



# Matrix-Metalloproteinasen in feliner Gingiva

unter besonderer Berücksichtigung  
der resorptiven Läsionen

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

**Isabelle Alexandra Ritz**





## **Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der  
Deutschen Nationalbibliografie;  
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2015

© 2015 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**,  
Gießen  
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-254-4

Verlag: DVG Service GmbH  
Friedrichstraße 17  
35392 Gießen  
0641/24466  
[info@dvg.de](mailto:info@dvg.de)  
[www.dvg.de](http://www.dvg.de)

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin  
Klinik für Kleintiere, Chirurgie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

**Matrix-Metalloproteinasen in feliner Gingiva unter  
besonderer Berücksichtigung der resorptiven Läsionen**

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

Eingereicht von  
**Isabelle Alexandra Ritz**  
Tierärztin aus Neunkirchen (Saar)

Gießen 2015



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

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

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

Prof. Dr. Carsten Staszky

Tag der Disputation: 01. April 2015



*„Wir müssen unbedingt Raum für Zweifel lassen, sonst gibt es keinen Fortschritt, kein Dazulernen. Man kann nichts Neues herausfinden, wenn man nicht vorher eine Frage stellt. Und um zu fragen, bedarf es des Zweifelns.“*

Richard P. Feynman



***Meiner Familie***



## Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>1</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IV</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 ANATOMIE DER MUNDHÖHLE UND ZÄHNE .....</b>	<b>2</b>
2.1.1 MUNDHÖHLE .....	2
2.1.2 ZÄHNE UND ZAHNHALTEAPPARAT .....	2
2.1.3 MIKROSKOPISCHE ANATOMIE DES ZAHNES, ZAHNHALTEAPPARATES UND DER GINGIVA.....	5
<b>2.2 RESORPTIVE LÄSIONEN (RL) .....</b>	<b>8</b>
2.2.1 CHARAKTERISIERUNG UND KLINISCHE EINTEILUNG .....	8
2.2.2 HISTOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN DER RESORPTIVEN LÄSIONEN .....	11
2.2.3 THEORIEN ZUR ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE DER RESORPTIVEN LÄSIONEN .....	13
2.2.4 RESORPTIVE LÄSIONEN ANDERER SPEZIES .....	16
<b>2.3 MATRIX-METALLOPROTEINASEN (MMPs).....</b>	<b>19</b>
2.3.1 EINTEILUNG, AUFBAU UND FUNKTION DER MATRIX-METALLOPROTEINASEN.....	19
2.3.2 REGULATION DER MATRIX-METALLOPROTEINASE-AKTIVITÄT.....	24
2.3.2.1 Aktivierung.....	24
2.3.2.2 Gewebeinhibitoren und andere Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen.....	25
2.3.3 BEDEUTUNG VON MATRIX-METALLOPROTEINASEN IN DER HUMANMEDIZIN .....	26
2.3.3.1 Matrix-Metalloproteinasen bei Mundhöhlenerkrankungen des Menschen .....	27
2.3.3.1.1 Parodontitis .....	27
2.3.3.1.2 Karies .....	28
2.3.4 BEDEUTUNG VON MATRIX-METALLOPROTEINASEN IN DER VETERINÄRMEDIZIN .....	29
2.3.4.1 Matrix-Metalloproteinasen bei der Katze.....	29
<b>3 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>32</b>
3.1 PATIENTENGUT .....	32

<b>3.2 PRÄANÄSTHETISCHE UNTERSUCHUNGEN .....</b>	<b>34</b>
<b>3.3 ANÄSTHESIE .....</b>	<b>34</b>
<b>3.4 UNTERSUCHUNG DER MUNDHÖHLE .....</b>	<b>34</b>
3.4.1 ZAHNSTATUS.....	35
3.4.2 PARODONTALSTATUS .....	35
3.4.3 BEURTEILUNG DER RESORPTIVEN LÄSIONEN UND RADIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG: .....	38
<b>3.5 PROBENENTNAHME UND TRANSPORT.....</b>	<b>40</b>
<b>3.6 BLUTPROBE.....</b>	<b>41</b>
<b>3.7 PROBENAUFBEREITUNG UND UNTERSUCHUNG.....</b>	<b>41</b>
3.7.1 AUFBEREITUNG DER GEWEBEPROBEN .....	41
3.7.2 Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung und Toluidinblaufärbung .....	41
3.7.3 Immunhistologischer Nachweis .....	42
3.7.3.1 Antikörper und Seren.....	42
3.7.3.2 Protokoll der Immunhistochemischen Reaktion .....	43
3.7.3.3 Kontrollen .....	44
3.7.4 LICHTMIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG .....	46
<b>3.8 STATISTISCHE AUSWERTUNG.....</b>	<b>48</b>
<b><u>4 ERGEBNISSE.....</u></b>	<b><u>50</u></b>
<b>4.1 ERGEBNISSE DER KLINISCHEN UND HISTOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN.....</b>	<b>50</b>
<b>4.2 ERGEBNISSE DER IMMUNHISTOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN.....</b>	<b>53</b>
4.2.1 MMP-1 .....	55
4.2.2 MMP-2.....	60
4.2.3 MMP-8.....	63
4.2.4 TIMP-1.....	65
4.2.5 TIMP-2.....	67
<b>4.3 FOTODOKUMENTATION DER BEFUNDE .....</b>	<b>70</b>
4.3.1 HISTOLOGISCHE BEFUNDE .....	70
4.3.3 IMMUNHISTOLOGISCHE BEFUNDE DER GINGIVA .....	71
<b><u>5 DISKUSSION.....</u></b>	<b><u>73</u></b>
<b>5.1 METHODIK DER UNTERSUCHUNG.....</b>	<b>73</b>
5.1.1 STUDIENDESIGN, PATIENTENGUT.....	73
5.1.2 PROBENBEARBEITUNG .....	75
5.1.3 HISTOLOGISCHE UND IMMUNHISTOLOGISCHE AUSWERTUNG.....	76

<b>5.2 ERGEBNISSE</b> .....	<b>77</b>
5.2.1 <i>KLINISCHE UND PATHOHISTOLOGISCHE BEFUNDE/VERTEILUNG DER PATIENTEN</i> .....	77
5.2.2 <i>IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN</i> .....	78
5.2.3 <i>MMP-1</i> .....	82
5.2.4 <i>MMP-2</i> .....	83
5.2.5 <i>MMP-8</i> .....	84
5.2.6 <i>TIMP-1</i> .....	85
5.2.7 <i>TIMP-2</i> .....	86
<b>5.3 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK</b> .....	<b>87</b>
<b><u>6 ZUSAMMENFASSUNG</u></b> .....	<b><u>91</u></b>
<b><u>7 SUMMARY</u></b> .....	<b><u>93</u></b>
<b><u>8 LITERATURÜBERSICHT</u></b> .....	<b><u>95</u></b>
<b><u>9 ANHANG</u></b> .....	<b><u>128</u></b>
9.1 <i>BEFUNDBÖGEN DER FIRMA PHARMACIA NACH DDR. FAHRENKRUG</i> .....	128
9.2 <i>BEZUGSQUELLEN VERWENDETER MEDIKAMENTE UND UNTERSUCHUNGSMATERIALIEN</i> .....	130
9.3 <i>LÖSUNGEN UND PUFFER FÜR DIE IMMUNHISTOLOGIE</i> .....	131
9.4 <i>HERSTELLER UND BEZUGSQUELLEN VERWENDETER MATERIALIEN</i> .....	131
9.5 <i>HERSTELLER UND BEZUGSQUELLEN VERWENDETER LABORGERÄTE</i> .....	132
9.7 <i>AUSWERTUNGSBÖGEN FÜR DIE HE-SCHNITTE UND IMMUNHISTOCHEMIE</i> .....	134
9.8 <i>TABELLEN ZUR ÜBERSICHT ÜBER PATIENTEN UND STATISTISCHE AUSWERTUNG</i> .....	136
<b><u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u></b> .....	<b><u>150</u></b>
<b><u>TABELLENVERZEICHNIS</u></b> .....	<b><u>154</u></b>
<b><u>DANKSAGUNG</u></b> .....	<b><u>156</u></b>
<b><u>ERKLÄRUNG</u></b> .....	<b><u>158</u></b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Anzahl der immunhistologisch positiv markierten Zellen
A. dest.	Destilliertes Wasser
AVDC	American Veterinary Dental College
Alv	Alveolarknochenreste
BSA	Bovines Serumalbumin
Bz	Basalzellschicht
bzw.	Beziehungsweise
CMTs	Chemisch modifizierte Tetrazykline
CORL	Canine odontoklastische resorptive Läsionen
EBE	Essigsäurebutylester
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMMPRIN	Extracellular matrix metalloproteinase inducer, extrazellulärer Matrix-Metalloproteinasen Induktor
End	Endothelzellen
Ent	Entzündungszellen
EOTRH	Equine odontoclastic tooth resorption and hypercementosis
Ep	Epithel gesamt
EZM	Extrazelluläre Matrix
EZR	Extrazellulärraum
FCGS	Feline chronische Gingivitis/Stomatitis
FCV	Felines Calicivirus
FIV	Felines Immundefizienzvirus
FORL	Feline odontoklastische resorptive Läsionen
Fzb	Fibrozyten/-blasten
ggr.	Geringgradig
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
h	Stunde
hgr.	Hochgradig
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
I	Intensität des immunhistologischen Signals
IgE	Immunglobulin E
IL-1	Interleukin-1
IL-1-β	Interleukin-1-beta
IL-6	Interleukin-6

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

JAK	Januskinase
kg	Kilogramm
m	Männlich
Mast	Mastzellen
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
mg	Milligramm
mgr.	Mittelgradig
min	Minute
mk	männlich-kastriert
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MT-MMP	„membran-type“ MMP = membrangebundene MMP
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug, nicht-steroidales Antiphlogistikum
o.g.	oben genannt
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphate-buffered saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Peri	Perivaskuläre Entzündungszellinfiltrate
pH-Wert	<i>potentia hydrogenii</i> (Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wäßrigen Lösung)
PLC	Pathogen-sezernierte Phospholipase
PMT	Prinomastat
pro-MMP	Pro-Form einer Matrix-Metalloproteinase
PUMP	Putative Metalloproteinase
RANK	Receptor activator of NF-κB
RANKL	Receptor activator of NF-κB ligand
RECK	reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs
RL	Resorptive Läsionen
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction, Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
Sc	Immunhistologischer Score
SIBLING	Small, Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein
SPF	Spezifisch pathogenfrei

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
s.u.	siehe unten
TFPI-2	Tissue Factor Pathway Inhibitor-2
Th1	T-Helfer-Zellen Typ 1
Th2	T-Helfer-Zellen Typ 2
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases, Gewebeinhibitor der Metalloproteinasen
TIMPs	Tissue inhibitors of metalloproteinases, Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen
TNF	Tumornekrosefaktor
TR	Tooth resorptions, Zahnresorptionen
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
w	Weiblich
wk	weiblich-kastriert
z.B.	zum Beispiel

## 1 Einleitung

In der Tierzahnheilkunde lässt sich bei der Katze, neben der Parodontitis und chronischen Gingivostomatitis, die Erkrankung an resorptiven Läsionen (RL) besonders hervorheben. Diese sind vorwiegend unter dem Begriff der felines odontoklastischen resorptiven Läsionen (FORL) bekannt. Die betroffenen Patienten zeigen zum Teil eine hochgradige Schmerzsymptomatik, die bis zur völligen Verweigerung der Futteraufnahme führen kann. Die Extraktion der betroffenen Zähne ist die derzeit einzige erfolversprechende Therapie. Prophylaxemaßnahmen existieren bisher aufgrund der unklaren Ätiologie nicht. In Bezug auf den Zahnerhalt ist dies aus tierärztlicher Sicht nicht zufriedenstellend. Die resorptiven Läsionen stellen klinisch eine Auflösung der Zahnhartsubstanz, also des Dentins und des Zahnschmelzes, dar. Aufgrund der Nähe zur Pulpahöhle und der darin befindlichen Nerven und Gefäße ist dies ein hochgradig schmerzhafter Prozess. Als gesichert gilt die Beteiligung der Odontoklasten. Aus welchem Grund diese Zellen aktiviert werden, ist jedoch nicht vollständig geklärt (MÖLLENBECK, 2004; MIHALJEVIC, 2009; BOOIJ-VRIELING et al., 2012).

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind eine Familie von mehr als 23 bekannten Endoproteasen, welche in der Lage sind, die Substanzen der extrazellulären Matrix ab- und umzubauen. Sie werden in einer Vielzahl von Organismen, auch außerhalb der Klasse der Säugetiere und in Pflanzen, nachgewiesen (WADA et al., 1998; ANGERER et al., 2006; WU et al., 2014). MMPs sind an der Pathogenese multipler Erkrankungen, beispielsweise von Tumoren, degenerativen Erkrankungen des Gehirns und auch an der Pathogenese der Parodontitis und Karies des Menschen beteiligt (BIRKEDAL-HANSEN, 1993; VISSE und NAGASE, 2003; ALLDINGER, 2009; FANJUL-FERNÁNDEZ et al., 2009).

Aufgrund der Vielfältigkeit der Enzyme und ihrer Substrate sowie der bisher nachgewiesenen Beteiligung an diversen Krankheitsprozessen sollen in der hier vorliegenden Arbeit Matrix-Metalloproteinasen in feliner Gingiva und deren mögliche Beteiligung an der Pathogenese der resorptiven Läsionen ausgehend von der Gingiva untersucht werden. Bei oralen Erkrankungen des Menschen wie der Parodontitis kann eine Dysregulierung unter anderem der MMPs-1, -2, und -8 sowie ihrer Gewebehinhibitoren -1 und -2 (TIMPs) nachgewiesen werden (SORSA et al., 2004; HANNAS et al., 2007).

Das Ziel dieser Studie ist es, die genannten MMPs und ihre Gewebehinhibitoren in gesunder und erkrankter feliner Gingiva nachzuweisen. Im Falle der Dysregulierung der MMPs und ihrer Inhibitoren kann diese Untersuchung als Basis für weitere Studien hinsichtlich der Pathogenese der resorptiven Läsionen sowie deren Inhibition dienen.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Anatomie der Mundhöhle und Zähne

Die Mundhöhle stellt die Eintrittspforte des Verdauungstraktes dar. Hier wird Nahrung aufgenommen und durch Zähne zerkleinert. Die Zunge dient der Sinneswahrnehmung sowie der Aufnahme von Flüssigkeit. Die Mundhöhle ist als Eingang zum Verdauungstrakt besonders mit Erregern belastet. Infolgedessen hat sich ein sehr gutes lokales Immunsystem entwickelt. Die Durchblutung ist aufgrund der gegebenen Funktionen besonders hoch, so dass eine schnelle Heilung gewährleistet wird (THOMÉ, 2004; SALOMON, 2008; KÖNIG et al., 2012).

#### 2.1.1 Mundhöhle

Die gesamte Mundhöhle besteht aus zwei Anteilen. Der äußere Anteil ist der Mundhöhlenvorhof, *Vestibulum oris*, welcher von außen durch Lippen und Wangen begrenzt wird und an den Zahnbögen endet. Er kommuniziert mit der Mundhöhle im engeren Sinne, *Cavum oris proprium*. Deren ventrale Begrenzung wird durch die Zunge dargestellt. Das Mundhöhlendach wird durch den harten und weichen Gaumen, *Palatum durum* und *molle*, gebildet. Von den Schneidezähnen als kraniale Begrenzung reicht die Mundhöhle bis zur Rachenenge, *Isthmus faucium*, welche eine Verbindung zum Rachen, *Pharynx*, herstellt (THOMÉ, 2004; BUDRAS et al., 2007; KÖNIG et al., 2012). Die gesamte Mundhöhle ist von mehrschichtigem, zum Teil verhornendem Plattenepithel ausgekleidet (SALOMON, 2008; KÖNIG et al., 2012).

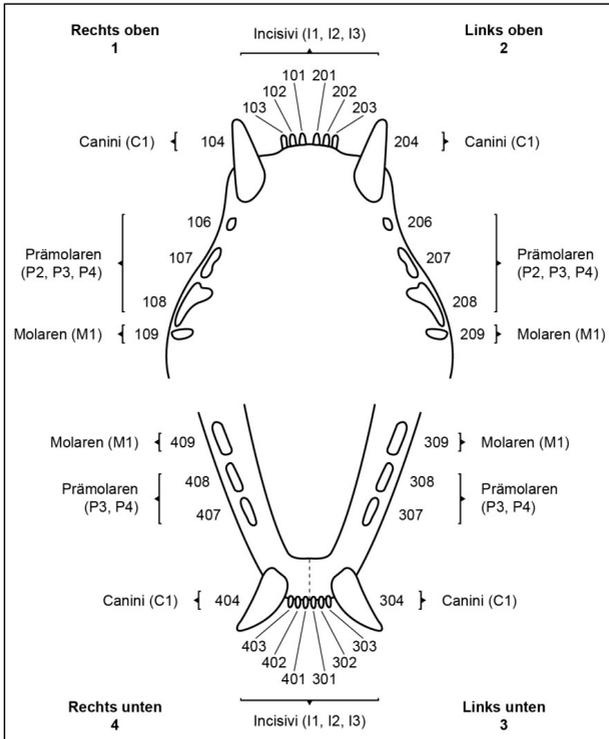
#### 2.1.2 Zähne und Zahnhalteapparat

Die Katze besitzt ein diphyodontes Gebiss. Dies bedeutet, dass im Alter von vier bis sechs Monaten die ersten Zähne, die sogenannten Milchzähne oder *Dentes decidui*, durch ihre bleibenden Nachfolger verdrängt werden. Adulte Katzen besitzen 30 Zähne, Welpen nur 26 Zähne (SALOMON, 2008). Im Milchgebiss fehlen die Molaren, die sogenannten Mahlzähne. Im Gebiss der Katze haben sie ihre Mahlfunktion vollständig verloren, hier liegt ein sekodontes, also schneidendes Gebiss mit spitzen Zähnen vor (ORSINI und HENNET, 1992; THOMÉ, 2004).

In jedem der vier Kieferquadranten befinden sich drei Schneidezähne (*Incisivi*) und ein Eck- bzw. Fangzahn (*Caninus*). In beiden Oberkieferquadranten sind drei Vormahlzähne (*Prämolares*) und ein rudimentärer Mahlzahn (*Molar*) vorhanden. Die Unterkiefer besitzen im

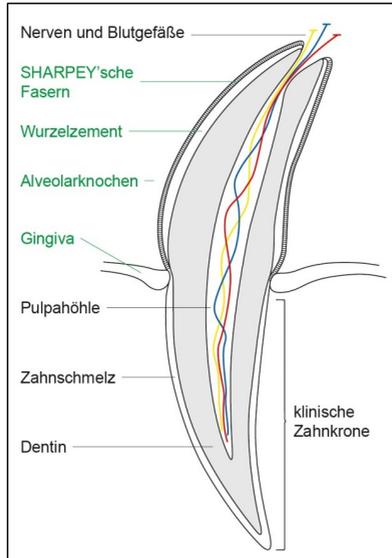
Seitenzahnbereich je drei Zähne, zwei Prämolare und einen Molar (EISENMENGER und ZETNER, 1982; ORSINI und HENNET, 1992; BELLOWS, 2010; KÖNIG et al., 2012).

Bei der nach TRIADAN (1972) modifizierten Nomenklatur werden die vier Kieferquadranten von oben rechts mit 1 beginnend, über 2 im linken Oberkiefer sowie 3 für den linken und 4 für den rechten Unterkieferquadranten benannt. Darauf folgt zweistellig die Benennung der einzelnen Zähne. Die Nummerierung beginnt immer am ersten Inzisivus des jeweiligen Quadranten mit 01, der Fangzahn (Caninus) wird mit 04 benannt, der Reißzahn im Oberkiefer (4. Prämolare) wird als 08 bezeichnet, der Reißzahn im Unterkiefer (1. Molar) als 09. So ist zum Beispiel der rechte Oberkiefercaninus eindeutig als Zahn 104 definiert (Abbildung 1). Im Milchgebiss werden die Quadranten mit 5, 6, 7 und 8 ebenfalls von oben rechts beginnend nummeriert. Die Zähne werden analog zum adulten Gebiss benannt (FLOYD, 1991; GIOSO und CARVALHO, 2005; BELLOWS, 2010).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Katzegebisses mit Bezeichnung der Zähne nach anatomischer und nach TRIADAN modifizierter Nomenklatur (modifiziert nach BELLOWS, 2010).**

Der Zahn selbst kann makroskopisch in Krone, *Corona dentis*, und Wurzel, *Radix dentis*, unterteilt werden (Abbildung 2). Die Krone ist der von Schmelz, *Enamelum*, überzogene Teil des Zahnes. Als klinische Krone wird jener Anteil bezeichnet, der über dem Zahnfleischrand, *Margo gingivalis*, zu sehen ist. Das Zahnfleisch, *Gingiva*, bildet zwischen den Zähnen die Interdentalpapillen, *Papillae gingivales* und am Zahn den *Sulcus gingivalis*, in welchem die Sulkusflüssigkeit zirkuliert. Die vom Zahnzement, *Cementum*, überzogene Wurzel befindet sich in der Alveole des entsprechenden Kieferknochens (EISENMENGER und ZETNER, 1982; THOMÉ, 2004; GIOSO und CARVALHO, 2005; SALOMON, 2008). Dort ist sie über querverlaufende Bindegewebsfasern, die sogenannten SHARPEY'schen Fasern, welche auch als Desmodont bezeichnet werden, verankert. Gemeinsam bilden der Alveolarknochen, die SHARPEY'schen Fasern und das Wurzelzement mit der oberhalb des Zements im Zahnhalsbereich abschließenden Gingiva den Zahnhalteapparat. Dieser wird auch als *Parodontium* bezeichnet und dient der Verankerung des Zahnes im Kieferknochen. Durch die wie ein Sprungtuch querverlaufenden Fasern des Zahnhalteapparates können bei Kauprozessen auf den Zahn einwirkende Kräfte neutralisiert und auf den Knochen umgelenkt werden, so dass sich eine dynamische Verbindung ergibt (EISENMENGER und ZETNER, 1982; SALOMON, 2008). Den größten Teil der Zahnhartsubstanz stellt das Zahnbein, *Dentin*, dar. Im Dentin befinden sich kleine Kanälchen, welche eine Verbindung zum Inneren des Zahnes, der Pulpahöhle, darstellen. In ihr münden die den Zahn versorgenden Nerven und Blutgefäße und ergänzen die weichgewebige *Pulpa dentis* (EISENMENGER und ZETNER, 1982; THOMÉ, 2004; GIOSO und CARVALHO, 2005; SALOMON, 2008).



