht möglich ist, müsste daran gearbeitet werden, dass der auserkorene Marker schnelle Ergebnisse liefert, sodass in der gleichen Narkose Diagnostik und die entsprechende Therapie erfolgen können.

In der vorliegenden Arbeit konnten das Vorhandensein und die Aktivität von MMP-2, -3, -8 und -9 in der gingivalen Sulkusflüssigkeit beim Hund nachgewiesen werden und es konnte die Aussage belegt werden, dass es mit steigendem Schweregrad einer Parodontalerkrankung zu einem Anstieg der enzymatischen Aktivität kommt. Es wurden keine therapiebezogenen Untersuchungen durchgeführt, aber unter Beachtung der aktuellen Literatur aus Human- und Veterinärmedizin sind MMPs als ein lohnendes Ziel weiterer gezielter Forschung anzusehen. Möglicherweise trägt ihre Modulation zur Linderung oder gar Heilung parodontaler Erkrankungen bei.

J. Zusammenfassung

Gelatinasen und Kollagenasen sind Enzyme, welche Gelatine und Kollagen abbauen. Dazu gehören die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). Diese Enzyme spielen eine wichtige Rolle bei der Parodontitis des Hundes, da sie das parodontale Ligament abbauen und somit am Verlust der Zähne und Zahnschmerzen beteiligt sind. Diese Enzyme werden durch neutrophile Granulozyten im Rahmen einer körpereigenen Entzündungsreaktion entlassen. Als Trigger für diese Reaktion dienen Bakterien.

In der vorliegenden Arbeit werden die gelatinolytische und kollagenolytische Aktivität bei Hunden mittels Aktivitätsassay untersucht. Außerdem werden das Vorliegen und der Gehalt von ausgewählten Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) in der kaninen gingivalen Sulkusflüssigkeit bei zahngesunden Hunden und bei, in unterschiedlichen Graden, an einer Parodontalerkrankung leidenden Hunden mittels ELISA untersucht. Eine entsprechende Untersuchung liegt in der Veterinärmedizin bisher nicht vor.

Bei Durchführung des Aktivitätsassays sowohl mit Gelatine als auch mit Kollagen als Substrat lässt sich die aufgestellte Hypothese, dass es mit steigendem Schweregrad einer Parodontalerkrankung, auch insgesamt zu einem Anstieg der enzymatischen Aktivität kommt, bestätigen. Bei der Untersuchung der absoluten Aktivität handelt es sich dabei um hoch signifikante Ergebnisse ($p=0,0003$, $p<0,0001$). Bei der Untersuchung der relativen Aktivität handelt es sich um signifikante ($p=0,0307$) und sehr signifikante ($p=0,0021$) Ergebnisse.

Bei Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität der Patientengruppe und der Kontrollgruppe bestehen bei Betrachtung auf Zahnebene hoch signifikant höhere relative Gelatinaseaktivitäten für die Patientenzähne a1 ($p=0,0006$), a2 ($p=0,0003$), e1 ($p=0,001$) und e2 ($p=0,0006$) gegenüber den entsprechenden Kontrollzähnen. Das gleiche gilt für die Patientenzähne a2 ($p=0,0003$) im Kollagenassay.

Bei Betrachtung der Zusammenhänge zwischen der enzymatischen Aktivität aller Zähne der Patientengruppe und der Kontrollgruppe unabhängig von der Art des Zahns zeigt sich die relative Gelatinase- und Kollagenaseaktivität von Patientenzähnen höher als die der Kontrollzähne. Die Ergebnisse sind hoch signifikant ($p<0,0001$, $p=0,0002$). Ebenfalls hoch signifikant ($p=0,0001$) sind die Ergebnisse bei Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität der

Patientengruppe und der Kontrollgruppe auf Probandenebene. Hierbei ist die relative Gelatinaseaktivität der Patienten gegenüber den Kontrollen erhöht.

Bei Untersuchung der Auswirkung der Zahnlokalisation auf die Enzymaktivität und dementsprechend den Schweregrad der Parodontalerkrankung, wenn dieser als Gesamtbefund aus klinischer und radiologischer Untersuchung erhoben wird, zeigen sich hoch signifikante ($p=0,0007$) Ergebnisse für den Zahn d. Für diesen Zahn kann also ein Anstieg der absoluten Kollagenaseaktivität entsprechend dem Anstieg des Schweregrades der Parodontalerkrankung nachgewiesen werden.

An den Eckzähnen im Oberkiefer lässt sich in dieser Studie kein Unterschied in der Enzymaktivität zwischen der Probenentnahme palatinal oder bukkal feststellen. Die Ergebnisse der relativen Gelatinaseaktivität an den palatinalen und bukkalen Probenentnahmestellen stimmen hoch signifikant überein ($p<0,001$), die Ergebnisse der absoluten Gelatinase- und Kollagenaseaktivität und der relativen Kollagenaseaktivität sind sehr signifikant bis signifikant übereinstimmend ($p=0,002-0,03$).

In der vorliegenden Arbeit können mit Hilfe des ELISA sowohl bei Zähnen von Tieren aus der Kontrollgruppe als auch aus der Patientengruppe MMP-2, -3 und -9 nachgewiesen werden. Die Untersuchungen zum MMP-Gehalt sind lediglich deskriptiv auf Grund der niedrigen Fallzahlen. Die aufgestellte Vermutung, dass es mit steigendem Grad der Parodontalerkrankung zu einem schrittweisen Anstieg im MMP-Gehalt kommt, kann auf Basis der vorliegenden Daten für keines der untersuchten MMPs bestätigt werden. Allerdings kann für MMP-2 und -3 bestätigt werden, dass es bei erkrankten Zähnen bzw. Patientenzähnen insgesamt zu höheren MMP-Gehalten kommt, als bei gesunden Zähnen bzw. Kontrollzähnen. MMP-8 wird insgesamt mit dem höchsten Gehalt nachgewiesen, aber lediglich in der Patientengruppe untersucht.

Abschließend ist festzuhalten, dass in der vorliegenden Studie nachgewiesen werden kann, dass es bei der Parodontitis des Hundes mit steigendem Schweregrad der Erkrankung zu einem Anstieg der enzymatischen Aktivität von Gelatinasen und Kollagenasen in gingivaler Sulkusflüssigkeit kommt. Auf Grund des Nachweises von höheren Gehalten an MMP-2 und -3 bei Patienten gegenüber Kontrollen ist von einer Beteiligung dieser MMPs beim Fortschreiten der Erkrankung auszugehen. MMP-8 und -9 können ebenfalls nachgewiesen werden.

K. Summary

Gelatinases und collagenases are enzymes that break down gelatin and collagen like for example matrix metalloproteinases. Since MMPs disintegrate the periodontal ligament they play an important role in periodontitis of the dog and are involved in tooth loss and concomitant pain. These enzymes are released by neutrophil granulocytes during the body's own inflammatory response to local bacteria.

In the present study gelatinolytic and collagenolytic activity in dogs is measured via enzyme activity assay. In addition the presence and the amount of selected MMPs in gingival crevicular fluid of dogs with different degrees of periodontal disease and without periodontitis are studied via ELISA. An equivalent investigation has not yet been conducted in veterinary medicine.

The hypothesis that an increase in gelatinolytic and collagenolytic activity occurs with increasing degree of periodontal disease can be verified. Regarding absolute activity the results are highly significant ($p=0,0003$, $p<0,0001$), regarding relative activity the results are statistically significant ($p=0,0021$, $p=0,0307$).

When investigating the correlation between enzymatic activity of the patient group and the control group on the level of the tooth there are highly significant higher relative gelatinolytic activities in the patient teeth a1 ($p=0,0006$), a2 ($p=0,0003$), e1 ($p=0,001$) und e2 ($p=0,0006$) compared to the corresponding control teeth. The same applies to the patient teeth a2 ($p=0,0003$) in the collagenolytic activity assay.

When looking at the connection between enzymatic activity of all teeth, independent to their type, the relative gelatinolytic and collagenolytic activities of the patient teeth are higher than those of the control teeth. The results are highly significant ($p<0,0001$, $p=0,0002$). Also highly significant ($p=0,0001$) results are achieved regarding the enzymatic activity of the patient and control group on the level of the dog. The gelatinolytic activity of the patients is higher than that of the control animals. Investigating the dependence of tooth location on total enzyme activity (cumulative diagnosis out of clinical and radiological findings) or degree of periodontal disease highly significant results are gained for tooth d ($p=0,0007$). For tooth d an increase in absolute collagenolytic activity in correspondence to an increase in disease severity can be proven.

No difference in enzyme activity can be detected when sampling palatally in contrast to buccally at the canines in the upper jaw. The results of the relative gelatinolytic activity of the palatal and the buccal sampling site match in a highly

significant manner ($p < 0,001$) whereas the results of the absolute gelatinolytic activity and the relative and absolute collagenolytic activity match significantly ($p = 0,002-0,03$).

In the present work MMP-2, -3 and -9 can be detected via ELISA in patients with periodontal disease and in periodontally healthy animals. Due to low sampling numbers the results concerning the amount of MMPs are only descriptive. The hypothesis that an increase in disease severity results in a gradual increase of MMP amount cannot be proven in this study. It can however be stated that total MMP-2 and -3 levels in patient teeth or periodontally diseased teeth are higher in comparison to control teeth or periodontally healthy teeth. MMP-8 levels in patients outnumber those of the other MMPs but they are not measured in the control group.

Finally, in the present work the increase of gelatinolytic and collagenolytic activity in gingival crevicular fluid of the dog corresponding to the severity of the periodontal disease can be proven. An increase in MMP-2 and -3 levels in patients compared to control animals proves an involvement of MMPs in the disease progress. The presence of MMP-8 and -9 in periodontitis can also be demonstrated.

L. Literaturverzeichnis

1. ACKERMANN, H. (2010) BiAS. für Windows, Biometrische Analyse von Stichproben, Modul Studienplanung. Version 9.08. Hochheim, Darmstadt, Epsilon-Verlag
2. ALBUQUERQUE, C., MORINHA, F., REQUICHA, J., MARTINS, T., DIAS, I., GUEDES-PINTO, H., BASTOS, E. und VIEGAS, C. (2012) Canine periodontitis: The dog as an important model for periodontal studies. *Veterinary Journal* 191, S. 299-305
3. ALLDINGER, S. (2009) Matrix-Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren bei viralen demyelinisierenden Erkrankungen am Beispiel der Staupe-Enzephalitis und der murinen Theilervirus-Enzephalomyelitis. Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Hannover, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH (Habilitationsschrift)
4. ALLMUCA, H., MAVROMATI, J. und MAZARI, B. (2015) The Influence of the Diet in the Development of the Gingivitis and Periodontitis in Dogs. *Anglisticum Journal* 4, S. 37-39
5. AMEET, M. M., AVNEESH, H. T., BABITA, R. P. und PRAMOD, P. M. (2013) The relationship between periodontitis and systemic diseases–hype or hope? *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 7, S. 758-762
6. ATTAR, N. B., BANODKAR, A. B., GAIKWAD, R. P., SETHNA, G. D., PATIL, C. L. und SIMON, S. (2018) Evaluation of gingival crevicular fluid volume in relation to clinical periodontal status with periotron 8000. *International Journal of Applied Dental Sciences* 4, S. 68-71
7. AVDC (2019) Anesthesia Free Dentistry.
URL: <http://avdc.org/AFD/what-is-an-anesthesia-free-dental-cleaning/>
(Stand 22.02.2019)
8. AVDC (2016) Periodontal Disease Classification.
URL: <https://www.avdc.org/nomenclature3.html#periostages>
(Stand: 17.11.2015)
9. ANTIBODIES-ONLINE GMBH (2013) Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). URL: <https://www.antikoerper-online.de/resources/17/1246/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa/> (Stand: 24.04.2018)

10. ARZI, B. und VERSTRAETE, F. J. M. (2009) Diagnosis of periodontal disease in dogs. *The Journal of Small Animal Practice* 50, S. 104
11. BAKER, A. H., EDWARDS, D. R. und MURPHY, G. (2002) Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of Cell Science* 115, S. 3719-3727
12. BEKLEN, A., TÜTER, G., SORSA, T., HANEMAAIJER, R., VIRTANEN, I., TERVAHARTIALA, T. und KONTTINEN, Y. T. (2006) Gingival tissue and crevicular fluid co-operation in adult periodontitis. *Journal of Dental Research* 85, S. 59-63
13. BEZUIDENHOUT, A. J. (2003) *Applied Oral Anatomy and Histology*. In: SLATTER, D. H. (Hrsg.): *Textbook of Small Animal Surgery*. Bd. 2, 3. Aufl., Philadelphia: Saunders, S. 2630-2637
14. BILDT, M. M., BLOEMEN, M., KUIJPERS-JAGTMAN, A. M. und VON DEN HOFF, J. W. (2008) Collagenolytic Fragments and Active Gelatinase Complexes in Periodontitis. *Journal of Periodontology* 79, S. 1704-1711
15. BIRKEDAL-HANSEN, H. (1993) Role of Cytokines and Inflammatory Mediators in Tissue Destruction. *Journal of Periodontal Research* 28, S. 500-510
16. BODE, W. (1995) A Helping Hand for Collagenases - the Hemopexin-Like Domain. *Structure* 3, S. 527-530
17. BODE, W., GOMIS-RÜTH, F.-X. und STÖCKLER, W. (1993) Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Letters* 331, S. 134-140
18. BORDEN, S. M., GOLUB, L. M. und KLEINBERG, I. (1977). The effect of age and sex on the relationship between crevicular fluid flow and gingival inflammation in humans. *Journal of Periodontal Research* 12, S.160-165
19. BORNBAUM, J. (2012) Immunhistologische Untersuchung ausgewählter Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren in der neoplastisch veränderten Mamma und den assoziierten Lymphknoten von Hunden. Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Gießen, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH (Dissertationsschrift)

20. BOSMAN, F. T. und STAMENKOVIC, I. (2003) Functional structure and composition of the extracellular matrix. *Journal of Pathology* 200, S. 423-428
21. BOSNJAK, A., PLANCAK, D. und CURILOVIC, Z. (2001) Advances in the relationship between periodontitis and systemic diseases. *Acta Stomatologica Croatica* 35, S. 267-271
22. BREW, K., DINAKARPANDIAN, D. und NAGASE, H. (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochimica Et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1477, S. 267-283
23. BRILL, N. und KRASSE, B. O. (1958) The Passage of Tissue Fluid into the Clinically Healthy Gingival Pocket. *Acta Odontologica Scandinavica* 16, S. 233-245
24. BRILL, N. und BJÖRN, H. (1959) Passage of Tissue Fluid Into Human Gingival Pockets. *Acta Odontologica Scandinavica* 17, S. 11-21
25. BUCHER, O. und WARTENBERG H. (1997) *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. 12. Aufl., Bern: Hans Huber Verlag
26. BUDDECKE, E. (1981) *Biochemische Grundlagen der Zahnmedizin*. Berlin, New York: De Gruyter Verlag
27. CHEN, H. Y., COX, S. W., ELEY, B. M., MÄNTYLÄ, P., RÖNKÄ, H. und SORSA, T. (2000) Matrix metalloproteinase-8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology* 27, S. 366–369
28. CULLINAN, M. P., FORD, P. J. und SEYMOUR, G. J. (2009) Periodontal disease and systemic health: current status. *Australian Dental Journal* 54, S. 62-69
29. DAHAN, M., NAWROCKI, B., ELKAIM, R., SOELL, M., BOLCATO-BELLEMIN, A. L., BIREMBAUT, P. und TENENBAUM, H. (2001) Expression of matrix metalloproteinases in healthy and diseased human gingiva. *Journal of Clinical Periodontology* 28, S. 128-136
30. DIXON, W. J. C. E. (1993) *BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2*. Berkeley, Los Angeles, London: University of California Press
31. EGEBLAD, M. und WERB, Z. (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer* 2, S. 161-174

32. EICKHOFF, M. (2005) Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde bei Klein- und Heimtieren. Stuttgart: Enke Verlag
33. EICKHOFF, M. (2012) Erkrankungen im Zahn-, Mund- und Kieferbereich. In: SUTER, P. F., KOHN, B. und SCHWARZ, G. (Hrsg.): Praktikum der Hundeklinik. 11. Aufl., Stuttgart: Enke Verlag, S. 637-658
34. EJEIL, A. L., IGONDJO-TCHEN, S., GHORNRASSENI, S., PELLAT, B., GODEAU, G. und GOGLY, B. (2003) Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human Gingiva. *Journal of Periodontology* 74, S. 188-195
35. ELEY, B. M. und COX, S. W. (1996) A 2-year longitudinal study of elastase in human gingival crevicular fluid and periodontal attachment loss. *Journal of Clinical Periodontology* 23, S. 681-692
36. ELLENBERGER, W. und BAUM, H. (1943) Handbuch der vergleichenden Anatomie der Haustiere. 18. Aufl., Berlin: Springer Verlag
37. EVANS, H. E. und DE LAHUNTA, A. (2013) *Miller's Anatomy of the Dog*. 4. Aufl., St. Louis: Elsevier Verlag
38. FAHRENKRUG, P. (2007) Zahnerkrankungen. In: GRÜNBAUM, E.-G. und SCHIMKE, E. (Hrsg.): *Klinik der Hundekrankheiten*. 3. Aufl., Stuttgart: Enke Verlag, S. 599-619
39. FLOYD, M. R. (1991) The modified Triadan system: nomenclature for veterinary dentistry. *Journal of Veterinary Dentistry* 8, S. 18-19
40. FOWLER, E.B., BREAUULT, L. G. und CUENIN, M. F. (2001) Periodontal disease and its association with systemic disease. *Military Medicine* 166, S. 85-89
41. GAD, T. (1968) Periodontal disease in dogs. I. Clinical Investigation. *Journal of Periodontal Research* 3, S. 268-272
42. GAWOR, J. (2013) Dental radiology for periodontal disease. In: NIEMIEC, B. A. (Hrsg.): *Veterinary Periodontology*. 1. Aufl., Ames, Chichester, Oxford: Wiley-Blackwell, S. 107-128
43. GENORISE SCIENTIFIC, INC. (2016) Nori® Canine MMP-3 ELISA Kit-DataSheet. URL: http://www.genorise.com/files/Nori_Canine_MMP-3_ELISA_Kit-DataSheet.pdf (Stand: 24.04.2018)

44. GLICKMAN, L. T., GLICKMAN, N. W., MOORE, G. E., GOLDSTEIN, G. S. und LEWIS, H. B. (2009) Evaluation of the risk of endocarditis and other cardiovascular events on the basis of the severity of periodontal disease in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 234, S. 486-494
45. GLICKMAN, L. T., GLICKMAN, N. W., MOORE, G. E., LUND, E. M., LANTZ, G. C. und PRESSLER, B. M. (2011) Association between chronic azotemic kidney disease and the severity of periodontal disease in dogs. *Preventive Veterinary Medicine* 99, S. 193-200
46. GORREL, C. (2006) *Zahnmedizin bei Klein- und Heimtieren*. 1. Aufl., München: Elsevier
47. GRIFFITHS, G. S., WILTON, J. M. A. und CURTIS, M. A. (1992) Contamination of human gingival crevicular fluid by plaque and saliva. *Archives of Oral Biology* 37, S. 559-564
48. GROSSI, S. G., ZAMBON, J. J., HO, A. W., KOCH, G., DUNFORD, R. G., MACHTEI, E. E., NORDERYD O.M. und GENCO, R.J. (1994) Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *Journal of Periodontology* 65, S. 260-267
49. GUL, S. S., DOUGLAS, C. W. I., GRIFFITHS, G. S. und RAWLINSON, A. (2016) A pilot study of active enzyme levels in gingival crevicular fluid of patients with chronic periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* 43, S. 629-636
50. HAMP, S. E., OLSSON, S. E., FARSOMADSEN, K., VIKLANDS, P. und FORNELL, J. (1984) A Macroscopic and Radiologic Investigation of Dental Diseases of the Dog. *Veterinary Radiology* 25, S. 86-92
51. HARDHAM, J., DREIER, K., WONG, J., SFINTESCU, C. und EVANS, R. T. (2005) Pigmented-anaerobic bacteria associated with canine periodontitis. *Veterinary Microbiology* 106, S. 119-128
52. HARVEY, C. E. (2005) Management of periodontal disease: Understanding the options. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* 35, S. 819-836

53. HERNÁNDEZ RÍOS, M., SORSA, T., OBREGÓN, F., TERVAHARTIALA, T., VALENZUELA, M. A., POZO, P., DUTZAN, N., LESAFFRE, E., MOLAS, M. und GAMONAL, J. (2009) Proteolytic roles of matrix metalloproteinase (MMP)-13 during progression of chronic periodontitis: initial evidence for MMP-13/MMP-9 activation cascade. *Journal of Clinical Periodontology* 36, S. 1011-1017
54. HOFFMANN, T. und GAENGLER, P. (1996) Epidemiology of periodontal disease in poodles. *Journal of Small Animal Practice* 37, S. 309-316
55. IACOPINO, A. M. und CUTLER, C. W. (2000) Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: recent concepts involving serum lipids. *Journal of Periodontology* 71, S. 1375-1384
56. INGMAN, T., TERVAHARTIALA, T., DING, Y., TSCHESCHE, H., HAERIAN, A., KINANE, D. F., KONTTINEN, Y. T. und SORSA, T. (1996) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology* 23, S. 1127-1132
57. ISHIKAWA, I. (2007) Host responses in periodontal diseases: a preview. *Periodontology 2000* 43, S. 9-13
58. ISOGAI, E., ISOGAI, H., MIURA, H., TAKANO, K., AOI, Y., HAYASHI, M. und NAMIOKA, S. (1989) Oral Flora of Mongrel and Beagle Dogs with Periodontal Disease. *Japanese Journal of Veterinary Science* 51, S. 110-118
59. JEDESZKO, C., SAMENI, M., OLIVE, M. B., MOIN, K. und SLOANE, B. F. (2008) Visualizing Protease Activity in Living Cells: From Two Dimensions to Four Dimensions. *Current Protocols in Cell Biology* 39, S. 4.20.1-4.20.15
60. JIANG, W. und BOND, J. S. (1992) Families of metalloendopeptidases and their relationships. *FEBS Letters* 312, S. 110-114
61. KAISER, S. M. (2014) Nachweis und Einfluss von Matrix-Metalloproteinasen bei der Parodontitis des Hundes. *Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Kleintiere, Chirurgie Justus-Liebig-Universität Gießen. Gießen, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH (Dissertationsschrift)*
62. KIM, S. E., KIM, S., JEONG, M., LEE, Y., AHN, J. T., PARK, Y. W., AHN, J. S., LEE, E., RYU, D. Y. und SEO, K. (2013) Experimental determination of a subantimicrobial dosage of doxycycline hyclate for treatment of periodontitis in Beagles. *American Journal of Veterinary Research* 74, S. 130-135

63. KINANE, D. F. und LINDHE, J. (1999) Pathogenese der Parodontitis. In: LINDHE, J. KARRING, T. und LANG, N. P. (Hrsg.): Klinische Parodontologie und Implantologie. 1. Aufl., Berlin: Quintessenz Verlag, S. 189-222
64. KINANE, D. F. und MARSHALL, G. J. (2001) Periodontal manifestations of systemic disease. Australian Dental Journal 46, S. 2-12
65. KINANE, D. F. und ATTSTRÖM, R. (2005) Advances in the pathogenesis of periodontitis. Group B consensus report of the fifth European workshop in periodontology. Journal of Clinical Periodontology 32, S.130-131
66. KINNEY, J. S., RAMSEIER, C. A. und GIANNOBILE, W. V. KINNEY (2007) Oral Fluid–Based Biomarkers of Alveolar Bone Loss in Periodontitis. Annals of the New York Academy of Sciences 1098, S. 230-251
67. KINNEY, J. S., MORELLI, T., BRAUN, T., RAMSEIER, C. A., HERR, A. E., SUGAI, J. V., SHELBURNE, C. E., RAYBURN, L. A., SINGH, A. K. und GIANNOBILE, W. V. (2011) Saliva/Pathogen Biomarker Signatures and Periodontal Disease Progression. Journal of Dental Research 90, S. 752-758
68. KINNEY, J. S., MORELLI, T., OH, M., BRAUN, T. M., RAMSEIER, C. A., SUGAI, J. V. und GIANNOBILE, W. V. (2014) Crevicular fluid biomarkers and periodontal disease progression. Journal of Clinical Periodontology 41, S. 113-120
69. KNÄUPER, V., DOCHERTY, A. J. P., SMITH, B., TSCHESCHE, H. und MURPHY, G. (1997) Analysis of the contribution of the hinge region of human neutrophil collagenase (HNC, MMP-8) to stability and collagenolytic activity by alanine scanning mutagenesis. FEBS Letters 405, S. 60-64.
70. KÖNIG, H. E., SÓTONYI, P., RUBERTE, J., LIEBICH, H.-G. (2012) Verdauungsapparat (apparatus digestorius): Kopfdarm. In: KÖNIG, H. E. und LIEBICH, H.-G. (Hrsg.): Anatomie der Haussäugetiere. 5. Aufl., Stuttgart: Schattauer Verlag, S. 302-325
71. KOROSTOFF, J. M., WANG, J. F., SARMENT, D. P., STEWART, J. C. B., FELDMAN, R. S. und BILLINGS, P. C. (2000) Analysis of In Situ Protease Activity in Chronic Adult Periodontitis Patients: Expression of Activated MMP-2 and a 40 kDa Serine Protease. Journal of Periodontology 71, S. 353-360
72. KORTEGAARD, H. E., ERIKSEN, T. und BAEELUM, V. (2014) Screening for periodontal disease in research dogs - a methodology study. Acta Veterinaria Scandinavica 56, S. 77-85

73. KRYSHITALSKYJ, E., SODEK, J. und FERRIER, J. M. (1986) Correlation of collagenolytic enzymes and inhibitors in gingival crevicular fluid with clinical and microscopic changes in experimental periodontitis in the dog. *Archives of Oral Biology* 31, S. 21-31
74. KUBOTA, T., ITAGAKI, M., HOSHINO, C., NAGATA, M., MOROZUMI, T., KOBAYASHI, T., TAKAGI, R. und YOSHIE, H. (2008) Altered gene expression levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in periodontitis-affected gingival tissue. *Journal of Periodontology* 79, S. 166-173
75. KUBOTA, T., NOMURA, T., TAKAHASHI, T. und HARA, K. (1996) Expression of mRNA for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontitis-affected human gingival tissue. *Archives of Oral Biology* 41, S. 253-262
76. KUNIMATSU, K., MINE, N., KATO, I., HASE, T., AOKI, Y. und YAMAMOTO, K. (1993) Kunimatsu, K., Mine, N., Kato, I., Hase, T., Aoki, Y., & Yamamoto, K. (1993). Possible functions of human neutrophil serine proteinases, medullasin and cathepsin G, in periodontal tissue breakdown. *Journal of periodontal research* 28, S. 547-549
77. KYLLAR, M. und WITTER, K. (2005) Prevalence of dental disorders in pet dogs. *Veterinari Medicina* 50, S. 496-505
78. LEE, W., AITKEN, S., SODEK, J. und MCCULLOCH, C. A. G. (1995) Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction in vivo: role of active enzyme in human periodontitis. *Journal of Periodontal Research* 30, S. 23-33
79. LEPPILAHTI, J. M., HERNÁNDEZ RÍOS, P. A., GAMONAL, J. A., TERVAHARTIALA, T., BRIGNARDELLO-PETERSEN, R., MANTYLA, P., SORSA, T. und HERNÁNDEZ, M. (2014) Matrix metalloproteinases and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid provide site-specific diagnostic value for chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 41, S. 348-356
80. LIEBICH, H.-G. (2010) *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel*. 5. Aufl., Stuttgart: Schattauer Verlag
81. LINDHE, J. und KARRING, T. (1999) Anatomie des Parodonts. In: LINDHE, J. KARRING, T. und LANG, N. P. (Hrsg.): *Klinische Parodontologie und Implantologie*. 1. Aufl., Berlin: Quintessenz Verlag, S. 19-67

82. LINDHE, J., HAMP, S.-E. und LOE, H. (1975) Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. *Journal of Periodontal Research* 10, S. 243-255
83. LOBPRISE, H. (2006) Canine periodontal disease overview. *Veterinary Technician* 27, S. 168-173
84. LÖE, H. (1993) Periodontal disease: the sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 16, S. 329-334
85. LOESCHE, W. J. und GROSSMAN, N. S. (2001) Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment. *Clinical Microbiology Reviews* 14, S. 727-752
86. LOUKOPOULOS, P., MUNGALL, B. A., STRAW, R. C., THORNTON, J. R. und ROBINSON, W. F. (2003) Matrix metalloproteinase-2 and-9 involvement in canine tumors. *Veterinary Pathology* 40, S. 382-394
87. MÄKELÄ, M., SALO, T., UITTO, V. J. und LARJAVA, H. (1994) Matrix Metalloproteinases (Mmp-2 and Mmp-9) of the Oral Cavity - Cellular-Origin and Relationship to Periodontal Status. *Journal of Dental Research* 73, S. 1397-1406
88. MAESO, G., BRAVO, M. und BASCONES, A. (2007) Levels of metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis, gingivitis, and healthy gingiva. *Quintessence International* 38, S. 247-252
89. MARCACCINI, A. M., MESCHIARI, C. A., ZUARDI, L. R., DE SOUSA, T. S., TABA, M., TEOFILO, J. M., JACOB-FERREIRA, A. L. B., TANUS-SANTOS, J. E., NOVAES, A. B. und GERLACH, R. F. (2010) Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology* 37, S. 180-190
90. MARCACCINI, A. M., NOVAES, A. B., JR., MESCHIARI, C. A., SOUZA, S. L., PALIOTO, D. B., SORGI, C. A., FACCIOLI, L. H., TANUS-SANTOS, J. E. und GERLACH, R. F. (2009) Circulating matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) and MMP-9 are increased in chronic periodontal disease and decrease after non-surgical periodontal therapy. *Clinica Chimica Acta* 409, S. 117-122
91. MARSHALL M. D., WALLIS, C. V., MILELLA, L., COLYER, A., TWEEDIE, A. D. und HARRIS, S. (2014) A longitudinal assessment of periodontal disease in 52 Miniature Schnauzers. *BMC Veterinary Research* 10, S. 166-179