**Abbildung 2: Schematische Anatomie des Zahnes und Zahnhalteapparates. Die grün beschrifteten Strukturen stellen in ihrer Gesamtheit den Zahnhalteapparat dar (modifiziert nach SALOMON, 2008 und BELLOWS, 2010).**

### **2.1.3 Mikroskopische Anatomie des Zahnes, Zahnhalteapparates und der Gingiva**

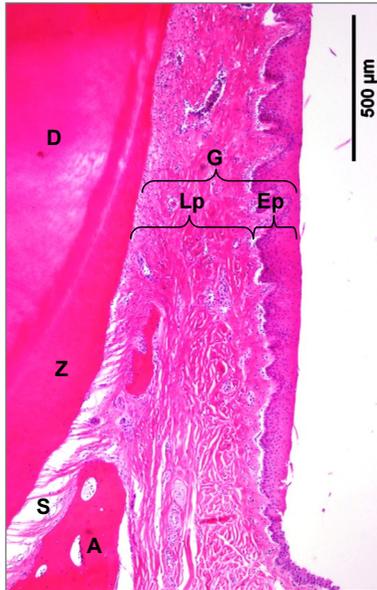
Die den Zahn umgebende Schmelzschicht ist die härteste Substanz, die der Körper bildet. Die schmelzbildenden Zellen, die Enamelo- oder Adamantoblasten, sezernieren den Schmelz, welcher zu mehr als 95 % aus säurelöslichem Hydroxylapatit und dementsprechend wenig organischen Anteilen besteht (EISENMENGER und ZETNER, 1982). Im Vergleich zum Menschen besitzen Fleischfresser nur eine sehr dünne Schmelzschicht, die das Dentin schützt. Die Schmelzdicke von Katzenzähnen liegt bei 0,1 bis 0,3 mm (CROSSLEY, 1995). Über dem in Prismen vorliegenden Schmelz befindet sich ein sehr dünner Überzug ohne Prismenstruktur, die Schmelzkutikula. Das zu 70 % aus Kalzium-Hydroxylapatit und 18 % aus Kollagen bestehende Dentin wird von den Odontoblasten gebildet, deren Fortsätze, die TOMES'schen Fasern, in den Dentinkanälchen liegen (EISENMENGER und ZETNER, 1982; GORREL, 2006; SALOMON, 2008). Im Gegensatz zum Schmelz kann Dentin auch im Erwachsenenalter nachgebildet werden. Hierzu werden Odontoblasten aus der Odontoblastenschicht aktiviert, die Zellen selbst stehen über tight junctions miteinander in Verbindung (BISHOP, 1987). Das reaktionär nach pathologischem Stimulus gebildete Tertiär- oder Reparationsdentin zeigt allerdings im

Gegensatz zum grauweißen Primär- und Sekundärdentin eine bräunliche Färbung. Diese Benennung des Dentins erfolgt aufgrund des Entwicklungszeitpunktes. Das Primärdentin wird noch vor Durchbruch des Zahnes im Zahnwechsel gebildet, Sekundärdentin ist jenes Dentin, welches nach dem Durchbruch entsteht (SALOMON, 2008; BELLOWES, 2010). Bis zum Alter von ca. vier bis fünf Jahren wird die Pulpahöhle durch Dentin fast vollständig ausgefüllt (GIOSO und CARVALHO, 2005). Im Dentin selbst befinden sich ca. 0,2 µm dünne Kanäle, die Dentinkanälchen oder Dentintubuli. In ihnen münden sehr feine Nervenendigungen, so dass eine Schmerzhaftigkeit ohne Pulpahöhleneröffnung bei Schmelz- und Dentinschäden erklärbar ist. Ebenso stellen sie eine Eintrittspforte für Bakterien dar, so dass eine Infektion der Pulpahöhle stattfinden kann. Das Wurzelzement ist eine knochenähnliche Substanz, die die Zahnwurzel umgibt. In diesem sind die straffen kollagenen Bindegewebsfasern des Zahnhalteapparates verankert (EISENMENGER und ZETNER, 1982; GORREL, 2006). Der Alveolarknochen ist aus den drei üblichen Schichten des Knochens, nämlich *Periost*, *Substantia compacta* und *Substantia spongiosa* zusammengesetzt. Zusätzlich besitzt er noch eine vierte Schicht, die als cribriforme Platte, *Lamina cribriformis* bzw. radiologisch als *Lamina dura*, bezeichnet wird. Sie kleidet die Alveole aus und ist für die den Zahnhalteapparat versorgenden Nerven und Gefäße durchlässig (GORREL, 2006).

Die Gingiva stellt ein teilweise verhornendes Plattenepithel dar (SALOMON, 2008). Mit Ausnahme des Saumepithels, welches nicht keratinisiert und damit hochpermeabel ist, wird die äußere Schicht durch das *Stratum corneum* bedeckt (GORREL, 2006). Dieses besteht aus vorwiegend zellkernlosen, parallel liegenden Keratinschuppen. Sie bestehen aus Keratohyalin, Tonofilamenten und toten Zellen. Der Verlust der Zellkerne beginnt bereits im *Stratum granulosum* mit einer Abflachung der Zellform und Degeneration der Zellkerne. Die Zellen dieser Schicht sind durch eingelagerte Keratohyalin granula gekennzeichnet. Als *Stratum germinativum*, also Keimzellschicht, zusammengefasst werden das *Stratum spinosum* und das *Stratum basale*, in welchen noch Mitosen stattfinden. Hierdurch wird die Proliferation des Epithels gewährleistet. In diesen Schichten sind Melanozyten, Lymphozyten und Mechanorezeptoren eingelagert. Das *Stratum spinosum*, auch Stachelzellschicht genannt, besteht aus mehreren Zelllagen. Die Zellen besitzen eine polyedrische Form und sind über Desmosomen miteinander verbunden. Aus der Basalzellschicht, *Stratum basale*, werden neue Epithelzellen gebildet. Diese Zellen sind von iso- bis hochprismatischer Form und sind über Hemidesmosomen mit der lichtmikroskopisch nicht sichtbaren Basalmembran verbunden (SEEGER et al., 2007; LIEBICH, 2010).

Unter den Epithelschichten liegt in der Regel lockeres Bindegewebe, die *Lamina propria*, in welchem sich mäßig Gefäße und gelegentlich Lymphozytenaggregate finden (Abbildung 3). Je nach Lokalisation befinden sich auch glatte Muskelzellen unter der Gingiva,

beziehungsweise der Mundhöhlenmukosa (KÖNIG et al., 2012). Eine Submukosa im eigentlichen Sinne ist nicht vorhanden, so dass die Mukosa mit der periostalen Auskleidung des Alveolarknochens verbunden ist (SALOMON, 2008).



**Abbildung 3: Histologischer Schnitt durch einen Katzens Zahn zur Darstellung des Zahnhalteapparates, Vergrößerung 4fach, Färbung mit Hämatoxylin-Eosin.**

**A = Alveolarknochen, D = Dentin, Ep = Epithel, G = Gingiva, Lp = Lamina propria, S = SHARPEY'sche Fasern, Z = Zement.**

## 2.2 Resorptive Läsionen (RL)

Die resorptiven Läsionen (RL) oder Zahnresorptionen (TR, „tooth resorptions“) sind eine seit langem bekannte Zahnerkrankung der Katze. Sie werden aufgrund ihres histologischen Erscheinungsbildes auch als feline odontoklastische resorptive Läsionen (FORL) bezeichnet. Eine frühere Benennung der Erkrankung ist der Begriff „neck lesions“ aufgrund der häufig am Zahnhals beginnenden Auflösung der Zahnhartsubstanz (SCHNECK und OSBORN, 1976; ZETNER und STEURER, 1992). Zahlreiche weitere Begriffe, wie zum Beispiel Katzenkaries und „cervical line lesions“ wurden im Laufe der Zeit zur Beschreibung der Erkrankung verwendet (OKUDA und HARVEY, 1992; GORREL, 2006). Mit steigendem Wissen hat sich derzeit der Begriff der resorptiven Läsionen als gültige Version durchgesetzt (BELLOWS et al., 2005). Die RL der Katze sind eine „exogen, in der Regel im Wurzelbereich beginnende Erkrankung des Periodontiums, die durch den zellulären Abbau der Zahnhartsubstanz gekennzeichnet ist und bei der zunächst Odontoklasten und später auch Plasmazellen eine zentrale Rolle spielen“ (MÖLLENBECK, 2004). Mittlerweile ist bekannt, dass auch Läsionen von der Pulpahöhle ausgehen können ohne Beteiligung des Zahnhalteapparates (HARVEY et al., 2004). Läsionen an der Wurzeloberfläche zeigen im Gegensatz zu Läsionen im Zahnhalsbereich eine Tendenz zur Abheilung (DELAURIER et al., 2009).

### 2.2.1 Charakterisierung und klinische Einteilung

Über die Prävalenz der resorptiven Läsionen (RL) gibt es unterschiedliche Angaben. Diese variieren zwischen 29 und 70 %, in Abhängigkeit vom Durchschnittsalter der untersuchten Population und den Untersuchungsmethoden (LOMMER und VERSTRAETE, 2000; INGHAM et al., 2001; GIRARD et al., 2008). So zeigt sich eine steigende Prävalenz bei der Verwendung von Röntgenaufnahmen und klinischer Untersuchung als Diagnostika. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass beide Untersuchungsmethoden zur Diagnosestellung angewandt werden müssen (VERSTRAETE et al., 1998). Wesentlich bedeutsamer ist die Tatsache, dass eine positive Korrelation zwischen dem Auftreten von RL und dem Alter der untersuchten Katzen besteht (VAN WESSUM et al., 1992; INGHAM et al., 2001; PETERSSON und MANNERFELT, 2003; GIRARD et al., 2008).

An RL erkrankte Tiere zeigen in der Regel eine verminderte Futteraufnahme oder Schmerzhaftigkeit beim Versuch der Futteraufnahme. Teilweise versuchen die Tiere bei gutem Appetit Futter aufzunehmen und lassen dieses aufgrund des Berührungsschmerzes wieder fallen. Lautäußerungen bei der Futteraufnahme sind ebenfalls ein Zeichen für Schmerzhaftigkeit. Des weiteren geht mit Läsionen im Kronenbereich eine erhöhte

Zahnsteinbildung einher, da sich an rauen Oberflächen schneller bakterielle Plaques und Zahnstein bilden können. Die resorptiven Läsionen treten in knapp der Hälfte der Fälle (40 %) mit einer Schädigung des Zahnhalteapparates und damit verbundener Zahnlockerung auf (GIRARD et al., 2008; MIHALJEVIC, 2009; BELLOWS, 2010; MIHALJEVIC et al., 2011). Eine vollständige und frühestmögliche Diagnose der RL ist nur durch eine gründliche klinische Untersuchung mittels Sondierung der Zähne sowie der dental-röntgenologischen Untersuchung zu stellen (VERSTRAETE et al., 1998; MIHALJEVIC, 2009). Bei der klinischen Untersuchung wird am sedierten Tier nach Entfernung harter Zahnbeläge zunächst auf das Vorliegen offensichtlicher Schädigungen der Zahnhartsubstanz geachtet. Es erfolgt eine ausführliche Sondierung mit Hilfe einer spitzen Zahnsonde, um auch kleine Läsionen im Zahnhalsbereich detektieren zu können. Betroffene Tiere zeigen auch in Narkose häufig ein Zittern des Kiefers, „chattering“, welches eine Schmerzreaktion auf die Berührung offener liegender Dentintubuli oder Pulpahöhlen mit der Zahnsonde darstellt (GORREL, 2006; MIHALJEVIC, 2009; BELLOWS, 2010). Um das vollständige Ausmaß der Erkrankung und eine endgültige Beurteilung durchführen zu können, ist die Anfertigung von überlagerungsfreien Röntgenaufnahmen unabdingbar (VERSTRAETE et al., 1998; MIHALJEVIC, 2009). Es hat sich herausgestellt, dass theoretisch die röntgenologische Untersuchung der Zähne 307 und 407 (linker und rechter mandibulärer dritter Prämolare) ausreichend für eine Diagnosestellung ist. Diese Zähne sind am häufigsten exponiert (INGHAM et al., 2001; GORREL und LARSSON, 2002). HEATON und Mitarbeiter (2004) können bei neun von zehn Katzen mittels radiologischer Untersuchung dieser Zähne eine korrekte Diagnose, ob ein Tier an RL erkrankt ist oder nicht, stellen. Es ist dennoch eine Untersuchung des ganzen Gebisses notwendig, da andere erkrankte Zähne auf diese Weise nicht detektiert werden. Zur korrekten Diagnosestellung müssen sechs bis acht Röntgenaufnahmen des gesamten Gebisses in Narkose angefertigt werden. Gerade frühe Stadien der Erkrankung können nur mit Hilfe der Röntgendiagnostik erkannt werden (VERSTRAETE et al., 1998).

Es wird eine Einteilung der RL zum einen in verschiedene Klassen bzw. Stadien vorgenommen, zum anderen in unterschiedliche Typen (Tabelle 1). Die Unterscheidung in Klassen dient der Erfassung des Ausmaßes der Defekte, die Typisierung der Charakterisierung des Erkrankungsbildes und den damit verbundenen Therapieoptionen (BELLOWS et al., 2005; BELLOWS, 2010). Die Klassen unterscheiden sich anhand der Lokalisation und Größe des Zahnhartsubstanzdefektes und reichen von 1 bis 5, wobei die letzte Klasse einen Zustand nach Verlust der Zahnkrone darstellt und nur radiologisch zu detektieren ist. Ebenso ist Klasse 1 in der Regel nur radiologisch zu erkennen, da die Läsion für gewöhnlich im Zahnhals- bzw. Parodontalbereich beginnt und klinisch höchstens sondier-, nicht aber sichtbar ist (MÖLLENBECK, 2004; GORREL, 2006; BELLOWS, 2010).

Weiterhin kann die Klasse 4 der RL in 3 Unterklassen gegliedert werden. Diese richten sich nach der Lokalisation der Zahnhartsubstanzzerstörung. Klasse 4a ist eine Läsion, bei der Krone und Wurzel gleichermaßen betroffen sind. Eine RL der Klasse 4b zeigt eine größtenteils koronale Schädigung, wohingegen bei Klasse 4c der größte Anteil des Defektes im Wurzelbereich liegt (BELLOWS, 2010).

**Tabelle 1: Einteilung der resorptiven Läsionen in fünf Klassen (BELLOWS et al., 2005; BELLOWS, 2010). RL = resorptive Läsionen.**

RL Klasse 1	RL Klasse 2	RL Klasse 3	RL Klasse 4	RL Klasse 5
Oberflächliche Läsionen, meist im Zahnhals- oder Wurzelbereich	Resorptionen bis in den Dentinbereich ohne Pulpaeröffnung	Resorptionen im Dentinbereich mit Pulpaeröffnung	Großer struktureller Schaden ( circa 50 % der Zahnhartsubstanz)	Wurzelrest nach Kronenverlust

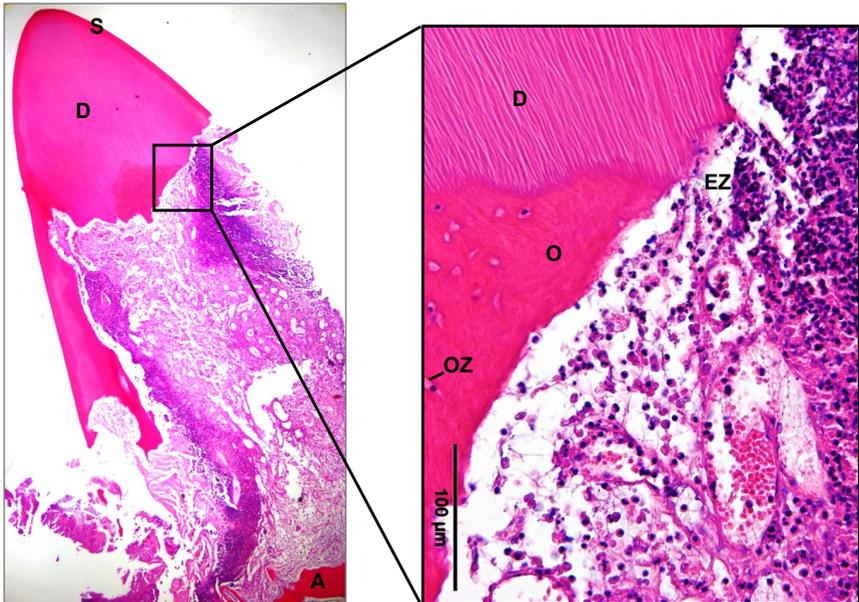
Die Unterscheidung der RL in Typen kann als eine Beschreibung der Erscheinungsform angesehen werden. Es existieren je nach Auffassung zwei bis drei Typen, wobei Typ 3 eine Mischform aus Typ 1 und Typ 2 darstellt. Typ 1 geht hinsichtlich des klinischen Erscheinungsbildes mit Entzündungen des Zahnhalteapparates (Gingivitis, Parodontitis) und Zahnfleischhyperplasie einher, die Zähne sind oft gelockert (MIHALJEVIC, 2009; BELLOWS, 2010). Radiologisch ist der Parodontalspalt intakt und neben aufgehellten Bereichen zeigt der Zahn eine normale Röntgendichte. Dahingegen zeigt Typ 2 radiologisch einen zum Teil verengten oder vollständig abwesenden Parodontalspalt. Zahn und Alveolarknochen stellen sich neben den Aufhellungsbereichen teilweise sogar von erhöhter Röntgendichte dar (MIHALJEVIC, 2009; BELLOWS, 2010). Typ 3, der vom American Veterinary Dental College (AVDC) als weitere Form definiert wird, besitzt sowohl Bereiche eines radiologisch normalen als auch verengten Parodontalspaltes sowie röntgendichten aber auch aufgehellten Arealen (BELLOWS et al., 2005; MIHALJEVIC, 2009). Es wird diskutiert, ob RL-Typ 1 und RL-Typ 2 als zwei Erscheinungsformen der gleichen Erkrankung oder als zwei gesondert zu behandelnde Erkrankungen betrachtet werden müssen (DUPONT und DEBOWES, 2002; MIHALJEVIC, 2009). Das Vorkommen von Typ 2 Läsionen ist mit 60 % im Vergleich zu Typ 1 mit 40 % etwas höher (GIRARD et al., 2008). In der Untersuchung von DUPONT und DEBOWES (2002) zeigen 49,4 % von über 500 untersuchten Zähnen Typ 1 Läsionen, so dass hier die annähernd gleiche Anzahl von Typ 1 und Typ 2 Veränderungen vorliegt. Die Autoren bemerken dennoch, dass frühe Typ 2 Läsionen mit Typ 1 Läsionen verwechselt werden könnten.

Therapeutisch ist die Extraktion betroffener Zähne die Methode der Wahl, da eine Füllungstherapie das Voranschreiten des Abbaus der Zahnhartsubstanz nicht aufhält und die Katzen so weiterhin unter starken Schmerzen leiden (LYON, 1992; ZETNER und STEURER, 1995; ROES, 1996). Beim Typ 1 mit einhergehender Parodontitis ist eine vollständige Extraktion der Zähne unbedingt anzustreben. Es kann bei Typ 2 eine Kronenamputation mit Belassen der zum Teil schon vollständig ankylosierten und umgebauten Wurzelreste durchgeführt werden (DUPONT, 1995; LOMMER und VERSTRAETE, 2000). Die Wurzeln solcher Zähne zeigen bei radiologischen Kontrollen einen zunehmenden Umbau ähnlich dem eines Kronenverlustes der Klasse 5 (GORREL und LARSSON, 2002; MIHALJEVIC et al., 2011).

### **2.2.2 Histologische Veränderungen der resorptiven Läsionen**

ROES (2004) gliedert die Pathogenese in vier Phasen, welche auf der Basis histologischer Untersuchungen wie folgt benannt werden: Resorptionsphase, Umbauphase, Bildung von Osteoid und Ossifikationsphase. Diese Gliederung stellt eine Erweiterung der bereits 1992 von OKUDA und Mitarbeitern postulierten Pathogenese in drei Phasen dar (Resorptionsphase, Reparations- oder Umbauphase und Odontoklasten-Ruhephase). Diesen Einteilungen folgend, wird durch aktivierte Odonto- bzw. Osteoklasten vom Zahnhalteapparat ausgehend zunächst Wurzelzement, danach Dentin bzw. Alveolarknochen resorbiert (Abbildung 4). Es werden als vorwiegende Entzündungszelltypen sowohl Plasmazellen als auch Makrophagen, jedoch nur wenige Lymphozyten beschrieben (OKUDA und HARVEY, 1992; ROES, 2004). Liegt eine begleitende Gingivitis vor, werden auch neutrophile Granulozyten im Gewebe gesehen (OKUDA und HARVEY, 1992). Dieses Entzündungs- bzw. Granulationsgewebe erfährt in einer zweiten Phase seinen Umbau, das Gewebe wird straffer, es werden vorwiegend Kollagen-produzierende Fibroblasten gefunden. Sowohl das Vorhandensein als auch die Aktivität der Odontoklasten nimmt ab (ROES, 2004). Es wird der Aufbau eines knochen- bzw. zementartigen Gewebes beschrieben, des sogenannten Osteoids. Diese Substanz erscheint, im Gegensatz zur tubulären Struktur des Dentins, homogen und befindet sich zwischen intaktem Dentin und dem die Resorptionslücke ausfüllenden Granulationsgewebe. Im Osteoid befindliche Osteoblasten verändern sich zu Osteozyten (OKUDA und HARVEY, 1992; ROES, 2004). In der vierten und theoretisch letzten Phase entsteht eine Verbindung zwischen Alveolarknochen und Osteoid, welche so weit voranschreitet, dass letztlich nur noch neu gebildeter Knochen vorhanden ist. In diesem Stadium hat in der Regel ein Kronenverlust stattgefunden, das umgebaute Gewebe ist von Gingiva überzogen (ROES, 2004). GORREL und LARSSON

(2002) definieren die Verbindung zwischen Dentin bzw. Zement und Knochen, aus welcher ein Beweglichkeitsverlust des Zahnes hervorgeht, als Ankylose. Diese Ankylosierung lässt sich sogar bei klinisch unauffälligen Zähnen erkrankter Tiere nachweisen, zusätzlich ist eine Hyperzementose zu sehen.



**Abbildung 4: HE-Färbung, Vergrößerung 2fach, Ausschnitt 20fach.**

**3. Prämolare des Unterkiefers einer Katze, welcher sich sowohl in der Resorptions-, als auch in der Umbauphase befindet. Die beginnende Bildung von Osteoid hat bereits stattgefunden. Die Zahnhartsubstanz ist fast vollständig lytisch. A = Alveolarknochen, D = Dentin, EZ = Entzündungszellinfiltrate, O = Osteoid, OZ = Osteozyt, S = Zahnschmelz.**

Da die Läsionen vom Zahnhalteapparat bzw. dem Zahnzement ausgehen, werden diese als exogen definiert (OKUDA und HARVEY, 1992). Eine alleinig endogene, also von der Pulpa ausgehende Resorption kann im Fall der RL nur selten festgestellt werden (HARVEY et al., 2004). Meistens ist im Fall der Beteiligung der Pulpa diese eröffnet, so dass eine Verbindung zum Parodont besteht (MÖLLENBECK, 2004; ROES, 2004). Weiterhin zeigen bis zu 80 % der betroffenen Zähne Läsionen in klinisch nicht sichtbaren Regionen (MÖLLENBECK, 2004).

Aufgrund der nur im mikroskopischen Bereich sichtbaren Veränderungen von klinisch und radiologisch unauffälligen Zähnen eines an RL erkrankten Tieres kann die Behauptung aufgestellt werden, dass ein Tier, welches einen Zahn mit RL besitzt, an einer Gesamterkrankung der Zähne leidet (GORREL und LARSSON, 2002; MÖLLENBECK, 2004). An diesen Zähnen lassen sich histologisch sowohl degenerative Veränderungen des parodontalen Ligaments und Veränderungen des Zahnzements im Sinne einer Hyperzementose nachweisen (GORREL und LARSSON, 2002; ROUX et al., 2005).

### ***2.2.3 Theorien zur Ätiologie und Pathogenese der resorptiven Läsionen***

Die Ursachen dieser Erkrankung sind nicht gesichert. Seit ihrer Beschreibung durch SCHNECK und OSBORN (1976) existieren vielfältige Hypothesen zu ihrer Entstehung. Ursprünglich wird aufgrund des ähnlichen Erscheinungsbildes im Vergleich zur Karies des Menschen eine entsprechende Ätiologie vermutet (EISENMENGER und ZETNER, 1982). Daraufhin finden Untersuchungen bezüglich des pH-Wertes in der Mundhöhle und auf der Zahnoberfläche nach der Futtermittelaufnahme statt. Hierbei kann ein Unterschied der pH-Werte zwischen gesunden, an resorptiven Läsionen (RL) und an chronischen Entzündungen erkrankten Tieren festgestellt werden. Tiere mit RL haben einen deutlich niedrigeren pH mit  $7,93 \pm 0,61$  als die anderen Gruppen, bei welchen der pH zwischen 8,25 und 8,65 rangiert. Dennoch ist der pH-Wert der erkrankten Tiere in einem zu basischen Bereich, um zur Dekalzifizierung der säurelöslichen Zahnhartsubstanz zu führen. Die Art des verabreichten Futters hat keinen nachweisbaren Einfluss auf die Entstehung der RL (ZETNER und STEURER, 1992). Im Widerspruch hierzu steht eine Untersuchung von DONOGHUE et al. (1994), welche einen Zusammenhang zwischen der Fütterung von Milchprodukten und dem Auftreten von RL ermitteln können. Hierbei wird eine Aktivierung von Odontoklasten durch den Säuregehalt im Nahrungsmittel wie z.B. Laktat oder Phosphat vermutet. Eine Widerlegung der Fütterungsätiologie wird durch die Untersuchungen von BERGER und Mitarbeitern (1997) an Großkatzen und Museumspräparaten gestellt. Es werden klinische Untersuchungen und Röntgenaufnahmen der Zähne von Schädeln ehemals wildlebender Großkatzen angefertigt. Hier zeigen sich an den Zähnen der Hauskatzen und in Gefangenschaft lebender Großkatzen ähnliche Läsionen (BERGER et al., 1997; BERGER et al., 2004). Weiterhin können die RL von der Karies sowohl durch die klinische Sondierung, bei der eine Aufweichung der Zahnhartsubstanz durch bakterielle und endogene Proteasen erfolgt, als auch durch für Karies spezifische Rhodamin-B-Färbungen und elektronenmikroskopische Veränderungen differenziert werden (BERGER et al., 1996, 1997). Allerdings zeigt eine neuere Untersuchung verschiedener wildlebender afrikanischer Felidenschädel mit 16 % eine deutlich geringere Prävalenz der RL als die für die

gewöhnliche Hauskatzenpopulation beschriebene (ROUX et al., 2009). Eine Untersuchung an Schädeln einer freilebenden schwedischen Luchspopulation (*Lynx lynx*) hat an lediglich einem von 46 Präparaten eine Wurzelresorption identifiziert (PETTERSSON, 2010). Es wird analog zu den Untersuchungen an domestizierten Katzen von SCARLETT et al. (1999) ein Zusammenhang zwischen der Aufnahme einer einseitigen Diät (z.B. Fütterung einer kommerziell hergestellten Futtersorte) mit der Häufung des Auftretens der RL hergestellt. Es liegt eine deutlich geringere Prävalenz der RL für Tiere mit mehr als sechs Stunden Freigang täglich vor als für Tiere mit weniger Freigang oder reine Hauskatzen. Die Arbeitsgruppe geht davon aus, dass die freilaufenden Tiere die Möglichkeit haben, durch Beute ihr Nahrungsangebot zu erweitern (SCARLETT et al., 1999).

Wesentlich bedeutsamer als die Zusammensetzung des Futters scheint jedoch der Stoffwechsel der betroffenen Patienten zu sein. Allerdings stehen sich auch hier widersprüchliche Angaben gegenüber. Die Arbeitsgruppe um REITER (2005) kann keine Verbindung zwischen den calciotropen Hormonen und dem Vorkommen von RL nachweisen. Es wird allerdings eine deutlich höhere mittlere 25(OH)Vitamin-D<sub>3</sub>-Konzentration, die Speicherform des Vitamin D<sub>3</sub>, im Serum erkrankter Tiere festgestellt. Da Katzen Vitamin D nur über die Nahrung beziehen können, wird wiederum auf die Fütterungsätiologie angespielt. Eine neuere Studie von GIRARD et al. (2010) hat die Ergebnisse von REITER und Mitarbeitern (2005) widerlegt und sogar eine erhöhte RL-Prävalenz bei Katzen mit niedrigerem 25(OH)Vitamin-D<sub>3</sub>-Serumspiegel feststellen können. Nach dem Transport zu seinen Zielgeweben erfährt 25(OH)Vitamin-D<sub>3</sub> eine Aktivierung zu Calcitriol (1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin-D<sub>3</sub>). Dieses wiederum scheint in der Lage zu sein, eine Zellkultur aus peripheren mononukleären Blutzellen von Katzen mit RL in Kombination mit „macrophage colony stimulating factor“ (M-CSF) und dem Rezeptoraktivator des NF- $\kappa$ B-Liganden (RANKL) auf Knochengewebe zur Osteoklastendifferenzierung anzuregen. Wahrscheinlich ist hier eine höhere Expression des Vitamin-D-Rezeptors (VDR) ursächlich im Vergleich zu Zellen aus einer Kultur von zahngesunden Katzen. Diese Zellen differenzieren häufiger zu Osteoklasten und zeigen sich sensitiver auf den Einfluss von Interleukin-6 (IL-6). Es wird vermutet, dass Osteoklastenvorläuferzellen unterschiedlich auf stimulierende Faktoren reagieren und hier die Ursache für die Entstehung der RL liegen könnte (BOOIJ-VRIELING et al., 2012). Lokale Hypoxie und pH-Erniedrigung sind in Zellkulturversuchen von MUZYLAk und Mitarbeitern (2006; 2007) als ursächlich für die Bildung von Osteoklasten und Knochenabsorption identifiziert worden. Bei intensiver Hypoxie bilden sich sogar Riesenzellen, ähnlich denen der RL (MUZYLAk et al., 2006). Ein pH-Wechsel von 7,25 auf 7,15 zeigt bei muren Osteoklasten eine 8,6fache Erhöhung der Zellgröße und eine leichte Erhöhung der Zellzahl. Außerdem zeigen diese Zellen auf einer

Knochenkultur deutlich höhere Expression von Kathepsin K und Protonenpumpenenzymen, welche als Marker für Osteoklastenaktivität gelten (MUZYLAk et al., 2007).

Ein erhöhter Gehalt von Interleukin-1-beta (IL-1 $\beta$ ) und Interleukin-6 mRNA in von RL betroffenen Zähnen kann von DELAURIER und Mitarbeitern (2002) nachgewiesen werden. Die mRNA Expression von RANKL oder Osteoprotegerin (OPG) zeigt keinen Unterschied in der Untersuchung der Zähne, wohl aber der Gingiva. Dort zeigt sich eine Erhöhung von OPG in der Gingiva an RL erkrankter Tiere, die Expression von RANKL verhält sich genau entgegengesetzt. Einen Hinweis auf den schützenden Effekt des an RANKL bindenden und somit die Interaktion von RANKL an seinem Rezeptor (RANK) hemmenden OPG kann der erhöhte Gehalt von OPG in Katzenzähnen im Vergleich zu Knochen geben (DELAURIER et al., 2002). IL-1 $\beta$  ist in der Lage, IL-6 zu aktivieren und eine Kaskade der Osteoklastenaktivierung anzustossen, auch durch die Aufregulierung von RANKL. Dieser Zusammenhang ist in der Studie von DELAURIER und Mitarbeitern (2002) durch die fehlende Aufregulierung von RANKL nicht gegeben. Allerdings werden hier lediglich Zähne im fortgeschrittenen, jedoch nicht im Initialstadium mit beginnender Resorptionsphase untersucht. Im Gegensatz zu dieser molekulargenetischen Untersuchung hat die Arbeitsgruppe um SENN (2010) in einer immunhistochemischen Studie sehr wohl eine Aktivität von RANK, RANKL und OPG in unterschiedlichen Stadien der RL sowohl in der Gingiva als auch im Granulationsgewebe der Resorptionslakunen nachweisen können. Die Gingiva der erkrankten Tiere zeigt eine positive immunhistochemische Reaktion auf RANKL, im Gegensatz zur o.g. mRNA Expression. Interessanterweise lassen sich in Resorptionslakunen mit hoher Odontoklastenaktivität sowohl RANK als auch OPG nachweisen. Bei gesunden Zähnen existierten keine positiven Signale für OPG, geringgradige für RANK und geringgradig stärkere Signale für RANKL. In späten Stadien der Erkrankung fanden sich kaum immunhistologisch positive Signale. Sowohl die Ergebnisse von SENN et al. (2010) als auch die Ergebnisse von DELAURIER et al. (2002) lassen auf eine Aktivierungskaskade für Odontoblasten ähnlich denen der Osteoklasten rückschließen. Die Ätiologie der RL bleibt weiterhin ungeklärt. Neuere Befunde weisen auf ein multifaktorielles Geschehen hin, bei welchem auch mechanische Einflüsse eine Rolle zur Aktivierung der o.g. molekularen Prozesse spielen könnten. So hat eine Arbeitsgruppe um ZIVKOVIC (2010; 2011) sowohl im Computermodell okklusalen Stress und eine mögliche Genese der Ankylosierung und Resorptionsprozesse untersucht, als auch Katzenzähne und insbesondere deren Schmelz auf mögliche Mikroläsionen durch okklusalen Stress. Diese Mikroläsionen führen zu einer Zerstörung der Diffusionshomöostase der geschädigten Zähne und könnten so zur Aktivierung odontoklastischer Prozesse führen (ZIVKOVIC et al., 2011). Das Vorhandensein von Furkationskanälchen in 27,2 % kann ebenfalls zu einem solchen Ungleichgewicht führen und stellt eventuell einen weiteren Faktor einer Prädisposition für RL

dar (NEGRO et al., 2004). Ein weiterer möglicher Zusammenhang wird in der Zahnextrusion, also der abnormalen Beweglichkeit eines Zahnes in seiner Alveole, und dem Auftreten von RL gesehen. Es weisen mehr erkrankte als gesunde Tiere eine Extrusion des Oberkiefercaninus auf. Die extrudierten Zähne zeigen deutlich häufiger als die nicht-extrudierten Zähne histologische Resorptionsanzeichen. Außerdem ist die Zementdicke der extrudierten Zähne deutlich höher (LEWIS et al., 2008). Hier kann wiederum ein Zusammenhang mit den Ergebnissen von GORREL und LARSSON (2002) gesehen werden, welche histologisch bei an RL erkrankten Tieren eine Zementveränderung an klinisch und radiologisch unauffälligen Zähnen nachweisen. Die mineralische Zusammensetzung gesunder und durch RL geschädigter Zähne weist nur geringgradige und klinisch wahrscheinlich nicht relevante Unterschiede auf (COLLEY et al., 2002).

Eine Häufung des Vorkommens von RL tritt bei Katzen mit immunsuppressiven Erkrankungen wie z.B. Infektionen mit dem feline Immundefizienzvirus (FIV) auf. Allerdings finden sich in der gesunden Kontrollgruppe ebenfalls Tiere, die mit FIV infiziert sind, so dass die Infektion keine ätiologische, aber durch die Immunsuppression eine fördernde Rolle spielen kann (HOFMANN-LEHMANN et al., 1998).

Das Geschlecht der erkrankten Tiere scheint keinen Einfluss auf die Häufigkeit des Auftretens der RL zu haben (SCARLETT et al., 1999; INGHAM et al., 2001). Es findet sich kein signifikanter Unterschied in der Prävalenz von RL bei Tieren mit chronischer Gingivitis/Stomatitis (FCGS) im Vergleich zu Kontrollgruppen ohne FCGS, so dass auch hier kein prädisponierender Faktor nachzuweisen ist (LOMMER und VERSTRAETE, 2000; FARCAS et al., 2014).

### **2.2.4 Resorptive Läsionen anderer Spezies**

Auch beim Menschen und einigen anderen Säugetieren, z.B. Hunden, Pferden, Nagetieren und Delphinen, wird über Zahn- bzw. Wurzelresorptionen berichtet (CROSSLEY et al., 1997; STASZYK et al., 2008; PERALTA et al., 2010b; FERNANDES et al., 2013; LUQUE et al., 2013). Über das Vorkommen der RL bei anderen Gattungen und Arten als der Hauskatze (*Felis silvestris catus*) wird bereits im vorhergehenden Kapitel eingegangen (BERGER et al., 1997; ROUX et al., 2009; PETTERSSON, 2010).

Aufgrund der Ähnlichkeit der RL der Katze mit den multiplen idiopathischen Wurzelresorptionen des Menschen wird die Katze als Modell zur Erforschung der humanen Erkrankung genutzt (DELAURIER et al., 2009). Ebenso wie bei der Katze ist die Ätiologie der humanen Zahnresorptionen nicht vollständig geklärt. Es wird zwar ebenfalls eine Aktivierung von Osteoklasten und Odontoklasten durch RANKL/RANK und OPG nachgewiesen, deren Ursache jedoch unbekannt ist (FERNANDES et al., 2013). Zwischen mechanischen

Traumata, wie z.B. der beim Menschen häufig durchgeführten kieferorthopädischen Behandlung, und dem Auftreten von Zahnresorptionen kann ein Zusammenhang, jedoch keine Ursache gefunden werden (WELTMAN et al., 2010). Die humanmedizinische Einteilung der Zahnresorptionen erfolgt zunächst nach internen oder externen Läsionen, wobei die externen häufiger vorkommen. Weiterhin können diese dann in interne Oberflächenresorption, Ersatzresorption oder entzündliche Resorption gegliedert werden. Die externen Resorptionen werden in vier Gruppen, ebenfalls nach Oberflächen-, Ersatz- und entzündlichen Resorptionen sowie den externen zervikalen Wurzeloberflächenresorptionen eingeteilt (FERNANDES et al., 2013).

Analog zur Klassifizierung der humanen Zahnresorptionen hat die Arbeitsgruppe um PERALTA (2010b; 2010a) an 224 Hunden umfangreiche Untersuchungen hinsichtlich des Vorkommens und der Einteilung der caninen Zahnresorptionen vorgenommen. Es werden bei 53,6 % der Hunde und bei 11,1 % der radiologisch untersuchten Zähne Resorptionen gefunden (PERALTA et al., 2010b). Allerdings werden alle Tiere dieser Studie zur speziellen zahnheilkundlichen Sprechstunde vorgestellt und behandelt, so dass in der Gesamtpopulation mit einer niedrigeren Prävalenz zu rechnen ist. Es werden vorwiegend externe Ersatzresorptionen (8,7 % der Zähne) und entzündliche Resorptionen (1,4 % der Zähne) gefunden. Deutlich seltener werden die anderen o.g. Formen identifiziert, das Auftreten von internen Ersatzresorptionen kann nicht festgestellt werden (PERALTA et al., 2010b). Besonders hervorzuheben ist hier der Anteil der externen zervikalen Wurzeloberflächenresorptionen, da diese den RL der Katze am nächsten kommen. Sie waren mit einer Prävalenz von 5,3 % der Hunde und nur 0,3 % der Zähne selten zu finden. Eine Untersuchung von ROES et al. (2008) zeigt an 24 veränderten Zähnen von Hunden histologische Befunde ähnlich der RL der Katze. Die Phasen der Pathogenese können analog zur Erkrankung der Katze nachgewiesen werden. Infolgedessen sprechen die Autoren von caninen odontoklastischen resorptiven Läsionen (CORL) (ROES et al., 2008). Da die beschriebenen Läsionen nur dezente entzündliche Begleiterscheinungen und lakunäre Defekte im Bereich der Zahnkrone, ausnahmslos am Zahnhsal beginnend, aufweisen, sind sie am ehesten vergleichbar mit den externen zervikalen Wurzeloberflächenresorptionen des Menschen und den caninen Analogen der Studien von PERALTA et al. (2010b, 2010a). Die Prävalenz in Bezug auf erkrankte Tiere liegt unter 1 % und ist damit noch niedriger als die oben beschriebene dieser Form der Zahnresorption des Hundes. Eine Unterscheidung in Typ 1 und Typ 2 analog zu den RL der Katze kann nicht getroffen werden (ROES et al., 2008).

Ein scheinbar häufiger auftretendes Problem vor allem älterer Pferde stellt die equine odontoklastische Zahnresorption und Hyperzementose (EOTRH) dar (STASZYK et al., 2008). Die Resorptionen sind ähnlich denen des Menschen, des Hundes oder der Katze,

allerdings ist die dominante Läsion weniger die Resorption als die Hyperzementose. Hierfür ist eventuell eine übermäßige Regeneration des parodontalen Ligamentes verantwortlich (WARHONOWICZ et al., 2006). Allerdings sind auch bei EOTRH die Ursachen der Erkrankung nicht bekannt. Es wird die Beteiligung parodontalpathogener Keime und auch eine mechanische Komponente diskutiert. Aufgrund des Auftretens der EOTRH an parodontal gesunden Zähnen und mechanisch kaum belasteten Canini sind diese Faktoren als alleinige Ursache jedoch eher unwahrscheinlich (STASZYK et al., 2008).

## 2.3 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind zinkabhängige Endopeptidasen, welche zur Proteasen-Überfamilie der Metzincine gehören (BODE et al., 1993; GOMIS-RÜTH, 2009).

Sie werden unterteilt in zwei große Gruppen. Membrangebundene MMPs und in den Extrazellulärraum (EZR) sezernierte MMPs. Mittlerweile ist die Struktur von mehr als 25 verschiedenen MMPs bekannt (MCCAWLEY und MATRISIAN, 2001; WOESSNER, 2002; STAMENKOVIC, 2003; VISSE und NAGASE, 2003; FANJUL-FERNÁNDEZ et al., 2009; AL-AZRI et al., 2013).

In ihrer Gesamtheit sind MMPs fähig, alle Proteine der extrazellulären Matrix (EZM) zu hydrolysieren und damit abzubauen (Tabelle 2). Häufig wird von einem „Remodeling“, also dem Umbau der extrazellulären Matrix, gesprochen (BOSMAN und STAMENKOVIC, 2003; STAMENKOVIC, 2003; VISSE und NAGASE, 2003; PAGE-MCCAW et al., 2007).

Die Aktivität der MMPs wird durch die endogenen Gewebeinhibitoren der MMPs („tissue inhibitors of matrix metalloproteinases“ = TIMPs), endogene Inhibitoren und alpha-Makroglobuline reguliert. Ihre Expression wird durch Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine gesteuert (NAGASE und WOESSNER, 1999; MCCAWLEY und MATRISIAN, 2001; CLARK et al., 2008; FANJUL-FERNÁNDEZ et al., 2009).

### 2.3.1 Einteilung, Aufbau und Funktion der Matrix-Metalloproteinasen

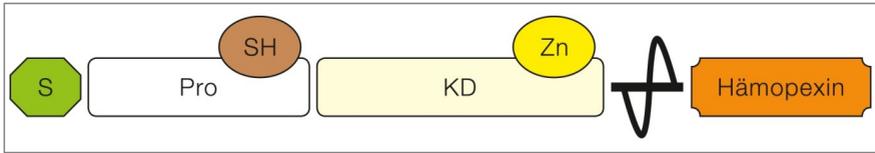
Die erste Matrix-Metalloproteinasen (MMP) wurde 1962 von GROSS und LAPIÈRE als diffusionsfähiger, kollagenolytischer Faktor beschrieben, der bei neutralem pH und physiologischer Temperatur an undenaturiertem Kollagen arbeitet. Dieser Faktor ist an der Involution des Kaulquappenschwanzes beteiligt. Heute werden bis zu 28 MMPs bei Vertebraten als bekannt angegeben, die Zahl variiert quellenabhängig (IYER et al., 2012; AL-AZRI et al., 2013). 24 MMPs existieren im Menschen, zwei Gene kodieren dabei für MMP-23 (PUENTE et al., 2003; FANJUL-FERNÁNDEZ et al., 2009). Auch bei Nicht-Vertebraten, wie zum Beispiel dem Seeigel, *Strongylocentrotus purpuratus*, kommen MMPs vor. Bei dieser Art lassen sich Gene zu 23 MMP-Familien nachweisen, so dass er eventuell als Forschungsmodell dienen kann (ANGERER et al., 2006). Selbst in Pflanzen werden MMP-Analoga nachgewiesen. Das bekannteste Beispiel hierfür dürfte der Ackerschmalwand, *Arabidopsis thaliana*, sein (MAIDMENT et al., 1999).