92. MCCAWLEY, L. J. und MATRISIAN, L. M. (2001) Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Current Opinion in Cell Biology* 13, S. 534-540
93. MESCHIARI, C. A., MARCACCINI, A. M., MOURA, B. C. S., ZUARDI, L. R., TANUS-SANTOS, J. E. und GERLACH, R. F. (2013) Salivary MMPs, TIMPs, and MPO levels in periodontal disease patients and controls. *Clinica Chimica Acta* 421, S. 140-146
94. MIHALJEVIĆ, S.-Y. (2010) Zahnradiologie bei Hund und Katze. Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG
95. MOLECULAR PROBES INC. (2001) EnzChek® Gelatinase/Collagenase Assay Kit. URL: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?id=man0002082&version=1.0&pdfurl=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp12052.pdf> (Stand: 26.01.2019)
96. MURPHY, G., NGUYEN, Q., COCKETT, M. I., ATKINSON, S. J., ALLAN, J. A., KNIGHT, C. G., WILLENBROCK, F. und DOCHERTY, A. J. P. (1994) Assessment of the Role of the Fibronectin-Like Domain of Gelatinase-a by Analysis of a Deletion Mutant. *Journal of Biological Chemistry* 269, S. 6632-6636
97. MURPHY, G., ALLAN, J. A., WILLENBROCK, F., COCKETT, M. I., O'CONNELL, J. P. und DOCHERTY, A. J. P. (1992) The Role of the C-terminal Domain in Collagenase and Stromelysin Specificity. *The Journal of Biological Chemistry* 267, S. 9612-9618
98. NABI, S. U., WANI, A.R., SHAH, O.S. und DEY, S. (2014) Association of periodontitis and chronic kidney disease in dogs. *Veterinary World* 7, S. 403-407
99. NAGASE, H. und WOESSNER, J. F. (1999) Matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry* 274, S. 21491-21494
100. NAGASE, H., VISSE, R. und MURPHY, G. (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research* 69, S. 562 – 573
101. NIEMIEC, B. A. (2013) *Veterinary Periodontology*. 1. Aufl., Ames, Chichester, Oxford: Wiley-Blackwell

102. OVERALL, C. M. (2001) Matrix Metalloproteinase Substrate Binding Domains, Modules and Exosites. In: CLARK, I. M. (Hrsg.): Matrix Metalloproteinase Protocols. 1. Aufl., New Jersey: Humana Press, S. 79-120
103. OVERALL, C. M., WIEBKIN, O. W. und THONARD, J. C. (1987) Demonstration of tissue collagenase activity in vivo and its relationship to inflammation severity in human gingiva. *Journal of Periodontal Research* 22, S. 81-88
104. PAGE, R. C. (1998) The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Annals of Periodontology* 3, S. 108-120
105. PAGE, R. C. und SCHROEDER, H. E. (1976) Pathogenesis of Inflammatory Periodontal Disease. A Summary of Current Work. *Laboratory Investigation* 34, S. 235-249
106. PAGE-MCCAW, A., EWALD A. J. und WERB, Z. (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, S. 221–233
107. PAULA-SILVA, F. W. G., DA SILVA, L. A. B. und KAPILA, Y. L. (2010) Matrix Metalloproteinase Expression in Teeth with Apical Periodontitis Is Differentially Modulated by the Modality of Root Canal Treatment. *Journal of Endodontics* 36, S. 231-237
108. PAVLICA, Z., PETELIN, M., JUNTES, P., ERZEN, D., CROSSLEY, D. A. und SKALERIC, U. (2008) Periodontal disease burden and pathological changes in organs of dogs. *Journal of Veterinary Dentistry* 25, S. 97-105
109. PEDDLE, G. D., DROBATZ, K. J., HARVEY, C. E., ADAMS, A. und SLEEPER, M. M. (2009) Association of periodontal disease, oral procedures, and other clinical findings with bacterial endocarditis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 234, S. 100-107
110. PEDERSON, E. D., STANKE, S. R., WHITENER, S. J., SEBASTIANI, P. T., LAMBERTS, B. L. und TURNER, D. W. (1995) Salivary levels of α 2-macroglobulin, α 1-antitrypsin, C-reactive protein, cathepsin G and elastase in humans with or without destructive periodontal disease. *Archives of Oral Biology* 40, S. 1151-1155
111. PEI, D. und WEISS, S. J. (1995) Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 375, S. 244-247

112. POLKOWSKA, I., SOBCZYNSKA-RAK, A. und GOLYNSKA, M. (2014) Analysis of Gingival Pocket Microflora and Biochemical Blood Parameters in Dogs Suffering from Periodontal Disease. *In Vivo* 28, S. 1085-1090
113. POPAT, R. P., BHAVSAR, N. V. und POPAT, P. R. (2014) Gingival crevicular fluid levels of Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1) in periodontal health and disease. *Singapore Dental Journal* 35, S. 59-64
114. POZO, P., VALENZUELA, M. A., MELEJ, C., ZALDIVAR, M., PUENTE, J., MARTINEZ, B. und GAMONAL, J. (2005) Longitudinal analysis of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *Journal of Periodontal Research* 40, S. 199-207
115. RAI, B., KHARB, S., JAIN, R. und ANAND, S. C. (2008) Biomarkers of periodontitis in oral fluids. *Journal of Oral Science* 50, S. 53-56
116. RAWLINSON, J. E., GOLDSTEIN, R. E., REITER, A. M., ATTWATER, D. Z. und HARVEY, C. E. (2011) Association of periodontal disease with systemic health indices in dogs and the systemic response to treatment of periodontal disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 238, S. 601-609
117. RAYBIOTECH, INC. (2018) RayBio Canine MMP-8 ELISA Kit.
URL: <https://www.raybiotech.com/files/manual/ELISA/ELC-MMP8.pdf>
(Stand: 24.04.2018)
118. REIMANN, E. L. (2019) Klinische, radiologische und histologische sowie immunhistologische Untersuchung auf MMP-2, -8, -9 und TIMP-1 bei der Parodontitis des Hundes. *Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Kleintiere, Chirurgie Justus-Liebig-Universität Gießen. Gießen, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH (Dissertationsschrift)*
119. RENVERT, S., WIKSTRÖM, M., MUGRABI, M., KELLY, A. und CLAFFEY, N. (1998) Association of crevicular fluid elastase like activity with histologically-confirmed attachment loss in ligature-induced periodontitis in beagle dogs. *Journal of Clinical Periodontology* 25, S. 368-374
120. SALOMON, F.-V. (2015) Verdauungsapparat, apparatus digestorius. In: SALOMON, F.-V., GEYER, H. und GILLE, U. (Hrsg.): *Anatomie für die Tiermedizin*. 3. Aufl., Stuttgart: Enke Verlag, S. 248-340

121. SCHENKEIN, H. A. (2006) Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontology* 2000 40, S. 77-93
122. SCHROEDER, H. E. und LISTGARTEN, M. A. (1997) The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontology* 2000 13, S. 91-120
123. SCHROEDER, H. E (1965) Crystal morphology and gross structures of mineralizing plaque and of calculus. *Helvetica Odontologica Acta* 9, S. 73-86
124. SCHWARZ, F., JEPSEN, S., HERTEN, M., AOKI, A., SCULEAN, A. und BECKER, J. (2007) Immunohistochemical characterization of periodontal wound healing following nonsurgical treatment with fluorescence controlled Er : YAG laser radiation in dogs. *Lasers in Surgery and Medicine* 39, S. 428-440
125. SIEFERT, S. A. und SARKAR, R. (2012) Matrix metalloproteinases in vascular physiology and disease. *Vascular* 20, S. 210-216
126. SOCRANSKY, S. S., HAFFAJEE, A. D., GOODSON, J. M. und LINDHE, J. (1984) New concepts of destructive periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* 11, S. 21-32
127. SOELL, M., ELKAIM, R. und TENENBAUM, H. (2002) Cathepsin C, matrix metalloproteinases, and their tissue inhibitors in gingiva and gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *Journal of Dental Research* 81, S. 174-178
128. SOMERVILLE, R. P. T., OBLANDER, S. A. und APTE, S. S. (2003) Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biology* 4, S. 216.1-216.11
129. SONG, S. E., CHOI, B. K., KIM, S. N., YOO, Y. J., KIM, M. M., PARK, S. K., ROH, S. S. und KIM, C. K. (2003). Inhibitory effect of procyanidin oligomer from elm cortex on the matrix metalloproteinases and proteases of periodontopathogens. *Journal of Periodontal Research*, 38, S. 282-289
130. SORENSON, W. P., LOE, H. und RAMFJORD, S. P. (1980) Periodontal disease in the beagle dog. A cross sectional clinical study. *Journal of Periodontal Research* 15, S. 380-389
131. SORSA, T., DING, Y. L., INGMAN, T., SALO, T., WESTERLUND, U., HAAPASALO, M., TSCHESCHE, H. und KONTTINEN, Y. T. (1995) Cellular source, activation and inhibition of dental plaque collagenase. *Journal of Clinical Periodontology* 22, S. 709-717

132. SORSA, T., INGMAN, T., SUOMALAINEN, K., HAAPASALO, M., KONTTINEN, Y. T., LINDY, O., SAARI, H. und UITTO, V.-J. (1992) Identification of Proteases from Periodontopathogenic Bacteria as Activators of Latent Human Neutrophil and Fibroblast-Type Interstitial Collagenases. *Infection And Immunity* 60, S. 4491-4495
133. SOUZA-TARLA, C. D., UZUELLI, J. A., MACHADO, A. A., GERLACH, R. F. und TANUS-SANTOS, J. E. (2005) Methodological issues affecting the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Clinical biochemistry* 38, S. 410-414
134. STAMENKOVIC, I. (2003) Extracellular matrix remodelling: the role of matrix Metalloproteinases. *Journal of Pathology* 200, S. 448-464
135. STASZYK, C. (2011) Anatomie. In: VOGT, C. (Hrsg.): *Lehrbuch der Zahnheilkunde beim Pferd*. 1. Aufl., Stuttgart: Schattauer Verlag, S. 1-30
136. STEFFENSON, B., WALLON, U. M. und OVERALL, C. M. (1995) Extracellular Matrix Binding Properties of Recombinant Fibronectin Type II-like Modules of Human 72-kDa Gelatinase/Type IV Collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen. *Journal of Biological Chemistry* 270, S. 11555-11566
137. STERNLICHT, M. D. und WERB, Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 17, S. 463-516
138. STÖCKER, W., GRAMS, F., BAUMANN, U., REINEMER, P., GOMISRUTH, F. X., MCKAY, D. B. und BODE, W. (1995) The Metzincins - Topological and Sequential Relations between the Astacins, Adamalysins, Serralysins, and Matrixins (Collagenases) Define a Superfamily of Zinc-Peptidases. *Protein Science* 4, S. 823-840
139. STÖCKER, W., GOMIS-RÜTH, F.-X., BODE, W. und ZWILLING, R. (1993) Implications of the three-dimensional structure of astacin for the structure and function of the astacin family of zinc-endopeptidases. *FEBS Journal* 214, S. 215-231

140. TERVAHARTIALA, T., PIRILÄ, E., CEPONIS, A., MAISI, P., SALO, T., TUTER, G., KALLIO, P., TÖRNWALL, J., SRINIVAS, R., KONTTINEN, Y. T. und SORSA, T. (2000) The in vivo expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2, -8, -13, and -14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. *Journal of Dental Research* 79, S. 1969-1977
141. TERVAHARTIALA, T., KONTTINEN, Y. T., INGMAN, T., HÄYRINEN-IMMONEN, R., DING, Y. und SORSA, T. (1996) Cathepsin G in gingival tissue and crevicular fluid in adult periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 23, S. 68-75
142. THEILADE, E. (1986) The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology* 13, S. 905-911
143. THEILADE, E., WRIGHT, W. H., JENSEN, S. B. und LOE, H. (1966) Experimental gingivitis in man. II. A Longitudinal Clinical and Bacteriological Investigation. *Journal of Periodontal Research* 1, S. 1-13
144. THODEN VAN VELZEN, S. K., ABRAHAM-INPIJN, L. und MOORER, W. R. (1984) Plaque and systemic disease: a reappraisal of the focal infection concept. *Journal of Clinical Periodontology* 11, S. 209-220
145. THOMÉ, H. (2004) Mundhöhle und Schlundkopf. In: NICKEL, R., SCHUMMER, A. und SEIFERLE, E. (Hrsg.): *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. Bd. 2 Eingeweide, 9. Aufl., Stuttgart: Parey Verlag, S. 19-102
146. TRIADAN, H. (1972) Tierzahnheilkunde: Zahnerhaltung (Füllungstherapie mit „Composite materials“ und Endodontie) bei Affen und Raubtieren. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 114, S. 292-316
147. TUTT, C. (2006) *Small Animal Dentistry: A Manual of Techniques*. 1. Aufl., Oxford, Ames, Carlton: Blackwell Publishing
148. UITTO, V.-J., OVERALL, C. M. und MCCULLOCH, C. (2003) Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontology* 2000 31, S. 77-104
149. UITTO, V.-J., SUOMALAINEN, K. und SORSA, T. (1990) Salivary collagenase. Origin, characteristics and relationship to periodontal health. *Journal of Periodontal Research* 25, S. 135-142
150. VAN DYKE, T. E. und DAVE, S. (2005) Risk Factors for Periodontitis. *Journal of the International Academy of Periodontology* 7, S. 1-8

151. VAN DYKE, T. E. und SERHAN, C. N. (2003) Resolution of Inflammation: A New Paradigm for Pathogenesis of Periodontal Diseases. *Journal of Dental Research* 82, S. 82-90
152. VAN WART, H. E. und BIRKEDAL-HANSEN, H. (1990) The Cysteine Switch - a Principle of Regulation of Metalloproteinase Activity with Potential Applicability to the Entire Matrix Metalloproteinase Gene Family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, S. 5578-5582
153. VISSÉ, R. und NAGASE, H. (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases - Structure, function, and biochemistry. *Circulation Research* 92, S. 827-839
154. WOLF, H. F., RATEITSCHAK, E. M., RATEITSCHAK, K. H. und HASSELL, T. M. (2005) Periodontology. In: RATEITSCHAK, K. H. und WOLF, H. F. (Hrsg.): *Color Atlas of Dental Medicine*. 3. Aufl., Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag
155. WHYTE, A., BONASTRE, C., MONTEAGUDO, L. V., LES, F., OBON, J., WHYTE, J. und TEJEDOR, M. T. (2014). Canine stage 1 periodontal disease: a latent pathology. *Veterinary Journal* 201, S. 118-120
156. WHYTE, A., OBON, J., LEUZA, A., WHYTE, J. und MONTEAGUDO L. V. (2013) Canine Severe Maxilla and Mandible Osteolysis Associated with Periodontal Disease Unperceived by Proprietors. *Pakistan Veterinary Journal* 33, S. 263-265

M. Anhang

10. Untersuchungsergebnisse

10.1 Signalement und Ergebnisse der klinischen Untersuchung der Hunde

Tabelle 7: Übersicht über die untersuchten Hunde

Proband	Rasse	Geschlecht	Alter	Gewicht
H1	Mischling	Männlich	1 J. 10 M	11,4 kg
H2	Russkiy Toy	Männlich-kastriert	2,5 J	2,95 kg
H3	Mischling	Weiblich-kastriert	3 J.	7,2 kg
H4	Westfahlen Terrier	Weiblich	2 J. 6 M	8,0 kg
H5	Mischling	Männlich kastriert	4 J.	25,0 kg
H6	Collie Langhaar	Männlich	8 J. 9 M.	30,0 kg
H7	Rauhaardackel	Weiblich-kastriert	5 J. 6 M.	4,4 kg
H8	Rauhaardackel	Männlich-kastriert	4 J.	5,5 kg
H9	Berner Sennenhund	Weiblich	5 J. 5 M.	52,0 kg
H10	Mischling	Männlich-kastriert	8 J. 5 M.	16,6 kg
H11	Mischling	Männlich	4 J. 5 M.	16,5 kg
H12	Beagle	Männlich-kastriert	3 J. 9 M.	10,8 kg
H13	Beagle	Weiblich-kastriert	5 J. 9 M.	9,8 kg
H14	Deutscher Schäferhund	Weiblich-kastriert	10 J.	39,5 kg
H15	Border Terrier	Weiblich	2 J.	7,4 kg
H16	Yorkshire Terrier	Weiblich	5 J.	8,8 kg
H17	Irish Setter	Weiblich	7 J. 4 M.	31,3 kg
H18	Beagle	Weiblich	11 J.	14,0 kg
H19	Mischling	Männlich	3 J. 3 M.	15,6 kg
H20	Beagle	Männlich-kastriert	4 J. 5 M.	10,9 kg
H21	Lagotto Romagnolo	Männlich	5 J.	14,9 kg
H22	Jack Russel Terrier	Männlich-kastriert	9 J. 7 M.	8,2 kg
H23	Airedale Terrier	Männlich	7 J.	31,3 kg
H24	Jack Russel Terrier	Männlich-kastriert	7 J. 5 M.	8,5 kg

H25	Deutscher Schäferhund	Weiblich	1 J.	32,0 kg
H26	Shetland Sheepdog	Männlich	5 J.	8,3 kg
H27	Berner Sennenhund	Männlich-kastriert	1 J. 2 M.	36,0 kg
H28	Großpudel	Männlich	9 J.	19,5 kg
H29	Bernhardiner	Weiblich	1 J. 4 M.	65,0 kg
H30	Mischling	Weiblich	7 J. 8 M.	23,0 kg
H31	Mischling	Weiblich	10 J. 5 M.	15,4 kg
H32	Mischling	Männlich	11 J.	8,2 kg
H33	Coton de Tulear	Männlich	6 J. 5 M.	6,75 kg
H34	Mischling	Weiblich	10 J. 8 M.	6,05 kg
H35	Beagle	Männlich	8 J. 7 M.	10,25 kg
H36	Beagle	Männlich-kastriert	4 J. 5 M.	10,45 kg
K1	Deutscher Schäferhund	Weiblich	1 J. 2 M.	25,3 kg
K2	Golden Retriever	Weiblich	1 J. 1 M.	25,0 kg
K3	Golden Retriever	Männlich	1 J. 1 M.	27,0 kg
K4	Englisch Springer Spaniel	Männlich	1 J.	21,9 kg
K5	Labrador Retriever	Männlich	1J.	23,7 kg
K7	Golden Retriever	Männlich	1 J. 2 M.	27,6 kg
K8	Collie Kurzhaar	Weiblich	1 J.	15 kg
K10	Labrador Retriever	Weiblich	1 J. 3 M.	21,0 kg
K11	Labrador Retriever	Weiblich	1 J. 2 M.	24,7 kg
K12	Labrador Retriever	Männlich	1 J. 3 M.	27,4 kg
K13	Bernhardiner	Weiblich	2 J.	52,0 kg
K14	Bernhardiner	Weiblich	1 J. 3 M.	53,7 kg
K15	Rhodesian Ridgeback	Männlich	1 J. 7 M.	45,2 kg
K16	Golden Retriever	Weiblich	1 J. 5 M.	28,0 kg
K17	Labrador Retriever	Männlich	1 J.	26,2 kg
K18	Schafpudel	Weiblich	1 J.	19,5 kg
K19	Golden Retriever	Männlich	1 J. 2 M.	28,5 kg
K20	Deutscher Schäferhund	Weiblich	1 J. 1 M.	29,0 kg

K21	Labrador Retriever	Männlich	1 J.	38,0 kg
K22	Deutscher Schäferhund	Männlich	1 J.	40,0 kg

H = Hund, J = Jahr(e), K = Kontrolltier, kg = Kilogramm, M = Monat(e)

Tabelle 8: Aufstellung der klinischen Untersuchungsergebnisse der beprobten Zähne

Proband	Zahn	Zahnstein (Grad)	Gingivitis (Grad)	Gingivarezession (mm)	Taschentiefe (mm)	Furkationsbefall (Grad)	Mobilität (Grad)
H1	a1	2	2	0	3	0	0
H1	a2	2	2	0	3	0	0
H1	b	2	1	0	2	1	0
H1	c	2	0	0	1	0	0
H1	d	1	2	0	2	0	0
H1	e1	2	2	0	3	0	0
H1	e2	2	2	0	3	0	0
H1	f	2	0	0	2	0	0
H1	g	1	2	0	1	0	0
H1	h	0	2	0	1	0	0
H10	a1	2	0	0	2	0	0
H10	a2	2	0	0	2	0	0
H10	b	3	2	0	0	0	0
H10	c	0	0	0	0	0	0
H10	d	1	0	0	0	0	0
H10	e1	2	0	0	0	0	0
H10	e2	2	0	0	0	0	0
H10	f	3	1	0	2	0	0
H10	g	0	0	0	0	1	0
H10	h	0	0	0	4	0	1
H11	a1	2	1	0	0	0	0
H11	a2	2	1	0	0	0	0
H11	b	1	1	0	0	0	0
H11	c	1	0	0	0	0	0
H11	d	1	0	0	0	0	0
H11	e1	1	1	0	0	0	0

H11	e2	1	1	1	0	0	0	0	0	0
H11	f	1	1	1	0	0	0	0	0	0
H11	g	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H11	h	1	0	0	0	0	0	0	0	0
H12	a1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
H12	a2	1	1	1	0	0	0	0	0	0
H12	b	2	2	2	0	0	4	0	0	0
H12	c	0	1	1	0	0	0	1	0	0
H12	d	1	1	1	0	0	0	0	0	1
H12	e1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H12	e2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H12	f	2	1	1	0	0	5	0	0	0
H12	g	2	1	1	0	0	0	0	0	0
H12	h	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H13	a1	2	2	2	0	0	0	0	0	0
H13	a2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
H13	b	3	2	2	0	0	0	0	0	0
H13	c	1	1	1	0	0	0	0	0	0
H13	d	2	2	2	0	0	0	0	0	0
H13	e1	2	2	2	0	0	0	0	0	0
H13	e2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
H13	f	3	2	2	0	0	0	0	0	0
H13	g	1	2	2	0	0	0	0	0	0
H13	h	2	2	2	0	0	0	0	0	0
H14	a1	1	2	2	0	0	0	0	0	0
H14	a2	1	2	2	0	0	0	0	0	0
H14	b	3	2	2	0	0	0	0	0	0
H14	c	1	2	2	0	0	0	0	0	0
H14	d	0	1	1	-3	0	0	0	0	0

H14	e1	2	2	0	0	0	0	0	0
H14	e2	2	2	0	0	0	0	0	0
H14	f	3	2	0	0	0	0	0	0
H14	g	0	2	0	0	0	0	0	0
H14	h	0	2	-2	0	0	0	0	0
H15	a1	2	1	0	0	0	0	0	0
H15	a2	2	1	0	0	0	0	0	0
H15	b	2	2	0	0	0	0	0	0
H15	c	0	0	0	0	0	0	0	0
H15	d	1	0	0	0	0	0	0	0
H15	e1	2	2	0	0	0	0	0	0
H15	e2	2	2	0	0	0	0	0	0
H15	f	2	2	0	0	0	0	0	0
H15	g	0	0	0	0	0	0	0	0
H15	h	1	2	0	0	0	0	0	0
H16	a1	2	2	0	0	4	0	0	0
H16	a2	2	2	0	0	4	0	0	0
H16	b	3	2	0	0	0	0	0	0
H16	c	1	1	0	0	0	0	0	0
H16	d	1	1	0	0	0	0	0	0
H16	e1	2	2	0	0	5	0	0	0
H16	e2	2	2	0	0	4	0	0	0
H16	f	3	2	0	0	0	0	0	0
H16	g	1	1	0	0	0	0	0	0
H16	h	1	1	0	0	0	0	0	0
H17	a1	2	2	0	0	2	0	0	0
H17	a2	2	2	0	0	6	0	0	0
H17	b	2	1	0	0	0	0	0	0
H17	c	1	0	0	0	0	0	0	0

H17	d	2	2	0	0	4	0	0	0
H17	e1	2	2	0	0	0	0	0	0
H17	e2	2	2	0	0	5	0	0	0
H17	f	2	1	0	0	0	0	0	0
H17	g	1	1	0	0	0	0	0	0
H17	h	2	2	0	0	4	0	0	0
H18	a1	2	2	0	0	0	0	0	0
H18	a2	2	2	0	0	0	0	0	0
H18	b	3	2	0	0	0	0	0	0
H18	c	2	2	0	0	0	0	0	0
H18	d	2	2	0	0	4	0	0	0
H18	e1	2	2	0	0	0	0	0	0
H18	e2	2	2	0	0	0	0	0	0
H18	f	3	2	0	0	0	0	0	0
H18	g	2	2	0	0	0	0	0	0
H18	h	2	2	0	0	4	0	0	0
H19	a1	2	2	0	0	6	0	0	0
H19	a2	2	2	0	0	6	0	0	0
H19	b	3	2	0	0	0	0	0	0
H19	c	2	1	0	0	0	0	0	0
H19	d	1	0	0	0	4	0	0	0
H19	e1	2	1	0	0	4	0	0	0
H19	e2	2	1	0	0	4	0	0	0
H19	f	3	2	0	0	0	0	0	0
H19	g	1	1	0	0	0	0	0	0
H19	h	1	0	0	0	0	0	0	0
H2	a1	1	1	-1	1	1	0	0	0
H2	a2	1	1	-1	1	1	0	0	0
H2	b	0	2	0	0	3	2	2	0

H2	c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H2	d	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
H2	e1	2	1	-1	-1	1	0	0	0	0	0	0
H2	e2	2	1	-1	-1	1	0	0	0	0	0	0
H2	f	2	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0
H2	g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H2	h	1	2	-1	-1	1	0	0	0	0	0	0
H20	a1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H20	a2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H20	b	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H20	c	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
H20	d	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H20	e1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H20	e2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H20	f	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H20	g	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H20	h	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H21	a1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H21	a2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H21	b	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H21	c	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H21	d	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H21	e1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H21	e2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H21	f	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H21	g	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H21	h	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H22	a1	3	2	-2	-2	8	0	0	0	0	0	0
H22	a2	3	2	-2	-2	8	0	0	0	0	0	0

H22	b	2	2	0	0	4	0	0	0
H22	c	0	0	0	0	0	0	0	0
H22	d	2	2	-2	-2	10	0	0	0
H22	e1	3	2	-2	-2	4	0	0	0
H22	e2	3	2	-2	-2	10	0	0	0
H22	f	2	1	0	0	0	0	0	0
H22	g	0	2	0	0	0	0	0	0
H22	h	3	2	-2	-2	8	0	0	0
H23	a1	1	2	0	0	0	0	0	0
H23	a2	1	2	0	0	0	0	0	0
H23	b	2	2	-4	-4	2	2	0	0
H23	c	1	0	0	0	0	0	0	0
H23	d	2	2	-2	-2	8	0	0	0
H23	e1	2	2	-2	-2	0	0	0	0
H23	e2	2	2	-2	-2	0	0	0	0
H23	f	0	2	-6	-6	6	3	0	0
H23	g	1	0	0	0	0	0	0	0
H23	h	1	2	0	0	4	0	0	0
H24	a1	2	2	0	0	0	0	0	0
H24	a2	2	2	0	0	0	0	0	0
H24	b	3	2	0	0	4	1	0	0
H24	c	1	2	0	0	0	0	0	0
H24	d	2	2	0	0	0	0	0	0
H24	e1	2	2	0	0	0	0	0	0
H24	e2	2	2	0	0	0	0	0	0
H24	f	3	2	0	0	4	1	0	0
H24	g	1	2	0	0	0	0	0	0
H24	h	2	2	0	0	0	0	0	0
H25	a1	0	0	0	0	0	0	0	0

H25	a2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H25	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H25	c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H25	d	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
H25	e1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H25	e2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H25	f	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H25	g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H25	h	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
H26	a1	2	2	0	0	0	3	0	0	0	0	0
H26	a2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H26	b	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H26	c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H26	d	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H26	e1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H26	e2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H26	f	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H26	g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H26	h	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H27	a1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H27	a2	1	1	0	0	5	0	0	0	0	0	0
H27	b	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H27	c	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H27	d	1	1	0	0	4	0	0	0	0	0	0
H27	e1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H27	e2	1	2	0	0	6	0	0	0	0	0	0
H27	f	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H27	g	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H27	h	1	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0

H28	a1	2	2	2	-1	2	0	0
H28	a2	2	2	2	-1	2	0	0
H28	b	2	2	2	0	0	0	0
H28	c	1	2	2	0	0	0	0
H28	d	1	2	2	0	0	0	0
H28	e1	2	2	2	0	0	0	0
H28	e2	2	2	2	0	0	0	0
H28	f	2	2	2	0	0	0	0
H28	g	1	2	2	0	0	0	0
H28	h	2	2	2	-2	0	0	0
H29	a1	0	1	0	0	0	0	0
H29	a2	0	1	0	0	4	0	0
H29	b	1	2	2	0	0	0	0
H29	c	0	2	2	0	3	0	0
H29	d	1	2	2	0	0	0	0
H29	e1	0	1	0	0	0	0	0
H29	e2	0	1	0	0	0	0	0
H29	f	1	1	0	0	0	0	0
H29	g	0	2	0	0	0	0	0
H29	h	1	2	2	0	4	0	0
H3	a1	2	2	2	-1	3	0	0
H3	a2	2	2	2	-1	2	0	0
H3	b	3	2	2	0	3	0	0
H3	c	0	1	0	0	1	1	0
H3	d	0	2	2	0	3	0	0
H3	e1	2	2	2	-2	3	0	0
H3	e2	2	2	2	-2	3	0	0
H3	f	2	2	2	0	2	0	0
H3	g	1	1	1	0	1	0	0