Die Matrix-Metalloproteinasen sind eine Unterfamilie der Metalloproteinasen. Aufgrund einer strukturellen Gemeinsamkeit, dem sogenannten „Met-turn“, werden sie zusammen mit den Astacinen, Serralysinen und den Reprolysinen zur Gruppe der Metzincine zusammengefasst (BODE et al., 1993; NAGASE und WOESSNER, 1999).

Ursprünglich wurden die MMPs nach ihrer Substratspezifität in 5 Gruppen eingeteilt (BODE et al., 1993). Da jedoch die meisten MMPs nicht nur ein, sondern mehrere Substrate spalten können, ist diese Einteilung mittlerweile obsolet. Die aktuelle Klassifizierung beruht auf strukturellen Unterschieden (MCCAWLEY und MATRISIAN, 2001; STAMENKOVIC, 2003; FANJUL-FERNÁNDEZ et al., 2009).

Die Urtyp-Matrix-Metalloproteinase besteht aus einem Propeptid mit ca. 80 Aminosäureresten, einem Cystein-switch-Motiv, einer katalytischen Domäne aus ca. 170 Aminosäureresten, einem „linker-Peptid“ und einer Hämpoxin-Domäne aus ca. 200 Aminosäureresten (Abbildung 5). Durch Entfernung oder Einfügen anderer Domänen entstehen unterschiedliche Spezifitäten (NAGASE und WOESSNER, 1999). So ist zum Beispiel die Hämpoxin-Domäne für Kollagenasen unbedingt notwendig, um die Tripel-Helix des Bindegewebe-Kollagens zu spalten (MURPHY und KNÄUPER, 1997). Außer bei MMP-23 bindet Cystein an Zink, um die Latenz der Pro-Form zu erhalten (NAGASE und WOESSNER, 1999).

Es können acht verschiedene Strukturklassen der Matrix-Metalloproteinasen unterschieden werden (Tabelle 2). Fünf der Strukturklassen bilden die Gruppe der sezernierten MMPs. Diese besitzen immer ein Propeptid, eine katalytische Domäne und, bis auf MMP-7 und MMP-26, eine Hämpoxin-ähnliche Sequenz. Diese fünf Strukturklassen (Tabelle 2) beinhalten MMPs mit einfacher Hämpoxin-Domäne (Abbildung 5), Gelatine-bindende MMPs, MMPs mit minimaler Domäne, Furin-aktivierte, sezernierte MMPs und MMPs mit Vitronektin-ähnlichen Einschüben (EGEBLAD und WERB, 2002; RAWLINGS et al., 2004). Die restlichen drei Strukturklassen (Tabelle 2) werden zu den membrangebundenen MMPs gezählt, den sogenannten MT-MMPs („membrane-type“ MMPs). Sie werden durch Furin-ähnliche Konvertasen aktiviert und besitzen ein Arginin-reiches Tetrapeptid, welches das Propeptid und die katalytische Domäne verbindet. Sie werden aufgeteilt in Typ I-transmembrane, Typ II-transmembrane und Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) - verankerte MMPs (SOMERVILLE et al., 2003; RAWLINGS et al., 2004).



**Abbildung 5: Schematisches Beispiel für den Aufbau einer MMP mit einfacher Hämopexin-Domäne.** S = Signalpeptid, Pro = Propeptid-Domäne mit Thiol-(SH)-Gruppe, KD = Katalytische Domäne mit Zink-Atom (Zn), verbunden über die „hinge“-Region mit der Hämopexin-Domäne (nach STERNLICHT und WERB, 2001; SOMERVILLE et al., 2003; PAUL, 2005).

Matrix-Metalloproteinasen bauen nicht nur Substrate der extrazellulären Matrix (EZM) ab, sondern sind maßgeblich am Umbau und feinen strukturellen Veränderungen der Zellarchitektur beteiligt. Durch die Proteolyse können Zellen auf direktem und indirektem Weg miteinander kommunizieren, da MMPs in der Lage sind, Signalmoleküle zu aktivieren, aber auch zu deaktivieren (STERNLICHT und WERB, 2001; PAGE-MCCAW et al., 2007). Dementsprechend sind MMPs an vielen physiologischen und notwendigen Prozessen im Körper beteiligt. Dazu gehören Zellproliferation, -migration und -adhäsion sowie Angiogenese, Knochenentwicklung, Wundheilung und Uterus- bzw. Brustdrüsenrückbildung (PAGE-MCCAW et al., 2007; FANJUL-FERNÁNDEZ et al., 2009; GOMIS-RÜTH, 2009). So wird zum Beispiel MMP-1 durch basale Keratinozyten menschlicher Hautwunden exprimiert. Es kann weiterhin nachgewiesen werden, dass durch Spaltung von Kollagen-Typ-1 eine Migration von Keratinozyten in Zellkulturen hervorgerufen wird (PILCHER et al., 1997). Auch an der Zahn- und Schmelzentwicklung sind MMPs beteiligt (BARTLETT und SIMMER, 1999; TJADERHANE et al., 2001; PALOSAARI et al., 2003). Durch die Spaltung von EZM-Proteinen können MMPs gebundene Wachstumsfaktoren, wie z.B. *insulin-* und *fibroblast-growth-factor* freisetzen (FOWLKES et al., 1995; WHITELOCK et al., 1996). Weiterhin sind MMPs maßgeblich durch Aktivierung von Chemokinen an der Leukozytenmigration und somit an Entzündungsreaktionen beteiligt (VAN LINT und LIBERT, 2007).

Derzeit sind viele MMPs in Kombination mit ihren Substraten *in vitro* sehr gut untersucht und bekannt. Es ist jedoch problematisch, diese *in vitro* oft als isolierte katalytische Domänen vorliegenden Proteine mit den *in vivo* vorkommenden MMPs in Zusammenhang zu bringen. Letztere besitzen die das Substrat erkennende Hämopexin-Domäne, welche *in vitro* meist fehlt (PAGE-MCCAW et al., 2007).

**Tabelle 2: Einteilung der Matrix-Metalloproteinasen (nach STERNLICHT und WERB, 2001, ALLDINGER, 2009)**

<b>MMP-Strukturklassen</b>	<b>Bezeichnungen/Synonyme der MMPs (Auswahl)</b>	<b>Substrate der EZM (Auswahl)</b>
<b>I - MMPs mit einfacher Hämopexin-Domäne</b>		
MMP-1	Kollagenase-1, Interstitielle Kollagenase	Kollagen Typ I, II, III, VII, VIII, X, XI, Gelatine, Fibronectin, basisches Myelinprotein (myelin basic protein, MBP), Vitronectin, Laminin, Aggrecan
MMP-3	Stromelysin-1, Transin-1	Kollagen Typ II, III, IV, V, IX, MBP, Gelatine, Elastin, Fibronectin, Vitronectin, Laminin
MMP-8	Kollagenase-2, Neutrophile Kollagenase	Kollagen Typ I, II, III, Aggrecan
MMP-10	Stromelysin-2, Transin-2	Kollagen Typ III, IV, V, Gelatine, Elastin, Fibronectin, Aggrecan
MMP-12	Metalloelastase, Makrophagen-Elastase	Kollagen Typ I, IV, MBP, Gelatine, Elastin, Fibronectin
MMP-13	Kollagenase-3	Kollagen Typ I-V, IX-XI, Gelatine, Fibronectin, Aggrecan, Perlecan, Tenascin
MMP-18	Kollagenase-4 (Xenopus)	Kollagen Typ I (Ratte)
MMP-19	RASI-1 (rheumatoid arthritis synovial inflammation)	Kollagen Typ I, IV, Gelatine, Laminin, Entaktin, Aggrecan
MMP-20	Enamelysin	Amelogenin, Aggrecan
MMP-22	CMMP („Chicken MMP“, Gallus)	Casein, Gelatine
MMP-27		Nicht bekannt
<b>II - Gelatine-bindende MMPs</b>		
MMP-2	Gelatinase A, 72-kDa Gelatinase, 72-kDa Typ IV Kollagenase	Kollagen Typ I, III, IV, V, VII, X, XI, XIV, Gelatine, Fibronectin, Elastin, Entaktin, Laminin, Tenascin, MBP
MMP-9	Gelatinase B, 92-kDa Gelatinase, 92-kDa Typ IV Kollagenase	Kollagen Typ IV, V, VII, X, XI, XIV, Gelatine, Elastin, MBP, Vitronectin, Laminin, Aggrecan, Versikan
<b>III - MMPs mit minimaler Domäne</b>		
MMP-7	Matrilysin, Matrin, PUMP 1 („putative metalloproteinase“)	Kollagen Typ I-V, Gelatine, MBP, Elastin, Fibronectin, Vitronectin, Laminin
MMP-26	Matrilysin-2, Endometase	Kollagen Typ IV, Gelatine, Fibronectin, Vitronectin
<b>IV - Furin-aktivierte, sezernierte MMPs</b>		
MMP-11	Stromelysin-3	Gelatine, Fibronectin, Laminin
MMP-28	Epilysin, Neurolysin	Casein

**Tabelle 3, Fortsetzung Tabelle 2: Einteilung der Matrix-Metalloproteinasen (nach STERNLICHT und WERB, 2001, ALLDINGER, 2009)**

<b>MMP-Strukturklassen</b>	<b>Bezeichnungen/Synonyme der MMPs (Auswahl)</b>	<b>Substrate der EZM (Auswahl)</b>
<b>V - MMPs mit Vitronektin-ähnlichen Einschüben</b>		
MMP-21	Homolog des Xenopus XMMP	Nicht bekannt
<b>VI - Typ 1-transmembrane MMPs</b>		
MMP-14	MT1-MMP, MT-MMP-1	Kollagen Typ I, II, III, Gelatine, Fibronektin, Tenascin, Laminin
MMP-15	MT2-MMP, MT-MMP-2	Fibronektin, Tenascin, Entaktin, Laminin, Aggrecan
MMP-16	MT3-MMP, MT-MMP-3	Kollagen Typ I, III, Gelatine, Fibronektin, Vitronektin
MMP-24	MT5-MMP, MT-MMP-5	Fibronektin, Gelatine, Chondroitin-Sulfat-Proteoglykan (CSP)
<b>VII - Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-verankerte MMPs</b>		
MMP-17	MT4-MMP, MT-MMP-4	Gelatine
MMP-25	MT6-MMP, MT-MMP-6	Kollagen Typ 4, Gelatine, Fibronektin, CSP
<b>VIII - Typ 2-transmembrane MMPs</b>		
MMP-23	“cysteine array”-MMP (CA-MMP)	Gelatine

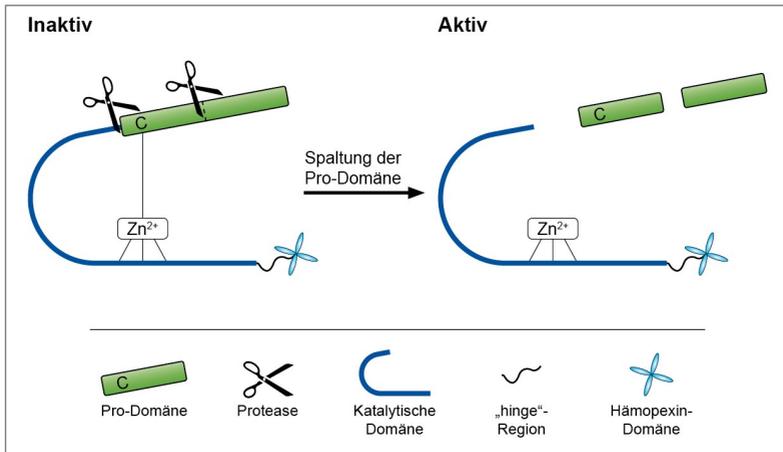
### **2.3.2 Regulation der Matrix-Metalloproteinase-Aktivität**

Die MMP-Aktivität beruht zum einen auf der Überführung der üblicherweise als Prä-Pro-Enzyme synthetisierten Moleküle in ihre aktive Form. Andererseits hängt die Möglichkeit der Aktivierung vom Vorhandensein dieser Pro-Formen, also der Gentranskription, ab. Der Grad der Aktivität der MMPs kann sowohl auf transkriptiver Ebene, als auch über die Aktivierung bereits vorhandener Pro-Formen herab- und heraufgesetzt werden (NAGASE, 1997; NAGASE und WOESSNER, 1999; CLUTTERBUCK et al., 2010).

#### **2.3.2.1 Aktivierung**

Die inaktive Prä-Pro-Form der meisten MMPs wird nach ihrer Sekretion in den Extrazellulärraum durch proteolytische Spaltung der Pro-Domäne vom katalytischen Zentrum des Enzyms in die aktive Form überführt (Abbildung 6) (NAGASE, 1997; PAGE-MCCAW et al., 2007). Dieser Vorgang wird als „cysteine switch“ bezeichnet, da hier die Bindung zwischen Cystein und einem Zinkatom getrennt wird. In der Regel findet die Spaltung in der EZM statt, mit Ausnahme von pro-MMP-2. Ihre zellmembrangebundene Pro-Form wird letztlich von MMP-14 (membrane-type-1 MMP) in die aktive Form überführt. Hierzu muss das pro-MMP-2-Molekül an TIMP-2 gebunden sein. Der pro-MMP-2/TIMP-2-Komplex bindet über die Hämopexin-Domäne der pro-MMP-2 an der Carboxy-terminalen Domäne der MMP-14 (NAGASE und WOESSNER, 1999; SOMERVILLE et al., 2003).

Eine Ausnahme bei der Aktivierung stellen MMP-11 und -28 dar, welche intrazellulär durch Furin aktiviert werden. Sie besitzen am C-terminalen Ende eine Furin erkennende Sequenz. Weiterhin besitzen MMP-14, -15, -16, -17, -23, -24 und -25 ein ähnliches Motiv im Propeptid und werden meistens in ihrer aktiven Form sezerniert. Die Regulierung erfolgt wahrscheinlich über endogene Inhibitoren (PEI und WEISS, 1995; NAGASE und WOESSNER, 1999; VISSE und NAGASE, 2003).



**Abbildung 6: Beispiel der Aktivierung des Proenzym durch Proteasen durch eine Kombination der Spaltung in der Pro-Domäne und ihrer Trennung von der katalytischen Domäne (C = Cystein der Pro-Domäne,  $Zn^{2+}$  = Zinkatom) (nach PAGE-MCCAW et al., 2007).**

FEDARKO und Mitarbeiter (2004) weisen nach, dass Mitglieder der SIBLING-Proteinfamilie (Small, Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein) an spezielle proMMPs binden und diese aktivieren. Dies sind Knochensialoprotein/proMMP-2, Osteopontin/proMMP-3 und Dentin-Matrixprotein-1/proMMP-2. Diese Komplexe können durch Komplementfaktor H aufgelöst werden.

### **2.3.2.2 Gewebehemmer und andere Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen**

Die wichtigsten endogenen Inhibitoren sind die Gewebehemmer der Matrix-Metalloproteinasen (TIMPs, „tissue inhibitors of matrix metalloproteinases“). Der erste TIMP wird 1975 von WOOLLEY und Mitarbeitern als Protein mit kleinem Molekulargewicht und der Fähigkeit, Kollagenasen zu hemmen, beschrieben. Seither wurden 3 weitere TIMPs entdeckt (STETLER-STEVENSON et al., 1989; BREW et al., 2000; VERSTAPPEN und VON DEN HOFF, 2006). TIMP-4 zeigt die am stärksten eingeschränkten Expressionsmuster. Ein hoher Gehalt von TIMP-4-mRNA wird vor allem in Gehirn-, Herz- und Hodengewebe sich entwickelnder Mäuse festgestellt (YOUNG et al., 2002). TIMP-1 und -2 können die Aktivitäten fast aller bekannten MMPs hemmen, wobei TIMP-1 die MT-MMPs seltener inhibiert und MMP-14 nicht hemmen kann (BAKER et al., 2002). TIMP-3 unterscheidet sich von den anderen drei Mitgliedern der TIMP-Familie, da es nicht frei vorliegt, sondern an Moleküle der EZM gebunden ist (BAKER et al., 1998; BAKER et al., 2002). Die Hemmung

erfolgt über eine 1:1 Komplexbildung zwischen TIMP und MMP. Es wird ein direkter Zusammenhang zwischen TIMP-Gehalt und MMP-Aktivitätslevel beobachtet (GOMEZ et al., 1997).

TIMPs spielen nicht nur in der Inhibierung der MMPs eine wichtige Rolle, sondern haben auch die Fähigkeit, zur Aktivierung von pro-MMPs beizutragen. So bildet z.B. TIMP-2 mit MMP-16 (MT3-MMP) einen dem oben genannten TIMP-2/MMP-14 ähnlichen Komplex, um pro-MMP-2 vollständig zu aktivieren. TIMP-3 zeigt ein ähnliches Verhalten bei der pro-MMP-2 Aktivierung, jedoch nur mit MMP-16, nicht aber mit MMP-14 (ZHAO et al., 2004). Teilweise widersprüchliche Ergebnisse erzielt die Forschung hinsichtlich der Beteiligung von TIMPs an der Apoptose. Es gibt sowohl nachgewiesene pro- als auch anti-apoptotische Effekte der Gewebehemmer (CHIRCO et al., 2006).

Weitere endogene Mechanismen zur Inhibierung der MMP-Aktivität existieren. Dazu zählt in erster Linie alpha-2-Makroglobulin, welches in der Gewebsflüssigkeit und im Plasma als Hauptinhibitor der MMPs vorkommt (SOTTRUP-JENSEN und BIRKEDAL-HANSEN, 1989; BAKER et al., 2002). Weiterhin sind Thrombospondin-1 und -2 sowie TFPI-2 („tissue factor pathway inhibitor-2“) in der Lage, die Aktivierung bestimmter MMPs zu hemmen (BAKER et al., 2002; CLUTTERBUCK et al., 2010). Außerdem existiert ein membrangebundenes Glykoprotein, RECK (reversion inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs), welches in vielen menschlichen Geweben vorkommt. Es wird in humanen Tumorzelllinien nach künstlich induzierter Aktivität von RECK ein Abfall der MMP-9 Sekretion und eine Suppression der Tumordinvasivität festgestellt (TAKAHASHI et al., 1998; BAKER et al., 2002). RECK scheint bislang der einzige membrangebundene Inhibitor zu sein (OH et al., 2001; STAMENKOVIC, 2003).

### **2.3.3 Bedeutung von Matrix-Metalloproteinasen in der Humanmedizin**

Vielen Erkrankungen des Menschen liegt eine Beteiligung von MMPs zugrunde. Dabei ist nicht immer nur die vermehrte Expression, sondern auch die Abwesenheit dieser Proteasen für pathologische Prozesse verantwortlich. Dies zeigt sich in der Fibrosierung von Geweben, beispielsweise der Leber oder der Lunge (BENYON et al., 1999; ATKINSON und SENIOR, 2003). Es findet sich eine Beteiligung von MMPs bei zentralnervösen Erkrankungen wie z.B. der Alzheimer-Erkrankung und der multiplen Sklerose (MAEDA und SOBEL, 1996; PAUL, 2005). Insbesondere bei entzündlichen Geschehen ist eine erhöhte Expression von MMPs auffällig, so spielen sie eine Rolle bei der rheumatoiden Arthritis, nicht heilenden Wunden, Ulzera des Magen-Darm-Traktes oder auch der Kornea (TWINING et al., 1993; PILCHER et al., 1999; YOSHIHARA et al., 2000; TOMITA et al., 2009). An der Entstehung und

Ausbreitung von Neoplasien sind sowohl MMPs als auch TIMPs beteiligt. Ihr Zusammenspiel ist bei einigen Erkrankungen dysreguliert (MCCAWLEY und MATRISIAN, 2000; EGEBLAD und WERB, 2002).

### **2.3.3.1 Matrix-Metalloproteinasen bei Mundhöhlenerkrankungen des Menschen**

Bei Mundhöhlenerkrankungen sind MMPs sowohl bei entzündlichen als auch neoplastischen Prozessen in die Pathogenese involviert (REYNOLDS und MEIKLE, 1997; SORSA et al., 2004; HANNAS et al., 2007). Insbesondere bei der Parodontitis und der Karies des Menschen wird eine Beteiligung von MMPs sowie deren Interaktion mit bakteriellen Proteasen und TIMPs nachgewiesen (BIRKEDAL-HANSEN, 1993; REYNOLDS et al., 1994). Orale Tumoren wie z.B. Plattenepithelkarzinome oder Speicheldrüsentumoren zeigen ebenfalls eine Aufregulierung und ein Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs (VERSTAPPEN und VON DEN HOFF, 2006). Durch das Zusammenspiel von MMPs und TIMPs wird die Entwicklung von Mundhöhle und Zähnen beeinflusst. Erfolgt bei der Entstehung der Mundhöhle keine Degradierung der extrazellulären Matrix durch MMPs, ist die Fusion der Gaumenfortsätze der primären Mundhöhle nicht möglich und es kann zur Entwicklung von Gaumenspalten kommen (BLAVIER et al., 2001). Eine Punktmutation von Amelogenin, einem Schlüsselprotein der Schmelzbildung, verzögert dessen Spaltung durch MMP-20 (Enamelysin) und wird als ursächlich für die Amelogenesis imperfecta, einer Schmelzentwicklungsstörung, angesehen (LI et al., 2001).

#### **2.3.3.1.1 Parodontitis**

Bereits 1966 erfolgt die erste Beschreibung kollagenolytischer Aktivität in humaner Gingiva parodontal erkrankter Individuen durch FULMER und GIBSON. In späteren Untersuchungen ist eine erhöhte Aktivität von MMP-2, -3, -8 und -9 in Proben aus humaner Mundschleimhaut und im Blutplasma parodontal erkrankter Individuen festzustellen (KUBOTA et al., 1996; MARCACCINI et al., 2009). Diese MMPs sind vorwiegend kollagenolytisch aktiv und somit in der Lage, die Grundstruktur des Zahnhalteapparates, die SHARPEY'schen Fasern, zu schädigen. Nach einer Parodontalbehandlung sinkt die Menge an in der Blutbahn zirkulierenden MMPs, so dass ein Zusammenhang zwischen MMP-Aufregulierung und Entzündungsgrad besteht, welcher auch systemische Auswirkungen haben könnte (MARCACCINI et al., 2009). In einem Versuch mit Ratten wird ebenfalls eine Beteiligung von MMP-2 und MMP-9 an der Entstehung von Parodontitis nachgewiesen (COROTTI et al., 2009). Hier zeigt sich eine Aufregulierung dieser Gelatinasen bei immunhistochemischen Untersuchungen des Parodonts insbesondere in der frühen Phase der Erkrankung. In der chronischen Phase ist eine Verminderung der Aktivität im Vergleich zur akuten Phase zu sehen. Dies ähnelt den Ergebnissen von GONCALVES und Mitarbeitern (2008), die mittels

Western blotting und zymographischen Untersuchungen eine Abwesenheit von MMP-2 bei chronischer Parodontitis feststellen können. Aufgrund einer Herunterregulierung von TIMP-1 und -2 in Verbindung mit einer Aufregulierung der Aktivität von MMP-1, -2, -3 und -9 scheint nicht die Aktivierung bereits vorhandener pro-MMPs, sondern ein Missverhältnis von TIMPs zu MMPs für das Voranschreiten der Parodontitis verantwortlich zu sein (SOELL et al., 2002). Durch pathogen-sezernierte Phospholipase (PLC) wird eine Freisetzung von pro-MMPs aus peripheren neutrophilen Granulozyten induziert. Diese inaktiven Formen wiederum können durch bakterielle Proteasen in ihre aktive Form überführt werden, wie am Beispiel einer isolierten Protease von *Porphyromonas gingivalis* als Aktivator von proMMP-2 und -9 gezeigt werden kann (DING et al., 1995).