H3	h	1	2	0	2	0	0	0	0
H30	a1	2	3	0	0	0	0	0	0
H30	a2	2	3	-6	0	0	0	0	0
H30	b	2	3	-4	0	0	3	0	0
H30	c	2	3	-2	4	2	2	0	0
H30	d	1	2	-2	0	0	0	0	0
H30	e1	0	3	0	0	0	0	0	0
H30	e2	0	3	-6	2	0	0	0	0
H30	f	2	2	-2	2	2	1	0	0
H30	g	0	2	0	0	0	0	0	0
H30	h	0	2	-2	0	0	0	0	0
H31	a1	0	2	0	0	0	0	0	0
H31	a2	0	2	0	0	0	0	0	0
H31	b	2	2	0	0	0	0	0	0
H31	c	0	2	0	0	0	0	0	0
H31	d	0	2	0	0	0	0	0	0
H31	e1	0	0	0	0	0	0	0	0
H31	e2	0	0	0	0	0	0	0	0
H31	f	2	2	0	0	0	0	0	0
H31	g	0	2	0	0	0	0	0	0
H31	h	0	2	0	0	0	0	0	0
H32	a1	3	2	0	0	0	0	0	0
H32	a2	3	2	0	0	0	0	0	0
H32	b	3	2	0	0	0	0	0	0
H32	c	1	1	0	0	0	0	0	0
H32	d	3	2	-6	6	0	0	0	0
H32	e1	3	2	0	4	0	0	0	0
H32	e2	3	2	0	0	0	0	0	0
H32	f	2	2	-3	0	0	3	0	0

H32	g	2	2	0	0	0	0	0	3
H32	h	2	2	0	0	0	0	0	0
H33	a1	1	2	0	0	0	0	0	0
H33	a2	1	2	0	0	0	0	0	0
H33	b	3	2	0	0	6	0	0	0
H33	c	3	2	0	0	0	0	0	0
H33	d	0	2	0	0	0	0	0	0
H33	e1	1	2	0	0	0	0	0	0
H33	e2	1	2	0	0	0	0	0	0
H33	f	3	2	0	0	0	1	0	0
H33	g	3	2	0	0	0	0	0	0
H33	h	0	2	0	0	0	0	0	0
H34	a1	1	2	0	0	0	0	0	0
H34	a2	1	2	0	0	0	0	0	0
H34	b	1	2	0	0	4	3	1	0
H34	c	0	1	-2	2	0	0	0	0
H34	d	1	2	-4	6	0	0	0	0
H34	e1	1	2	0	0	0	0	0	0
H34	e2	1	2	0	0	0	0	0	0
H34	f	1	2	0	0	0	1	0	0
H34	g	0	2	0	0	4	0	0	1
H34	h	1	2	0	0	0	0	0	0
H35	a1	1	2	0	0	0	0	0	0
H35	a2	1	2	0	0	0	0	0	0
H35	b	2	2	0	0	0	1	0	0
H35	c	1	2	0	0	0	0	0	1
H35	d	1	2	0	0	4	0	0	0
H35	e1	1	2	0	0	0	0	0	0
H35	e2	1	2	0	0	0	0	0	0

H35	f	2	2	0	0	0	0	1	0	0
H35	g	1	1	0	0	0	0	0	1	0
H35	h	1	2	0	0	4	0	0	0	0
H36	a1	2	1	0	0	0	0	0	0	0
H36	a2	2	1	0	0	0	0	0	0	0
H36	b	2	2	0	0	0	0	0	0	0
H36	c	1	2	0	0	0	0	0	0	0
H36	d	1	2	0	0	0	0	0	0	0
H36	e1	2	1	0	0	4	0	0	0	0
H36	e2	2	1	0	0	4	0	0	0	0
H36	f	2	2	0	0	0	0	0	0	0
H36	g	1	2	0	0	0	0	0	0	0
H36	h	1	1	0	0	0	0	0	0	0
H4	a1	2	0	0	0	2	0	0	0	0
H4	a2	2	0	0	0	2	0	0	0	0
H4	b	3	0	0	0	1	0	0	0	0
H4	c	2	2	0	0	2	0	0	0	0
H4	d	1	0	0	0	2	0	0	0	0
H4	e1	2	1	0	0	2	0	0	0	0
H4	e2	2	1	0	0	2	0	0	0	0
H4	f	2	1	0	0	0	0	0	0	0
H4	g	1	0	0	0	1	0	0	0	0
H4	h	1	0	0	0	1	0	0	0	0
H4		1	2	0	0	2	0	0	0	0
H5	a1	1	1	0	0	2	0	0	0	0
H5	a2	1	1	0	0	2	0	0	0	0
H5	b	2	1	0	0	1	0	0	0	0
H5	c	1	1	0	0	1	0	0	0	0
H5	d	1	1	+1	1	1	0	0	0	0
H5	e1	1	2	0	0	2	0	0	0	0

H5	e2	1	2	0	2	0	0	0	0
H5	f	1	2	0	1	0	0	0	0
H5	g	1	1	0	1	0	1	0	0
H5	h	1	1	0	2	0	0	0	0
H6	a1	2	2	0	3	0	0	0	0
H6	a2	2	2	0	3	0	0	0	0
H6	b	2	0	0	1	0	0	0	0
H6	c	1	0	0	1	0	0	0	0
H6	d	1	2	0	6	0	0	0	0
H6	e1	2	2	0	6	0	0	0	0
H6	e2	2	2	0	6	0	0	0	0
H6	f	3	1	0	1	0	0	0	0
H6	g	0	0	0	1	0	0	0	0
H6	h	1	2	0	10	0	0	0	0
H7	a1	2	1	0	3	0	0	0	0
H7	a2	2	1	0	3	0	0	0	0
H7	b	3	0	0	2	0	0	0	0
H7	c	1	0	0	1	0	0	0	0
H7	d	1	0	0	1	0	0	0	0
H7	e1	3	0	-1	5	0	0	0	0
H7	e2	3	0	-1	5	0	0	0	0
H7	f	3	0	0	1	0	0	0	0
H7	g	1	0	0	1	0	0	0	0
H7	h	1	0	0	3	0	0	0	0
H8	a1	2	0	0	1	0	0	0	0
H8	a2	2	0	0	1	0	0	0	0
H8	b	3	1	0	1	0	0	0	0
H8	c	0	0	0	1	0	0	0	0
H8	d	1	0	0	1	0	0	0	0

H8	e1	2	0	0	0	1	0	0	0
H8	e2	2	0	0	0	1	0	0	0
H8	f	3	1	0	0	1	0	0	0
H8	g	1	0	0	0	1	0	0	0
H8	h	1	0	0	0	1	0	0	0
H9	a1	1	0	0	0	4	0	0	0
H9	a2	1	0	0	0	4	0	0	0
H9	b	3	0	0	0	0	0	0	0
H9	c	1	0	0	0	0	0	0	0
H9	d	1	1	0	0	4	0	0	0
H9	e1	2	1	0	0	0	0	0	0
H9	e2	2	1	0	0	0	0	0	0
H9	f	3	1	0	0	0	0	0	0
H9	g	0	0	0	0	0	0	0	0
H9	h	2	1	0	0	4	0	0	0
K1	a1	0	0	0	0	0	0	0	0
K1	a2	0	0	0	0	0	0	0	0
K1	b	0	0	0	0	0	0	0	0
K1	c	0	0	0	0	0	0	0	0
K1	d	0	0	0	0	0	0	0	0
K1	e1	0	0	0	0	0	0	0	0
K1	e2	0	0	0	0	0	0	0	0
K1	f	0	0	0	0	0	0	0	0
K1	g	0	0	0	0	0	0	0	0
K1	h	0	0	0	0	0	0	0	0
K10	a1	0	0	0	0	0	0	0	0
K10	a2	0	0	0	0	0	0	0	0
K10	b	0	0	0	0	0	0	0	0
K10	c	0	0	0	0	0	0	0	0

K10	d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K10	e1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K10	e2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K10	f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K10	g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K10	h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K11	a1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K11	a2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K11	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K11	c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K11	d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K11	e1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K11	e2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K11	f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K11	g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K11	h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K12	a1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K12	a2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K12	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K12	c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K12	d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K12	e1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K12	e2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K12	f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K12	g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K12	h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K13	a1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K13	a2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K13	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

K13	c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K13	d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K13	e1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K13	e2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K13	f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K13	g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K13	h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K14	a1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K14	a2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K14	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K14	c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K14	d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K14	e1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K14	e2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K14	f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K14	g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K14	h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K15	a1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K15	a2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K15	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K15	c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K15	d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K15	e1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K15	e2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K15	f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K15	g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K15	h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K16	a1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K16	a2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

K16	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K16	c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K16	d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K16	e1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K16	e2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K16	f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K16	g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K16	h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K17	a1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K17	a2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K17	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K17	c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K17	d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K17	e1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K17	e2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K17	f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K17	g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K17	h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K18	a1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K18	a2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K18	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K18	c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K18	d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K18	e1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K18	e2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K18	f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K18	g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K18	h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K19	a1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

K19	a2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K19	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K19	c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K19	d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K19	e1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K19	e2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K19	f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K19	g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K19	h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K2	a1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K2	a2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K2	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K2	c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K2	d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K2	e1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K2	e2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K2	f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K2	g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K2	h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K20	a1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K20	a2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K20	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K20	c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K20	d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K20	e1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K20	e2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K20	f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K20	g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K20	h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

K21	a1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K21	a2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K21	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K21	c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K21	d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K21	e1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K21	e2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K21	f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K21	g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K21	h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K22	a1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K22	a2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K22	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K22	c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K22	d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K22	e1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K22	e2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K22	f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K22	g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K22	h	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K3	a1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K3	a2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K3	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K3	c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K3	d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K3	e1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K3	e2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K3	f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K3	g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

K3	h	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K4	a1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K4	a2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K4	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K4	c	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K4	d	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K4	e1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K4	e2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K4	f	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K4	g	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K4	h	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K5	a1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K5	a2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K5	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K5	c	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K5	d	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K5	e1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K5	e2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K5	f	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K5	g	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K5	h	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K7	a1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K7	a2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K7	b	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K7	c	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K7	d	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K7	e1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K7	e2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K7	f	0	0	0	0	0	0	0	0	0

K7	g	0	0	0	0	0	0	0	0
K7	h	0	0	0	0	0	0	0	0
K8	a1	0	0	0	0	0	0	0	0
K8	a2	0	0	0	0	0	0	0	0
K8	b	0	0	0	0	0	0	0	0
K8	c	0	0	0	0	0	0	0	0
K8	d	0	0	0	0	0	0	0	0
K8	e1	0	0	0	0	0	0	0	0
K8	e2	0	0	0	0	0	0	0	0
K8	f	0	0	0	0	0	0	0	0
K8	g	0	0	0	0	0	0	0	0
K8	h	0	0	0	0	0	0	0	0

Buchstaben a1-h = Zähne a1-h, H = Hund, K = Kontrollier, mm = Millimeter

10.2 Darstellung der Enzymaktivitäten der unterschiedlichen Hundezähne in den Aktivitätsassays

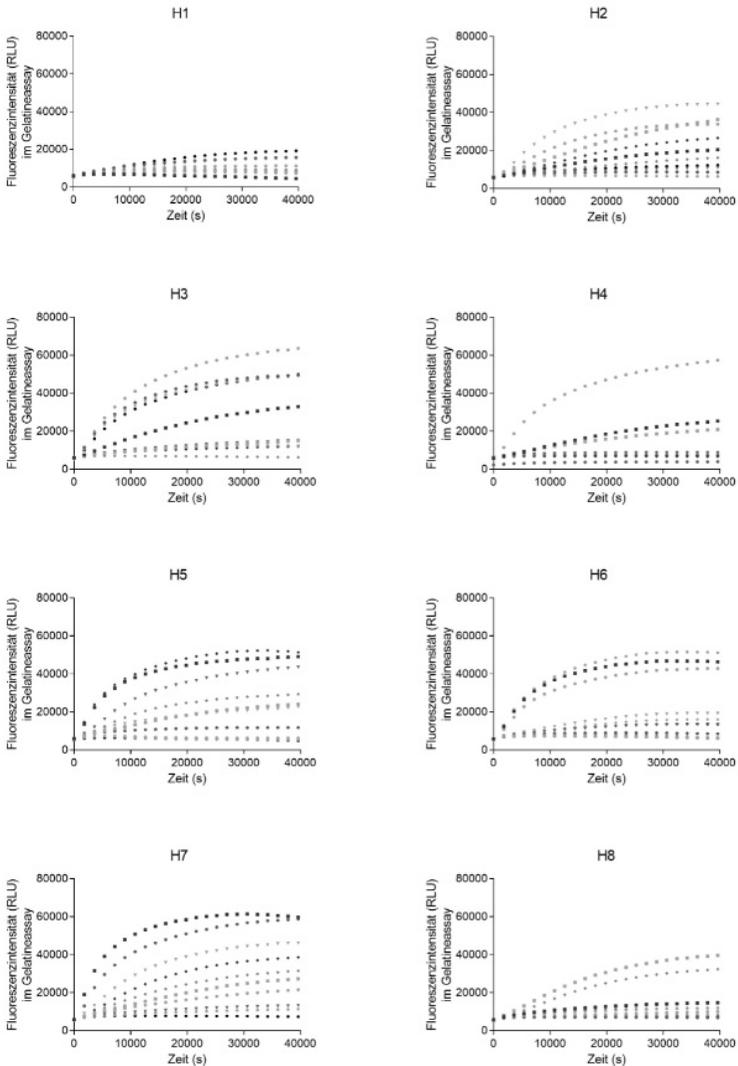


Abbildung 38: Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden H1-H8

DQ = dye quenched, H = Hund, RLU = relative light units, s = Sekunden

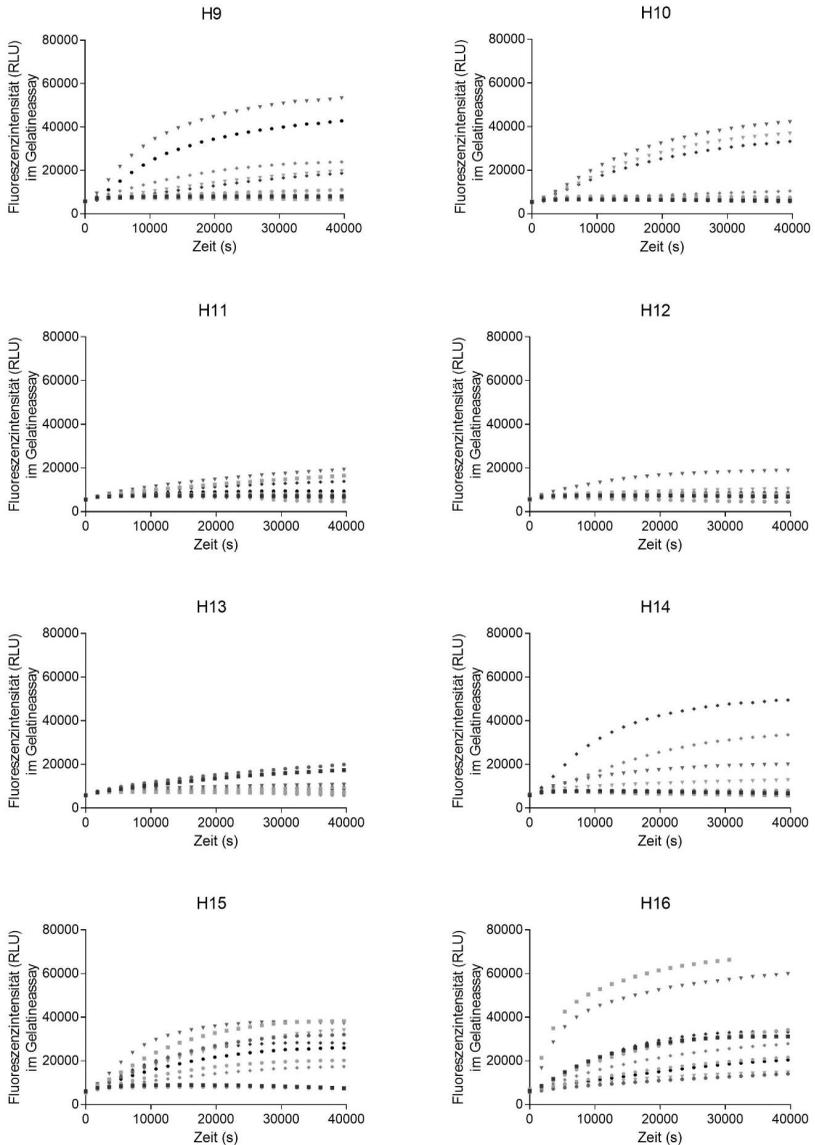


Abbildung 39: Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden H9-H16

DQ = dye quenched, H = Hund, RLU = relative light units, s = Sekunden

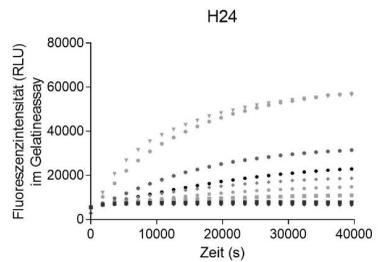
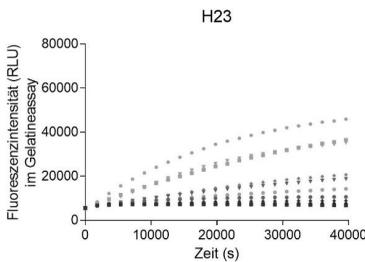
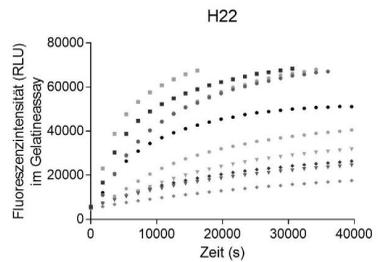
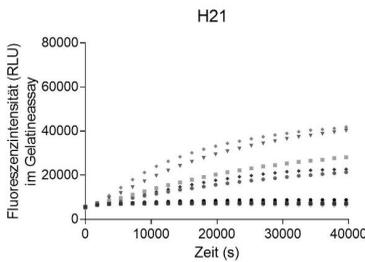
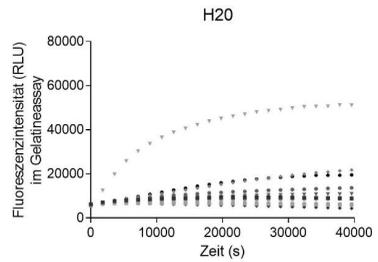
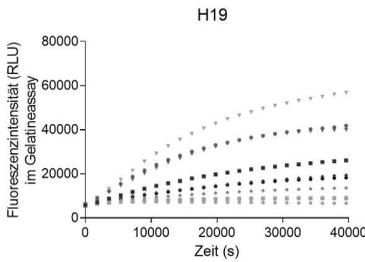
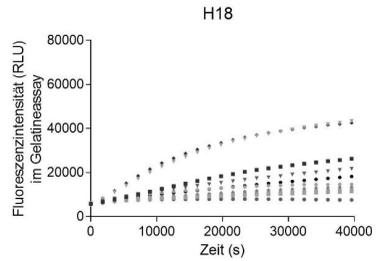
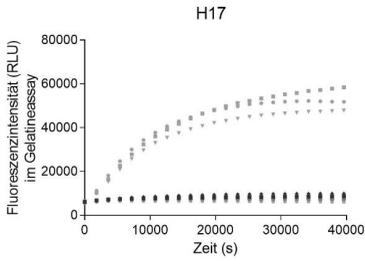


Abbildung 40: Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden H17-H24

DQ = dye quenched, H = Hund, RLU = relative light units, s = Sekunden

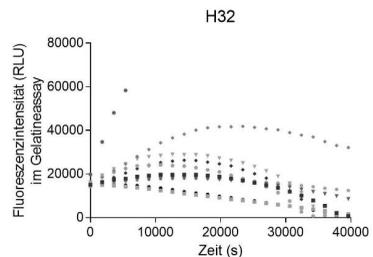
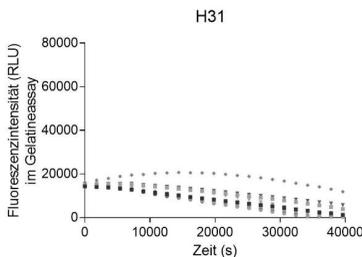
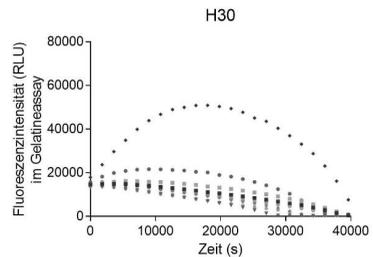
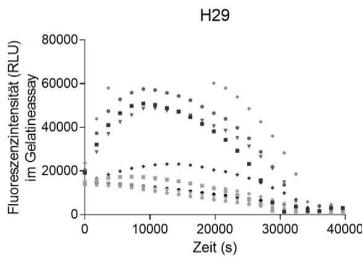
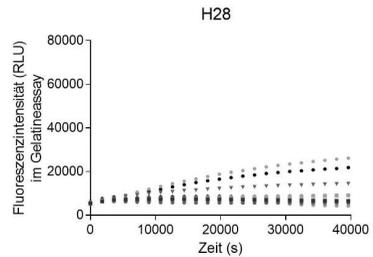
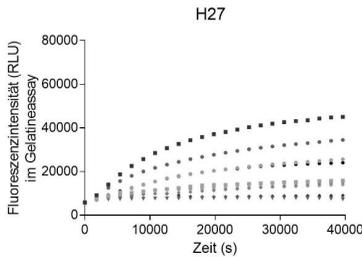
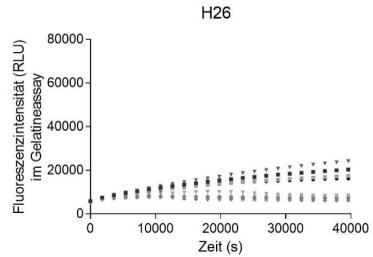
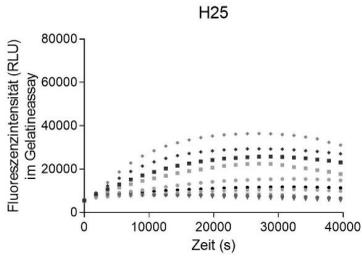


Abbildung 41: Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden H25-H32

DQ = dye quenched, H = Hund, RLU = relative light units, s = Sekunden

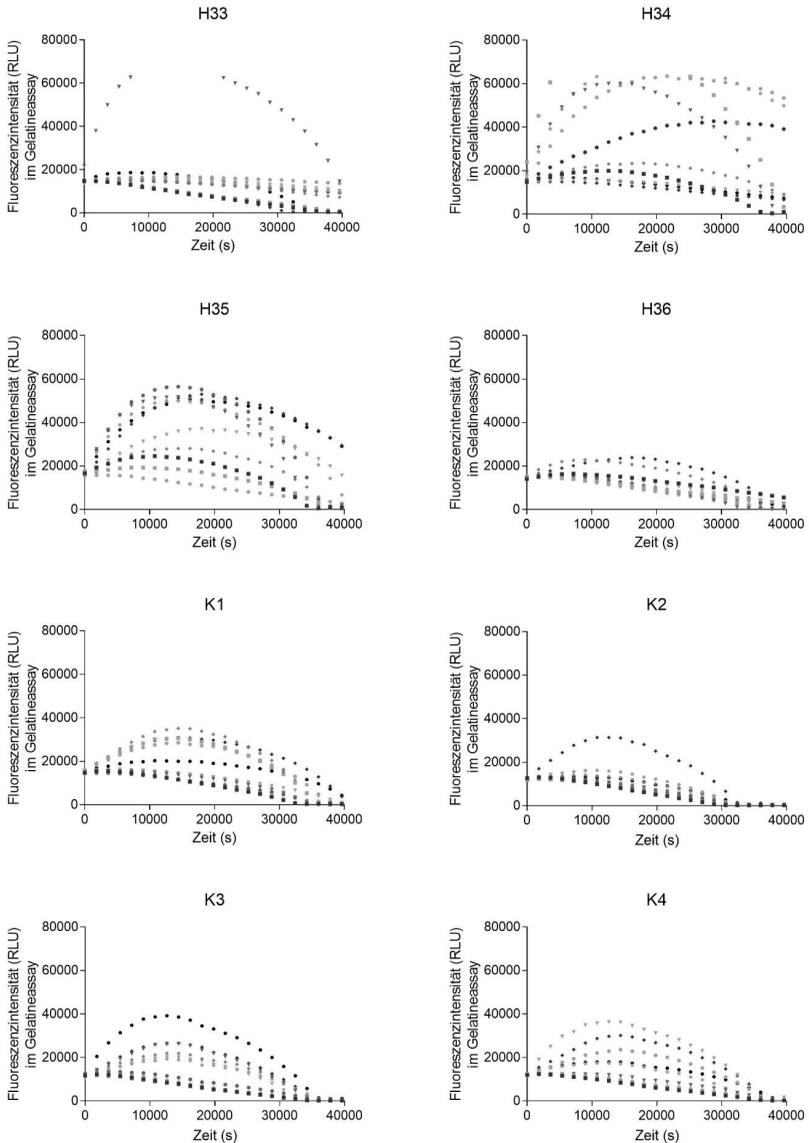


Abbildung 42: Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden H33-H36 und K1-K4

DQ = dye quenched, H = Hund, K = Kontrolltier, RLU = relative light units, s = Sekunden

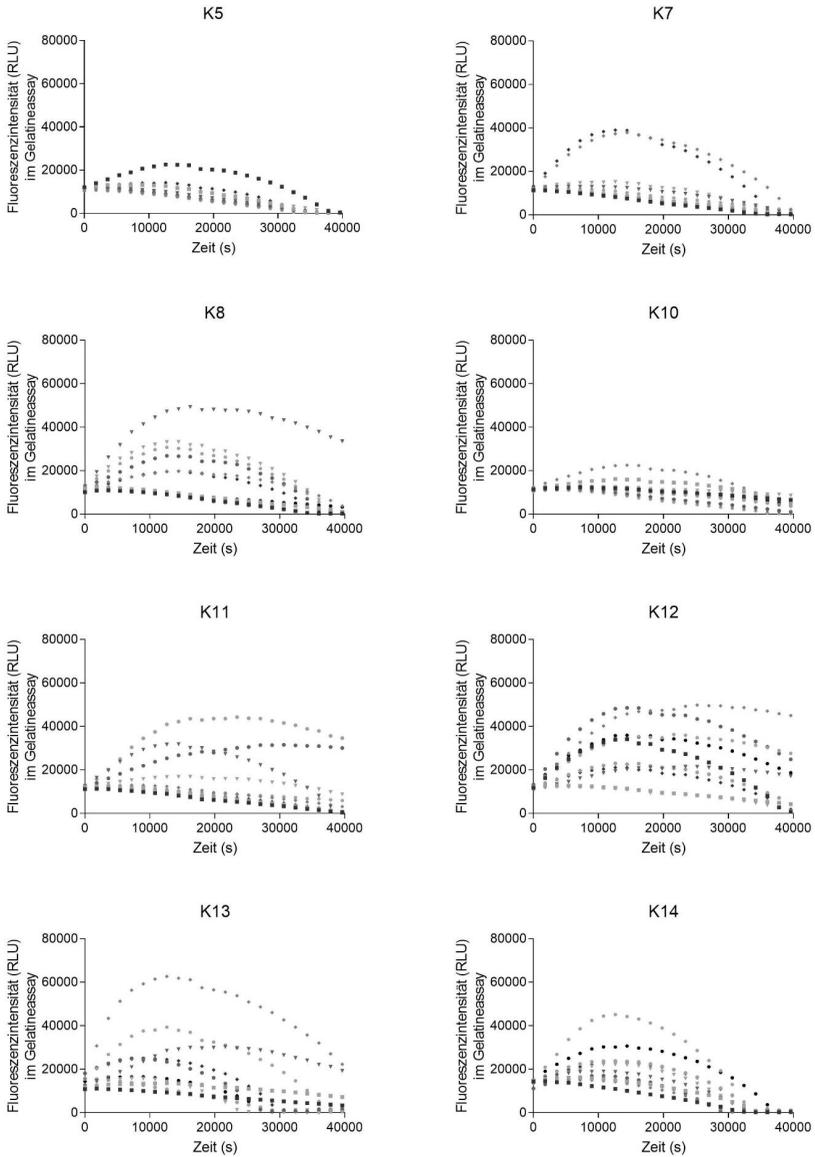


Abbildung 43: Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden K5-K14

DQ = dye quenched, K = Kontrolltier, RLU = relative light units, s = Sekunden

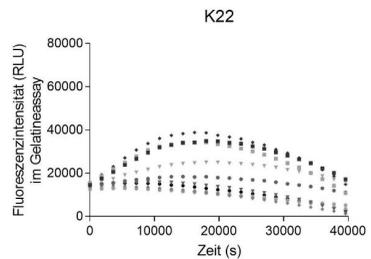
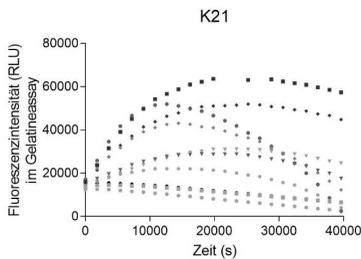
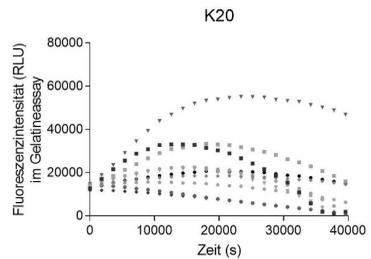
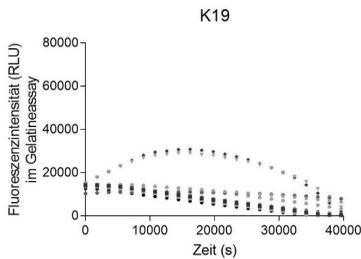
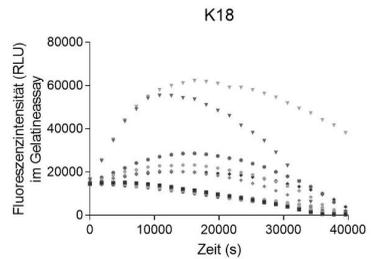
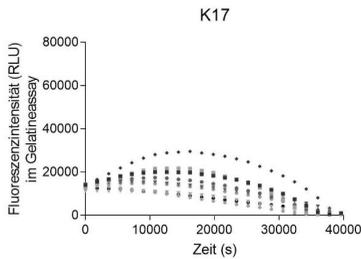
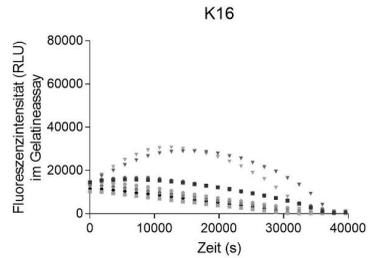
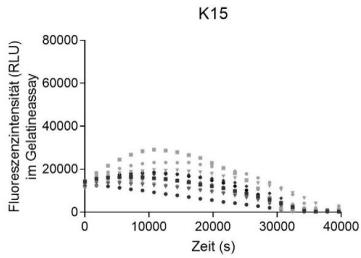


Abbildung 44: Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden K15-K22

DQ = dye quenched, K = Kontrolltier, RLU = relative light units, s = Sekunden

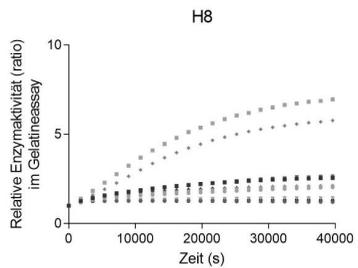
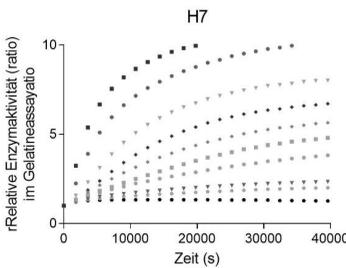
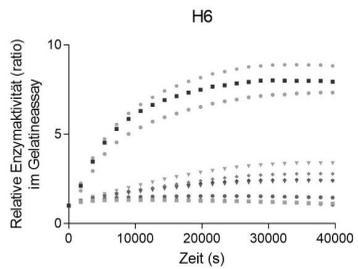
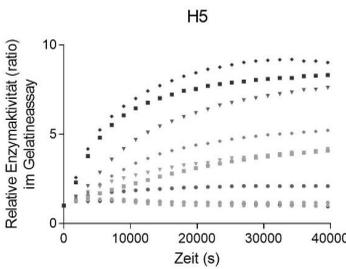
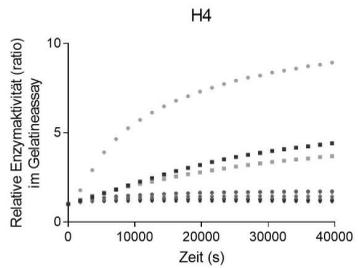
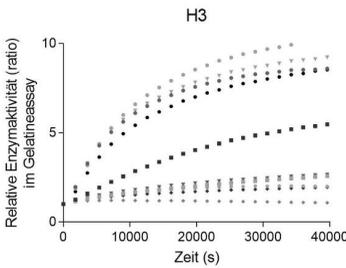
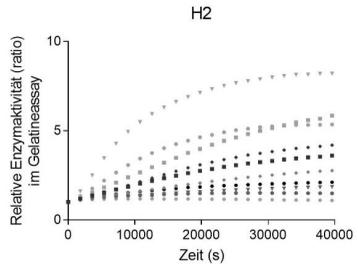
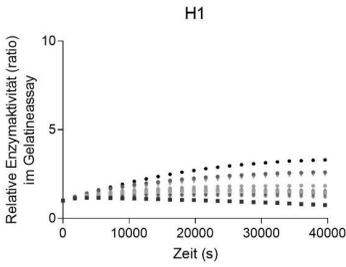


Abbildung 45: Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden H1-H8

DQ = dye quenched, H = Hund, s = Sekunden

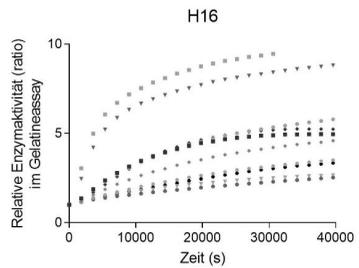
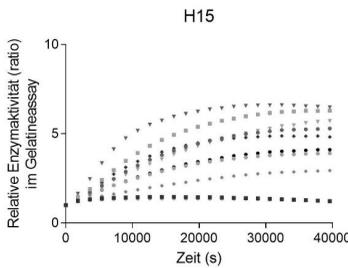
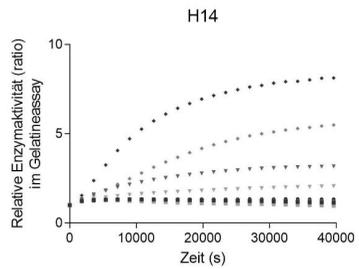
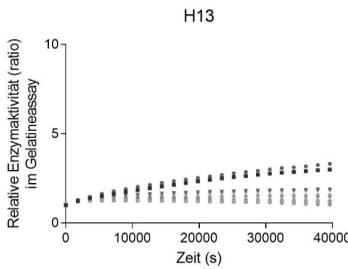
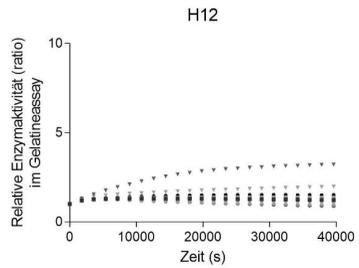
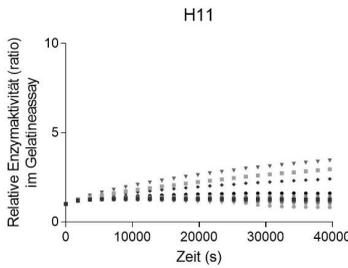
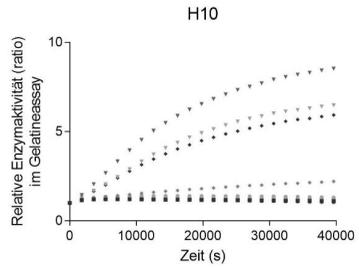
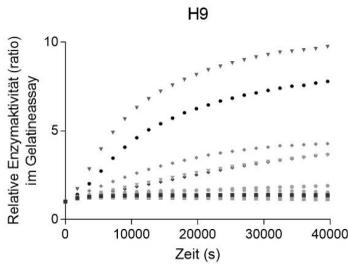


Abbildung 46: Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden H9-H16

DQ = dye quenched, H = Hund, s = Sekunden

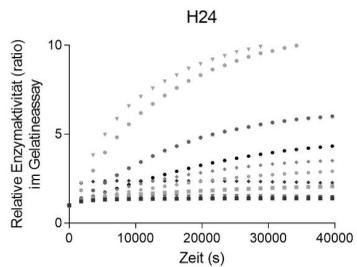
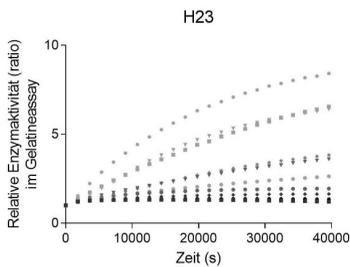
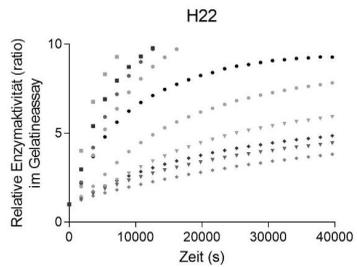
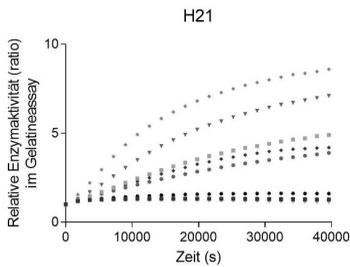
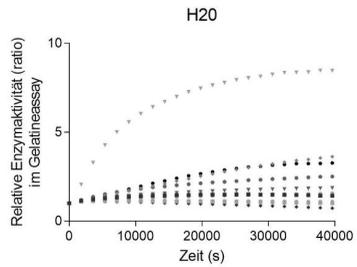
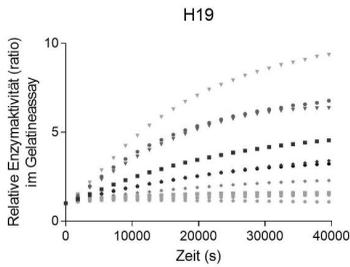
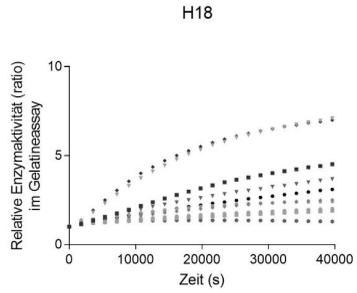
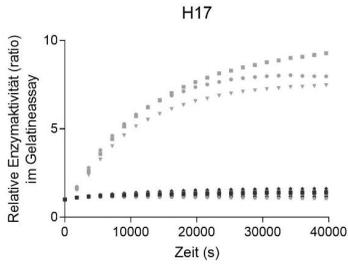


Abbildung 47: Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden H17-H24

DQ = dye quenched, H = Hund, s = Sekunden

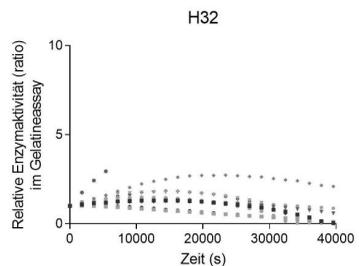
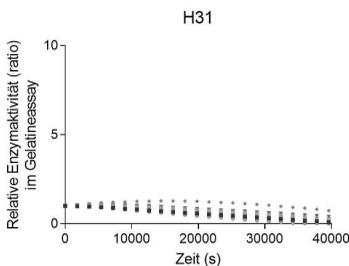
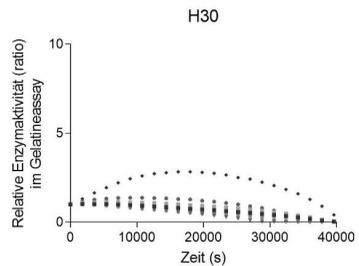
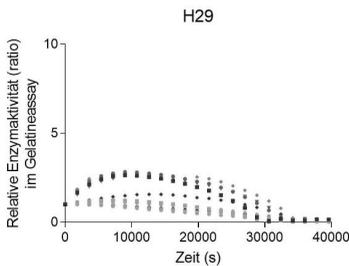
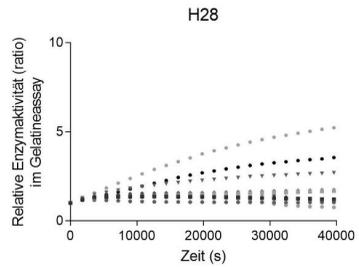
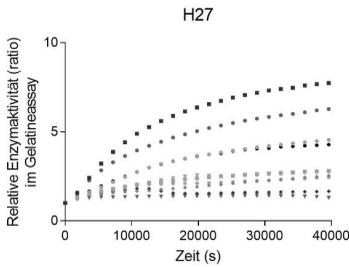
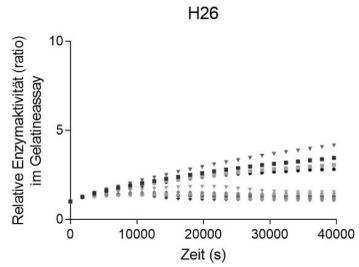
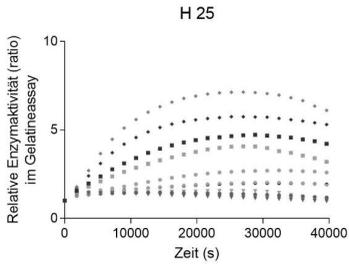


Abbildung 48: Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden H25-H32

DQ = dye quenched, H = Hund, s = Sekunden

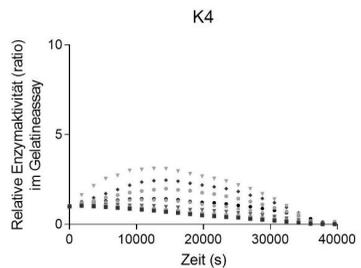
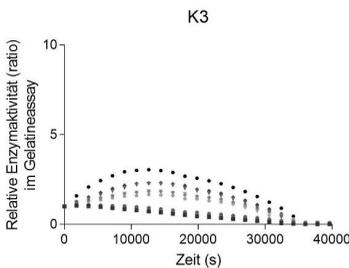
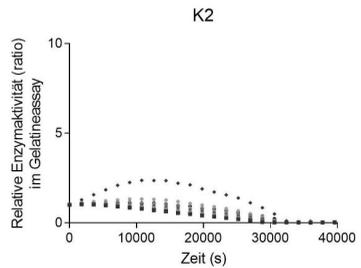
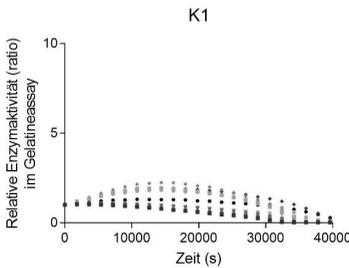
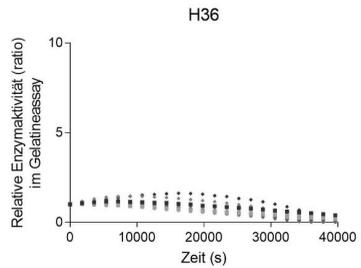
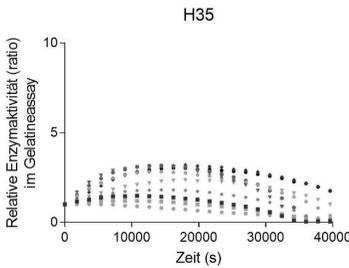
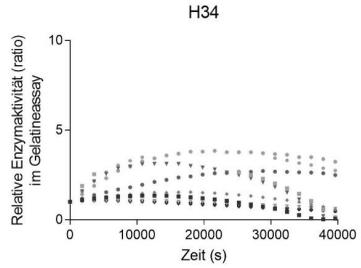
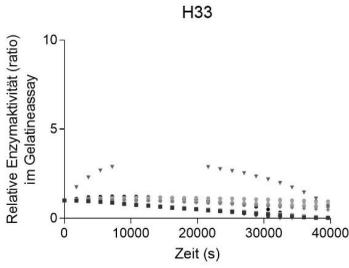


Abbildung 49: Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden H32-H36 und K1-K4

DQ = dye quenched, H = Hund, K = Kontrolltier, s = Sekunden

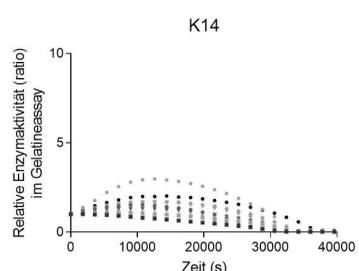
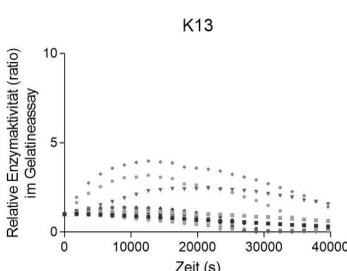
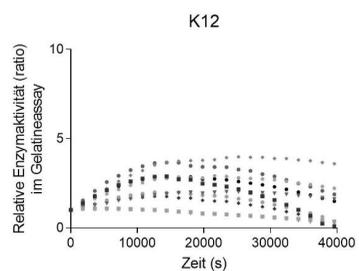
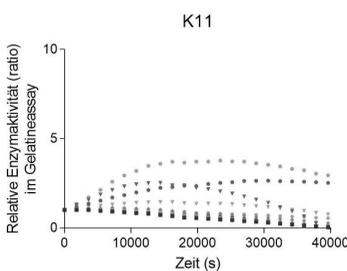
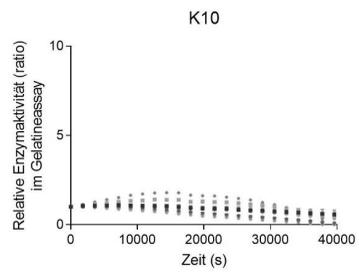
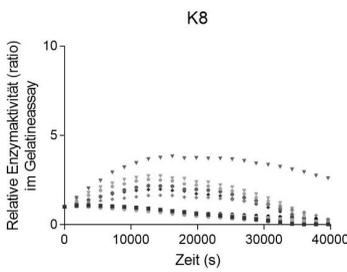
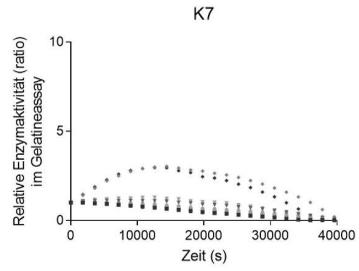
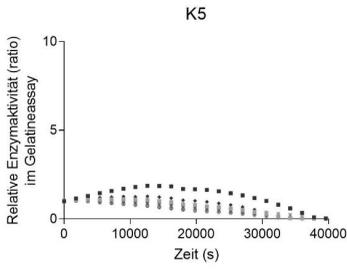


Abbildung 50: Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden K5-K14

DQ = dye quenched, H = Hund, K = Kontrolltier, s = Sekunden

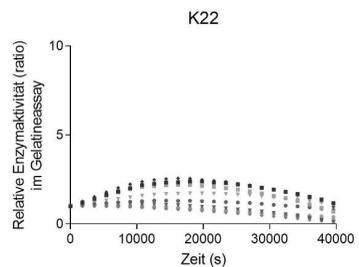
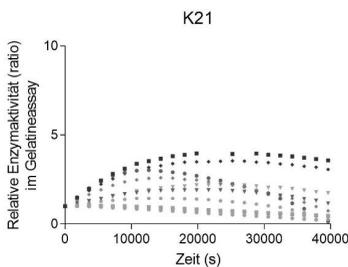
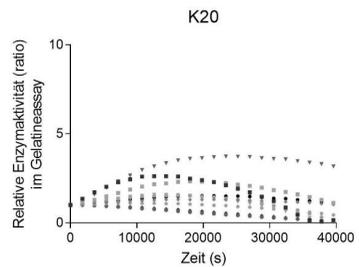
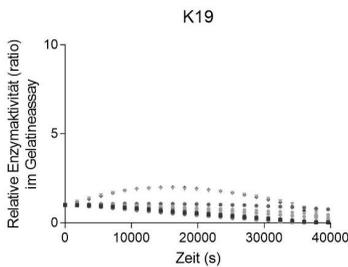
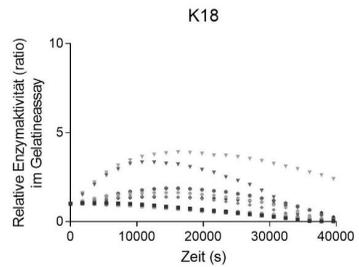
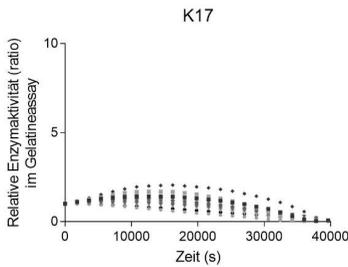
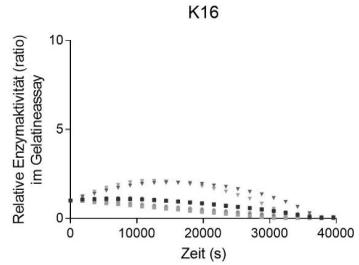
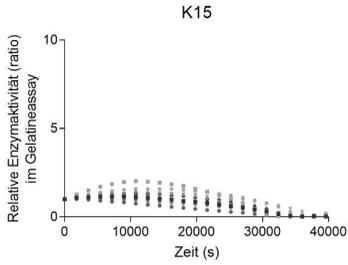


Abbildung 51: Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Gelatineassay nach Zeit für die Probanden K15-K22

DQ = dye quenched, H = Hund, K = Kontrolltier, s = Sekunden

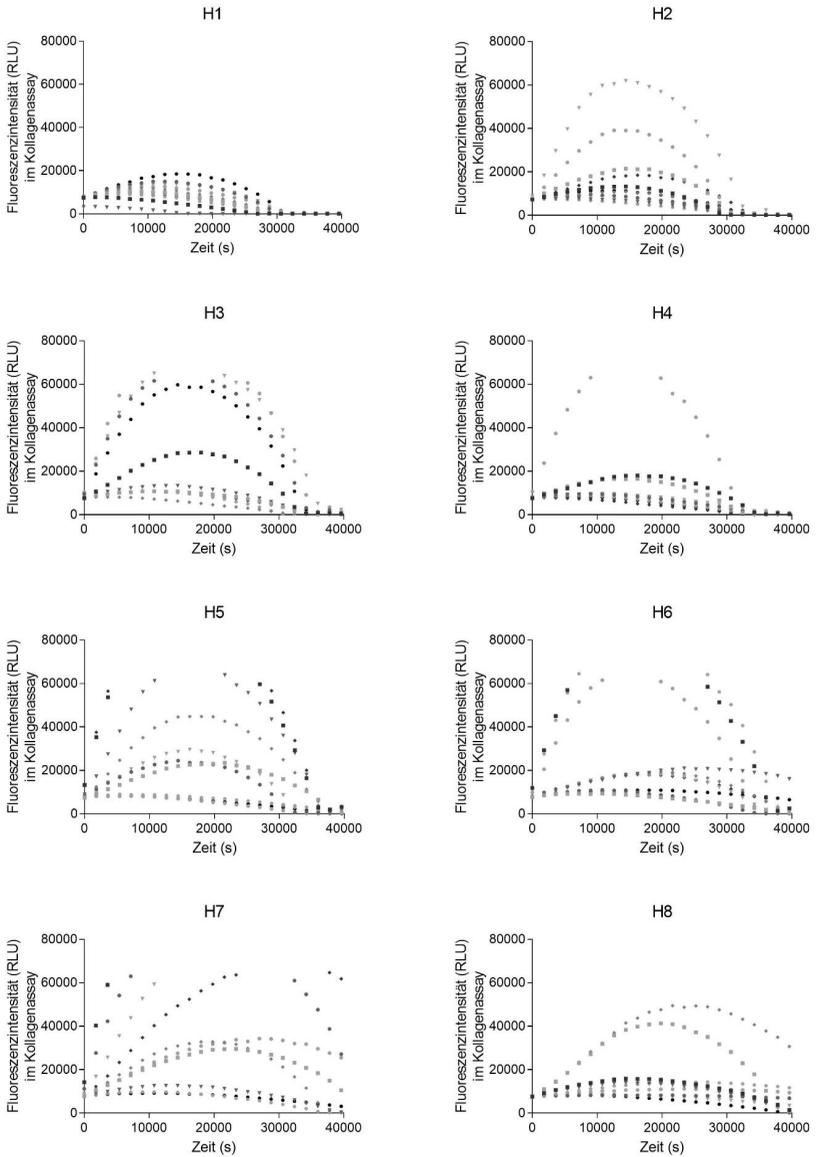


Abbildung 52: Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden H1-H8

DQ = dye quenched, H = Hund, RLU = relative light units, s = Sekunden

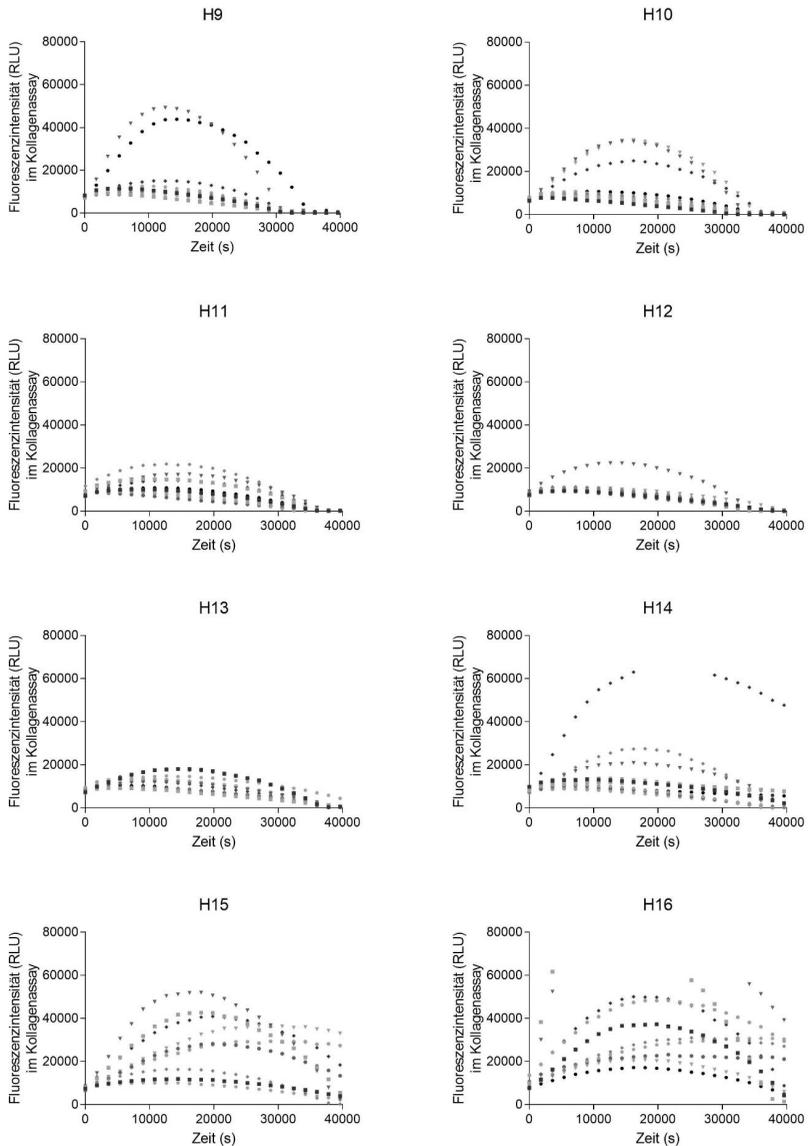


Abbildung 53: Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden H9-H16

DQ = dye quenched, H = Hund, RLU = relative light units, s = Sekunden

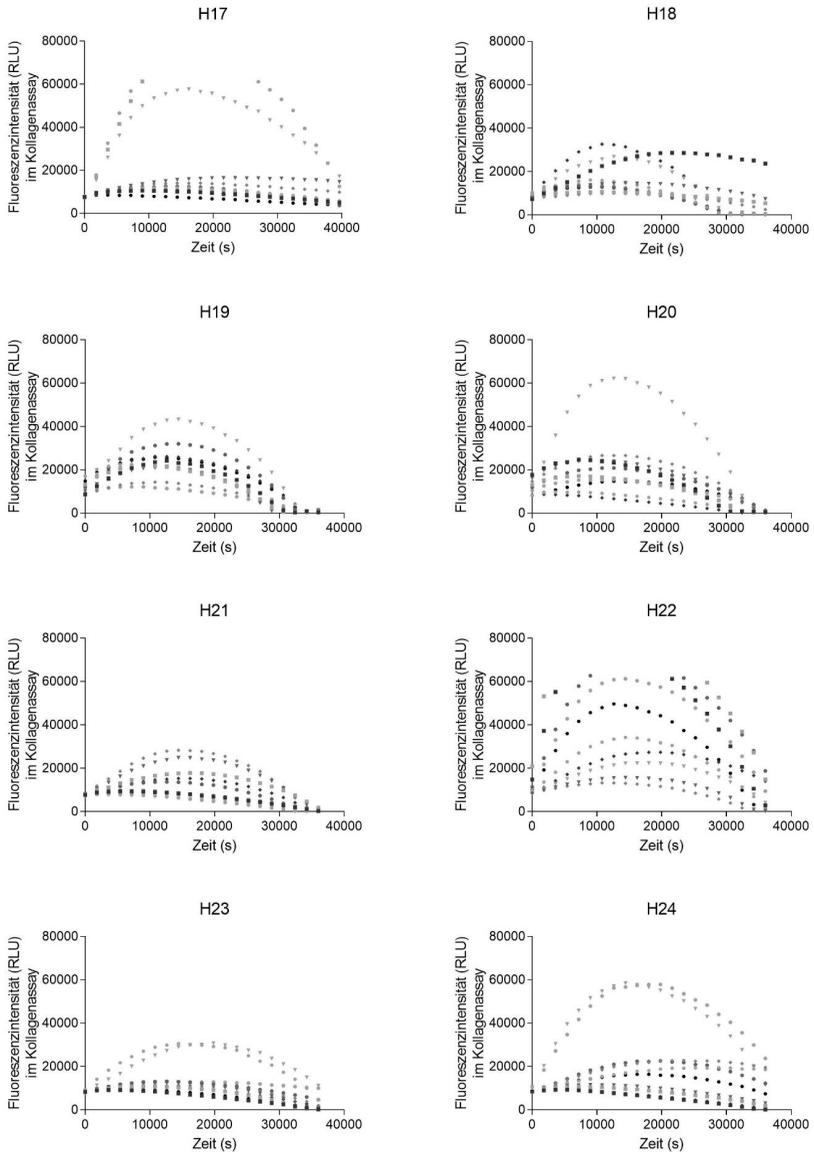


Abbildung 54: Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden H17-H24

DQ = dye quenched, H = Hund, RLU = relative light units, s = Sekunden

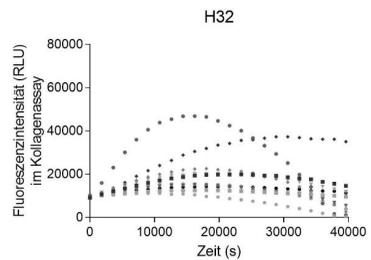
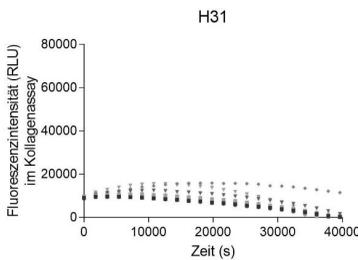
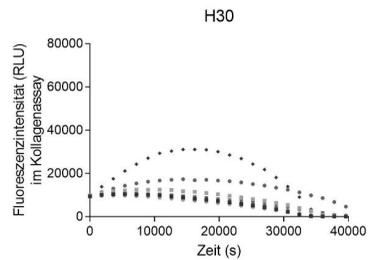
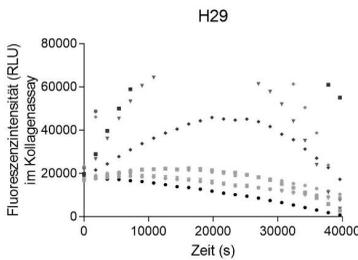
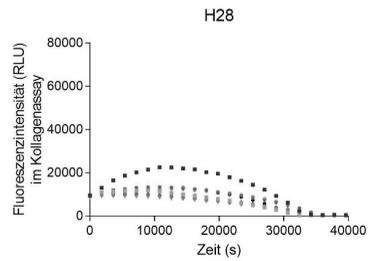
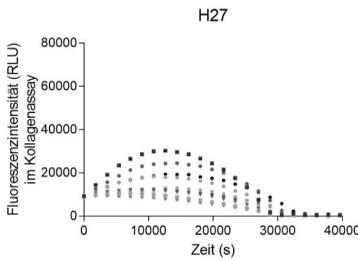
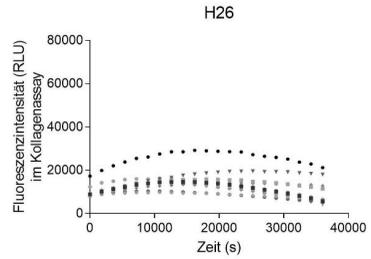
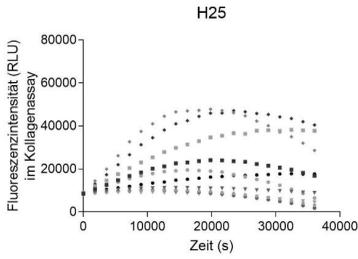