### 2.3.3.1.2 Karies

Ähnlich der Parodontitis ist eine Beteiligung von MMPs an der Pathogenese dieser Erkrankung nachgewiesen, der genaue Mechanismus ist jedoch nicht vollständig geklärt (HANNAS et al., 2007). Als gesichert gilt, dass Karies durch eine Infektion mit *Streptococcus mutans* verursacht wird. Dieser Keim kommt in SPF-Tieren nicht vor. Die Virulenz dieses Bakteriums steigt mit erhöhtem Zuckergehalt in der Mundhöhle. Durch die Verdauung der Zuckermoleküle sinkt dort der pH-Wert (TANZER et al., 2001). Dies führt zur Aktivierung der proMMP-2, -8, und -9, welche zumindest *in vitro* die demineralisierte organische Dentinmatrix degradieren können (TJADERHANE et al., 1998). Da die kariogenen Bakterien nur die Dentinoberfläche, nicht jedoch die Dentinmatrix zerstören können, wird hier ein Zusammenspiel zwischen bakteriellen Proteasen und Matrix-Metalloproteinasen vermutet (KATZ et al., 1987). Die von Odontoblasten und dem Pulpagewebe exprimierte MMP-8 ist sowohl an die mineralisierten als auch nicht-mineralisierten Anteile des Dentins gebunden. Ihr Hauptsubstrat ist Kollagen Typ 1, welches den größten Teil des interstitiellen Kollagens der organischen Dentinmatrix darstellt, so dass hier ein Zusammenhang zwischen der Aufregulierung von MMP-8 und dem Zahnhartsubstanzabbau bei Karies gesehen werden kann (SULKALA et al., 2007). Obwohl die MMP-20 Synthese bei kariösen Zähnen im Vergleich zu gesunden Zähnen nicht wesentlich erhöht ist, wird ein Zusammenhang mit der Kariespathogenese vermutet. Da MMP-20 hauptsächlich an die organische Matrix gebunden ist, könnte eine Aktivierung dieser Enzyme bei beginnender Lyse der Dentinmatrix erfolgen und so den Schmelzabbau triggern (SULKALA et al., 2002). Weiterhin kann durch die Arbeitsgruppe um SULKALA (2001) gezeigt werden, dass nicht-antimikrobiell wirksame, chemisch modifizierte Tetracykline (CMTs) als MMP-Inhibitoren das Voranschreiten kariöser Läsionen bei Ratten hemmen.

### **2.3.4 Bedeutung von Matrix-Metalloproteinasen in der Veterinärmedizin**

Auf veterinärmedizinischem Gebiet wurden bislang ebenfalls sehr viele Untersuchungen zu MMPs und deren Beteiligung an pathologischen Vorgängen unternommen. Ähnlich der Humanmedizin sind auch hier vor allem entzündliche und neoplastische Erkrankungen von Bedeutung (CLUTTERBUCK et al., 2009; CLUTTERBUCK et al., 2010). Insbesondere die Arthritis des Pferdes und des Hundes sowie die Hufrehe des Pferdes sind sehr gut untersucht. So wird durch die Zerstörung der Basalmembran der Huflederhaut das akute Aufflammen der Hufrehe hervorgebracht. Es wird eine Beteiligung sowohl von MMP-2 als auch -9 nachgewiesen, wobei MMP-14 eine Schlüsselrolle zu spielen scheint (KYAW-TANNER et al., 2008; DE LAAT et al., 2011). Bei der Osteoarthritis des Hundes ist eine Aufregulierung von MMP-1 und Abregulierung von TIMP-2 in synovialer Flüssigkeit auffällig (SALINARDI et al., 2006). Die Degeneration des kranialen Kreuzbandes von Hunden könnte mit einer Aufregulierung von MMP-2 und -9 einhergehen, da bei Hunden mit einer Ruptur des kranialen Kreuzbandes ein erhöhter Gehalt dieser MMPs in der Synovia festzustellen ist (MUIR et al., 2005). MIAO et al. (2003) weisen durch immunhistochemische Untersuchungen von Gehirnen an Staupe erkrankter Hunde die Aufregulierung mehrerer MMPs sowie TIMP-1 und -2 nach. Es wird ein Zusammenhang mit dem Voranschreiten der Demyelinisierung hergestellt. Über Kardiomyopathien existieren einige Untersuchungen, sowohl immunhistochemischer als auch genomanalytischer Art, insbesondere an Hunden, aber auch an Katzen (AUPPERLE et al., 2009; AUPPERLE et al., 2011; FONFARA et al., 2013). Neoplasien mit nachgewiesener MMP-Beteiligung und Aufregulierung stellen Mammatumoren bei Hund und Katze dar, aber auch bei Meningiomen und verschiedenen Sarkomen, insbesondere Fibrosarkomen, lässt sich eine Aufregulierung zumeist von MMP-2 und -9 nachweisen (JANKOWSKI et al., 2002; LOUKOPOULOS et al., 2004; PALTIAN, 2006; NAKAICHI et al., 2007; MANDARA et al., 2009; AKKOC et al., 2012).

#### **2.3.4.1 Matrix-Metalloproteinasen bei der Katze**

Bislang existieren verhältnismäßig wenige Untersuchungen zu Matrix-Metalloproteinasen bei der Katze. Einige beschäftigen sich in Bezug auf die Forschung am humanen Immundefizienzvirus (HIV) mit der felines Variante, dem felines Immundefizienzvirus (FIV) (JOHNSTON et al., 2000; JOHNSTON et al., 2002; POWER et al., 2004). Mittels Western blotting und mRNA-Analysen wird ein erhöhter Gehalt an MMP-2 und MMP-9 in den Gehirnen sowohl HIV-infizierter Menschen als auch FIV-infizierter Katzen festgestellt. Die MMPs werden in infizierten Makrophagen exprimiert. Es findet eine Regulierung von MMP-2 durch den JAK/STAT-Transduktionsweg statt. MMP-9 scheint davon unabhängig reguliert zu werden (JOHNSTON et al., 2000). Weiterführend kann durch gezielte Hemmung von MMPs

gezeigt werden, dass diese einen Einfluss auf die FIV-induzierte Neurotoxizität haben. Nach Einsetzen von Prinomastat (PMT), einem selektiven MMP-Inhibitor mit Affinität für Gelatinasen, zeigt sich *in vitro* eine herabgesetzte Neurotoxizität der felines monozytären Makrophagen. Beim *in vivo* Einsatz von PMT an infizierten Neonaten ist eine deutliche Verminderung der systemischen und neurologischen Erkrankungszeichen zu bemerken (JOHNSTON et al., 2002).

Weiterhin existieren einige sowohl genomanalytische als auch zymographische oder immunhistochemische Untersuchungen diverser Neoplasien (JANKOWSKI et al., 2002; SORENSEN et al., 2004a; SORENSEN et al., 2004b; MANDARA et al., 2009). Es lässt sich im Gewebe verschiedener Tumorarten, im Vergleich zu gesundem Gewebe der gleichen Katze, eine signifikante Erhöhung der Konzentration an MMP-2 und MMP-9 zymographisch nachweisen. Ebenso ist die Serum-MMP-Konzentration erkrankter Tiere im Vergleich zu gesunden Tieren erhöht. Es ist jedoch keine Korrelation des MMP-Gehaltes mit der Dignität der Neoplasie zu detektieren (JANKOWSKI et al., 2002). Immunhistochemische Untersuchungen an kaninen und felines Meningiomen stellen eine Aufregulierung von MMP-2 und -9 fest, wobei zwei von 23 felines Tumoren keine MMP-2 Expression zeigen. Auch hier lässt sich keine signifikante Korrelation zwischen der MMP-Expression und dem Tumorverhalten bzw. der Dignität nachweisen (MANDARA et al., 2009). Mittels RT-PCR lassen sich an 31 unterschiedlichen Sarkomen und Karzinomen ohne signifikante Unterschiede zwischen den Tumorarten MMP-1, -2, -3, -10, -13 und -16 nachweisen sowie TIMP-1, -2 und -3. Hierbei findet sich eine negative Korrelation zwischen der Erhöhung von MMP-2 und -16 in Bezug auf die mittlere Überlebensdauer der Patienten (SORENSEN et al., 2004a). Die Arbeitsgruppe um AKKOC (2012) weist MMP-2 und -9 in neoplastisch veränderten Mammaepithelzellen, stromalen Fibroblasten und Entzündungszellen sowie in neoplastisch veränderten Zellen in Lymphgefäßen feline papillärer Mammakarzinome nach. In der felines Plazenta werden im Zusammenhang mit der Untersuchung der extrazellulären Matrix (EZM) dieser endotheliochorialen Plazenta in verschiedenen Gestationsstadien die unterschiedlichen Komponenten immunhistochemisch auf MMPs, verschiedene Kollagentypen und Intermediärfilamente untersucht. Die Untersuchung auf MMP-9 ergibt keine immunhistochemischen Signale. MMP-2 findet sich in den maternalen Stromazellen und in den Blutgefäßendothelien, nicht jedoch im Trophoblasten. Dagegen werden MMP-1 und -13 sowohl in den maternalen Blutgefäßendothelien als auch im Trophoblasten gefunden, was auf eine Assoziation mit der Angiogenese schließen lässt (WALTER und SCHONKYPL, 2006).

Neuere immunhistochemische Untersuchungen an Herzen mit feline Myokardfibrose beweisen eine erhöhte Expression von MMP-2 und TIMP-3 sowie TGF- $\beta$ -2 sowie eine Herunterregulierung von TIMP-2 im Vergleich zu Herzmuskelzellen gesunder Katzen. Die

Fibroblasten der gesunden Herzen zeigen lediglich eine TIMP-2-Expression, in einigen Fällen lässt sich bei erkrankten Herzen eine Erhöhung von MMP-14 nachweisen. Wahrscheinlich sind die MMPs an Pathogenese und Umbau des Bindegewebes dieser Erkrankung beteiligt (AUPPERLE et al., 2011).

In einem Katzenmodell einer allergischen Atemwegserkrankung wird nach Induktion einer Entzündung mit Hilfe von *Ascaris suum* eine Erhöhung von MMP-9 aus bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit gezeigt. Diese besteht auch nach einer Ruhephase und Abklingen aller klinischer Symptome weiter, was auf eine Beteiligung von MMP-9 an chronischen Atemwegserkrankungen schließen lässt (KIRSCHVINK et al., 2007).

Im Rahmen von Untersuchungen zum Einfluss des dritten Augenlides auf Proteine im Tränenfilm von Katzen kann zymographisch eine Aufregulierung von MMP-2 und -9 nach chirurgischer Entfernung der Nickhaut nachgewiesen werden. 18 Wochen nach der Operation ist der MMP-Gehalt des Tränenfilms mit dem eines nicht operierten Auges vergleichbar, so dass MMP-2 und -9 Indikatoren für die Wundheilung darstellen können (PETZNICK et al., 2012).

MUZYLAk und Mitarbeiter (2002) legen aus peripheren Blutzellen von Katzen eine Osteoklastenkultur an. Hierzu werden mononukleäre periphere Blutzellen durch M-CSF und RANKL zur Ausdifferenzierung in multinukleäre Osteoklasten gebracht. In dieser Zellkultur kann neben der Expression von Kathepsin K auch eine MMP-9 Expression ermittelt werden. Die Knochenresorption wird in dieser Kultur durch Calcitonin, Alendronat und einen Integrin-Antagonisten gehemmt. Langfristig besteht die Möglichkeit, das Voranschreiten von Erkrankungen mit resorptiven Komponenten, z.B. Osteoarthritis, sekundärer Hyperparathyreoidismus und resorptive Läsionen, durch Weiterentwicklung oben genannter Stoffe als hemmende Medikamente zu verlangsamen oder zu unterbinden (MUZYLAk et al., 2002).

## **3 Material und Methoden**

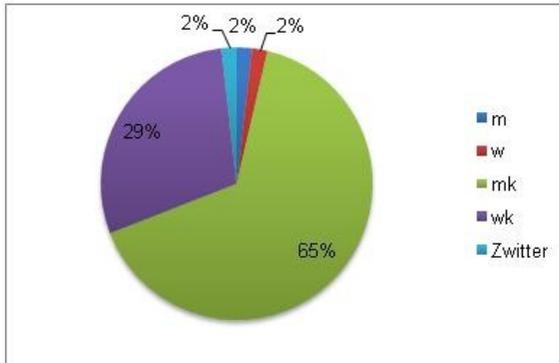
### **3.1 Patientengut**

Es werden insgesamt 55 Katzen, die in der Klinik für Kleintiere, Chirurgie, der Justus-Liebig-Universität Gießen zu einer Behandlung in Narkose vorgestellt werden, stomatologisch untersucht. Je nach Erkrankungsgruppe werden eine bis drei Gingivabiopsien pro Katze entnommen. Der Zahn- und Parodontalstatus wird erhoben, sowie Röntgenübersichtsaufnahmen aller Zähne angefertigt. Es erfolgt eine Einteilung der untersuchten Katzen in die verschiedenen Klassen der RL sowie eine Einstufung, ob eine Parodontitis vorliegt, wobei beide Erkrankungen parallel vorkommen können. Das Versuchsvorhaben wurde beim Regierungspräsidium Gießen vor der Durchführung beantragt und genehmigt (Geschäftszeichen V54 – 19 c 20 15 (1) GI 18/17 Nr. 13/2012).

Eingeschlossen sind Katzen ab dem 12. Lebensmonat, jeglicher Rasse und jeglichen Geschlechts. Als Ausschlusskriterien werden eine Vorbehandlung mit Antibiotika, steroidalen oder nicht-steroidalen Antiphlogistika sowie eine immunsuppressive Therapie definiert. Die Tiere dürfen weiterhin nicht an einem neoplastischen oder anderen chronisch-entzündlichen Geschehen als den resorptiven Läsionen bzw. der Parodontitis erkrankt sein.

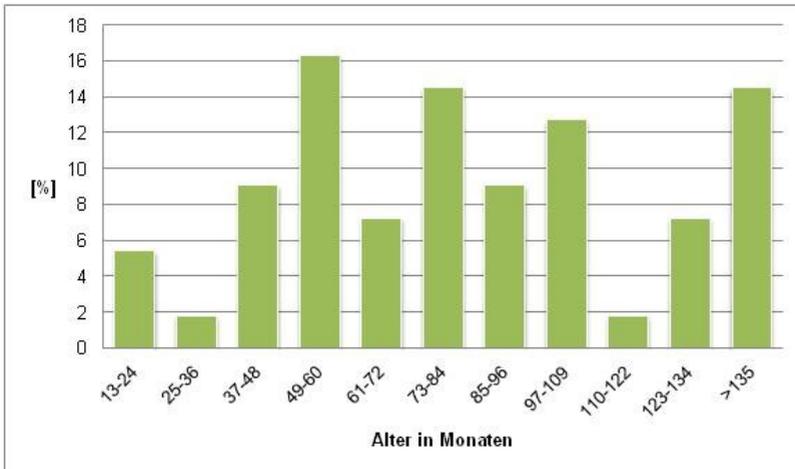
Die Patienten werden in unterschiedliche Gruppen eingeordnet. Als gesunde Kontrollgruppe dienen Katzen, welche frei von RL und Parodontitis sind. Als Untersuchungsgruppen werden Tiere mit RL und Parodontitis (RL Typ 1) und Tiere mit RL ohne Parodontitis (RL Typ 2) sowie Tiere mit Parodontitis ohne RL unterschieden.

Insgesamt werden 55 Katzen untersucht. 37 Tiere sind männlich, eines davon unkastriert. Unter den 17 weiblichen Katzen ist ebenfalls eine unkastriert. Außerdem wird ein Tier, bei welchem sowohl weibliche Geschlechtsorgane als auch beide Hoden angelegt sind, untersucht (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Relative Häufigkeitsverteilung des Geschlechts der stomatologisch untersuchten und behandelten sowie beprobten Katzen (n=55). (m = männlich, w = weiblich, mk = männlich-kastriert, wk = weiblich-kastriert)**

Das Alter der untersuchten Katzen liegt zwischen 12 und 168 Monaten mit einem Mittelwert von 85,75 Monaten (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Relative Häufigkeitsverteilung des Alters der untersuchten Katzen (n=55).**

Es werden mit 40 von 55 Tieren (72,73 %) vor allem Mischlinge der europäischen Kurzhaarkatze (EKH) vorgestellt. Unter den übrigen 15 Patienten finden sich fünf Maine Coon (9,09 %), drei Perser (5,45 %), drei Siam (5,45 %), drei Türkisch Angora (5,45 %) und eine Ragdoll (1,82 %).

### 3.2 Präanästhetische Untersuchungen

Nach der Erhebung einer Anamnese wird jedes Tier allgemein untersucht. Hierbei wird insbesondere auf chronische entzündliche Erkrankungen sowie mögliche Neoplasien geachtet. Vor der Durchführung der Narkose wird eine Blutuntersuchung (Hämatologie und Blutchemie) durchgeführt, um Veränderungen determinieren und gegebenenfalls behandeln zu können.

### 3.3 Anästhesie

Alle Untersuchungen finden in Allgemeinanästhesie statt. Hierzu werden intramuskulär 0,05 mg/kg Körpermasse Medetomidin<sup>1</sup> und 5 mg/kg Körpermasse Ketamin<sup>2</sup> injiziert. Die Narkose wird intravenös mit 0,2 mg/kg Körpermasse Diazepam<sup>3</sup> erhalten. Alternativ erfolgt die Narkose intravenös mittels Prämedikation durch 0,1 mg/kg Körpermasse Butorphanol<sup>4</sup> und Einleitung der Narkose durch maximal 5 mg/kg Körpermasse Alfaxalon<sup>5</sup>. Die Applikation von Alfaxalon erfolgt langsam und streng intravenös. Sobald nach erfolgter dental-röntgenologischer Untersuchung die orotracheale Intubation erfolgt ist, wird die Narkose mit einem 2%igen Isofluran<sup>6</sup>-Sauerstoff-Gemisch aufrecht erhalten. Während der gesamten Narkosedauer wird eine Dauertropfinfusion mit Vollelektrolytlösung<sup>7</sup> (6ml/kg Körpermasse/Stunde) verabreicht.

### 3.4 Untersuchung der Mundhöhle

Die Mundhöhle wird systematisch inspiziert. Zur Dokumentation der Befunde werden Befundbögen der Firma Pharmacia (nach DDr. Fahrenkrug) verwendet (siehe Anhang,

---

<sup>1</sup> Dorbene ad us vet.®, Zoetis Deutschland GmbH (ehemals Pfizer), Berlin

<sup>2</sup> Ketamin 10% Injektionslösung für Hunde und Katzen, medistar® Arzneimittelvertrieb GmbH, Ascheberg

<sup>3</sup> Diazepam-ratiopharm® 10mg/2ml Injektionslösung, ratiopharm GmbH, Ulm

<sup>4</sup> Dolorex® 10mg/ml Injektionslösung für Pferde und Hunde, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim

<sup>5</sup> Alfaxan® 10mg/ml Injektionslösung für Hunde und Katzen, Vetoquinol GmbH, Ravensburg

<sup>6</sup> Isoflo®, Albrecht GmbH, Aulendorf

<sup>7</sup> Sterofundin®, Lösung zur intravenösen Infusion, 1/1 E, B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Kapitel 9.1). Es werden sowohl der Zahn- als auch der Parodontalstatus erhoben. Anschließend werden Übersichtsröntgenaufnahmen aller vier Kieferquadranten angefertigt.

#### **3.4.1 Zahnstatus**

Zur Erhebung des Zahnstatus gehört die Feststellung der Anzahl der Zähne, die Beurteilung des Zahnschmelzes, der Zahnkronen, des Vorhandenseins von Zahnfrakturen, und wenn ja, welchen Typs. Außerdem wird auf klinisch erkennbare Wurzelreste geachtet.

#### **3.4.2 Parodontalstatus**

Der Parodontalstatus wird mit Hilfe verschiedener Indizes ermittelt (GORREL, 2006). Zuerst wird der Plaque-Index ermittelt, welcher eine Graduierung der Plaqueakkumulation darstellt. Er wurde durch SILNESS und LOE (1964) dahingehend modifiziert, dass die quantitative Belastung der Mundhöhle durch Plaque erfasst wird (Tabelle 4). Dieser wird an der bukkalen Zahnfläche erhoben, ebenso wie der Zahnstein-Index, der eine Graduierung der Zahnsteinakkumulation darstellt (Tabelle 5) (BELLOWS, 2010). Hierzu werden mit Hilfe einer Parodontalsonde<sup>8</sup> (Abb. 9) alle Zähne auf Zahnfleischtaschen und einen eventuellen Anhaftungsverlust der Gingiva untersucht. Danach wird anhand der vorhandenen Entzündung und dem Grad der Blutung nach Sondierung der Gingivitis-Index (Tabelle 6) ermittelt (LOE und SILNESS, 1963). Außerdem muss eine eventuell vorhandene Rezession der Gingiva vom freien Gingivalrand bis zur Schmelz-Zement-Grenze beurteilt werden. Diesem wird eine Beurteilung der Furkation der mehrwurzeligen Zähne angeschlossen (Tabelle 7) sowie eine eventuelle Zahnbeweglichkeit untersucht (Tabelle 8) (BELLOWS, 2010). Zuletzt wird die Erhebung des Parodontalstatus (Tabelle 9) mittels radiologischem Parodontal-Index vervollständigt (GORREL, 2006).