Abbildung 55: Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden H25-H32

DQ = dye quenched, H = Hund, RLU = relative light units, s = Sekunden

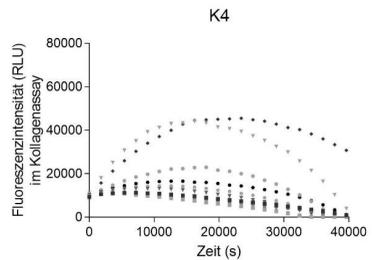
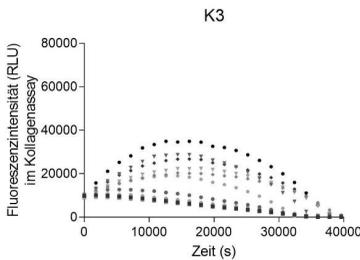
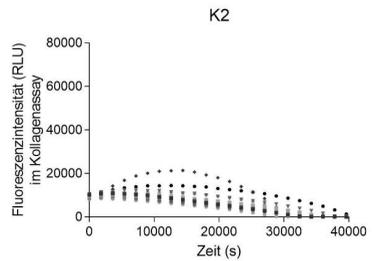
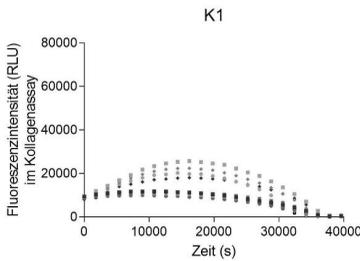
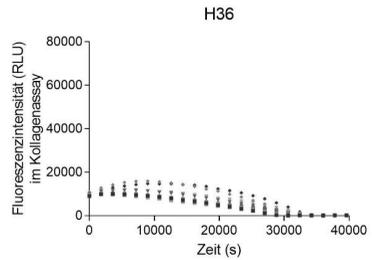
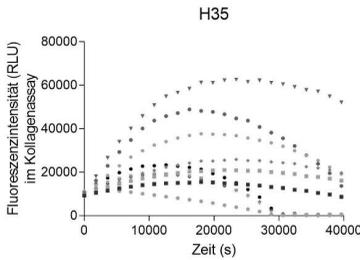
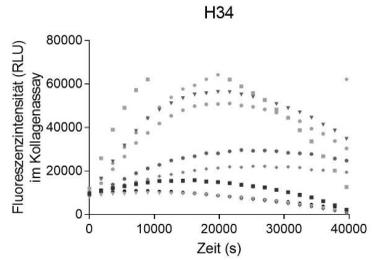
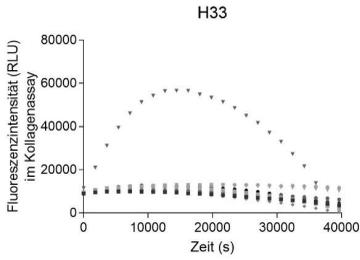


Abbildung 56: Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden H32-H36 und K1-K4

DQ = dye quenched, H = Hund, K = Kontrolltier, RLU = relative light units, s = Sekunden

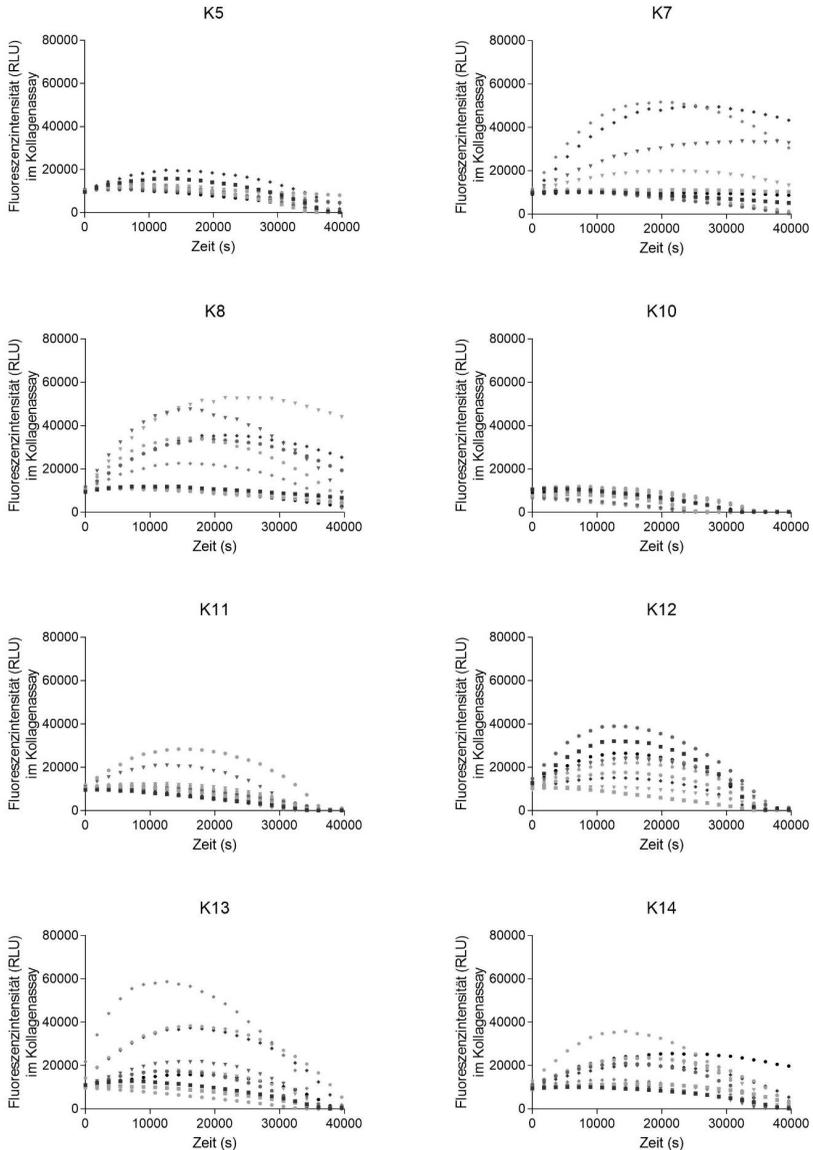


Abbildung 57: Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden K5-K14

DQ = dye quenched, H = Hund, K = Kontrolltier, RLU = relative light units, s = Sekunden

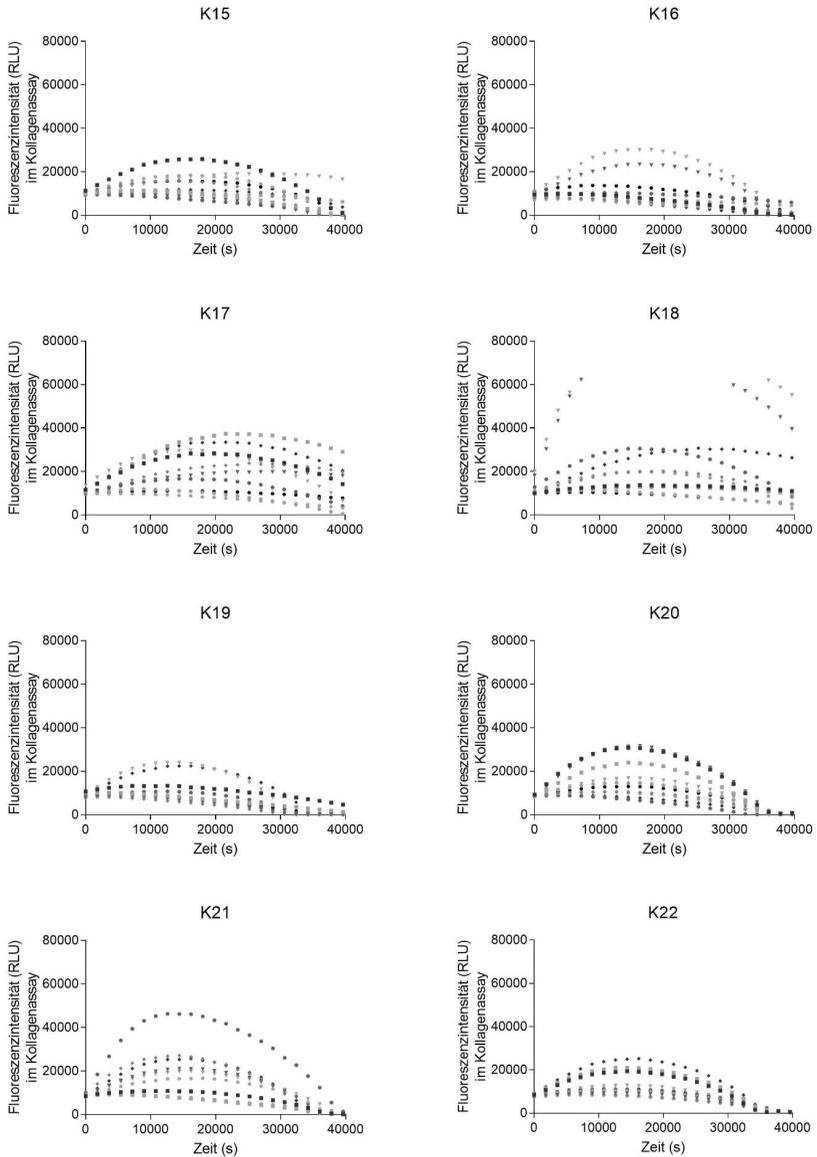


Abbildung 58: Darstellung der absoluten Werte der Fluoreszenzintensität in RLU im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden K14-K22

DQ = dye quenched, H = Hund, K = Kontrolltier, RLU = relative light units, s = Sekunden

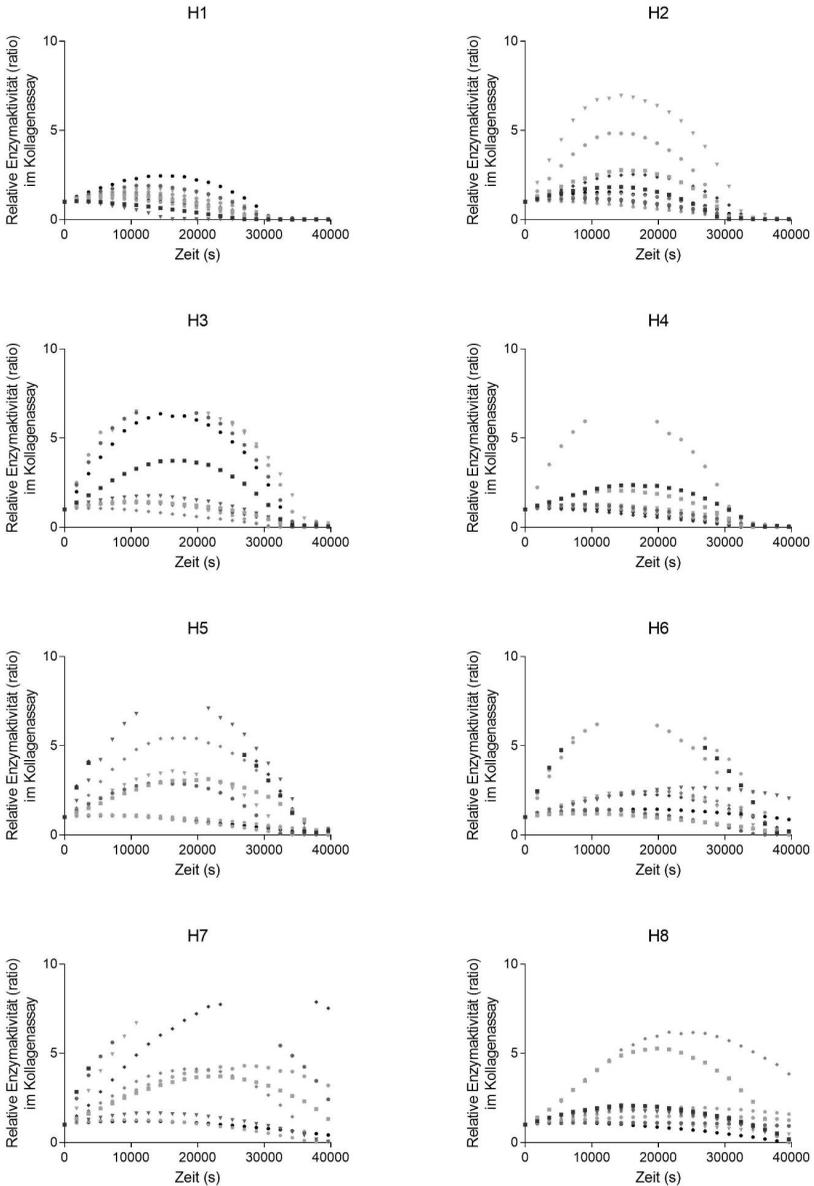


Abbildung 59: Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden H1-H8

DQ = dye quenched, H = Hund, s = Sekunden

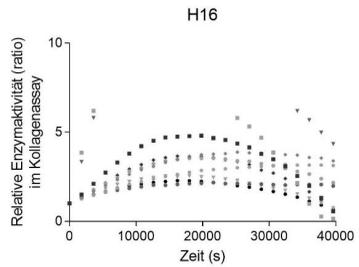
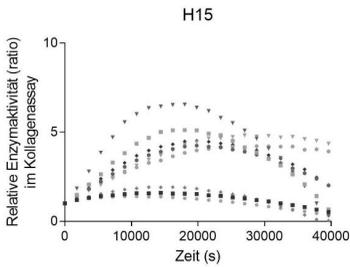
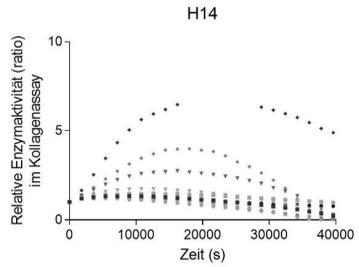
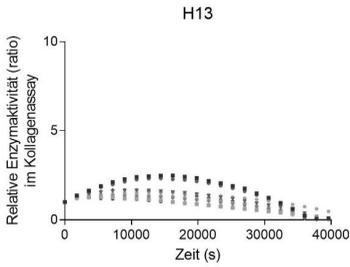
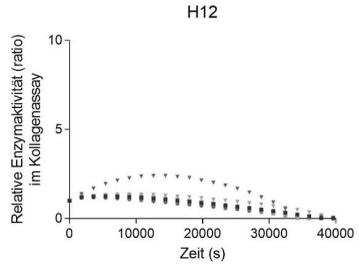
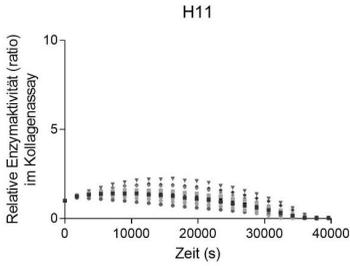
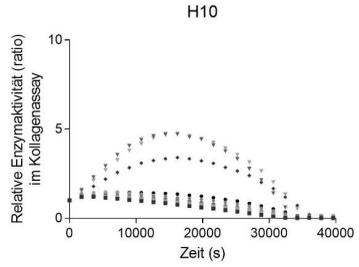
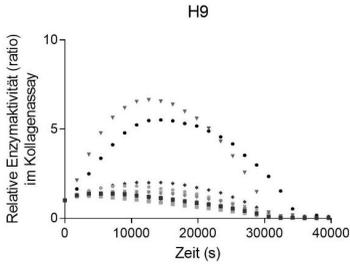


Abbildung 60: Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden H9-H16

DQ = dye quenched, H = Hund, s = Sekunden

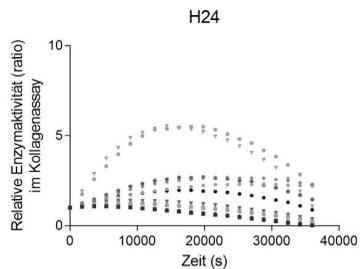
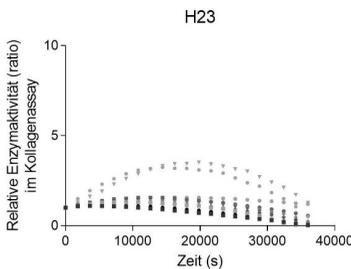
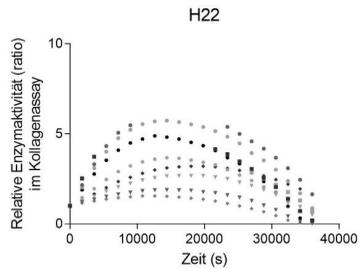
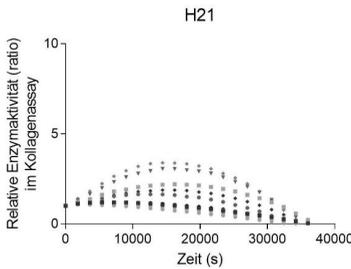
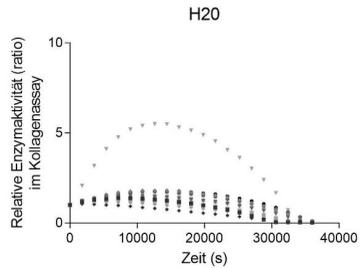
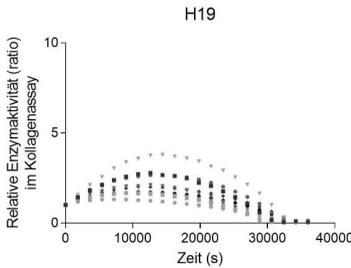
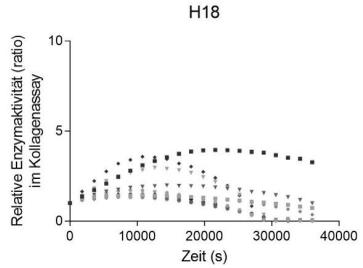
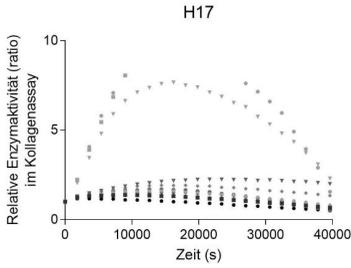


Abbildung 61: Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden H16-H24

DQ = dye quenched, H = Hund, s = Sekunden

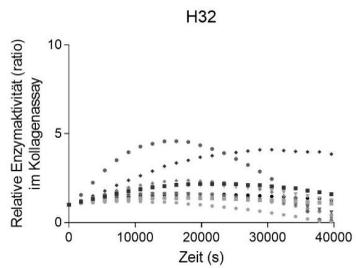
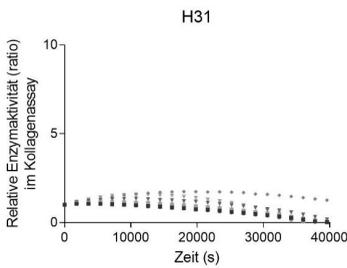
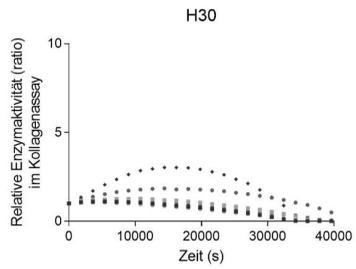
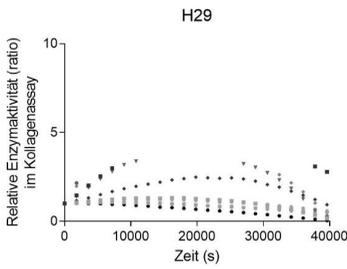
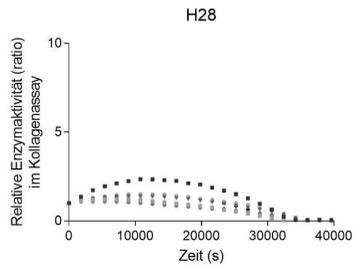
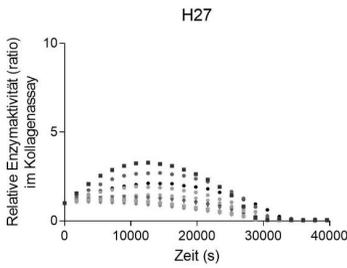
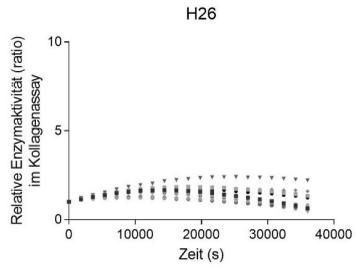
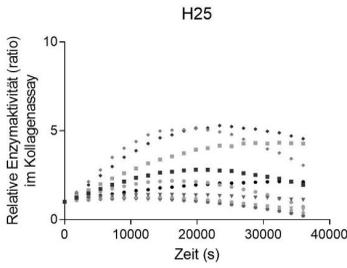


Abbildung 62: Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden H25-H32

DQ = dye quenched, H = Hund, s = Sekunden

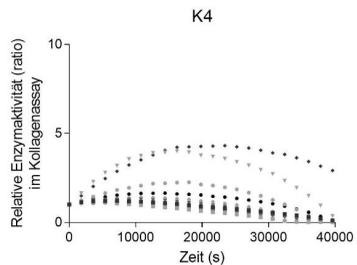
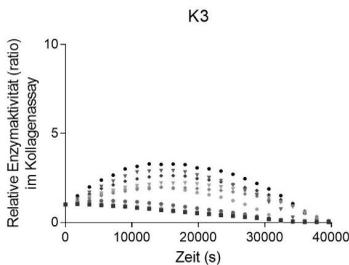
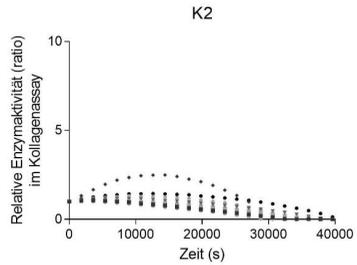
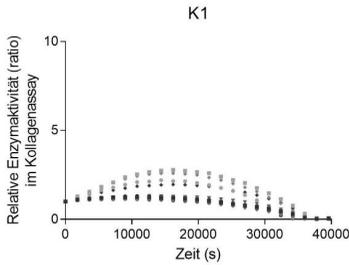
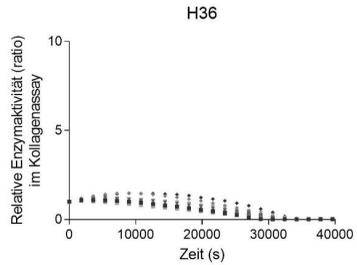
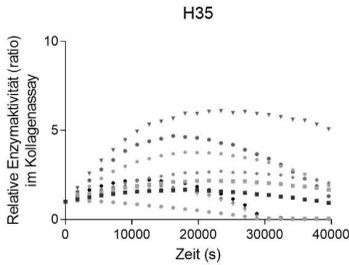
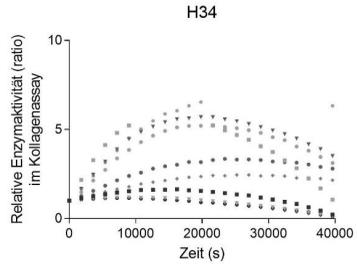
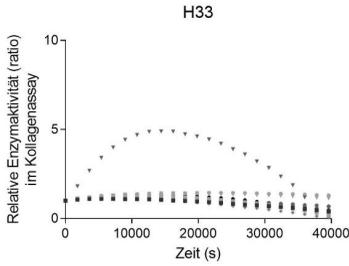


Abbildung 63: Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden H33-H36 und K1-K4

DQ = dye quenched, H = Hund, K = Kontrolltier, s = Sekunden

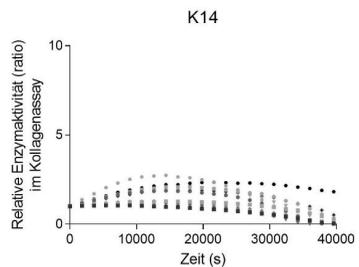
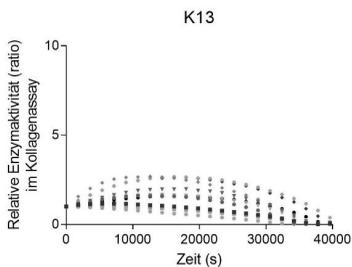
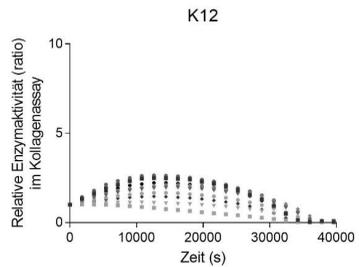
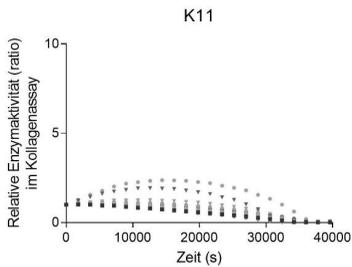
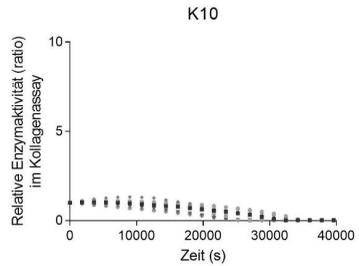
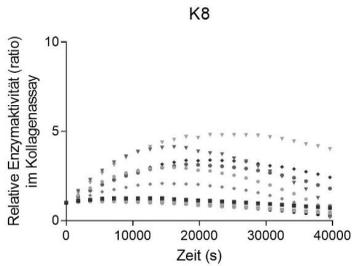
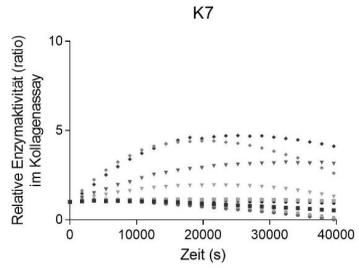
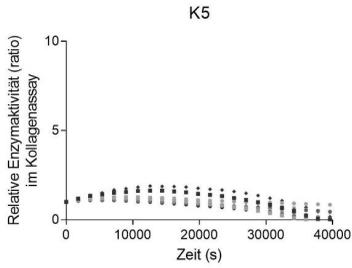


Abbildung 64: Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden K5-K14

DQ = dye quenched, H = Hund, K = Kontrolltier, s = Sekunden

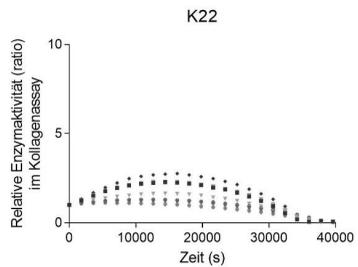
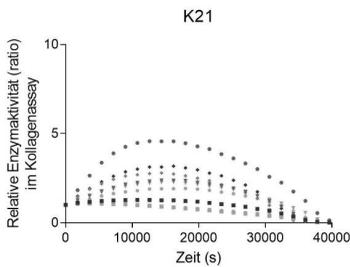
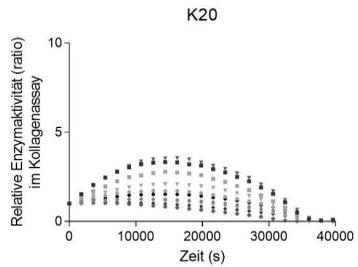
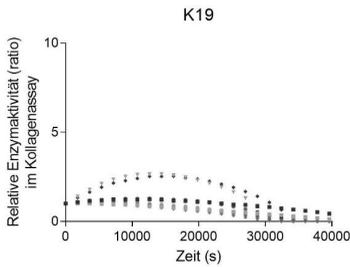
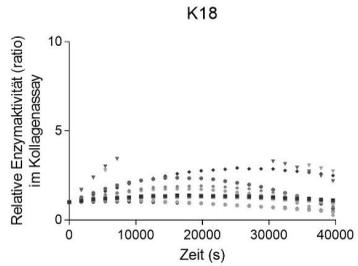
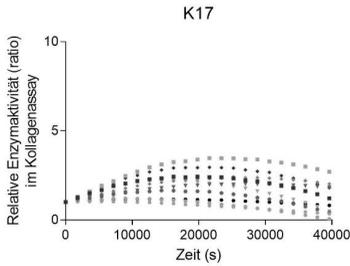
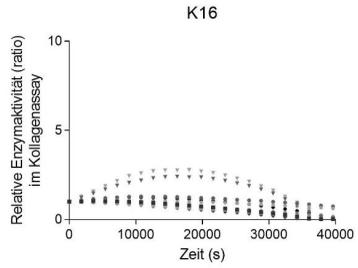
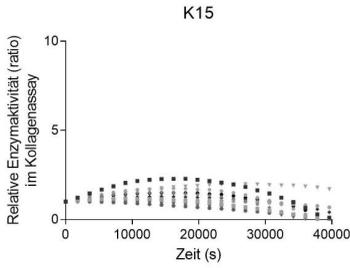


Abbildung 65: Darstellung der relativen Werte der Fluoreszenzintensität im DQ-Kollagenassay nach Zeit für die Probanden K15-K22

DQ = dye quenched, H = Hund, K = Kontrolltier, s = Sekunden

- a1
- a2
- ▼ b
- c
- d
- e1
- e2
- ▼ f
- g
- h

Abbildung 66: Legende zu den in den Abbildungen 38-65 verwendeten Zeichen, diese repräsentieren die Zähne a1-h

10.3 Ergebnisse der Aktivitätsmessungen und klinisch-radiologischen Untersuchungen

Tabelle 9: Auflistung der Enzymaktivitäten und des Parodontalstatus nach betroffenem Zahn

Proband	Zahn	Maximale Gelatinaseaktivität in RLU (absolute Werte)	Maximale Kollagenaseaktivität in RLU (absolute Werte)	Maximale Gelatinaseaktivität (relative Werte)	Maximale Kollagenaseaktivität (relative Werte)	Klinischer Grad der Parodontalerkrankung nach Zahn	Radiologischer Grad der Parodontalerkrankung nach Zahn	Grad der Parodontalerkrankung nach Zahn (orientierend am schlechtesten Wert aus klinischer und radiologischer Untersuchung)	Grad der Parodontalerkrankung nach Hund
H1	a1	6892	7750	1,165	1,0354	1	2	2	2
H1	a2	8556	10332	1,5665	1,3783	1	1	1	2
H1	b	8268	3290	1,3225	1,0211	2	2	2	2
H1	c	9645	11873	1,6496	1,4938	0	0	0	2
H1	d	8220	9193	1,3205	1,2003	1	1	1	2
H1	e1	15803	15057	2,6233	1,911	1	1	1	2
H1	e2	11344	12675	1,8539	1,5625	1	1	1	2
H1	f	15530	13728	2,5256	1,703	0	2	2	2
H1	g	8090	9058	1,3376	1,1909	1	1	1	2
H1	h	19404	18489	3,3415	2,456	1	1	1	2
H10	a1	6634	7773	1,2152	1,2031	0	0	0	2
H10	a2	6748	8724	1,2434	1,2172	0	0	0	2
H10	b	44849	33978	9,0787	4,7277	1	2	2	2
H10	c	11285	9555	2,3813	1,2952	0	2	2	2
H10	d	6942	9962	1,2649	1,2031	0	0	0	2
H10	e1	6716	9193	1,2465	1,2351	0	0	0	2
H10	e2	8114	10471	1,4048	1,462	0	0	0	2

H10	f	38241	34575	6,7302	4,7028	1	2	2	2	2
H10	g	35726	24984	6,3683	3,401	2	2	2	2	2
H10	h	6919	10740	1,27	1,4418	0	0	0	0	2
H11	a1	7288	10168	1,3028	1,413	1	1	1	1	2
H11	a2	19799	14985	3,5508	1,5984	1	1	1	1	2
H11	b	22893	17227	4,1012	2,2347	1	1	1	1	2
H11	c	8423	21973	1,4593	1,8691	0	2	2	2	2
H11	d	7534	9248	1,3716	1,3513	0	0	0	0	2
H11	e1	7240	8684	1,2556	1,1711	1	2	2	2	2
H11	e2	7452	9401	1,3094	1,2871	1	2	2	2	2
H11	f	6951	9126	1,2554	1,2556	1	2	2	2	2
H11	g	15361	14602	2,6595	1,9529	0	2	2	2	2
H11	h	9407	10903	1,6105	1,5359	0	0	0	0	2
H12	a1	7381	9547	1,3138	1,2557	1	1	1	1	4
H12	a2	8130	9681	1,3749	1,3263	1	1	1	1	4
H12	b	19913	22355	3,4004	2,4071	2	3	3	3	4
H12	c	7341	11392	1,297	1,2652	2	2	2	2	4
H12	d	6516	10199	1,319	1,2324	1	1	1	1	4
H12	e1	6525	9696	1,2972	1,1942	0	0	0	0	4
H12	e2	7282	9198	1,2581	1,2734	0	0	0	0	4
H12	f	10854	10766	2,0588	1,3609	2	2	2	2	4
H12	g	8317	10952	1,4278	1,2354	2	3	3	3	4
H12	h	8666	10010	1,5295	1,2722	0	0	0	0	4
H13	a1	18398	18130	3,1715	2,4842	1	1	1	1	2
H13	a2	7439	9236	1,2731	1,2694	1	1	1	1	2
H13	b	10683	11996	1,8891	1,6471	1	2	2	2	2
H13	c	8118	9738	1,4232	1,3517	1	2	2	2	2
H13	d	8124	14927	1,3681	1,5706	1	1	1	1	2
H13	e1	23508	18087	3,9134	2,3311	1	1	1	1	2

H13	e2	9674	13449	1,5945	1,4178	1	1	1	1	1	2
H13	f	11980	12834	1,9815	1,6414	1	2	2	2	2	2
H13	g	8695	12245	1,5088	1,6822	1	2	2	2	2	2
H13	h	7885	10880	1,3085	1,2439	1	1	1	1	1	2
H14	a1	7837	13289	1,3243	1,3483	1	1	1	1	1	3
H14	a2	7561	12032	1,2776	1,486	1	1	1	1	1	3
H14	b	20063	20967	3,1851	2,7422	1	3	3	3	3	3
H14	c	34595	27516	5,6565	3,9942	1	2	2	2	2	3
H14	d	7450	10899	1,2672	1,3481	1	1	1	1	1	3
H14	e1	7625	10360	1,3389	1,4149	1	1	1	1	1	3
H14	e2	8113	9111	1,2823	1,2218	1	1	1	1	1	3
H14	f	13460	13625	2,1748	1,7306	1	3	3	3	3	3
H14	g	50584	70000	8,3102	7,1869	1	2	2	2	2	3
H14	h	8085	8960	1,3428	1,2149	1	1	1	1	1	3
H15	a1	8965	11975	1,4687	1,5945	1	1	1	1	1	1
H15	a2	38258	42686	6,3049	5,1207	1	1	1	1	1	1
H15	b	37873	52053	6,6096	6,5541	1	1	1	1	1	1
H15	c	17479	16420	2,9525	1,9129	0	0	0	0	0	1
H15	d	7956	10177	1,3746	1,3953	0	0	0	0	0	1
H15	e1	32144	28320	5,3236	4,2497	1	1	1	1	1	1
H15	e2	20316	29453	3,9228	4,2166	1	1	1	1	1	1
H15	f	35031	36655	5,8806	4,8211	1	1	1	1	1	1
H15	g	28345	40937	4,8854	4,5105	0	0	0	0	0	1
H15	h	25962		4,1144		1	1	1	1	1	1
H16	a1	31141	37323	4,9612	4,8035	2	2	2	2	2	4
H16	a2	70000	70000	9,9758	7,0253	2	2	2	2	2	4
H16	b	62923	70000	9,2602	7,7425	1	2	2	2	2	4
H16	c	31380	31041	5,1612	3,8792	1	2	2	2	2	4
H16	d	25205	31038	4,0653	3,1876	1	1	1	1	1	4

H16	e1	16994	23220	3,0499	2,1721	2	2	2	2	4
H16	e2	37947	48365	6,4165	3,5414	2	2	2	2	4
H16	f	15503	20798	2,7843	2,5394	1	3	3	3	4
H16	g	33347	50082	5,254	3,6556	1	2	2	2	4
H16	h	21776	17232	3,5558	2,2791	1	1	1	1	4
H17	a1	8891	10616	1,4448	1,3814	1	1	1	1	2
H17	a2	61331	70000	9,7397	9,1972	2	1	2	2	2
H17	b	8406	16495	1,4367	2,2448	1	2	2	2	2
H17	c	7313	14131	1,3022	1,9215	1	1	1	1	2
H17	d	6556	12019	1,1452	1,6066	1	1	1	1	2
H17	e1	7553	12578	1,3468	1,697	2	1	2	2	2
H17	e2	52260	70000	8,0338	8,7206	2	1	2	2	2
H17	f	48422	57683	7,5494	7,6676	1	2	2	2	2
H17	g	10060	11180	1,6329	1,5395	1	2	2	2	2
H17	h	7097	8564	1,1692	1,1738	2	1	2	2	2
H18	a1	30582	28664	5,2492	3,9515	1	1	1	1	2
H18	a2	13733	10601	2,2767	1,4396	1	1	1	1	2
H18	b	27056	14772	4,5772	1,9908	1	2	2	2	2
H18	c	14193	10002	2,6415	1,4264	1	1	1	1	2
H18	d	14702	16074	2,409	1,7201	2	1	2	2	2
H18	e1	8003	13263	1,3627	1,4215	1	1	1	1	2
H18	e2	14045	14100	2,2704	1,3573	1	1	1	1	2
H18	f	48782	26834	7,9709	2,9667	1	2	2	2	2
H18	g	46874	32654	7,6994	3,5821	1	1	1	1	2
H18	h	23151	12839	3,9346	1,4874	2	1	2	2	2
H19	a1	29421	24183	5,1283	2,7781	2	1	2	2	2
H19	a2	9001	22100	1,5937	1,6699	2	1	2	2	2
H19	b	40005	21546	6,3631	2,1062	1	1	1	1	2
H19	c	14115	14397	2,3735	1,7211	1	1	1	1	2

H19	d	7278	22521	1,1836	1,3123	2	2	2	2	2	2
H19	e1	45664	32030	7,3771	2,6546	2	1	2	2	2	2
H19	e2	10323	12174	1,6509	1,3128	2	1	2	2	2	2
H19	f	62460	43329	10,297	3,7865	1	1	1	1	1	2
H19	g	22314	26240	3,8949	2,0098	1	1	1	1	1	2
H19	h	19133	25803	3,3756	1,737	0	0	0	0	0	2
H2	a1	21345	13330	3,7632	1,8401	1	2	2	2	2	4
H2	a2	41143	21480	6,6381	2,7756	1	2	2	2	2	4
H2	b	11851	7679	1,9755	1,1033	3	2	3	3	3	4
H2	c	17890	10892	3,0644	1,4679	0	2	2	2	2	4
H2	d	6810	7584	1,1794	1,0597	1	1	1	1	1	4
H2	e1	8743	9479	1,5121	1,2397	1	3	3	3	3	4
H2	e2	33810	39089	5,3421	4,8401	1	3	3	3	3	4
H2	f	44714	61919	8,2422	6,9494	1	2	2	2	2	4
H2	g	28498	18476	4,4999	2,5369	0	2	2	2	2	4
H2	h	12811	11414	2,218	1,5485	1	2	2	2	2	4
H20	a1	9329	24715	1,502	1,3919	1	1	1	1	1	2
H20	a2	6759	17202	1,1415	1,3138	1	1	1	1	1	2
H20	b	11415	24441	1,944	1,5136	1	1	1	1	1	2
H20	c	24816	26652	4,1202	1,8169	1	2	2	2	2	2
H20	d	6775	9837	1,1559	1,1878	1	1	1	1	1	2
H20	e1	15017	20916	2,7574	1,7469	1	1	1	1	1	2
H20	e2	9285	15594	1,648	1,4805	1	1	1	1	1	2
H20	f	51627	62151	8,539	5,4962	1	1	1	1	1	2
H20	g	6684	8726	1,1136	1,0604	1	1	1	1	1	2
H20	h	19610	14758	3,2837	1,7744	1	1	1	1	1	2
H21	a1	7319	9379	1,3192	1,2044	1	1	1	1	1	1
H21	a2	31895	17842	5,5673	2,2022	1	1	1	1	1	1
H21	b	45162	24814	7,9834	3,0593	1	1	1	1	1	1

H21	c	45035	28309	9,255	3,3984	1	1	1	1	1	1
H21	d	6938	7855	1,2681	1,094	1	1	1	1	1	1
H21	e1	24459	13692	4,4593	1,6488	1	1	1	1	1	1
H21	e2	7373	8407	1,3504	1,0737	1	1	1	1	1	1
H21	f	6938	9666	1,2808	1,1709	1	1	1	1	1	1
H21	g	23040	15297	4,2494	1,8797	1	1	1	1	1	1
H21	h	8778	9192	1,6223	1,1975	1	1	1	1	1	1
H22	a1	70000	70000	12,498	4,7352	4	2	2	4	4	4
H22	a2	70000	70000	12,225	3,3555	4	2	2	4	4	4
H22	b	27668	15608	5,055	1,8998	2	1	1	2	2	4
H22	c	19977	13216	4,3409	1,5532	0	0	0	0	0	4
H22	d	43990	34225	8,5202	3,6789	4	2	2	4	4	4
H22	e1	70000	70000	14,262	6,1173	3	2	2	3	3	4
H22	e2	70000	61286	12,725	5,7373	4	2	2	4	4	4
H22	f	34817	22353	6,4945	2,6728	1	1	1	1	1	4
H22	g	28997	27350	5,35	3,203	1	2	2	2	2	4
H22	h	51389	49679	9,3333	4,8858	4	2	2	4	4	4
H23	a1	7329	9230	1,3213	1,1064	1	1	1	1	1	4
H23	a2	42395	10838	7,6195	1,3155	1	1	1	1	1	4
H23	b	22102	12798	4,2479	1,555	3	4	4	4	4	4
H23	c	23506	11416	4,3538	1,4026	0	2	2	2	2	4
H23	d	49882	30624	9,156	3,2575	4	1	1	4	4	4
H23	e1	10763	13151	1,9741	1,5466	1	1	1	1	1	4
H23	e2	16878	13036	3,1117	1,5809	1	1	1	1	1	4
H23	f	39126	30798	7,1268	3,5238	4	4	4	4	4	4
H23	g	8913	10755	1,6539	1,3332	0	3	3	3	3	4
H23	h	7535	9345	1,3795	1,1387	2	1	1	2	2	4
H24	a1	7796	9293	1,408	1,0901	1	2	2	2	2	4
H24	a2	11150	10703	2,1002	1,2601	1	2	2	2	2	4

H24	b	8013	11534	1,531	1,3938	2	2	2	2	4
H24	c	19112	22826	3,5965	2,6845	1	2	2	2	4
H24	d	15157	19547	2,9825	2,3204	1	2	2	2	4
H24	e1	32016	22613	6,1134	2,7001	1	2	2	2	4
H24	e2	58427	57892	10,529	5,501	1	2	2	2	4
H24	f	57176	58515	10,606	5,5265	2	2	2	2	4
H24	g	6942	9236	2,3905	1,093	1	2	2	2	4
H24	h	24171	16454	4,5631	1,9762	1	2	2	2	4
H25	a1	25860	24069	4,7173	2,8138	0	0	0	0	2
H25	a2	22472	38200	4,071	4,3311	0	0	0	0	2
H25	b	8138	11316	1,4325	1,4062	0	0	0	0	2
H25	c	36426	47841	7,1396	5,1211	0	2	2	2	2
H25	d	10564	10249	2,0311	1,2729	0	0	0	0	2
H25	e1	8174	10276	1,4573	1,228	0	0	0	0	2
H25	e2	15513	19544	2,7092	2,1903	0	0	0	0	2
H25	f	8297	9269	1,5578	1,1567	0	0	0	0	2
H25	g	29386	47163	5,7484	5,2945	0	2	2	2	2
H25	h	11764	17801	1,9963	2,1447	0	0	0	0	2
H26	a1	23724	14586	4,0142	1,6536	1	1	1	1	2
H26	a2	17643	15755	3,0936	1,8479	1	1	1	1	2
H26	b	26939	19510	4,6271	2,4036	1	1	1	1	2
H26	c	8051	14124	1,5359	1,7651	0	0	0	0	2
H26	d	8203	9678	1,4562	1,2299	1	1	1	1	2
H26	e1	8029	10241	1,3993	1,2462	1	1	1	1	2
H26	e2	7761	16223	1,3979	1,3195	1	1	1	1	2
H26	f	10135	13445	1,8397	1,5069	1	1	1	1	2
H26	g	8442	13892	1,4558	1,5295	0	0	0	0	2
H26	h	16339	29134	2,8376	1,6933	1	1	1	1	2
H27	a1	47231	30218	8,1069	3,2778	1	1	1	1	3

H27	a2	16109	10535	2,8547	1,2003	2	1	2	2	3
H27	b	7962	12213	1,411	1,3453	0	0	0	0	3
H27	c	17733	9348	3,0133	1,0675	0	2	2	2	3
H27	d	16118	12985	2,8149	1,4719	2	1	2	2	3
H27	e1	38531	24437	7,012	2,7041	1	1	1	1	3
H27	e2	28298	18323	5,0227	1,9338	3	1	3	3	3
H27	f	16154	11523	2,9554	1,2728	0	0	0	0	3
H27	g	9863	11965	1,8117	1,3068	0	2	2	2	3
H27	h	24135	19382	4,3029	2,1231	2	1	2	2	3
H28	a1	7368	22567	1,378	2,3576	1	1	1	1	2
H28	a2	10435	11766	1,9292	1,2185	1	1	1	1	2
H28	b	14538	13078	2,7058	1,399	1	1	1	1	2
H28	c	9871	9519	1,8784	1,0878	1	1	1	1	2
H28	d	27330	12530	5,4715	1,403	1	1	1	1	2
H28	e1	6277	10294	1,1676	1,097	1	2	2	2	2
H28	e2	7342	13491	1,3303	1,5101	1	2	2	2	2
H28	f	7565	9106	1,3279	1,0808	1	1	1	1	2
H28	g	8812	11317	1,5898	1,2137	1	1	1	1	2
H28	h	23333	12901	3,8051	1,4634	1	2	2	2	2
H29	a1	50899	70000	2,6433	3,5443	1	1	1	1	2
H29	a2	17360	22465	1,2251	1,3225	2	1	2	2	2
H29	b	48626	70000	2,6326	3,678	1	1	1	1	2
H29	c	70000	70000	2,9556	3,0027	1	1	1	1	2
H29	d	17260	22134	1,1372	1,2531	1	1	1	1	2
H29	e1	57577	70000	2,8304	3,0946	1	1	1	1	2
H29	e2	13656	18847	1,0026	1,0819	1	1	1	1	2
H29	f	14506	19339	1,0218	1,0998	1	1	1	1	2
H29	g	23184	45922	1,5719	2,4901	1	1	1	1	2
H29	h	14578	17646	1,0154	1,0116	2	1	2	2	2

H3	a1	37184	28576	6,1696	3,7393	2	2	2	2	3
H3	a2	17483	10790	2,9962	1,4203	2	2	2	2	3
H3	b	16747	13315	2,9176	1,7657	1	2	2	2	3
H3	c	6994	8111	1,2117	1,0732	1	2	2	2	3
H3	d	12592	10811	2,0215	1,4814	1	2	2	2	3
H3	e1	49598	70000	8,6227	7,3107	2	1	2	2	3
H3	e2	65515	70000	10,535	6,7915	2	1	2	2	3
H3	f	50726	70000	9,5332	6,9909	1	3	3	3	3
H3	g	12990	10704	2,1043	1,3806	1	3	3	3	3
H3	h	53936	59794	9,2293	6,3597	1	2	2	2	3
H30	a1	14890	10470	1,0228	1,1098	1	2	2	2	4
H30	a2	16204	12560	1,1396	1,2672	3	2	2	3	4
H30	b	13583	10213	1,0296	1,1255	4	3	4	4	4
H30	c	15112	9980	1,045	1,105	3	3	3	3	4
H30	d	13863	9797	1	1,0773	1	1	1	1	4
H30	e1	21638	17367	1,3825	1,8503	1	2	2	2	4
H30	e2	15818	9780	1,0436	1,0633	4	2	4	4	4
H30	f	14855	10851	1,0447	1,1577	2	3	3	3	4
H30	g	50904	31075	2,8386	3,0255	1	1	1	1	4
H30	h	14846	10674	1,0195	1,1267	1	1	1	1	4
H31	a1	14349	9613	1	1,0549	1	2	2	2	2
H31	a2	15552	10672	1,0377	1,1496	1	2	2	2	2
H31	b	15486	12512	1,0518	1,3481	1	1	1	1	2
H31	c	20677	15920	1,2839	1,742	1	1	1	1	2
H31	d	15919	9442	1,0174	1,0595	1	1	1	1	2
H31	e1	14847	9803	1,0092	1,0724	0	2	2	2	2
H31	e2	14441	10566	1,0033	1,1551	0	2	2	2	2
H31	f	15683	15520	1,1181	1,5777	1	1	1	1	2
H31	g	14289	10560	1,019	1,1634	1	1	1	1	2

H31	h	14660	9376	1,0128	1,0757	1	2	2	2	2
H32	a1	19692	19929	1,3074	2,1818	1	2	2	2	4
H32	a2	14951	12606	1,0176	1,3912	1	2	2	2	4
H32	b	18103	15064	1,2501	1,6235	1	2	2	2	4
H32	c	41863	22534	2,731	2,3765	1	1	1	1	4
H32	d	18129	11170	1,2768	1,1936	4	2	4	4	4
H32	e1	70000	46855	3,5432	4,5757	2	3	3	3	4
H32	e2	24137	15432	1,4876	1,6384	2	3	3	3	4
H32	f	28996	20249	1,7911	2,1121	4	4	4	4	4
H32	g	26288	37330	1,834	4,104	1	2	2	2	4
H32	h	15349	14339	1,0347	1,5987	1	2	2	2	4
H33	a1	14792	10002	1	1,1072	1	2	2	2	3
H33	a2	14856	12510	1	1,3087	1	2	2	2	3
H33	b	70000	56642	3,2236	4,8947	3	3	3	3	3
H33	c	15752	10510	1,0497	1,1416	1	2	2	2	3
H33	d	15792	10196	1,0617	1,1149	1	2	2	2	3
H33	e1	15453	10564	1,0761	1,1429	1	2	2	2	3
H33	e2	16667	13056	1,1692	1,4468	1	2	2	2	3
H33	f	15413	13113	1,1173	1,4273	2	2	2	2	3
H33	g	15048	11028	1,0358	1,1885	1	3	3	3	3
H33	h	18604	12891	1,2354	1,3518	1	2	2	2	3
H34	a1	19949	15749	1,3491	1,6465	1	2	2	2	4
H34	a2	70000	70000	2,9236	5,8947	1	2	2	2	4
H34	b	60033	56344	3,1222	5,6948	4	3	4	4	4
H34	c	23487	22190	1,5432	2,4555	2	2	2	2	4
H34	d	70000	70000	3,8557	7,1334	3	2	3	3	4
H34	e1	42785	29665	2,7246	3,3524	1	2	2	2	4
H34	e2	63502	51020	3,8432	5,2377	1	2	2	2	4
H34	f	15807	9957	1,0904	1,196	2	1	2	2	4

H34	g	14987	10715	1,0503	1,1687	2	2	2	2	4
H34	h	16669	10887	1,109	1,15	1	2	2	2	4
H35	a1	24588	15553	1,4779	1,676	1	2	2	2	2
H35	a2	19330	21037	1,2057	2,1861	1	2	2	2	2
H35	b	51688	62650	3,1117	6,0938	1	2	2	2	2
H35	c	28131	25931	1,8099	2,7099	1	2	2	2	2
H35	d	50039	37710	2,8115	3,7823	2	2	2	2	2
H35	e1	56483	48875	1,0787	4,6932	1	2	2	2	2
H35	e2	15814	11722	1,0141	1,0474	1	2	2	2	2
H35	f	37070	19223	2,3513	1,8123	2	2	2	2	2
H35	g	53059	19072	3,2011	1,9036	1	2	2	2	2
H35	h	50624	23368	3,0317	2,2262	2	2	2	2	2
H36	a1	16513	10006	1,1703	1,0987	1	1	1	1	2
H36	a2	14989	9972	1,0242	1,0445	1	1	1	1	2
H36	b	15695	11791	1,0725	1,1675	1	1	1	1	2
H36	c	22893	15912	1,4615	1,4783	1	1	1	1	2
H36	d	14928	10928	1,0225	1,0636	1	1	1	1	2
H36	e1	15441	10210	3,1693	1,0587	2	1	2	2	2
H36	e2	14974	10411	1,0267	1,0687	2	1	2	2	2
H36	f	16320	11672	1,1322	1,1737	2	1	2	2	2
H36	g	23914	14789	1,6203	1,4751	1	1	1	1	2
H36	h	15120	10349	1,0055	1,0461	1	1	1	1	2
H4	a1	28533	18010	4,9597	2,3716	0	0	0	0	2
H4	a2	23001	16452	4,0559	2,058	0	0	0	0	2
H4	b	8607	9394	1,4007	1,2469	0	2	2	2	2
H4	c	8062	9060	1,3582	1,201	1	1	1	1	2
H4	d	9033	8855	1,4432	1,1841	0	0	0	0	2
H4	e1	3949	9396	1,7229	1,2493	1	1	1	1	2
H4	e2	62881	70000	9,7854	6,5988	1	1	1	1	2

H4	f	8737	9560	1,5837	1,2714	1	1	1	1	1	2
H4	g	6801	7821	1,174	1,0598	0	2	2	2	2	2
H4	h	7536	8217	1,2942	1,0917	1	1	1	1	1	2
H5	a1	50089	70000	8,4825	5,2628	1	1	1	1	1	3
H5	a2	25696	23483	4,3508	3,1357	1	1	1	1	1	3
H5	b	45614	70000	7,9619	7,7726	1	1	1	1	1	3
H5	c	30058	44826	5,3427	5,4269	1	2	2	2	2	3
H5	d	7241	9004	1,3144	1,1495	1	1	1	1	1	3
H5	e1	11786	24469	2,1077	2,975	1	2	2	2	2	3
H5	e2	7299	8332	1,3623	1,1138	1	2	2	2	2	3
H5	f	23520	29654	4,3164	3,5711	1	1	1	1	1	3
H5	g	52410	70000	9,198	5,1128	1	2	2	2	2	3
H5	h	6416	8231	1,2605	1,0885	1	1	1	1	1	3
H6	a1	46810	70000	8,0168	5,8538	1	1	1	1	1	3
H6	a2	7441	9371	1,3196	1,2078	1	1	1	1	1	3
H6	b	13597	20958	2,3909	2,6576	0	2	2	2	2	3
H6	c	16112	19318	2,7977	2,4574	0	2	2	2	2	3
H6	d	51552	70000	8,8975	5,9072	1	1	1	1	1	3
H6	e1	9026	11071	1,5434	1,4588	2	1	1	2	2	3
H6	e2	42932	70000	7,3401	7,0543	2	1	1	2	2	3
H6	f	19326	18380	3,3793	2,4277	1	2	2	2	2	3
H6	g	13636	18191	2,453	2,3082	0	1	1	1	1	3
H6	h	7881	10901	1,3401	1,4442	2	1	1	2	2	3
H7	a1	61448	70000	10,481	4,9233	2	2	2	2	2	2
H7	a2	27890	29574	4,9128	3,7102	2	2	2	2	2	2
H7	b	13325	12666	2,3659	1,6377	0	0	0	0	0	2
H7	c	32287	32837	5,7976	4,1201	0	2	2	2	2	2
H7	d	11453	9785	2,0343	1,2677	0	0	0	0	0	2
H7	e1	59016	70000	10,168	6,2355	2	2	2	2	2	2

H7	e2	22893	34329	4,0648	4,3003	2	2	2	2	2	2
H7	f	46689	70000	8,11	7,9069	0	0	0	0	0	2
H7	g	39068	70000	6,7897	8,5189	0	0	0	0	0	2
H7	h	7775	9248	1,3421	1,2062	1	0	0	1	1	2
H8	a1	14818	15904	2,582	2,0784	0	0	0	0	0	2
H8	a2	39871	41339	6,9998	5,2708	0	0	0	0	0	2
H8	b	14800	13998	2,7047	1,7882	1	0	0	1	1	2
H8	c	32996	49487	5,8942	6,189	0	2	2	2	2	2
H8	d	12186	14463	2,1664	1,9699	0	0	0	0	0	2
H8	e1	7137	8379	1,2708	1,1252	0	0	0	0	0	2
H8	e2	10690	11241	2,1579	1,4948	0	0	0	0	0	2
H8	f	8328	8489	1,4463	1,1398	1	0	0	1	1	2
H8	g	12202	14657	2,1574	1,955	0	2	2	2	2	2
H8	h	7583	8324	1,3225	1,1085	0	0	0	0	0	2
H9	a1	8019	11521	1,3852	1,3894	0	0	0	0	0	2
H9	a2	7238	9383	1,2366	1,2598	0	0	0	0	0	2
H9	b	54137	49309	9,888	6,6374	0	2	2	2	2	2
H9	c	24051	10311	4,301	1,4734	0	2	2	2	2	2
H9	d	9038	12647	1,649	1,8155	1	1	1	1	1	2
H9	e1	7361	8900	1,2962	1,2528	1	1	1	1	1	2
H9	e2	12096	9942	2,0855	1,3493	1	1	1	1	1	2
H9	f	22029	10427	4,0704	1,4958	1	1	1	1	1	2
H9	g	20879	15086	4,0923	2,008	0	2	2	2	2	2
H9	h	45534	43835	8,2729	5,5111	1	1	1	1	1	2
K1	a1	15554	11759	1,0498	1,2455	0	0	0	0	0	0
K1	a2	30785	25748	1,936	2,7797	0	0	0	0	0	0
K1	b	15560	11068	1,0635	1,2942	0	0	0	0	0	0
K1	c	35196	22418	2,2478	2,5932	0	0	0	0	0	0
K1	d	16279	10742	1,1082	1,1978	0	0	0	0	0	0

K1	e1	14666	10028	1,0105	1,1449	0	0	0	0	0
K1	e2	28541	20301	1,8318	2,2009	0	0	0	0	0
K1	f	16301	11338	1,0688	1,2039	0	0	0	0	0
K1	g	30753	18091	1,9293	1,9634	0	0	0	0	0
K1	h	20282	11007	1,3085	1,3305	0	0	0	0	0
K10	a1	12424	10914	1,0924	1,0314	0	0	0	0	0
K10	a2	16191	8216	1,415	1,0769	0	0	0	0	0
K10	b	11564	6426	1,0216	1	0	0	0	0	0
K10	c	22476	9618	1,7971	1,3294	0	0	0	0	0
K10	d	12245	6595	1	1	0	0	0	0	0
K10	e1	11599	7030	1,0022	1	0	0	0	0	0
K10	e2	11340	11945	1,0794	1,1132	0	0	0	0	0
K10	f	12464	11677	1,0782	1,099	0	0	0	0	0
K10	g	12150	11292	1,0546	1,075	0	0	0	0	0
K10	h	12706	9480	1,0768	1,0467	0	0	0	0	0
K11	a1	11389	9732	1,0141	1,0105	0	0	0	0	0
K11	a2	12507	11231	1,0288	1,0815	0	0	0	0	0
K11	b	31929	20971	2,5212	1,931	0	0	0	0	0
K11	c	13049	10046	1,1258	1,0204	0	0	0	0	0
K11	d	11195	12403	1,0345	1,1708	0	0	0	0	0
K11	e1	31588	11540	2,6447	1,1081	0	0	0	0	0
K11	e2	44305	28419	3,7678	2,3708	0	0	0	0	0
K11	f	16907	12400	1,4431	1,256	0	0	0	0	0
K11	g	11861	9833	1,0882	1,0231	0	0	0	0	0
K11	h	11335	10177	1,0244	1,0425	0	0	0	0	0
K12	a1	34175	32124	2,8898	2,4885	0	0	0	0	0
K12	a2	12765	10666	1,0867	1,0221	0	0	0	0	0
K12	b	21467	23883	2,0212	1,9594	0	0	0	0	0
K12	c	49836	24815	3,9792	2,1206	0	0	0	0	0