**Abbildung 9: Parodontalsonde (Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Firma Zoetis).**

<sup>8</sup> Parodontalsonde, Zoetis Deutschland GmbH (ehemals Pfizer), Berlin

**Tabelle 4: Plaque-Index, gibt den Grad der Plaqueakkumulation an (SILNESS und LOE, 1964)**

0	1	2	3
Plaquetfreiheit	Geringgradige Plaque, dünner Plaquefilm, mit Sonde am Gingivalsaum detektierbar	Mittelgradige Plaque, mäßige Plaqueschicht, Gingivalsaum als Linie sichtbar	Hochgradige Plaque, dicke Plaqueschicht, im Sulkus und den Zahnzwischenräumen

**Tabelle 5: Zahnstein-Index, Grad der Zahnsteinakkumulation (BELLOWS, 2010)**

0	1	2	3
Abwesenheit von Zahnstein	Supragingivaler Zahnstein, <1/3 der Krone ist bedeckt	Supragingivaler Zahnstein, der 1-2/3 der Krone bedeckt; geringgradige subgingivale Beläge	>2/3 der bukkalen Zahnoberfläche sind bedeckt; mittel- hochgradige subgingivale Beläge

**Tabelle 6: Gingivitis-Index, zur Beurteilung des Entzündungsgrades der Gingiva (LOE und SILNESS, 1963)**

0	1	2	3
Physiologische Gingiva	Marginale Gingivitis: Geringgradige Entzündung am Gingivalsaum, geringgradige Farbveränderung, Sulkustiefe physiologisch, keine Blutung (Sondierung)	Mittelgradige Gingivitis: Hyperämie des Gingivalsaumes, mittelgradige Entzündung und Ödematisierung, physiologische Sulkustiefe, Blutung (Sondierung)	Hochgradige Gingivitis: Entzündung bis zur mukogingivalen Grenze, hochgradige Hyperämie und Ödem, Gingivahyperplasie, Ulzerationen, Blutung (spontan)

**Tabelle 7: Graduierung des Furkationsbefalls der mehrwurzeligen Zähne (BELLOWS, 2010)**

0	1	2	3
Physiologische Furkation	Sonde ertastet Beginn der Furkation, Defekt <1 mm	Sonde dringt in Furkation ein, Defekt reicht nicht bis zur Gegenseite	Sonde penetriert Furkation, Defekt ist für Sonde passierbar

**Tabelle 8: Graduierung der Zahnlockerung (BELLOWS, 2010)**

0	1	2	3
Fest: bis zu 0,2mm	Geringgradige Mobilität: alle Richtungen außer axial 0,2-0,5 mm	Mittelgradige Mobilität: alle Richtungen außer axial 0,5-1,0 mm	Hochgradige Mobilität: alle Richtungen außer axial >1,0 mm oder jegliche axiale Bewegung

**Tabelle 9: Röntgenologischer Parodontal-Index (GORREL, 2006)**

0	1	2	3
Physiologisch	Geringgradiger Knochenverlust <25 % der Wurzellänge	Mittelgradiger Knochenverlust 25-50 % der Wurzellänge	Hochgradiger Knochenverlust >50 % der Wurzellänge

#### **3.4.3 Beurteilung der resorptiven Läsionen und radiologische Untersuchung:**

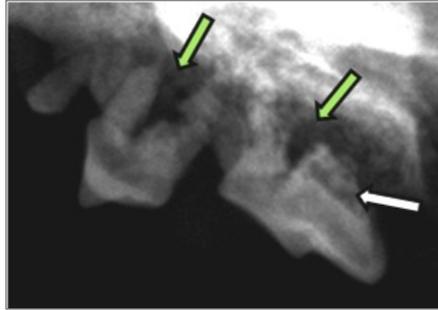
Zunächst werden adspektorisch und mit Hilfe der Zahnsonde<sup>9</sup> klinische Befunde erhoben (Abbildung 10). Es wird die o.g. Klassifizierung in Klasse 1-5 (Tabelle 1) und Typisierung der RL unterschieden, Typ 1 und Typ 2 (Abbildung 11 und 12).



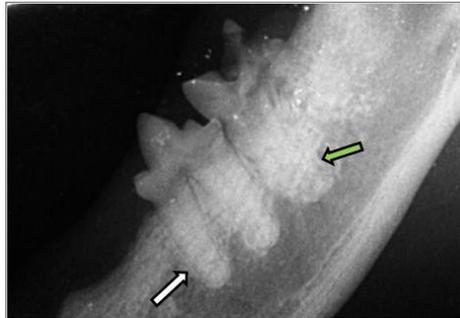
**Abbildung 10: Sondierung eines RL-Defektes mit Hilfe einer Zahnsonde (Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Firma Zoetis).**

Die Röntgenbilder werden mit einer Obertischröhre (Sapphire, Firma Varian) angefertigt. Der Film-Fokus-Abstand beträgt bei allen Aufnahmen 1,00 m. Es kommt ein Computed Radiography-System (CR-System) der Firma Philips (PCR Eleva) mit Speicherfolien (IP) ST-VI (Standardtyp), und IP Kassetten Typ CC der Firma Fujifilm zur Anwendung. Das Auslesen der Speicherfolien erfolgt mit dem CR Folienleser PCR Eleva Cosimax der Firma Philips. Es werden extraorale Übersichtsaufnahmen aller vier Kieferquadranten in der Schrägprojektion, sowie intraorale Aufnahmen des rostralen Ober- bzw. Unterkiefers angefertigt. Die Schrägprojektionen erfolgen bei maximal weit geöffnetem Fang. Der zu untersuchende Kieferquadrant wird so gelagert, dass möglichst alle Molaren und Prämolaren, orthograd und überlagerungsfrei im Zentralstrahl liegen. Bei den intraoralen Aufnahmen von Ober- bzw. Unterkiefer wird der zu untersuchende Kieferanteil auf einer in die Mundhöhle eingelegten Speicherplatte mit der Halbwinkeltechnik zur Beurteilung der Front- und Eckzähne abgebildet.

<sup>9</sup> Zahnsonde, Zoetis Deutschland GmbH (ehemals Pfizer), Berlin



**Abbildung 11:** Röntgenaufnahme der Oberkieferseitenzähne eines Patienten mit RL Typ 1, es zeigen sich neben vertikalem und horizontalem Knochenabbau um die distale Wurzel des 4. Prämolaren sowie um beide Wurzeln des 3. Prämolaren (jeweils grüner Pfeil) deutliche Dichteminderungen im Sinne resorptiver Läsionen aller Wurzeln des 4. Prämolaren (weißer Pfeil) und auch der distalen Wurzel des 3. Prämolaren.



**Abbildung 12:** Röntgenaufnahme der Unterkieferseitenzähne eines Patienten mit RL Typ 2, der 3. Prämolare fehlt, die Laminae durae aller Alveolen zeigen eine erhöhte Röntgendichte (weißer Pfeil), der Parodontalspalt ist an den Wurzeln des 4. Prämolaren kaum, am 1. Molar nicht mehr abgrenzbar (grüner Pfeil).

### 3.5 Probenentnahme und Transport

Es werden eine bis drei Gewebeproben aus der zahnnahen Gingiva entnommen. Die Größe der Gewebeproben wird durch eine Biopsiestanze<sup>10</sup> mit dem Durchmesser von 3 mm definiert. Die Wunden werden mittels resorbierbarem, monofilem Faden der Stärke 4-0<sup>11</sup> durch chirurgische Einzelknopflehte verschlossen.

Bei gesunden Patienten erfolgt die Probenentnahme aus der Gingiva über einem der Oberkiefercanini. Es wird eine Probe entnommen. Bei erkrankten Patienten werden 3 Proben entnommen, immer in der unmittelbaren Nähe erkrankter Zähne (Abbildung 13). Die Proben werden in fest verschließbare, auslaufsichere Gefäße<sup>12</sup> mit 10 %-iger Formalinlösung verbracht. Jedes Tier erhält eine fortlaufende Fallnummer (K1-K55), die Proben werden entsprechend mit der Fallnummer und einer Probennummer von a, b und c versehen. Die Proben werden innerhalb von maximal 10 Tagen nach Entnahme an das Institut für Pathologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover zur weiteren Verarbeitung versandt.



**Abbildung 13: Probenentnahme mittels 3 mm-Biopsiestanze an einem an RL-erkrankten 4. Prämolaren im linken Unterkiefer einer europäischen Kurzhaarkatze (Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Firma kai Europe).**

<sup>10</sup> Einmal Biopsie-Stanze, Durchmesser 3mm, kai Europe GmbH, Solingen

<sup>11</sup> Monocryl 4-0 (1.5 Ph. Eur.) FS-2 (19 mm 3/8c) 45 cm, Firma Ethicon, Johnson&Johnson, Norderstedt

<sup>12</sup> Mikro-Röhren 2,0ml mit Schraubverschluss, Bestellnr. 72.694.406, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

### **3.6 Blutprobe**

Es wird eine präanästhetische Blutuntersuchung (Differentialblutbild und Blutchemie) durchgeführt, so dass eventuelle Begleiterkrankungen und Veränderungen wie zum Beispiel Azotämien, Leukopenien und auch der Immunglobulingehalt erfasst werden können. Außerdem wird eine Serumprobe (1,2 ml) von jedem Tier entnommen und sofort nach Zentrifugation bei -80°C gelagert, um eine zymographische Untersuchung des Blutserums auf MMPs bzw. TIMPs vornehmen zu können. Die Probe wird für weitere Studien asserviert.

### **3.7 Probenaufbereitung und Untersuchung**

#### ***3.7.1 Aufbereitung der Gewebeproben***

Die Proben werden zunächst mit 10 %-igem Formalin fixiert. Die Gewebeproben werden nach einer Fixationszeit von 7 bis 10 Tagen maschinell entwässert, halbiert und in einem Gewebereinbettungsautomat<sup>13</sup> in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke werden bei Raumtemperatur gelagert. Diese Bearbeitung erfolgt durch die Mitarbeiter des Instituts für Pathologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover. Alle weiteren Bearbeitungsschritte werden von der Doktorandin selbst ausgeführt.

Spezialobjektträger<sup>14</sup> werden mit den Patientendaten (fortlaufende Untersuchungsnummer, Schnittnummer) beschriftet. Es werden mit Hilfe eines halbautomatischen Rotationsmikrotoms<sup>15</sup> 20 Serienschnitte von 2 µm Dicke pro Block (je ein Block pro Patient) angefertigt. Die Schnitte werden katalogisiert und für die weiteren Untersuchungen trocken und dunkel archiviert.

#### ***3.7.2 Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung und Toluidinblaufärbung***

Die Färbung erfolgt automatisiert in einem Färbecenter<sup>16</sup> nach einem standardisierten Laborprotokoll mit Hämatoxylin und Eosin.

Die Toluidinblaufärbung wird ebenfalls nach einem standardisierten Laborprotokoll angefertigt.

---

<sup>13</sup> TissueTec® TEC TM 5, Einbettssystem, Vogel GmbH & Co. Kg, Gießen

<sup>14</sup> SuperFrost® Plus Objektträger, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig

<sup>15</sup> HM 350, Microm, Heidelberg

<sup>16</sup> Färbegerät Leica ST 4040, Leica Mikrosystems Nussloch GmbH, Nussloch

### 3.7.3 Immunhistologischer Nachweis

Der immunhistochemische Nachweis der Matrix-Metalloproteinasen -1, -2 und -8 sowie deren Gewebehinhibitoren -1 und -2 (TIMP-1 und -2) wird mit Hilfe der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode erbracht und durch DAB (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) sichtbar gemacht.

#### 3.7.3.1 Antikörper und Seren

Für die Untersuchung ist eine Verdünnung der Primär- und Sekundär-Antikörper in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS<sup>17</sup>) notwendig (ALLDINGER et al., 1996). Bei den Primärantikörpern wird PBS mit 1 % bovinem Serumalbumin<sup>18</sup> (BSA) verwendet. Der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex<sup>19</sup> wird bei allen immunhistologischen Untersuchungen in PBS verdünnt (ALLDINGER et al., 1996). Die zu verwendende Gebrauchsverdünnung wird durch Titration an Kontrollgeweben ermittelt.

#### A. Blocking-Serum

Zur Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen im Gewebe dient inaktiviertes Ziegennormalserum, welches aus klinisch gesunden Spendertieren der Klinik für kleine Klautiere der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, entnommen wird.

Das Vollblut wird in Zentrifugenröhrchen für 5 Stunden bei 4°C gekühlt, danach 10 Minuten bei 37°C bei 190xG zentrifugiert. Zur Inaktivierung der im Serum enthaltenen Komplementkomponenten ist eine Inkubation für 30 Minuten bei 56°C im Wasserbad nötig. Hiernach wird das Serum aliquotiert und bei -20°C gelagert.

#### B. Primäre Antikörper

Die primären Antikörper werden entsprechend der in den Vorversuchen ermittelten Konzentrationen mit PBS und 1 % BSA angemischt.

MMP-2 <sup>20</sup> :	monoklonale Maus-anti-Mensch IgG:	1:200
MMP-1 <sup>21</sup> :	polyklonale Kaninchen-anti-Mensch IgG:	1:500
MMP-8 <sup>22</sup> :	polyklonale Kaninchen-anti-Mensch IgG :	1:500
TIMP-1 <sup>23</sup> :	polyklonale Kaninchen-anti-Mensch IgG:	1:500
TIMP-2 <sup>24</sup> :	polyklonale Kaninchen-anti-Mensch IgG:	1:500

<sup>17</sup> Rezeptur im Anhang, Kapitel 9.3

<sup>18</sup> Bovines Serumalbumin (BSA), A-3059, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

<sup>19</sup> PK 6100, Vectastain®Elite®ABC-Kit, Vector Laboratories Inc., Burlingame, Kalifornien, USA

<sup>20</sup> MMP-2 Ab-1 (Clone CA4001), Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland

<sup>21</sup> RP1-MMP-1, Triple Point Biologics, Inc., Forest Grove, Oregon, USA

<sup>22</sup> SPA-MMP-8, Triple Point Biologics, Inc., Forest Grove, Oregon, USA

<sup>23</sup> RP3-TIMP-1, Triple Point Biologics, Inc., Forest Grove, Oregon, USA

#### C. Sekundäre Antikörper

Als sekundäre Antikörper werden biotinylierte Antikörper verwendet. Die monoklonal aus Mäusen stammenden MMP-2-Antikörper werden mit Hilfe von Ziege-anti-Maus-Antikörpern<sup>25</sup> besetzt. Für die restlichen, polyklonal aus Kaninchen stammenden Antikörper werden Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper<sup>26</sup> genutzt. Diese Sekundärantikörper werden je 1:200 in PBS verdünnt.

#### D. Detektionssystem

Als Detektionssystem dient der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex<sup>27</sup>. Es werden je 15 µl Avidin und Biotin pro 1 ml PBS verwendet. Diese Komponenten sind mindestens 30 min vor Gebrauch anzumischen, so dass sich der Avidin-Biotin-Komplex ausbilden kann.

#### 3.7.3.2 Protokoll der Immunhistochemischen Reaktion

In Anlehnung an die von HSU et al. (1981) beschriebene und von ALLDINGER et al. (1996) modifizierte Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode wird folgendes Protokoll verwendet:

1. Deparaffinieren und Rehydratisieren der Schnitte:  
Roticlear®<sup>28</sup> 2 x 2 min, Isopropylalkohol<sup>29</sup> 1 x 2 min, 96 % Ethanol<sup>30</sup> 1 x 2 min.
2. Inaktivierung der endogenen Peroxidase für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer in Ethanol (85 %ig) mit 0,5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>31</sup>.
3. Spülen der Schnitte (3 x Leitungswasser, 1 x PBS).
4. Verbringen der Schnitte in Coverplates™<sup>32</sup> und Sequenza®<sup>33</sup>-Einsätze, Dichtigkeitskontrolle mit PBS (einmaliges Spülen).
5. Auftragen von Blockserum (ZNS 1:5) und Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur.
6. Auftragen des primären Antikörpers in der zuvor ermittelten Verdünnung und Inkubation 1,5 Stunden bei Raumtemperatur.
7. Zweimaliges Spülen der Schnitte mit PBS.
8. Auftragen des sekundären Antikörpers und Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur.

---

<sup>24</sup> RP2-TIMP-2, Triple Point Biologics, Inc., Forest Grove, Oregon, USA

<sup>25</sup> BA 9200, Vector Laboratories Inc., Burlingame, Kalifornien, USA

<sup>26</sup> BA 1000, Vector Laboratories Inc., Burlingame, Kalifornien, USA

<sup>27</sup> PK 6100, Vectastain®Elite®ABC-Kit, Vector Laboratories Inc., Burlingame, Kalifornien, USA

<sup>28</sup> Roticlear®, A5381, Roth C. GmbH & Co KG, Karlsruhe

<sup>29</sup> 2-Propanol (Isopropanol), 9866.2, Roth C. GmbH & Co KG, Karlsruhe

<sup>30</sup> Ethanol, vergällt, K928.2, Roth C. GmbH & Co KG, Karlsruhe

<sup>31</sup> Wasserstoffperoxid 8070.1, Roth C. GmbH & Co KG, Karlsruhe

<sup>32</sup> Shandon Coverplates™, 72110013, Thermo Electron GmbH, Dreieich

<sup>33</sup> Shandon Sequenza® Slide Racks, 7331017, Thermo Electron GmbH, Dreieich

9. Dreimaliges Spülen der Schnitte mit PBS.
10. Inkubation mit Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex für 30 min bei Raumtemperatur.
11. Einmaliges Spülen der Schnitte mit PBS und Umsetzen der Schnitte in PBS-gefüllte Glasküvetten.
12. Inkubation der Schnitte mit 0,05 % 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid<sup>34</sup> (DAB) mit 0,03 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 5 min auf dem Magnetrührer bei Raumtemperatur.
13. Dreimaliges Spülen der Schnitte mit Leitungswasser.
14. Gegenfärben der Schnitte für 30 Sekunden in Hämalau<sup>35</sup> nach Mayer.
15. Bläuen der Schnitte in Leitungswasser, bis dieses klar bleibt.
16. Entwässern der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe:  
Ethanol 70 % und 96 % (je 1 min), Isopropanol (1 min), Essigsäure-n-butylester<sup>36</sup> (EBE, 3 min) bis zum maschinellen Eindecken der Schnitte mit Hilfe eines Eindeckautomaten<sup>37</sup>.

#### 3.7.3.3 Kontrollen

##### A. Positivkontrollen

Als Positivkontrollen werden definierte Kontrollgewebe aus der gleichen Tierart der zu untersuchenden Proben, in diesem Fall Katzensgewebe, verwendet. Das Gewebe für die Kontrolle des TIMP-1 ist ein infiltrativ und destrukturierend wachsendes Osteosarkom mit Osteolyse (Archivnummer: E4362/12B) (MANDARA et al., 2009). Die Kontrollgewebe für die anderen eingesetzten Antikörper sind zwei einfache, lokal invasive, papilläre Adenokarzinome der Mamma (Archivnummer: E5302/12A bzw. E6073) (SORENSEN et al., 2004a; PALTIAN, 2006; KOEHRMANN et al., 2009; AKKOC et al., 2012). Diese Gewebe zeigten nach Titrationsversuchen eine deutlich positive, zytoplasmatische Markierung für die entsprechenden Antikörper (Tabelle 10).

---

<sup>34</sup> 3,3'-Diaminobenzidine-tetrahydrochloride Dihydrate, 32750, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

<sup>35</sup> Hämalau<sup>35</sup> Lösung sauer nach Mayer, T865.2, Roth C. GmbH & Co. KG, Karlsruhe

<sup>36</sup> Essigsäurebutylester, 4600, Roth C. GmbH & Co. KG, Karlsruhe

<sup>37</sup> Objektträger Eindeckautomat Promounter RCM 2000, Medite Medizintechnik, Burgdorf

**Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Positivkontrollgewebe und Beschreibung ihrer immunhistologischen Signale.**

Kontrollgewebe	Markierte Zellen und Beschreibung des Signals	
<b>Osteosarkom</b> (E4362/12B)	<b>TIMP-1</b> Deutliche, feingranuläre bis körnige, goldbraune zytoplasmatische Reaktion der Tumorzellen	
<b>Adenokarzinom</b> (E5302/12A)	<b>MMP-1</b> Deutliche feingranuläre, goldbraune zytoplasmatische Reaktion der Dukt epithelien (80 %) und Gefäßendothelien (75 %)	<b>MMP-2</b> Deutliche feingranuläre bis körnige, braune zytoplasmatische Reaktion von ca. 75-80 % der Dukt epithelien und Gefäßendothelien
<b>Adenokarzinom</b> (E6073)	<b>MMP-8</b> Deutliche, vorwiegend feingranuläre, braune zytoplasmatische Reaktion in ca. 70 % der Dukt epithelien und Gefäßendothelien	<b>TIMP-2</b> Deutliche, vorwiegend feingranuläre, goldbraune zytoplasmatische Reaktion in ca. 70 % der Dukt epithelien und Gefäßendothelien

#### B. Negativkontrollen

Zur Überprüfung der Spezifität der immunhistochemischen Reaktion werden Negativkontrollen (Serienschnitte der Patientengingiva und des Kontrollgewebes) mitgeführt. Als Ersatz für die Primärantikörper der polyklonalen Antikörper wird Kaninchennormalserum<sup>38</sup> in der Verdünnung 1:2250 verwendet. Als Ersatz für die Primärantikörper des monoklonalen Antikörpers wird Aszitesflüssigkeit von nicht-immunisierten Balb/cJ-Mäusen<sup>39</sup> in der Verdünnung 1:1000 verwendet um eine dem Primärantikörper ähnliche Globulinkonzentration zu erreichen.

<sup>38</sup> Kaninchenserum, R4505, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

<sup>39</sup> Aszitesflüssigkeit von nicht-immunisierten Balb/cJ Mäusen, CL8100, Biologo, Dr. Hartmut Schultheiß e.K., Immunbiologische Produkte, Kronshagen

Die Spezifität der Antikörperbindung wird durch das Ersetzen des sekundären Antikörpers in einem und des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex in einem anderen Schnitt des Positivkontrollgewebes durch PBS überprüft.

#### **3.7.4 Lichtmikroskopische Auswertung**

Die Untersuchung der Gewebeproben wird mit Hilfe eines binokularen Standard-Lichtmikroskopes<sup>40</sup> durch die Doktorandin selbst durchgeführt. Die Kontrolle erfolgt durch eine Fachtierärztin für Pathologie und Diplomate des European College of Veterinary Pathologists. Die Ergebnisse der Untersuchungen werden auf Auswertungsbögen dokumentiert und archiviert (siehe Anhang, Kapitel 9.7).

Das Stellen einer pathohistologischen Diagnose erfolgt anhand der HE-gefärbten Präparate (Schnitt 1, 10 und 17 der Gingiva-Serienschnitte). Der Schnitt wird morphologisch beschrieben, die infiltrierenden Entzündungszellen sowie der Grad der entzündlichen Veränderungen erfasst. Die Graduierung erfolgt in fünf Gruppen: gesunde Gingiva, vereinzelte Entzündungszellen, gering-, mittel- und hochgradige Entzündung. Nachfolgend werden, zur genaueren Differenzierung der Mastzellen, die Schnitte mit der Toluidinblaufärbung betrachtet und bewertet.

Die immunhistologisch behandelten Präparate werden bei 40facher Vergrößerung untersucht. Es werden sowohl die Anzahl der positiv markierten Zellen, als auch ihre Signalintensität untersucht (Tabelle 11 und 12). Die Anzahl der untersuchten Gesichtsfelder ist durch die Größe der Schnitte limitiert, so dass je Präparat zwei Gesichtsfelder untersucht werden. Bei der Untersuchung werden folgende Bereiche gesondert betrachtet:

- 1) Das gesamte verhornende Plattenepithel
- 2) Das Stratum basale
- 3) Die gesamte Lamina propria
- 4) In der Lamina propria befindliche Entzündungszellen
- 5) Fibroblasten/-zyten
- 6) Gefäßendothelzellen
- 7) Perivaskuläre Infiltrate
- 8) Mastzellen in der Lamina propria
- 9) Sofern vorhanden, wird der periostale Bereich/Alveolarknochen ausgewertet

Bei besonderen Befunden wird eine Skizze des untersuchten Abschnittes erstellt.

---

<sup>40</sup> Typ 020-507.010, Leitz Biomed, Wetzlar

**Tabelle 11: Einteilung zur Ermittlung der Anzahl (A) der positiv markierten Zellen.**

0	1	2	3	4
0 % positive Zellen	1-25 % positive Zellen	26-50 % positive Zellen	51-75 % positive Zellen	> 75 % positive Zellen

**Tabelle 12: Einteilung der Signalintensität (I) positiv markierter Zellen.**

0	1	2	3
Kein Signal	Schwaches Signal: Geringgradige Braunfärbung	Mittelstarkes Signal: Deutliche/mittelgradige Braunfärbung	Starkes Signal: Sehr deutliche/hochgradige Braunfärbung

Zur weiteren Auswertung wird aus Intensitätswert I und Häufigkeitswert A durch Multiplikation beider Werte ein immunhistologischer Score (SINICROPE et al., 1995) ermittelt, welcher zwischen 0,0 und 12,0 liegt. Hierbei gelten Scores bis 3 als „niedrig“, Scores von 4-6 werden als „mittel“, 7-9 als „hoch“ und 10-12 als „sehr hoch“ eingestuft. Die auszuwertenden Gewebestrukturen und Zellarten werden im Folgenden für die statistische Auswertung als „Lokalisation“ bezeichnet (Tabelle 13).

**Tabelle 13: Zu untersuchende Strukturen und Zellarten (= Lokalisationen) und die verwendeten Abkürzungen.**

Lokalisation	Abkürzung
Epithel gesamt	Ep
Basalzellschicht	Bz
Lamina propria gesamt	Lp
Fibrozyten bzw. Fibroblasten	Fzb
Endothelien der Gefäßwände	End
Entzündungszellen	Ent
Perivaskuläre Entzündungszellinfiltrate	Peri
Mastzellen	Mast
Alveolarknochenreste	Alv

### 3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Aufbereitung der erhobenen Daten erfolgt mit der freundlichen Unterstützung der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Datenhaltung und -auswertung sowie die Erstellung der grafischen Abbildungen im Rahmen der Ergebnispräsentation erfolgt auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung. Die statistischen Auswertungen werden unter Verwendung des Statistikprogramm Pakets BMDP/Dynamic, Release 8.1, durchgeführt (DIXON, 1993). Die grafischen Abbildungen werden mit dem Programm Statistiksoftware R (Free Software Foundation's GNU project, offizielle Homepage: <http://www.r-project.org>) sowie Excel 2007 für Windows erzeugt.

Zur Beschreibung der Daten werden arithmetische Mittelwerte ( $\bar{x}$ ), Standardabweichungen (s), Minima ( $x_{min}$ ), Maxima ( $x_{max}$ ) und Stichprobenumfänge (n) berechnet und tabellarisch wiedergegeben. Die Datenbeschreibung der semiquantitativen Variablen erfolgt durch die Angabe der Mediane ( $\tilde{x}$ ), der Quartile (Q1 und Q3) sowie der kleinsten und größten Beobachtungen mit Darstellung im Box-and-Whisker-Plot (LORENZ, 1996). Die qualitativen Merkmale werden nach Gruppen getrennt ausgezählt und in Form von Häufigkeitstabellen (Kontingenztafeln) dargestellt.

Zur statistischen **Prüfung des Gruppeneinflusses auf Signifikanz** wird bei den angenähert normalverteilten Merkmalen, hier der Gruppe auf das Alter, eine einfaktorische Varianzanalyse mit dem Programm BMDP7D durchgeführt.

Da sich die erhobenen Daten mehrheitlich als nicht normalverteilt erwiesen, kommt ansonsten beim Gruppenvergleich der **Kruskal-Wallis-Test** als nicht-parametrische Varianzanalyse zum Vergleich unabhängiger Stichproben unter Verwendung des Programms BMDP3S zum Einsatz. Zunächst wird der Einfluss der klinischen Gruppen (Gesunde, RL 1, RL 2, Parodontitis) auf die Scorewerte der unterschiedlichen Lokalisationen geprüft. In einem zweiten Testverfahren wird der mögliche Einfluss der histologischen Gingivitisgruppen (andere Falleinteilung) auf die Scorewerte getestet. Die Untersuchung der Variablenzusammenhänge erfolgt bei den semiquantitativen Merkmalen mit dem **Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman** ( $r_s$ ). Für die Gegenüberstellung qualitativer Merkmale werden Häufigkeitstabellen mit dem Programm BMDP4F erzeugt.

Um die globalen Effekte von Gruppe, Enzym und Lokalisation auf die beobachteten Variablen zu überprüfen, wird eine 3-faktorische Varianzanalyse mit Messwiederholungen in den Faktoren Lokalisation und Enzym durchgeführt. Wegen teilweise fehlender Daten (z.B. Struktur nicht vorhanden oder beurteilbar) wird der **Wald-Test** (maximum-likelihood-Methode) angewandt. Hierfür wird das Programm BMDP5V eingesetzt. Aufgrund der Verteilung der vorliegenden Daten wird zuvor eine *arcsin*-Transformation durchgeführt.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

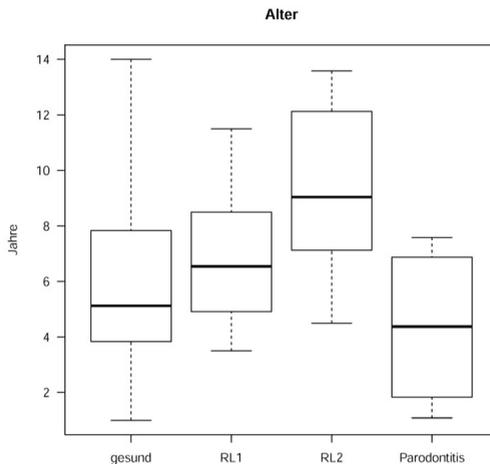
Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wird das Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  zugrunde gelegt, d.h. Ergebnisse mit  $p < 0,05$  werden als statistisch signifikant angesehen. Zusätzlich wird der p-Wert angegeben.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der klinischen und histologischen Untersuchungen

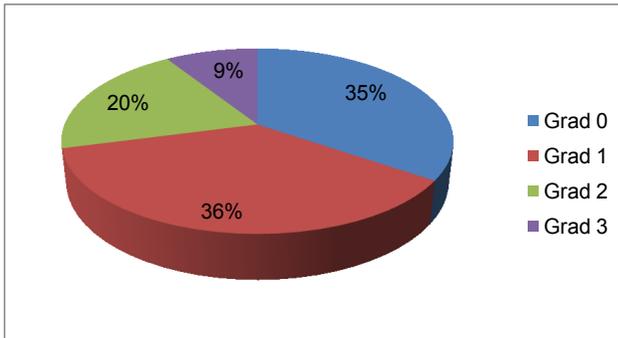
Von 55 untersuchten Tieren wurden aufgrund der **klinischen und radiologischen** Untersuchung 20 Tiere als gesund (frei von RL Typ 1 und 2 sowie Parodontitis) eingestuft. 50 % dieser Tiere ( $n = 10$ ) wiesen klinisch eine geringgradige Gingivitis auf. In die Gruppe der an RL Typ 1 erkrankten Tiere wurden 15 Patienten aufgenommen, die Gruppe der an RL Typ 2 erkrankten Patienten bestand aus 15 Probanden. Vier der Tiere waren an Parodontitis ohne Auftreten von resorptiven Läsionen erkrankt und stellten somit eine eigene Gruppe dar (Tabelle 16, Kapitel 9.8).

Aufgetragen auf das Alter zeigt die Gruppe 3 (RL Typ 2) das höchste Alter mit  $112,4 \pm 35,7$  Monaten, die Gruppe der parodontal erkrankten Tiere das niedrigste Alter mit  $52,3 \pm 36,4$  Monaten (Abbildung 14). Aufgrund der geringen Gruppengröße wurde Gruppe 4 (Tiere mit Parodontitis, aber ohne Zeichen von RL) in der statistischen Auswertung nach Gruppen nicht berücksichtigt.



**Abbildung 14: Alter aufgetragen auf die einzelnen, klinisch eingeteilten Gruppen. RL1 = Resorptive Läsionen Typ 1, RL2 = Resorptive Läsionen Typ 2.**

Im Rahmen der **klinischen** Untersuchung wurden **Gingivitisgrade** von 0 bis 3 ermittelt. Hier zeigten 19 Tiere keine Anzeichen von Entzündung der Gingiva (Grad 0), 20 Tiere eine geringgradige (Grad 1), 11 eine mittelgradige (Grad 2) und 5 Tiere eine hochgradige Gingivitis (Grad 3) (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Klinische Gingivitisgrade, prozentuale Verteilung der Patienten auf die einzelnen Gruppen.**

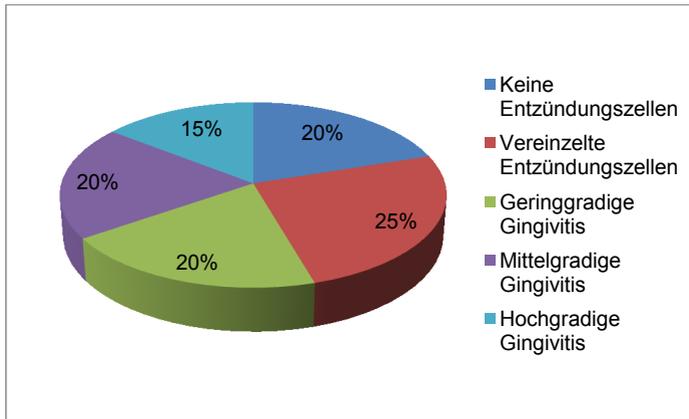
In der **histologischen Untersuchung** (Abbildung 16) wurden 11 Patienten als **frei von Entzündungszellen** diagnostiziert. Diese Präparate zeigten einen physiologischen Aufbau der Gingiva, bestehend aus verhornendem Plattenepithel und der Lamina propria. In allen Präparaten ließen sich Mastzellen unterschiedlicher Anzahl nachweisen. Auffällig an den Präparaten von Tieren unter 2 Jahren war das vermehrte Vorkommen von Blutgefäßen in der Lamina propria. Selten auftretende, intravaskuläre neutrophile Granulozyten wurden nicht als Entzündungszellen in der Lamina propria gewertet.

**Vereinzelte Entzündungszellen** waren bei 14 der Katzen zu detektieren. In diesen Präparaten befanden sich maximal vier Entzündungszellen pro Gesichtsfeld (40fache Vergrößerung), meist Lymphozyten oder neutrophile Granulozyten, in der Lamina propria. Es ließ sich keine Anhäufung dieser Zellen feststellen. Auch hier fanden sich in allen Präparaten Mastzellen unterschiedlicher Anzahl und Größe.

Als **geringgradige Gingivitis** wurde in 11 Fällen das regelmäßige Auftreten diffus verteilter, geringgradiger Mengen von Entzündungszellen in der Lamina propria bezeichnet. Auch Präparate mit lokal begrenzten Aggregaten neutrophiler Granulozyten oder Lymphozyten multifokal in der Lamina propria wurden dieser Gruppe zugeordnet. Mastzellen waren auch hier regelmäßig in unterschiedlich großer Anzahl zu finden.

Ebenfalls 11 der Katzen zeigten eine **mittelgradige Gingivitis**. Sie wiesen eine mittelgradige Infiltration von Entzündungszellen auf, wobei im Regelfall in der gesamten Lamina propria diffus verteilte Lymphozyten und neutrophile Granulozyten, aber auch Plasmazellen, vorkamen. In einigen Fällen zeigten sich lokale Exozytosen in das verhornende Plattenepithel mit fokalen Entzündungszellaggregationen. In diesen Präparaten waren ebenfalls diffus verteilte Mastzellen unterschiedlicher Anzahl und Ausprägung zu detektieren.

Eine **hochgradige Gingivitis** konnte in 8 Fällen diagnostiziert werden. Hierbei war die gesamte Lamina propria hochgradig mit Entzündungszellen infiltriert. Die verschiedenen Zellkonglomerate bestanden überwiegend aus Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten. Auch Plasma- und Mastzellen waren präsent. In diesen Präparaten zeigten sich erosive bis ulzerative Veränderungen des Plattenepithels sowie ein Kollagenfaserverlust der Lamina propria. Die Mastzellen befanden sich in der Lamina propria, nicht jedoch in den Arealen hochgradiger Entzündungszell- und Detritusanhäufungen.



**Abbildung 16: Histologische Gingivitisgrade, prozentuale Verteilung der Patienten auf die unterschiedlichen Entzündungsstufen.**

Zwischen der klinisch diagnostizierten Gingivitis und den pathohistologischen Diagnosen bestand eine signifikante Korrelation ( $p = 0,0057$ ;  $T_s = 0,3681$ ).

## 4.2 Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen

Bei der einfaktoriellen Analyse, getrennt nach Lokalisation und Enzym, ließen sich mit dem **Kruskal-Wallis-Test** keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten klinischen Gruppen in Bezug auf die MMP-Expression nachweisen.

Bezieht man in der Analyse die Faktoren Enzym und Lokalisation mit ein, so zeigte der **Wald-Test** global (Tabelle 14) hochsignifikante p-Werte bezüglich der Haupteffekte dieser Faktoren sowie der Wechselwirkungen zwischen Enzym und Lokalisation. Der Einfluss der Lokalisation war also enzymabhängig. Ein Gruppenunterschied war mit einem  $p = 0,73$  ebenfalls nicht vorhanden.

**Tabelle 14: Übersicht über die im Wald-Test ermittelten globalen Effekte mit signifikanten p-Werten.**

Effekt	Chi-Quadrat	p-Wert
Enzym	649,9574	<0,0001
Lokalisation	797,4556	<0,0001
Enzym-Lokalisation	174,3592	< 0,0001

Die weiteren Ergebnisse der **dreifaktoriellen Varianzanalysen** und globalen Enzymeffekte werden in den entsprechenden Unterkapiteln behandelt bzw. in Tabelle 19 im Anhang, Kapitel 9.8, aufgeführt.

Die globalen Ergebnisse der einzelnen Lokalisationen über alle Gruppen und Enzyme zeigten signifikante p-Werte mit unterschiedlichen geschätzten Effekten (Tabelle 15). Ebenso zeigten die Enzymeffekte über alle Gruppen und Lokalisationen signifikante p-Werte (Tabelle 16). War der geschätzte Effekt oder der Schätzwert kleiner Null, so lag ein negativer Effekt vor. Bei einem Schätzwert größer Null lag ein positiver Effekt vor.

**Tabelle 15: Übersicht der globalen Lokalisationseffekte über alle Gruppen und Enzyme (= Abweichungen vom Gesamtmittelwert der *arcsin*-transformierten Werte = Abweichung vom globalen Mittelwert = Effektschätzer).**

Parameter/Lokalisation	Effektschätzer	p-Wert
Lokalisation 1 = Epithel	+ 0,31170	< 0,0001
Lokalisation 2 = Basalzellschicht	+ 0,30582	< 0,0001
Lokalisation 3 = Lamina propria	+ 0,06250	= 0,011
Lokalisation 4 = Fibrozyten-/blasten	- 0,18118	< 0,0001
Lokalisation 5 = Endothelzellen	+ 0,24813	< 0,0001
Lokalisation 6 = Entzündungszellen	- 0,11681	< 0,0012
Lokalisation 7 = perivaskuläre Infiltrate	- 0,13667	< 0,0001
Lokalisation 8 = Mastzellen	- 0,49348	< 0,0001

**Tabelle 16: Übersicht der globalen Enzymeffekte über alle Gruppen und Lokalisationen (= Abweichungen vom Gesamtmittelwert der *arcsin*-transformierten Werte = Abweichung vom globalen Mittelwert = Effektschätzer).**

Parameter/Lokalisation	Effektschätzer	p-Wert
Enzym 1 = MMP-1	+ 0,02157	= 0,25
Enzym 2 = MMP-2	+ 0,30545	< 0,0001
Enzym 3 = MMP-8	- 0,34864	< 0,0001
Enzym 4 = TIMP-1	+ 0,21160	< 0,0001
Enzym 5 = TIMP-2	- 0,18997	< 0,0001

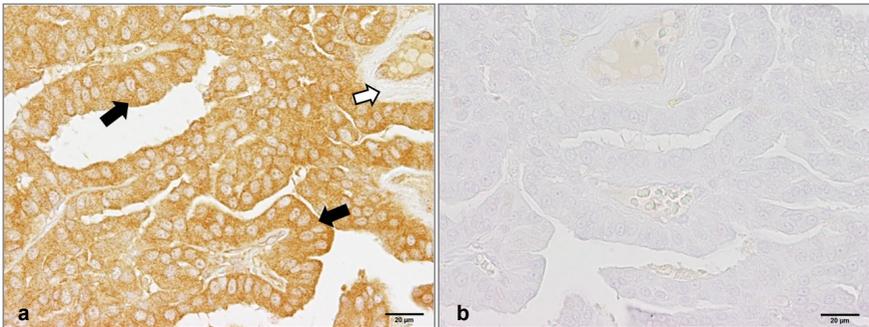
Ein durchgeführtes Verfahren mittels **Spearman-Rang-Korrelationskoeffizienten** (bei monotonem Zusammenhang) oder **Kruskal-Wallis-Test** (bei nicht monotonem Zusammenhang) bezüglich der **Auswirkung der pathohistologisch diagnostizierten Gingivitisgrade** (ordinal skaliert) **auf die MMP-Expression** zeigte vor allem für MMP-1 deutliche Signifikanzen. Für MMP-2 und TIMP-2 fanden sich wenige signifikante Werte. Für MMP-8 und TIMP-1 ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich MMP-Expression und histologischem Entzündungsgrad ermitteln. Die Übersicht über die

Testergebnisse zeigt Tabelle 20 im Anhang, Kapitel 9.8, auf die statistisch signifikanten Werte wird in den einzelnen Unterkapiteln eingegangen.

In jedem Unterkapitel wird pro Antikörper zunächst das Kontrollgewebe gezeigt um dann auf die Reaktionen der unterschiedlichen Zellen bzw. Gewebeschichten in der Gingiva genauer einzugehen (Ergebnisse der dreifaktoriellen Varianzanalyse). Zuletzt werden die Unterschiede der MMP- bzw. TIMP-Expression, bezogen auf die histologischen Entzündungsgrade, dargestellt.

#### 4.2.1 MMP-1

Im Kontrollgewebe, einem einfachen, lokal invasiven, papillären Adenokarzinom der Mamma (E 5302/12A), waren ca. 80 % der Dukt epithelien und 75 % der Gefäßendothelien positiv markiert. Das Signal war goldbraun und zeigte eine feingranuläre, deutliche zytoplasmatische Reaktion (Abb. 17a). Die Zellkerne waren frei von Reaktion. Sämtliche Negativkontrollen waren frei von spezifischem Signal (Abb. 17b)



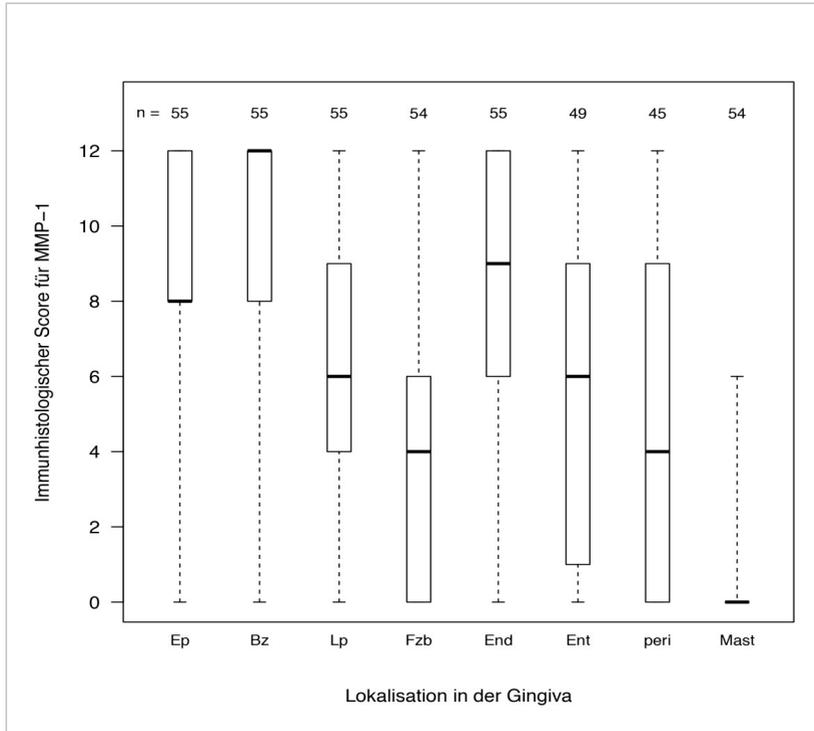
**Abbildung 17a und b: Adenokarzinom, Vergrößerung 40fach, Messbalken 20µm**

**a) Positivkontrolle für MMP-1, schwarze Pfeile: positiv markiertes Zytoplasma der Dukt epithelien mit freien Zellkernen, weißer Pfeil: Bindegewebe**

**b) Negativkontrolle mit Kaninchennormalserum (Verdünnung 1:2250)**

In der Auswertung der immunhistologischen Scores aller Gruppen zeigten das gesamte Epithel und die trotz Zugehörigkeit zum Epithel als eigene Lokalisation geführte Basalzellschicht sehr hohe Scorewerte. Die Gefäßendothelien der Lamina propria wiesen mittlere bis sehr hohe Scorewerte auf, die gesamte Lamina propria, die Fibrozyten bzw. -blasten sowie die diffus vorhandenen Entzündungszellen und perivaskulären Infiltrate

wiesen mittlere Scorewerte auf. Der Mastzellscore war deutlich niedriger und lag bis auf wenige Ausnahmen bei Null (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Scorewerte für MMP-1 (Mittelwert und Standardabweichung).**

**Ep=Epithel, Bz=Basalzellschicht, Lp=Lamina propria gesamt, Fzb=Fibrozyten/-blasten, End=Endothel, Ent=Entzündungszellen, peri=perivaskuläre Infiltrate, Mast=Mastzellen.**

Die dreifaktorielle Varianzanalyse ergab ein hochsignifikantes  $p < 0,0001$  für den Wechselwirkungsterm zwischen MMP-1 und den Mastzellen mit negativem Effektschätzer von -0,21 für das Vorhandensein von MMP-1 in Mastzellen. Alle anderen Lokalisationen in Kombination mit MMP-1 zeigten deutlich höhere p-Werte. Abbildung 18 verdeutlicht durch den niedrigen immunhistologischen Scorewert für Mastzellen, dass MMP-1 in den Mastzellen nur geringgradig exprimiert wurde.