K12	d	36315	22118	2,9166	2,0223	0	0	0	0	0
K12	e1	48580	38992	3,6612	2,6342	0	0	0	0	0
K12	e2	23008	17699	1,9951	1,6644	0	0	0	0	0
K12	f	12182	10947	1,0313	1,1199	0	0	0	0	0
K12	g	21140	15237	1,768	1,4599	0	0	0	0	0
K12	h	35991	26529	2,8825	2,218	0	0	0	0	0
K13	a1	11085	12905	1,0191	1,1635	0	0	0	0	0
K13	a2	13641	10645	1,1627	1,0258	0	0	0	0	0
K13	b	30332	21863	2,4505	1,9777	0	0	0	0	0
K13	c	62675	58786	3,9778	2,6877	0	0	0	0	0
K13	d	39358	38417	3,1884	2,6686	0	0	0	0	0
K13	e1	25062	17421	1,3806	1,6162	0	0	0	0	0
K13	e2	15647	9719	1	1	0	0	0	0	0
K13	f	15839	17686	1,284	1,6636	0	0	0	0	0
K13	g	24972	37490	1,3883	2,6463	0	0	0	0	0
K13	h	16579	15901	1,1492	1,5822	0	0	0	0	0
K14	a1	14593	10170	1,0137	1,055	0	0	0	0	0
K14	a2	16251	11620	1,1	1,2764	0	0	0	0	0
K14	b	19001	10954	1,2976	1,1503	0	0	0	0	0
K14	c	15147	13626	1,1235	1,305	0	0	0	0	0
K14	d	45183	35844	2,9784	2,741	0	0	0	0	0
K14	e1	17041	21109	1,5225	1,8831	0	0	0	0	0
K14	e2	23817	23573	1,6947	2,0727	0	0	0	0	0
K14	f	22229	23596	1,6785	2,0898	0	0	0	0	0
K14	g	23520	20222	1,7243	1,9056	0	0	0	0	0
K14	h	30694	25600	2,0244	2,3473	0	0	0	0	0
K15	a1	16416	25849	1,1485	2,2881	0	0	0	0	0
K15	a2	29153	11405	2,0174	1,1746	0	0	0	0	0
K15	b	13583	9506	1,0445	1,0018	0	0	0	0	0

K15	c	15976	16037	1,3996	1,531	0	0	0	0	0
K15	d	23149	18346	1,5791	1,7469	0	0	0	0	0
K15	e1	12468	9520	1,0048	1,0249	0	0	0	0	0
K15	e2	14539	10302	1,0324	1,1308	0	0	0	0	0
K15	f	19730	19184	1,3506	1,9804	0	0	0	0	0
K15	g	17967	11856	1,2792	1,2933	0	0	0	0	0
K15	h	18557	15827	1,3494	1,5	0	0	0	0	0
K16	a1	15855	9914	1,0929	1,0389	0	0	0	0	0
K16	a2	10287	10119	1	1,0221	0	0	0	0	0
K16	b	28920	23407	2,0097	2,4079	0	0	0	0	0
K16	c	12774	8106	1	1	0	0	0	0	0
K16	d	14111	7616	1,0038	1,0765	0	0	0	0	0
K16	e1	16678	10308	1,1373	1,2946	0	0	0	0	0
K16	e2	14835	8249	1,0054	1	0	0	0	0	0
K16	f	30604	30186	2,1084	2,7806	0	0	0	0	0
K16	g	13205	8309	1	1	0	0	0	0	0
K16	h	11630	13712	1	1,2503	0	0	0	0	0
K17	a1	19967	28307	1,4202	2,4321	0	0	0	0	0
K17	a2	21678	37361	1,6856	3,4709	0	0	0	0	0
K17	b	15349	19864	1,0719	2,0085	0	0	0	0	0
K17	c	20988	23837	1,4487	2,4185	0	0	0	0	0
K17	d	13499	9866	1	1,0351	0	0	0	0	0
K17	e1	17452	16725	1,2839	1,6501	0	0	0	0	0
K17	e2	14938	11974	1,1336	1,2133	0	0	0	0	0
K17	f	11313	29682	1,0093	2,1917	0	0	0	0	0
K17	g	29542	33485	2,0502	2,9539	0	0	0	0	0
K17	h	12570	11125	1,0039	1,1738	0	0	0	0	0
K18	a1	15164	13741	1,0432	1,3725	0	0	0	0	0
K18	a2	14719	13090	1,0183	1,3156	0	0	0	0	0

K18	b	55462	70000	3,3351	3,8572	0	0	0	0	0
K18	c	20467	20233	1,4309	1,9104	0	0	0	0	0
K18	d	23264	20030	1,633	1,7546	0	0	0	0	0
K18	e1	28633	30571	1,8727	2,37	0	0	0	0	0
K18	e2	14939	11418	1,0471	1,102	0	0	0	0	0
K18	f	62208	70000	3,9068	3,4587	0	0	0	0	0
K18	g	20191	30792	1,3866	2,9167	0	0	0	0	0
K18	h	14390	10515	1,0029	1,0468	0	0	0	0	0
K19	a1	14228	13392	1	1,2438	0	0	0	0	0
K19	a2	13942	10182	1	1,0117	0	0	0	0	0
K19	b	13001	8983	1	1,0643	0	0	0	0	0
K19	c	14062	8227	1,0075	1,0526	0	0	0	0	0
K19	d	14140	8569	1,0246	1,0909	0	0	0	0	0
K19	e1	11117	10787	1,078	1,2965	0	0	0	0	0
K19	e2	14559	8806	1,0213	1,0501	0	0	0	0	0
K19	f	29003	24002	1,9417	2,6613	0	0	0	0	0
K19	g	30767	22473	2,0024	2,5413	0	0	0	0	0
K19	h	12681	9358	1	1,0953	0	0	0	0	0
K2	a1	13049	10972	1,0333	1,0667	0	0	0	0	0
K2	a2	12237	10832	1,0448	1,0774	0	0	0	0	0
K2	b	12691	12268	1,0629	1,1644	0	0	0	0	0
K2	c	14085	9107	1,1564	1,0914	0	0	0	0	0
K2	d	16287	11491	1,3322	1,3107	0	0	0	0	0
K2	e1	13119	9258	1,0464	1,0921	0	0	0	0	0
K2	e2	12206	8555	1,0339	1,0291	0	0	0	0	0
K2	f	12187	8641	1,0401	1,0352	0	0	0	0	0
K2	g	31382	21402	2,3667	2,4996	0	0	0	0	0
K2	h	13431	14495	1,1422	1,4455	0	0	0	0	0
K20	a1	33057	30761	2,6209	3,3291	0	0	0	0	0

K20	a2	33350	24034	2,3385	2,7878	0	0	0	0	0
K20	b	55118	31623	3,726	3,5531	0	0	0	0	0
K20	c	18494	10680	1,3114	1,2672	0	0	0	0	0
K20	d	15655	10476	1,1103	1,2367	0	0	0	0	0
K20	e1	14125	8903	1	1,0479	0	0	0	0	0
K20	e2	22484	14813	1,5429	1,7255	0	0	0	0	0
K20	f	21934	16874	1,5808	2,098	0	0	0	0	0
K20	g	11846	9047	1,0027	1,1033	0	0	0	0	0
K20	h	20726	13035	1,529	1,5265	0	0	0	0	0
K21	a1	70000	10885	4,3712	1,2812	0	0	0	0	0
K21	a2	14569	9347	1,0457	1,0889	0	0	0	0	0
K21	b	28869	21101	1,9148	2,38	0	0	0	0	0
K21	c	43124	27157	2,6068	2,7988	0	0	0	0	0
K21	d	22108	16710	1,447	1,9322	0	0	0	0	0
K21	e1	51981	46275	3,0288	4,5767	0	0	0	0	0
K21	e2	12567	9372	1,0018	1,0859	0	0	0	0	0
K21	f	31131	19903	2,2021	2,2793	0	0	0	0	0
K21	g	51934	25714	3,5557	3,1797	0	0	0	0	0
K21	h	15483	9160	1,0233	1,0681	0	0	0	0	0
K22	a1	34932	19464	2,3984	2,2792	0	0	0	0	0
K22	a2	34316	21013	2,2068	2,3124	0	0	0	0	0
K22	b	16044	9278	1,135	1,2277	0	0	0	0	0
K22	c	14239	9092	1,0169	1,107	0	0	0	0	0
K22	d	13018	10542	1,0448	1,2743	0	0	0	0	0
K22	e1	18454	11024	1,3226	1,3005	0	0	0	0	0
K22	e2	13188	8471	1,0211	1,1295	0	0	0	0	0
K22	f	25033	12923	1,7308	1,6454	0	0	0	0	0
K22	g	38841	25229	2,5745	2,7588	0	0	0	0	0
K22	h	15433	11220	1,0529	1,2964	0	0	0	0	0

K3	a1	12309	10164	1,0534	1,0264	0	0	0	0	0
K3	a2	11853	9307	1,0284	1,0262	0	0	0	0	0
K3	b	26457	28772	2,2621	2,906	0	0	0	0	0
K3	c	21968	20402	1,8495	1,9672	0	0	0	0	0
K3	d	19349	19059	1,6721	1,9756	0	0	0	0	0
K3	e1	13705	12784	1,0849	1,2162	0	0	0	0	0
K3	e2	13551	10751	1,0503	1,0489	0	0	0	0	0
K3	f	20215	22407	1,8463	2,2106	0	0	0	0	0
K3	g	26550	26849	2,3241	2,631	0	0	0	0	0
K3	h	39241	34969	3,0533	3,2841	0	0	0	0	0
K4	a1	12482	11389	1,0381	1,2139	0	0	0	0	0
K4	a2	12711	10991	1,0663	1,131	0	0	0	0	0
K4	b	12524	13257	1,0759	1,284	0	0	0	0	0
K4	c	12579	11408	1,0601	1,1697	0	0	0	0	0
K4	d	17446	14474	1,3721	1,3917	0	0	0	0	0
K4	e1	12244	11377	1,0376	1,1043	0	0	0	0	0
K4	e2	23636	23030	1,9919	2,2561	0	0	0	0	0
K4	f	36276	44164	3,1133	4,0047	0	0	0	0	0
K4	g	30136	45583	2,4698	4,3109	0	0	0	0	0
K4	h	17955	16664	1,4283	1,6434	0	0	0	0	0
K5	a1	22616	15796	1,8723	1,6352	0	0	0	0	0
K5	a2	13273	12478	1,1227	1,2368	0	0	0	0	0
K5	b	12058	12640	1,03	1,2037	0	0	0	0	0
K5	c	10891	11844	1,0405	1,1372	0	0	0	0	0
K5	d	10752	12125	1,0327	1,2043	0	0	0	0	0
K5	e1	12266	11165	1,0245	1,0965	0	0	0	0	0
K5	e2	11764	11369	1,0306	1,1855	0	0	0	0	0
K5	f	11498	12976	1,0259	1,2637	0	0	0	0	0
K5	g	14246	19742	1,2819	1,8959	0	0	0	0	0

K5	h	12133	10695	1.0219	1.0878	0	0	0	0	0
K7	a1	11317	10420	1.0026	1.0762	0	0	0	0	0
K7	a2	11895	11153	1.0314	1,148	0	0	0	0	0
K7	b	13029	33665	1,1188	3,2231	0	0	0	0	0
K7	c	37823	51706	3,0358	4,4242	0	0	0	0	0
K7	d	12337	11471	1,0465	1,1668	0	0	0	0	0
K7	e1	11818	10815	1,0155	1,0963	0	0	0	0	0
K7	e2	11189	10847	1,0171	1,0871	0	0	0	0	0
K7	f	15193	19867	1,2871	1,9455	0	0	0	0	0
K7	g	38965	49619	2,962	4,7175	0	0	0	0	0
K7	h	11344	10086	1,0084	1,097	0	0	0	0	0
K8	a1	10978	11903	1,0888	1,2549	0	0	0	0	0
K8	a2	12423	11669	1,0505	1,1445	0	0	0	0	0
K8	b	49289	47647	3,8304	4,1314	0	0	0	0	0
K8	c	19774	22688	1,6465	2,0861	0	0	0	0	0
K8	d	30730	34307	2,5349	2,983	0	0	0	0	0
K8	e1	26847	34059	2,1837	3,1568	0	0	0	0	0
K8	e2	12282	10942	1,0263	1,083	0	0	0	0	0
K8	f	33211	52838	2,7207	4,8122	0	0	0	0	0
K8	g	19752	35654	1,9881	3,3976	0	0	0	0	0
K8	h	11494	11505	1,0201	1,153	0	0	0	0	0

Buchstaben a1-h = Zähne a1-h, H = Hund, K = Kontrolltier, RLU = relative light units

10.4 Ergebnisse der statistischen Auswertung der Aktivitätsassays

Es wird das globale Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt, das heißt, Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ werden als statistisch auffällig angesehen. Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) dient der Beschreibung des Zusammenhangs zweier nicht linearer Merkmale. Wenn nicht anders ausgewiesen handelt es sich bei dem festgestellten Grad einer Parodontalerkrankung nach Zahn um den Gesamt-Befund, d.h. der Grad orientiert sich für jeden Zahn am schlechtesten Befund aus klinischer und radiologischer Untersuchung.

Tabelle 10: Untersuchung der Zusammenhänge zwischen dem Schweregrad einer parodontalen Erkrankung nach Zahn und der maximalen Gelatinase-Aktivität, relative Werte

Maximale Gelatinase-Aktivität, relative Werte (Mittelwert und SD)	Grad der Parodontalerkrankung nach Zahn (Mittelwert und SD)	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
3,2248 ± 2,4923	1,5243 ± 0,91318	0,1274	0,0307	$Y = 1,8975 + 0,38547 \cdot X$

SD = standard deviation

Tabelle 11: Untersuchung der Zusammenhänge zwischen dem Schweregrad einer parodontalen Erkrankung nach Zahn und der maximalen Kollagenase-Aktivität, relative Werte

Maximale Kollagenase-Aktivität, relative Werte (Mittelwert und SD)	Grad der Parodontalerkrankung nach Zahn (Mittelwert und SD)	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
2,3733 ± 1,6358	1,5243 ± 0,91318	0,1807	0,0021	$Y = 1,8672 + 0,33203 \cdot X$

SD = standard deviation

Tabelle 12: Untersuchung der Zusammenhänge zwischen dem Schweregrad einer parodontalen Erkrankung nach Zahn und der maximalen Gelatinase-Aktivität, absolute Werte

Maximale Gelatinase-Aktivität, absolute Werte (Mittelwert und SD)	Grad der Parodontalerkrankung nach Zahn (Mittelwert und SD)	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
22251 ± 15436	1,5243 ± 0,91318	0,3084	<0,0001	Y= 13992 + 5418,7*X

SD = standard deviation

Tabelle 13: Untersuchung der Zusammenhänge zwischen dem Schweregrad einer parodontalen Erkrankung nach Zahn und der maximalen Kollagenase-Aktivität, absolute Werte

Maximale Kollagenase-Aktivität, absolute Werte (Mittelwert und SD)	Grad der Parodontalerkrankung nach Zahn (Mittelwert und SD)	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
22048 ± 16757	1,5243 ± 0,91318	0,2118	0,0003	Y= 16480 + 3653*X

SD = standard deviation

Tabelle 14: Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der relativen Enzymaktivität aller Zähne der Patientengruppe und der Kontrollgruppe nach Zahn

Zahn	Maximum Gelatine Patient (Mittelwert und SD)	Maximum Gelatine Kontrolltier (Mittelwert und SD)	p-Wert
a1	3,3561 ± 2,9943	1,5131 ± 0,8958	0,0006
a2	3,4406 ± 2,9348	1,3193 ± 0,4493	0,0003
b	3,6184 ± 2,5630	1,7996 ± 0,9503	0,0013
c	3,0883 ± 1,9683	1,7631 ± 0,9420	0,0022
d	2,4121 ± 2,2052	1,5630 ± 0,7357	0,0811
e1	3,2166 ± 3,0013	1,5171 ± 0,7731	0,001
e2	3,4746 ± 3,2541	1,3662 ± 0,6671	0,0006
f	4,0079 ± 3,1383	1,7224 ± 0,7795	0,0059
g	3,2495 ± 2,2850	1,8598 ± 0,7028	0,0419
h	2,6783 ± 2,2255	1,3551 ± 0,6079	0,0011
Zahn	Maximum Kollagen Patient (Mittelwert und SD)	Maximum Kollagen Kontrolltier (Mittelwert und SD)	p-Wert
a1	2,3266 ± 1,3970	1,5266 ± 0,6623	0,0093
a2	2,4216 ± 1,9199	1,4605 ± 0,7363	0,0003
b	2,8228 ± 2,0174	2,0363 ± 1,0143	0,1713
c	2,2624 ± 1,3254	1,8009 ± 0,8693	0,1823
d	1,8766 ± 1,3636	1,5990 ± 0,6113	0,7453
e1	2,3660 ± 1,6308	1,6355 ± 0,9143	0,024
e2	2,6940 ± 2,1800	1,3774 ± 0,4775	0,0056
f	2,8026 ± 2,0853	2,1400 ± 1,0098	0,669
g	2,5350 ± 1,7675	2,3636 ± 1,0646	0,8508
h	1,8338 ± 1,2432	1,4618 ± 0,5657	0,2046

Tabelle 15: Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der absoluten Enzymaktivität aller Zähne der Patientengruppe und der Kontrollgruppe nach Zahn

Zahn	Maximum Gelatine Patient (Mittelwert und SD)	Maximum Gelatine Kontrolltier (Mittelwert und SD)	p-Wert
a1	22591,7773 ± 17020,2305	20079,5020 ± 14083,6436	0,9387
a2	23678,3047 ± 18806,0293	17427,2988 ± 7839,6523	0,4117
b	26304,4727 ± 18202,6758	24112,3477 ± 14330,4463	0,9251
c	21521,6406 ± 13279,9893	23781,1504 ± 14334,3008	0,6443
d	17424,3066 ± 15726,4795	20321,0000 ± 10022,5654	0,0159
e1	23385,5840 ± 20087,8242	20472,1484 ± 11894,7246	0,4315
e2	23468,6660 ± 19639,4160	17666,7500 ± 8072,4243	0,9047
f	25604,6680 ± 16781,8672	22772,9023 ± 12159,2607	0,9455
g	22415,2500 ± 14630,6133	24986,0000 ± 10640,7930	0,1937
h	18179,4707 ± 13002,7422	17732,7500 ± 8234,1465	0,5961
Zahn	Maximum Kollagen Patient (Mittelwert und SD)	Maximum Kollagen Kontrolltier (Mittelwert und SD)	p-Wert
a1	23670,5000 ± 20201,6504	15528,0498 ± 7484,2329	0,4725
a2	22692,0000 ± 19133,3105	14055,3496 ± 7321,6831	0,1042
b	25625,7266 ± 20239,7812	21858,8008 ± 15352,1865	0,6381
c	20530,7832 ± 13977,9463	19491,6523 ± 13793,5762	0,62
d	17453,1406 ± 15065,4375	16560,0488 ± 9472,6289	0,4315
e1	23087,2520 ± 19549,9434	16984,5508 ± 11316,1504	0,4832
e2	25443,3320 ± 21468,1777	13527,7500 ± 5876,5010	0,0385
f	25142,5586 ± 19442,6562	23564,5488 ± 15675,3848	0,6443
g	24001,6934 ± 18400,9629	23895,9473 ± 11967,2021	0,4215
h	16644,5742 ± 12014,9727	14553,0010 ± 6844,1699	0,8474

Tabelle 16: Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der relativen Gelatinaseaktivität aller Zähne der Patientengruppe und der Kontrollgruppe unabhängig vom Zahn

Maximum Gelatine Patient (Mittelwert und SD)	Maximum Gelatine Kontrolltier (Mittelwert und SD)	p-Wert
3,2248 ± 2,4923	1,6139 ± 0,7528	<0,0001

Tabelle 17: Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der relativen Kollagenaseaktivität aller Zähne der Patientengruppe und der Kontrollgruppe unabhängig vom Zahn

Maximum Kollagen Patient (Mittelwert und SD)	Maximum Kollagen Kontrolltier (Mittelwert und SD)	p-Wert
2,3733 ± 1,6368	1,8002 ± 0,8552	0,0002

Tabelle 18: Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der absoluten Gelatinaseaktivität aller Zähne der Patientengruppe und der Kontrollgruppe unabhängig vom Zahn

Maximum Gelatine Patient (Mittelwert und SD)	Maximum Gelatine Kontrolltier (Mittelwert und SD)	p-Wert
22251,4902 ± 15435,9473	21441,1191 ± 11133,4355	0,1798

Tabelle 19: Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der absoluten Kollagenaseaktivität aller Zähne der Patientengruppe und der Kontrollgruppe unabhängig vom Zahn

Maximum Kollagen Patient (Mittelwert und SD)	Maximum Kollagen Kontrolltier (Mittelwert und SD)	p-Wert
22047,8320 ± 16756,9238	18746,4844 ± 11716,2139	0,4097

Tabelle 20: Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der relativen Gelatinaseaktivität der Patientengruppe und der Kontrollgruppe

Maximum Gelatine Patient (Mittelwert und SD)	Maximum Gelatine Kontrolltier (Mittelwert und SD)	p-Wert
2,7154 ± 1,5497	1,3941 ± 0,3930	0,0001

Tabelle 21: Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der relativen Kollagenaseaktivität der Patientengruppe und der Kontrollgruppe

Maximum Kollagen Patient (Mittelwert und SD)	Maximum Kollagen Kontrolltier (Mittelwert und SD)	p-Wert
2,0212 ± 0,8699	1,6106 ± 0,4496	0,0699

Tabelle 22: Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der absoluten Gelatinaseaktivität der Patientengruppe und der Kontrollgruppe

Maximum Gelatine Patient (Mittelwert und SD)	Maximum Gelatine Kontrolltier (Mittelwert und SD)	p-Wert
18740,9727 ± 9363,2666	18294,2500 ± 5534,0493	0,602

Tabelle 23: Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der absoluten Kollagenaseaktivität der Patientengruppe und der Kontrollgruppe

Maximum Kollagen Patient (Mittelwert und SD)	Maximum Kollagen Kontrolltier (Mittelwert und SD)	p-Wert
18349,5664 ± 9544,9424	16222,2119 ± 5517,8604	0,7976

Tabelle 24: Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der relativen Gelatinaseaktivität aller Hunde der Patientengruppe mit mindestens einem Zahn mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung und aller Hunde der Kontrollgruppe

Maximum Gelatine Patient (Mittelwert und SD)	Maximum Gelatine Kontrolltier (Mittelwert und SD)	p-Wert
2,3556 ± 1,1145	1,3941 ± 0,3930	0,0013

Tabelle 25: Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der relativen Kollagenaseaktivität aller Hunde der Patientengruppe mit mindestens einem Zahn mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung und aller Hunde der Kontrollgruppe, relative Werte

Maximum Kollagen Patient (Mittelwert und SD)	Maximum Kollagen Kontrolltier (Mittelwert und SD)	p-Wert
1,7588 ± 0,8886	1,6106 ± 0,4496	0,8337

Tabelle 26: Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der absoluten Gelatinaseaktivität aller Hunde der Patientengruppe mit mindestens einem Zahn mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung und aller Hunde der Kontrollgruppe

Maximum Gelatine Patient (Mittelwert und SD)	Maximum Gelatine Kontrolltier (Mittelwert und SD)	p-Wert
13047,3574 ± 5931,3423	18294,2500 ± 5534,0493	0,0057

Tabelle 27: Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der absoluten Kollagenaseaktivität aller Hunde der Patientengruppe mit mindestens einem Zahn mit Grad 0 einer Parodontalerkrankung und aller Hunde der Kontrollgruppe

Maximum Kollagen Patient (Mittelwert und SD)	Maximum Kollagen Kontrolltier (Mittelwert und SD)	p-Wert
15211,8916 ± 8546,8320	16222,2119 ± 5517,8604	0,3639

Tabelle 28: Statistische Auswertung bezüglich des Einflusses des Alters auf die relative Enzymaktivität

Abhängige Variable	p-Wert
Maximum Gelatine	0,4071
Maximum Kollagen	0,7672

Tabelle 29: Statistische Auswertung bezüglich des Einflusses der Körpermasse auf die relative Enzymaktivität

Abhängige Variable	p-Wert
Maximum Gelatine	0,1910
Maximum Kollagen	0,3130

Tabelle 30: Statistische Auswertung bezüglich des Einflusses des Alters auf die absolute Enzymaktivität

Abhängige Variable	p-Wert
Maximum Gelatine	0,8190
Maximum Kollagen	0,9482

Tabelle 31: Statistische Auswertung bezüglich des Einflusses der Körpermasse auf die absolute Enzymaktivität

Abhängige Variable	p-Wert
Maximum Gelatine	0,8445
Maximum Kollagen	0,4069

Tabelle 32: Statistischer Zusammenhang zwischen klinischem Grad der Parodontalerkrankung nach Zahn und relativer Enzymaktivität

Zahn	Klinischer Grad der Parodontalerkrankung (Mittelwert und SD)	Maximale Gelatinase-Aktivität, relative Werte (Mittelwert und SD)	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
a1	1,0556 ± 0,71492	3,3561 ± 2,9943	0,3278	0,051	Y= 0,83882 + 2,3848*X
a2	1,1944 ± 0,82183	3,4406 ± 2,9348	0,1324	0,4415	Y= 1,8964 + 1,2928*X
b	1,2778 ± 1,0313	3,6184 ± 2,5630	0,0257	0,8818	Y= 4,0445 - 0,33352*X
c	0,7222 ± 0,70147	3,0883 ± 1,9683	-0,431	0,0087	Y= 3,7118 - 0,86330*X
d	1,2222 ± 1,0720	2,4121 ± 2,2052	0,2074	0,2248	Y= 1,1113 + 1,0643*X
e1	1,1389 ± 0,68255	3,2166 ± 3,0013	0,5882	0,0002	Y= 0,07475 + 2,7587*X
e2	1,3056 ± 0,95077	3,4746 ± 3,2541	0,3394	0,0429	Y= 1,6114 + 1,4271*X
f	1,2500 ± 0,87423	4,0079 ± 3,1383	-0,21	0,219	Y= 4,2446 - 0,18937*X
g	0,75000 ± 0,60356	3,2495 ± 2,2850	-0,1594	0,3531	Y= 3,3253 - 0,10112*X
h	1,1111 ± 0,78478	2,6783 ± 2,2255	0,0973	0,5725	Y= 1,5260 + 1,0371*X
Zahn	Klinischer Grad der Parodontalerkrankung (Mittelwert und SD)	Maximale Kollagenase-Aktivität, relative Werte (Mittelwert und SD)	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
a1	1,0556 ± 0,71492	2,3266 ± 1,3970	0,315	0,0613	Y= 1,3860 + 0,89107*X
a2	1,1944 ± 0,82183	2,4216 ± 1,9199	0,1005	0,5596	Y= 2,0649 + 0,29861*X
b	1,2778 ± 1,0313	2,8228 ± 2,0174	-0,0859	0,6185	Y= 2,8530 - 0,02364*X
c	0,7222 ± 0,70147	2,2624 ± 1,3254	-0,0988	0,5666	Y= 2,4567 - 0,26903*X
d	1,2222 ± 1,0720	1,8766 ± 1,3636	0,2992	0,0763	Y= 1,1993 + 0,55409*X
e1	1,1389 ± 0,68255	2,3660 ± 1,6308	0,5115	0,0014	Y= 0,84939 + 1,3316*X
e2	1,3056 ± 0,95077	2,6940 ± 2,1800	0,2587	0,1276	Y= 1,8073 + 0,67917*X
f	1,2500 ± 0,87423	2,8026 ± 2,0853	-0,0677	0,6946	Y= 3,1157 - 0,25049*X
g	0,75000 ± 0,60356	2,5350 ± 1,7675	-0,1643	0,3384	Y= 2,8699 - 0,44659*X
h	1,1143 ± 0,79600	1,8338 ± 1,2432	0,0155	0,9297	Y= 1,3845 + 0,40324*X

Tabelle 33: Statistischer Zusammenhang zwischen radiologischem Grad der Parodontalerkrankung nach Zahn und relativer Enzymaktivität

Zahn	Radiologischer Grad der Parodontalerkrankung (Mittelwert und SD)	Maximale Gelatinase-Aktivität, relative Werte (Mittelwert und SD)	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
a1	1,2222 ± 0,68080	3,3561 ± 2,9943	-0,0981	0,569	$Y = 2,9120 + 0,36335 \cdot X$
a2	1,1944 ± 0,66845	3,4406 ± 2,9348	-0,0856	0,6196	$Y = 3,0220 + 0,35048 \cdot X$
b	1,6389 ± 0,96074	3,6184 ± 2,5630	0,0506	0,7696	$Y = 3,5392 + 0,04827 \cdot X$
c	1,5278 ± 0,73625	3,0883 ± 1,9683	0,0951	0,5813	$Y = 2,6577 + 0,28186 \cdot X$
d	1,0278 ± 0,65405	2,4121 ± 2,2052	0,0503	0,7708	$Y = 1,7520 + 0,64221 \cdot X$
e1	1,3333 ± 0,75593	3,2166 ± 3,0013	0,0535	0,7568	$Y = 2,4408 + 0,58181 \cdot X$
e2	1,3333 ± 0,75593	3,4746 ± 3,2541	-0,0259	0,8809	$Y = 2,7916 + 0,51227 \cdot X$
f	1,6111 ± 1,0220	4,0079 ± 3,1383	0,139	0,4187	$Y = 3,5076 + 0,31054 \cdot X$
g	1,6389 ± 0,79831	3,2495 ± 2,2850	-0,05	0,7722	$Y = 3,7773 - 0,32207 \cdot X$
h	1,0833 ± 0,69179	2,6783 ± 2,2255	0,0856	0,6197	$Y = 1,6376 + 0,96066 \cdot X$
Zahn	Radiologischer Grad der Parodontalerkrankung (Mittelwert und SD)	Maximale Kollagenase-Aktivität, relative Werte (Mittelwert und SD)	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
a1	1,2222 ± 0,68080	2,3266 ± 1,3970	-0,0653	0,7052	$Y = 2,1402 + 0,15251 \cdot X$
a2	1,1944 ± 0,66845	2,4216 ± 1,9199	0,076	0,6594	$Y = 2,2950 + 0,10593 \cdot X$
b	1,6389 ± 0,96074	2,8228 ± 2,0174	0,1342	0,435	$Y = 2,3566 + 0,28444 \cdot X$
c	1,5278 ± 0,73625	2,2624 ± 1,3254	0,0118	0,9455	$Y = 1,7180 + 0,35635 \cdot X$
d	1,0278 ± 0,65405	1,8766 ± 1,3636	0,2077	0,2241	$Y = 1,1560 + 0,70107 \cdot X$
e1	1,3333 ± 0,75593	2,3660 ± 1,6308	0,2746	0,1051	$Y = 1,4969 + 0,65180 \cdot X$
e2	1,3333 ± 0,75593	2,6940 ± 2,1800	0,0504	0,7705	$Y = 2,2173 + 0,35751 \cdot X$
f	1,6111 ± 1,0220	2,8026 ± 2,0853	0,3052	0,0703	$Y = 2,4477 + 0,22030 \cdot X$
g	1,6389 ± 0,79831	2,5350 ± 1,7675	-0,1547	0,3677	$Y = 3,4478 - 0,56699 \cdot X$
h	1,0857 ± 0,70174	1,8338 ± 1,2432	0,1628	0,3501	$Y = 1,3353 + 0,45919 \cdot X$

Tabelle 34: Statistischer Zusammenhang zwischen Gesamt-Grad der Parodontalerkrankung nach Zahn (orientierend am schlechtesten Befund aus klinischer und radiologischer Untersuchung) und relativer Enzymaktivität

Zahn	Grad der Parodontalerkrankung nach Zahn (Mittelwert und SD)	Maximale Gelatinase-Aktivität, relative Werte (Mittelwert und SD)	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
a1	1,3056 ± 0,82183	3,3561 ± 2,9943	-0,0154	0,929	$Y = 1,9229 + 1,0978 \cdot X$
a2	1,3889 ± 0,87105	3,4406 ± 2,9348	-0,0452	0,7935	$Y = 2,2691 + 0,84349 \cdot X$
b	1,7778 ± 1,0450	3,6184 ± 2,5630	0,0532	0,7578	$Y = 3,7414 - 0,06921 \cdot X$
c	1,5278 ± 0,73625	3,0883 ± 1,9683	0,0951	0,5813	$Y = 2,6577 + 0,28186 \cdot X$
d	1,3056 ± 1,0907	2,4121 ± 2,2052	0,2262	0,1847	$Y = 1,1066 + 0,99994 \cdot X$
e1	1,5000 ± 0,81064	3,2166 ± 3,0013	0,1934	0,2583	$Y = 1,3475 + 1,2460 \cdot X$
e2	1,6389 ± 0,99003	3,4746 ± 3,2541	0,1501	0,3821	$Y = 1,6499 + 1,1133 \cdot X$
f	1,6944 ± 0,98036	4,0079 ± 3,1383	0,0237	0,8909	$Y = 3,8569 + 0,08910 \cdot X$
g	1,6389 ± 0,79831	3,2495 ± 2,2850	-0,05	0,7722	$Y = 3,7773 - 0,32207 \cdot X$
h	1,3333 ± 0,86189	2,6783 ± 2,2255	0,0751	0,6631	$Y = 1,3893 + 0,96678 \cdot X$
Zahn	Grad der Parodontalerkrankung nach Zahn (Mittelwert und SD)	Maximale Kollagenase-Aktivität, relative Werte (Mittelwert und SD)	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
a1	1,3056 ± 0,82183	2,3266 ± 1,3970	-0,0045	0,9793	$Y = 1,8990 + 0,32754 \cdot X$
a2	1,3889 ± 0,87105	2,4216 ± 1,9199	0,0805	0,6409	$Y = 2,1039 + 0,22873 \cdot X$
b	1,7778 ± 1,0450	2,8228 ± 2,0174	0,0797	0,6442	$Y = 2,5122 + 0,17468 \cdot X$
c	1,5278 ± 0,73625	2,2624 ± 1,3254	0,0118	0,9455	$Y = 1,7180 + 0,35635 \cdot X$
d	1,3056 ± 1,0907	1,8766 ± 1,3636	0,3155	0,0609	$Y = 1,2001 + 0,51812 \cdot X$
e1	1,5000 ± 0,81064	2,3660 ± 1,6308	0,2967	0,0788	$Y = 1,1179 + 0,83206 \cdot X$
e2	1,6389 ± 0,99003	2,6940 ± 2,1800	0,175	0,3074	$Y = 1,7417 + 0,58105 \cdot X$
f	1,6944 ± 0,98036	2,8026 ± 2,0853	0,1994	0,2436	$Y = 2,6437 + 0,09379 \cdot X$
g	1,6389 ± 0,79831	2,5350 ± 1,7675	-0,1547	0,3677	$Y = 3,4478 - 0,55699 \cdot X$
h	1,3429 ± 0,87255	1,8338 ± 1,2432	0,0808	0,6444	$Y = 1,2870 + 0,40719 \cdot X$

Tabelle 35: Statistischer Zusammenhang zwischen Grad der Parodontalerkrankung nach Hund (orientierend am schlechtesten Befund Einzelzahnbefund eines Gebisses) und relativer Enzymaktivität

Zahn	Grad der Parodontalerkrankung nach Hund (Mittelwert und SD)	Maximale Gelatinase-Aktivität, relative Werte (Mittelwert und SD)	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
a1	2,6111 ± 0,93435	3,3561 ± 2,9943	0,0369	0,8309	$Y = 2,1284 + 0,47019 * X$
a2	2,6111 ± 0,93435	3,4406 ± 2,9348	0,0392	0,8204	$Y = 2,0510 + 0,53220 * X$
b	2,6111 ± 0,93435	3,6184 ± 2,5630	-0,075	0,6637	$Y = 4,5894 - 0,37187 * X$
c	2,6111 ± 0,93435	3,0883 ± 1,9683	-0,0226	0,8961	$Y = 3,6704 - 0,22295 * X$
d	2,6111 ± 0,93435	2,4121 ± 2,2052	0,2243	0,1884	$Y = -0,1307 + 0,92877 * X$
e1	2,6111 ± 0,93435	3,2166 ± 3,0013	0,1266	0,4618	$Y = 2,1165 + 0,42129 * X$
e2	2,6111 ± 0,93435	3,4746 ± 3,2541	0,2489	0,1433	$Y = ,35452 + 1,1949 * X$
f	2,6111 ± 0,93435	4,0079 ± 3,1383	0,1042	0,5453	$Y = 3,1005 + 0,34751 * X$
g	2,6111 ± 0,93435	3,2495 ± 2,2850	0,0018	0,9915	$Y = 3,5154 - 0,10186 * X$
h	2,6111 ± 0,93435	2,6783 ± 2,2255	-0,0168	0,9226	$Y = 2,2052 + 0,18118 * X$
Zahn	Grad der Parodontalerkrankung nach Hund (Mittelwert und SD)	Maximale Kollagenase-Aktivität, relative Werte (Mittelwert und SD)	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
a1	2,6111 ± 0,93435	2,3266 ± 1,3970	0,0602	0,7272	$Y = 1,8016 + 0,20106 * X$
a2	2,6111 ± 0,93435	2,4216 ± 1,9199	-0,0417	0,809	$Y = 2,3887 + 0,01258 * X$
b	2,6111 ± 0,93435	2,8228 ± 2,0174	-0,085	0,622	$Y = 2,9480 - 0,04795 * X$
c	2,6111 ± 0,93435	2,2624 ± 1,3254	-0,1389	0,4192	$Y = 2,5654 - 0,11602 * X$
d	2,6111 ± 0,93435	1,8766 ± 1,3636	0,187	0,2749	$Y = ,42548 + 0,55574 * X$
e1	2,6111 ± 0,93435	2,3660 ± 1,6308	0,2063	0,2274	$Y = 1,6350 + 0,27993 * X$
e2	2,6111 ± 0,93435	2,6940 ± 2,1800	0,2716	0,1091	$Y = 1,3411 + 0,51812 * X$
f	2,6111 ± 0,93435	2,8026 ± 2,0853	0,1545	0,3682	$Y = 2,4737 + 0,12597 * X$
g	2,6111 ± 0,93435	2,5350 ± 1,7675	-0,0045	0,9792	$Y = 2,6175 - 0,03160 * X$
h	2,6571 ± 0,90563	1,8338 ± 1,2432	0,1254	0,473	$Y = 1,4376 + 0,14912 * X$

Tabelle 36: Statistischer Zusammenhang zwischen klinischem Grad der Parodontalerkrankung nach Zahn und absoluter Enzymaktivität

Zahn	Klinischer Grad der Parodontalerkrankung (Mittelwert und SD)	Maximale Gelatinase-Aktivität, absolute Werte (Mittelwert und SD)	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
a1	1,0556 ± 0,71492	22592 ± 17020	0,4041	0,0145	Y= 8421,6 + 13424*X
a2	1,1944 ± 0,82183	23678 ± 18808	0,2604	0,1251	Y= 13749 + 8312,7*X
b	1,2778 ± 1,0313	26304 ± 18203	0,1839	0,2831	Y= 22048 + 3331,5*X
c	0,72222 ± 0,70147	21522 ± 13280	-0,0476	0,7826	Y= 21505 + 23,654*X
d	1,2222 ± 1,0720	17424 ± 15726	0,4821	0,0045	Y= 6513,1 + 8927,3*X
e1	1,1389 ± 0,68255	23386 ± 20088	0,5051	0,0017	Y= 5716,8 + 15514*X
e2	1,3056 ± 0,95077	23469 ± 19639	0,5128	0,0014	Y= 12293 + 8560,2*X
f	1,2500 ± 0,87423	25605 ± 16782	0,1129	0,5121	Y= 23046 + 2046,7*X
g	0,75000 ± 0,60356	22415 ± 14631	0,091	0,5978	Y= 20099 + 3088,1*X
h	1,1111 ± 0,78478	18179 ± 13003	0,2317	0,1739	Y= 10294 + 7096,9*X
Zahn	Klinischer Grad der Parodontalerkrankung (Mittelwert und SD)	Maximale Kollagenase-Aktivität, absolute Werte (Mittelwert und SD)	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
a1	1,0556 ± 0,71492	23671 ± 20202	0,3882	0,0272	Y= 9186,6 + 13722*X
a2	1,1944 ± 0,82183	22692 ± 19133	0,2833	0,0941	Y= 12705 + 8360,9*X
b	1,2778 ± 1,0313	25626 ± 20240	-0,0165	0,9241	Y= 24439 + 929,09*X
c	0,72222 ± 0,70147	20531 ± 13978	-0,0143	0,9341	Y= 21359 - 1147,4*X
d	1,2222 ± 1,0720	17453 ± 15065	0,5461	0,0006	Y= 10009 + 6090,7*X
e1	1,1389 ± 0,68255	23087 ± 19550	0,5462	0,0006	Y= 5403,4 + 15527*X
e2	1,3056 ± 0,95077	25443 ± 21468	0,3586	0,0318	Y= 15554 + 7574,8*X
f	1,2500 ± 0,87423	25143 ± 19443	-0,1838	0,9157	Y= 27178 - 1628,6*X
g	0,75000 ± 0,60356	24002 ± 18401	-0,0888	0,6066	Y= 25230 - 1637,5*X
h	1,1143 ± 0,79600	16645 ± 12015	0,1488	0,3937	Y= 11424 + 4694,7*X

Tabelle 37: Statistischer Zusammenhang zwischen radiologischem Grad der Parodontalerkrankung nach Zahn und absoluter Enzymaktivität

Zahn	Radiologischer Grad der Parodontalerkrankung (Mittelwert und SD)	Maximale Gelatinase-Aktivität, absolute Werte (Mittelwert und SD)	Rangkorrelationskoeffizient Spearman	p-Wert	Steigungsformel
a1	1,2222 ± 0,68080	22592 ± 17020	0,1899	0,2673	Y= 16604 + 4898,7*X
a2	1,1944 ± 0,66845	23678 ± 18808	0,2758	0,1035	Y= 14247 + 7895,8*X
b	1,6389 ± 0,96074	26304 ± 18203	0,1897	0,2678	Y= 19751 + 3999,0*X
c	1,5278 ± 0,73625	21522 ± 13280	0,1439	0,4024	Y= 20181 + 877,80*X
d	1,0278 ± 0,65405	17424 ± 15726	0,3893	0,0189	Y= 7135,4 + 10011*X
e1	1,3333 ± 0,75593	23386 ± 20088	0,3969	0,0166	Y= 9862,8 + 10142*X
e2	1,3333 ± 0,75593	23469 ± 19639	0,3117	0,0642	Y= 14784 + 6513,7*X
f	1,6111 ± 1,0220	25605 ± 16782	0,1922	0,2615	Y= 20971 + 2876,2*X
g	1,6389 ± 0,79831	22415 ± 14631	-0,093	0,5897	Y= 26587 - 2545,8*X
h	1,0833 ± 0,69179	18179 ± 13003	0,5099	0,0015	Y= 8105,4 + 9299,1*X
Zahn	Radiologischer Grad der Parodontalerkrankung (Mittelwert und SD)	Maximale Kollagenase-Aktivität, absolute Werte (Mittelwert und SD)	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
a1	1,2222 ± 0,68080	23671 ± 20202	0,0089	0,9588	Y= 19832 + 3140,6*X
a2	1,1944 ± 0,66845	22692 ± 19133	0,2113	0,216	Y= 16659 + 5050,9*X
b	1,6389 ± 0,96074	25626 ± 20240	0,0745	0,666	Y= 21959 + 2237,6*X
c	1,5278 ± 0,73625	20531 ± 13978	0,0427	0,8046	Y= 17475 + 2000,5*X
d	1,0278 ± 0,65405	17453 ± 15065	0,4529	0,0055	Y= 8804,6 + 8414,8*X
e1	1,3333 ± 0,75593	23087 ± 19550	0,3311	0,0486	Y= 13512 + 7181,5*X
e2	1,3333 ± 0,75593	25443 ± 21468	0,1244	0,4696	Y= 19943 + 4125,4*X
f	1,6111 ± 1,0220	25143 ± 19443	0,2702	0,1109	Y= 22147 + 1859,3*X
g	1,6389 ± 0,79831	24002 ± 18401	-0,2271	0,1828	Y= 32674 - 5291,3*X
h	1,0857 ± 0,70174	16645 ± 12015	0,2752	0,1095	Y= 11564 + 4679,0*X

Tabelle 38: Statistischer Zusammenhang zwischen Gesamt-Grad der Parodontalerkrankung nach Zahn (orientierend am schlechtesten Befund aus klinischer und radiologischer Untersuchung) und absoluter Enzymaktivität

Zahn	Grad der Parodontalerkrankung nach Zahn (Mittelwert und SD)	Maximale Gelatinase-Aktivität, absolute Werte (Mittelwert und SD)	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
a1	1,3056 ± 0,82183	22592 ± 17020	0,2511	0,1396	Y= 12589 + 7661,7*X
a2	1,3889 ± 0,87105	23678 ± 18808	0,3006	0,0748	Y= 12290 + 8199,3*X
b	1,7778 ± 1,0450	26304 ± 18203	0,1778	0,2996	Y= 20453 + 3291,4*X
c	1,5278 ± 0,73625	21522 ± 13280	0,1439	0,4024	Y= 20181 + 877,8*X
d	1,3056 ± 1,0907	17424 ± 15726	0,4998	0,0019	Y= 6439,5 + 8413,9*X
e1	1,5000 ± 0,81064	23386 ± 20088	0,4397	0,0073	Y= 6441,4 + 11296*X
e2	1,6389 ± 0,99003	23469 ± 19639	0,5019	0,0018	Y= 9788,6 + 8347,2*X
f	1,6944 ± 0,98036	25605 ± 16782	0,1625	0,3437	Y= 22140 + 2044,8*X
g	1,6389 ± 0,79831	22415 ± 14631	-0,093	0,5897	Y= 26587 - 2545,8*X
h	1,3333 ± 0,86189	18179 ± 13003	0,3707	0,026	Y= 8585,9 + 7195,2*X
Zahn	Grad der Parodontalerkrankung nach Zahn (Mittelwert und SD)	Maximale Kollagenase-Aktivität, absolute Werte (Mittelwert und SD)	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
a1	1,3056 ± 0,82183	23671 ± 20202	0,0701	0,6847	Y= 15711 + 6096,7*X
a2	1,3889 ± 0,87105	22692 ± 19133	0,3105	0,0653	Y= 12346 + 7448,8*X
b	1,7778 ± 1,0450	25626 ± 20240	0,0157	0,9275	Y= 23393 + 1255,8*X
c	1,5278 ± 0,73625	20531 ± 13978	0,0427	0,8046	Y= 17475 + 2000,5*X
d	1,3056 ± 1,0907	17453 ± 15065	0,5364	0,0007	Y= 10142 + 5600*X
e1	1,5000 ± 0,81064	23087 ± 19550	0,3752	0,0241	Y= 9326,6 + 9173,8*X
e2	1,6389 ± 0,99003	25443 ± 21468	0,2526	0,1372	Y= 15220 + 6237,9*X
f	1,6944 ± 0,98036	25143 ± 19443	0,1733	0,312	Y= 24001 + 673,57*X
g	1,6389 ± 0,79831	24002 ± 18401	-0,2271	0,1828	Y= 32674 - 5291,3*X
h	1,3429 ± 0,87255	16645 ± 12015	0,2556	0,1731	Y= 10636 + 4474,4*X

Tabelle 39: Statistischer Zusammenhang zwischen Grad der Parodontalerkrankung nach Hund (orientierend am schlechtesten Befund Einzelzahnbefund eines Gebisses) und absoluter Enzymaktivität

Zahn	Grad der Parodontalerkrankung nach Hund (Mittelwert und SD)	Maximale Gelatinase-Aktivität, absolute Werte (Mittelwert und SD)	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
a1	2,6111 ± 0,93435	22592 ± 17020	0,1912	0,264	Y= 14928 + 2935,2*X
a2	2,6111 ± 0,93435	23678 ± 18808	0,1467	0,3933	Y= 7782,4 + 6087,8*X
b	2,6111 ± 0,93435	26304 ± 18203	0,0066	0,9694	Y= 26217 + 33,630*X
c	2,6111 ± 0,93435	21522 ± 13280	0,0375	0,8281	Y= 22839 - 504,33*X
d	2,6111 ± 0,93435	17424 ± 15726	0,3498	0,0365	Y= -659,61 + 6925,8*X
e1	2,6111 ± 0,93435	23386 ± 20088	0,1805	0,2922	Y= 13143 + 3922,7*X
e2	2,6111 ± 0,93435	23469 ± 19639	0,4271	0,0094	Y= -495,05 + 9177,6*X
f	2,6111 ± 0,93435	25605 ± 16782	0,1827	0,2861	Y= 20732 + 1866,2*X
g	2,6111 ± 0,93435	22415 ± 14631	0,0488	0,7775	Y= 20330 + 798,43*X
h	2,6111 ± 0,93435	18179 ± 13003	0,0618	0,7205	Y= 15548 + 1007,8*X
Zahn	Grad der Parodontalerkrankung nach Hund (Mittelwert und SD)	Maximale Kollagenase-Aktivität, absolute Werte (Mittelwert und SD)	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
a1	2,6111 ± 0,93435	23671 ± 20202	0,0774	0,6538	Y= 17712 + 2281,8*X
a2	2,6111 ± 0,93435	22692 ± 19133	-0,0089	0,959	Y= 14599 + 3099,4*X
b	2,6111 ± 0,93435	25626 ± 20240	-0,0677	0,6948	Y= 25912 - 109,57*X
c	2,6111 ± 0,93435	20531 ± 13978	-0,1014	0,5563	Y= 26154 - 2153,6*X
d	2,6111 ± 0,93435	17453 ± 15065	0,2904	0,0858	Y= 2903,5 + 5572,2*X
e1	2,6111 ± 0,93435	23087 ± 19550	0,1936	0,2578	Y= 15818 + 2783,8*X
e2	2,6111 ± 0,93435	25443 ± 21468	0,191	0,2644	Y= 8232,4 + 6591,4*X
f	2,6111 ± 0,93435	25143 ± 19443	0,1586	0,3557	Y= 20934 + 1611,8*X
g	2,6111 ± 0,93435	24002 ± 18401	-0,0152	0,9297	Y= 22330 + 640,10*X
h	2,6571 ± 0,90563	16645 ± 12015	0,0704	0,6876	Y= 13957 + 1011,6*X

Tabelle 40: Statistische Auswertung bezüglich der Übereinstimmung des ermittelten klinischen und radiologischen Grades der Parodontalerkrankung für alle Zähne

Zahn	Klinischer Grad der Parodontalerkrankung (Mittelwert und SD)	Radiologischer Grad der Parodontalerkrankung (Mittelwert und SD)	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
a1	1,0556 ± 0,71492	1,2222 ± 0,68080	0,6692	<0,0001	Y= 0,59938 + 0,59006*X
a2	1,1944 ± 0,82183	1,1944 ± 0,66845	0,5952	0,0001	Y= 0,60635 + 0,49236*X
b	1,2778 ± 1,0313	1,6389 ± 0,96074	0,5414	0,0007	Y= 0,89702 + 0,58060*X
c	0,72222 ± 0,70147	1,5278 ± 0,73625	0,1079	0,5309	Y= 1,3065 + 0,30645*X
d	1,2222 ± 1,0720	1,0278 ± 0,65405	0,7954	<0,0001	Y= 0,51796 + 0,41713*X
e1	1,1389 ± 0,68255	1,3333 ± 0,75593	0,3566	0,0328	Y= 0,82112 + 0,444974*X
e2	1,3066 ± 0,95077	1,3333 ± 0,75593	0,3585	0,0318	Y= 0,94820 + 0,29500*X
f	1,2500 ± 0,87423	1,6111 ± 1,0220	0,5041	0,0017	Y= 0,65317 + 0,76636*X
g	0,75 ± 0,60356	1,6389 ± 0,79831	0,1422	0,4081	Y= 1,4183 + 0,29412*X
h	1,1111 ± 0,78478	1,0833 ± 0,69179	0,4929	0,0023	Y= 0,58505 + 0,44845*X

SD = standard deviation

Tabelle 41: Statistische Auswertung bezüglich der Übereinstimmung der relativen Enzymaktivität an zwei Probenentnahmestellen

Ig Maximum Gelatine (Mittelwert und SD) Zahn a1	Ig Maximum Gelatine (Mittelwert und SD) Zahn a2	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
0,29367 ± 0,31982	0,29466 ± 0,31574	0,516	< 0,001	$Y = 0,14510 + 0,50930 \cdot X$
Ig Maximum Kollagen (Mittelwert und SD) Zahn a1	Ig Maximum Kollagen (Mittelwert und SD) Zahn a2	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
0,24743 ± 0,22261	0,23376 ± 0,24428	0,402	0,002	$Y = 0,12456 + 0,44133 \cdot X$
Ig Maximum Gelatine (Mittelwert und SD) Zahn e1	Ig Maximum Gelatine (Mittelwert und SD) Zahn e2	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
0,29262 ± 0,29737	0,28797 ± 0,32392	0,545	< 0,001	$Y = 0,11411 + 0,59413 \cdot X$
Ig Maximum Kollagen (Mittelwert und SD) Zahn e1	Ig Maximum Kollagen (Mittelwert und SD) Zahn e2	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
0,25128 ± 0,23367	0,24641 ± 0,26897	0,339	0,011	$Y = 0,14849 + 0,38968 \cdot X$

Ig = Logarithmus, SD = standard deviation

Tabelle 42: Statistische Auswertung bezüglich der Übereinstimmung der absoluten Enzymaktivität an zwei Probenentnahmestellen

Ig Maximum Gelatine (Mittelwert und SD) Zahn a1	Ig Maximum Gelatine (Mittelwert und SD) Zahn a2	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
4,2403 ± 0,28373	4,2421 ± 0,26750	0,29	0,03	$Y = 3,0842 + 0,27307 \cdot X$
Ig Maximum Kollagen (Mittelwert und SD) Zahn a1	Ig Maximum Kollagen (Mittelwert und SD) Zahn a2	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
4,2217 ± 0,26485	4,1988 ± 0,25803	0,386	0,003	$Y = 2,6092 + 0,37653 \cdot X$
Ig Maximum Gelatine (Mittelwert und SD) Zahn e1	Ig Maximum Gelatine (Mittelwert und SD) Zahn e2	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
4,2336 ± 0,31448	4,2344 ± 0,27412	0,316	0,018	$Y = 3,0688 + 0,27533 \cdot X$
Ig Maximum Kollagen (Mittelwert und SD) Zahn e1	Ig Maximum Kollagen (Mittelwert und SD) Zahn e2	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	p-Wert	Steigungsformel
4,2173 ± 0,27932	4,2154 ± 0,28486	0,312	0,019	$Y = 2,8717 + 0,31860 \cdot X$

Ig = Logarithmus, SD = standard deviation

10.5 MMP-Gehalt der jeweiligen Proben

Tabelle 43: Tabelle zu den Gehalten an MMP-2, -3, -8 und -9 der verschiedenen Proben

Proband	Zahn	MMP-8-Gehalt (ng/ml)	MMP-9-Gehalt (ng/ml)	MMP-3-Gehalt (ng/ml)	MMP-2-Gehalt (ng/ml)
H1	b			0,052	
H10	b	1,28			
H10	f		0,063		
H10	g		0,052		
H11	d		0,052		
H12	b				0,37
H13	a1			0,052	
H13	e1			0,055	0,2
H15	a2			0,046	
H15	e1			0,047	
H15	e2			0,049	
H16	b	1,41	0,05		
H17	e2	4,84	0,091		
H17	f		0,028		
H18	f		0,05	0,053	
H19	e1			0,05	0,04
H19	f	0,21	0,523		
H2	f	0,53			
H20	f	1,92	0,343		
H21	b		0,069	0,045	
H22	a1		0,011		
H22	e1		0,021		
H22	h			0,044	
H23	a2			0,048	
H23	d		0,078		0,19
H23	f			0,045	
H24	e2			0,05	
H24	f	0,49	0,144		
H25	a1			0,023	
H25	a2			0,023	
H25	g			0,05	
H26	a1			0,025	
H27	f			0,047	
H27	g			0,028	
H28	e1			0,044	
H29	a1	1,51			
H29	a2		0,048		
H29	b		0,05	0,047	
H29	e1		0,029		

H3	f	2,56			
H3	h	1,08			
H30	g		0,099		
H31	h			0,046	
H34	a1		0,084		
H34	b		0,046	0,048	
H34	e1		0,046		
H34	e2		0,035	0,045	
H35	b		0,022	0,044	
H35	d		0,936	0,042	
H35	e1		0,051		
H35	f		0,035		
H35	h		0,04		
H4	e2	6,12			
H5	a1		0,086	0,04	
H5	b		0,039		
H5	c			0,04	0,02
H5	g	5,33	0,031		
H6	a1	2,6	0,025		
H6	d	2,39	0,032		
H7	a1			0,024	
H7	e1	0,04			
H8	a2				0,03
H8	c				0,17
H9	e1				0,62
H9	e2				0,75
H9	h			0,044	
K1	c		0,023	0,034	0,13
K1	e1		0,065		
K12	e1		0,042	0,039	0,11
K16	a2			0,044	0,12
K16	c				0,11
K18	b			0,037	
K19	g			0,023	
K2	g		0,063	0,036	
K20	b		0,032	0,037	0,08
K21	a1		0,035		
K21	g			0,015	
K3	a1		0,478	0,054	0,49
K3	a2		0,114	0,047	0,135

ng/ml = Nanogramm/ml

N. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer dafür, dass er mir ermöglicht hat meine Doktorarbeit in der Klinik für Kleintiere (Chirurgie) der Justus-Liebig-Universität Gießen anzufertigen. Zudem möchte ich mich bei Frau Dr. Cetina Thiel bedanken für die Betreuung meiner Doktorarbeit und Organisation der Zusammenarbeit mit dem Labor des Institutes für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart. Hier möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Angelika Hausser bedanken für die tatkräftige Unterstützung bei den Laborarbeiten und der Auswertung meiner Daten. Ich danke zudem besonders der Gesellschaft zur Förderung Kynologischer Forschung e.V. (GKF) für die finanzielle Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht hätte durchgeführt werden können.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Isabelle Ritz, die mir während der gesamten Zeit als Ansprechpartner zur Verfügung stand und mir meine praktischen zahnärztlichen Fähigkeiten mit auf den Weg gab. Außerdem bedanke ich mich für die statistische Auswertung meiner Daten und die kompetente Betreuung bei Herrn Dr. Klaus Failing und Frau Marion Sparenberg von der AG Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. An dieser Stelle möchte ich auch Frau Dr. Sylke Enderlein danken für ihre Unterstützung bei der Statistik. Des Weiteren danke ich den Mitarbeitern am Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, dass mir die Geräte im Labor zur Verfügung gestellt wurden und für die Aufbewahrung meiner Proben. Ich danke allen Hundebesitzern, die ihre Zustimmung zur Teilnahme an meiner Studie gegeben haben und mir ihre Tiere anvertraut haben.

Ich möchte ganz herzlich meiner Kollegin und wundervollen Freundin Dr. Franziska Schmied danken, die mich während der Anfertigung meiner Dissertation stets unterstützt hat und mir in allen Lebenslagen mit offenem Ohr und offenen Armen zur Seite steht. Vielen Dank dafür. Außerdem bei allen Freunden und Kollegen, die über die Jahre gemäß der Devise „geteiltes Leid ist halbes Leid“ für mich da waren.

Ein großer Dank geht an meine Familie und vor allem meinen Vater, der getreu dem Motto „mit Zuckerbrot und Peitsche“ einen wichtigen Anteil an der Fertigstellung dieser Arbeit hatte und Roman Thissen für die jahrelange Förderung. Zu guter Letzt möchte ich mich bei Sebastian bedanken, ohne den ich diese Arbeit nicht zu Ende gebracht hätte. Er ist mein Fels in der Brandung.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6812-7



9 783835 196812 7