Zwischen den Medianen der einzelnen Scorewerte für MMP-1, gruppiert nach **histologischen Gingivitisgruppen**, fanden sich deutliche Signifikanzen in allen Lokalisationen, außer im Bereich der Mastzellen ( $p = 0,48$ ) (Tabelle 17 und im Anhang Tabelle 19, Kapitel 9.8).

**Tabelle 17: Ergebnis des Kruskal-Wallis-Test zum Vergleich der mittleren Scorewerte (= Mediane) der einzelnen Lokalisationen/Zellarten für MMP-1 in Bezug auf die histologischen Gingivitisgruppen. Die signifikanten p-Werte sind fett markiert.**

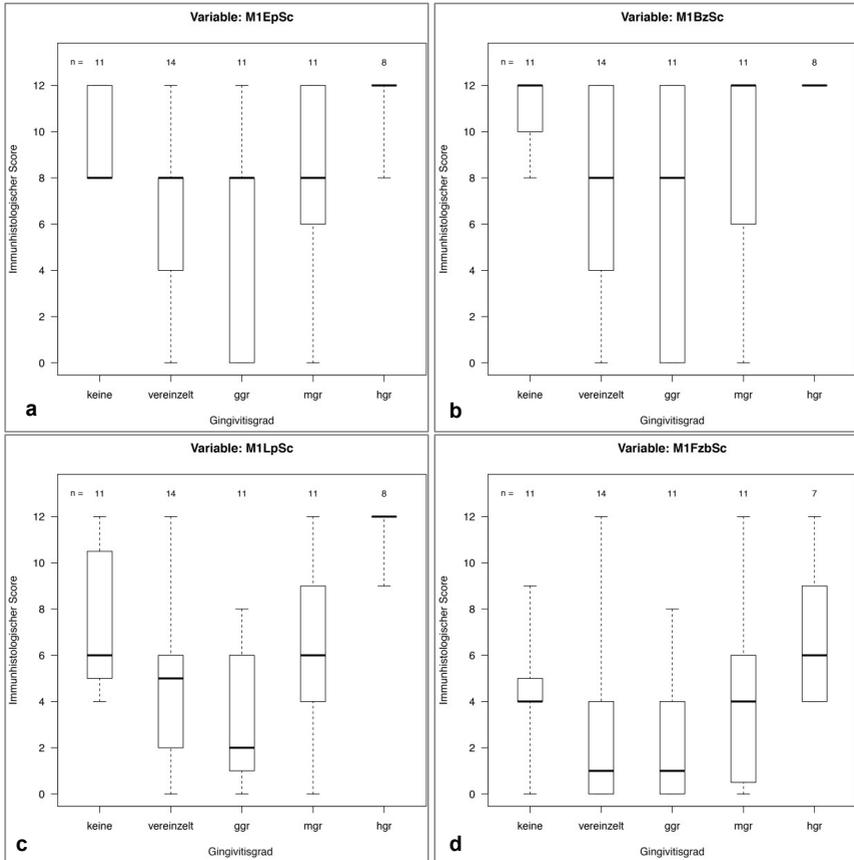
Variable	p-Wert
Epithelzellscore	= <b>0,0019</b>
Basalzellscore	= <b>0,0077</b>
Lamina propria Score	= <b>0,0003</b>
Fibrozyten/-blastenscore	= <b>0,043</b>
Endothelzellscore	= <b>0,0079</b>
Entzündungszellscore	= <b>0,01</b>
Perivaskuläre Infiltrate Score	= <b>0,0002</b>
Mastzellscore	= 0,48

Da die Zusammenhänge nicht monoton waren, wurde hier der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Diese Zusammenhänge wurden durch die entsprechenden Box-and-Whisker-Plots der medianen Scorewerte je Gruppe und deren Standardabweichungen verdeutlicht (Abb. 19a-d und 20a-d).

Am Beispiel der Werte der immunhistologischen Scores der MMP-1 Expression in den Epithelzellen (M1EpSc, Abb. 19a) wurde ersichtlich, dass die Medianen über die histologischen Gingivitisgruppen für die ersten vier Gruppen im hohen Bereich lagen, die Streuung jedoch variabel war. So zeigten die Werte der geringgradigen Gingivitiden eher eine Tendenz zu niedrigen Scorewerten. Auffällig zeigte sich der Median der hochgradigen Gingivitiden mit einem sehr hohen Wert bei 12 und einer sehr geringen Streuung.

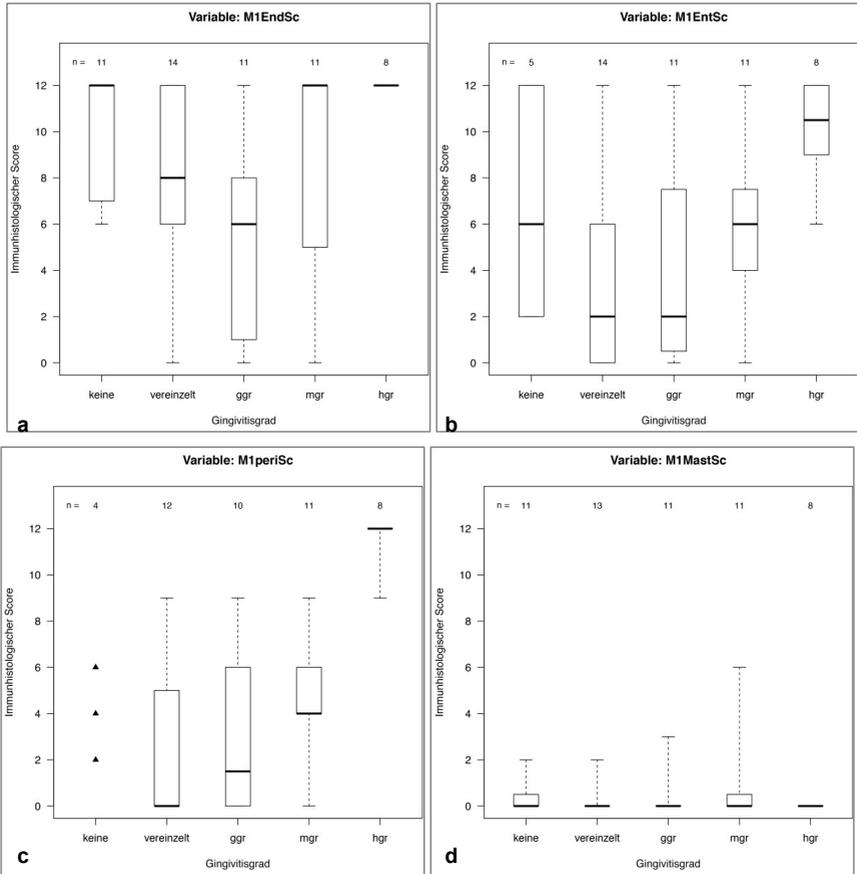
Im Gegensatz hierzu verhielten sich die Mastzellscores bei allen Gingivitisgruppen annähernd gleich mit Medianwerten der Scores von 0 bei sehr geringer Streuung, so dass sich hieraus ein nicht signifikanter p-Wert ( $p = 0,48$ ) ergab (Abbildung 20d).

## 4 ERGEBNISSE



**Abbildung 19a-d:** Box-and-Whisker-Plots der Scores für MMP-1 aufgetragen auf die histologischen Entzündungsgrade (ggr = geringgradig, mgr = mittelgradig, hgr = hochgradig; M1EpSc = Epithelzellscore für MMP-1, M1BzSc = Basalzellscore für MMP-1, M1LpSc = Lamina propria gesamt Score für MMP-1, M1FzSc = Fibrozyten/-blastenscore für MMP-1)

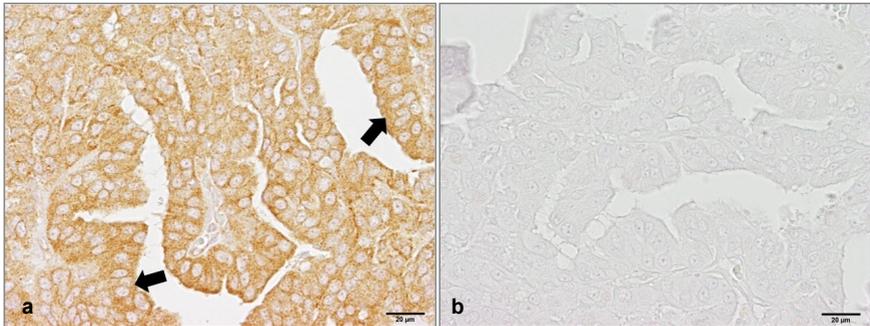
## 4 ERGEBNISSE



**Abbildung 20 a-d: Box-and-Whisker-Plots der Scores für MMP-1 aufgetragen auf die histologischen Entzündungsgrade (ggr = geringgradig, mgr = mittelgradig, hgr = hochgradig; M1EndSc = Endothelzellscore für MMP-1, M1EntSc = Entzündungszellscore für MMP-1, M1periSc = perivaskuläre entzündliche Infiltrate Score für MMP-1, M1MastSc = Mastzellscore für MMP-1).**

#### 4.2.2 MMP-2

Im Kontrollgewebe, einem einfachen, lokal invasiven, papillären Adenokarzinom der Mamma (E 5302/12A), waren ca. 75-80 % der Dukt epithelien und der Gefäßendothelien positiv markiert. Das Signal war braun, vorwiegend feingranulär bis körnig und deutlich zytoplasmatisch (Abbildung 21a). Die Zellkerne waren frei von Reaktion. Sämtliche Negativkontrollen waren frei von spezifischem Signal (Abbildung 21b).

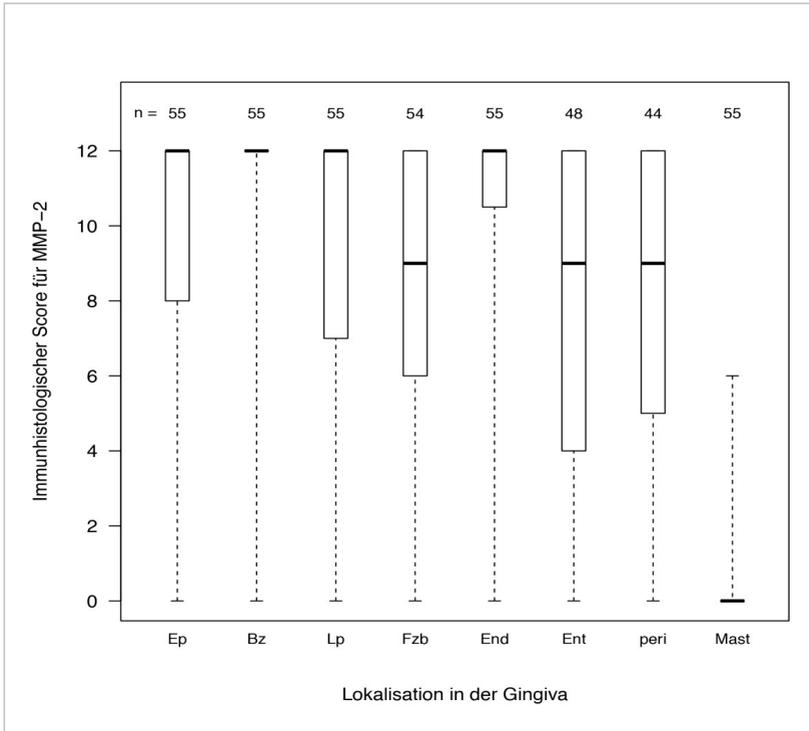


**Abbildung 21a und b: Adenokarzinom, Vergrößerung 40fach, Messbalken 20µm**

**a) Positivkontrolle für MMP-2, schwarze Pfeile: positiv markiertes Zytoplasma der Dukt epithelien mit freien Zellkernen**

**b) Negativkontrolle mit balb/cJ-Maus Aszites (Verdünnung 1:1000)**

In der Auswertung der immunhistologischen Scores zeigten die diffus in der Lamina propria befindlichen Entzündungszellen, die perivaskulären entzündlichen Infiltrate und die Fibrozyten bzw. -blasten mittlere bis hohe Scorewerte. Der Mastzellscore war sehr niedrig. Die Scorewerte der anderen Lokalisationen befanden sich im hohen Bereich (Abbildung 22).

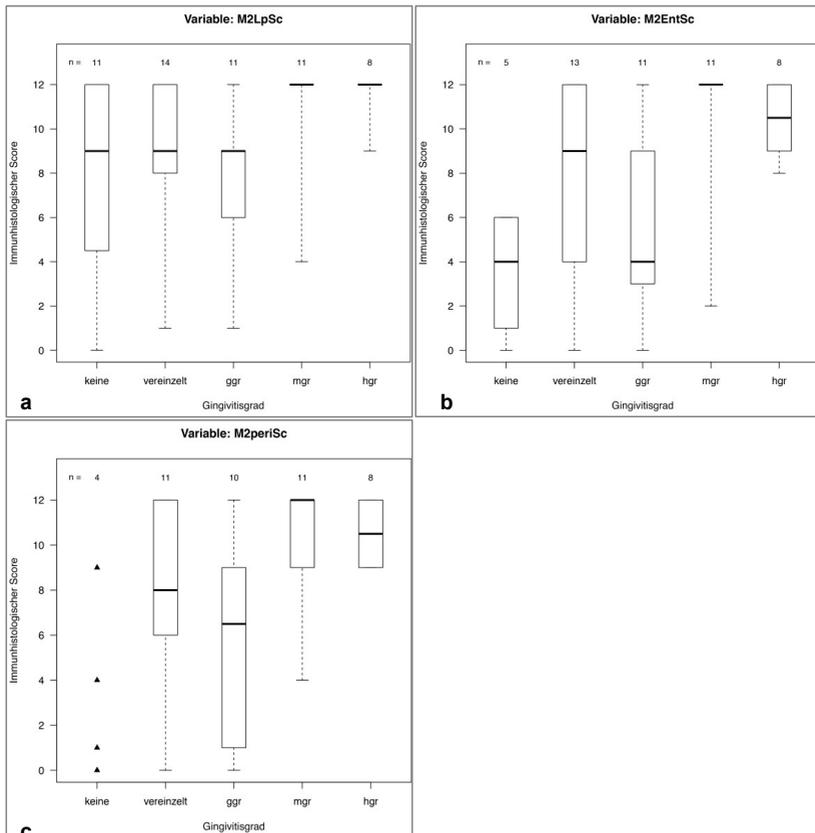


**Abbildung 22: Scorewerte für MMP-2 (Mittelwert und Standardabweichung). Ep=Epithel, Bz=Basalzellschicht, Lp=Lamina propria gesamt, Fzb=Fibrozyten/-blasten, End=Endothel, Ent=Entzündungszellen, peri=perivaskuläre Infiltrate, Mast=Mastzellen.**

Die dreifaktorielle Varianzanalyse ergab ein hochsignifikantes  $p < 0,0001$  für den Wechselwirkungsterm zwischen MMP-2 und den Mastzellen mit negativem Effektschätzer von  $-0,65$  für das Vorhandensein von MMP-2 in Mastzellen. Der  $p$ -Wert des Wechselwirkungsterms zwischen MMP-2 und den Fibrozyten bzw. -blasten ist  $p = 0,0001$  und somit ebenfalls hochsignifikant mit einem positiven Effektschätzer von  $0,2001$ . Alle anderen Lokalisationen zeigten für MMP-2 deutlich höhere, und somit nicht signifikante,  $p$ -Werte. Abbildung 22 verdeutlicht durch den niedrigen immunhistologischen Scorewert für Mastzellen, dass MMP-2 in den Mastzellen nur geringgradig exprimiert wurde.

Die histologischen Gingivitisgruppen zeigten für die gesamte Lamina propria ( $p = 0,0077$ ) sowie Entzündungszellen ( $p = 0,0017$ ) und perivaskuläre Infiltrate ( $p = 0,011$ ) signifikante

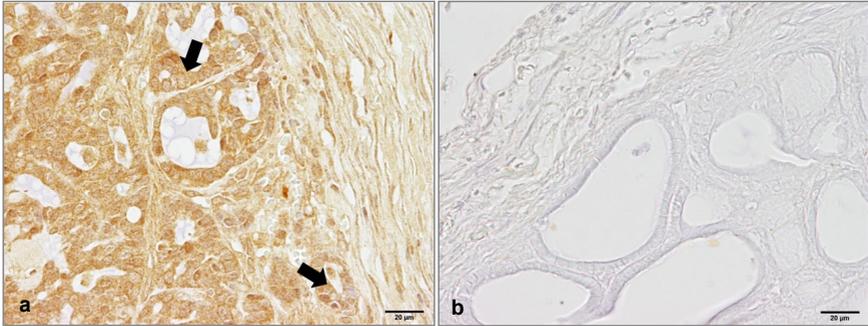
Zusammenhänge (siehe Tabelle 19 im Anhang, Kapitel 9.8). Da die Zusammenhänge nicht monoton waren, wurde hier der Kruskal-Wallis-Test zugrunde gelegt. Diese Zusammenhänge wurden durch die entsprechenden Box-and-Whisker-Plots verdeutlicht (Abb. 23a-c). Am Beispiel der Mediane der immunhistologischen Scorewerte für die Expression von MMP-2 in der Lamina propria zeigten sich für die ersten drei histologisch klassifizierten Gruppen hohe Mediane mit einer mittleren Streuung der Werte. Die Tiere mit mittel-hochgradiger Gingivitis wiesen generell sehr hohe Scorewerte (Mediane 12,0) mit einer geringen Streuung auf (Abb. 23a).



**Abbildung 23a-c:** Box-and-Whisker-Plots der Scores für MMP-2 aufgetragen auf die histologischen Entzündungsgrade (ggr = geringgradig, mgr = mittelgradig, hgr = hochgradig; M2LpSc = Lamina propria gesamt Score für MMP-2, M2EntSc = Entzündungszellscore für MMP-2, M2periSc = perivaskuläre entzündliche Infiltrate Score für MMP-2).

### 4.2.3 MMP-8

Im Kontrollgewebe, einem einfachen, lokal invasiven, papillären Adenokarzinom der Mamma (E 6073), fand sich eine vorwiegend feingranuläre, deutlich zytoplasmatische Reaktion. Es waren ca. 70 % der Duktalepithelien und Gefäßendothelien positiv markiert (Abb. 24a). Ein Anteil des Gewebes von ca. 30 % zeigte keinerlei Reaktion. Die Zellkerne waren frei von Reaktion. Sämtliche Negativkontrollen waren frei von spezifischem Signal (Abb. 24b).

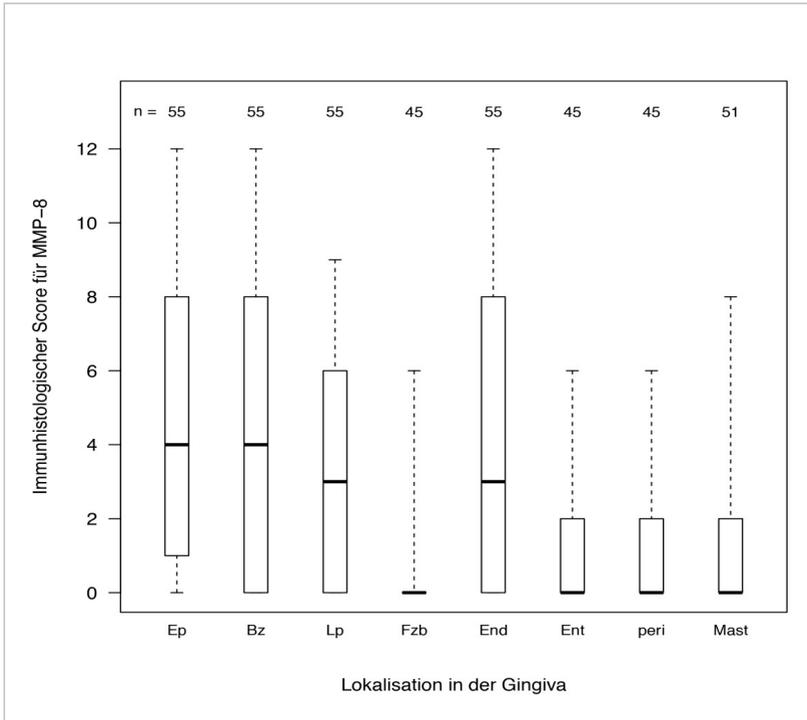


**Abbildung 24a und b: Adenokarzinom, 40fache Vergrößerung.**

**a) Positivkontrolle für MMP-8, schwarze Pfeile: positiv markierte Duktalepithelien mit freien Zellkernen**

**b) Negativkontrolle mit Kaninchennormalserum (Verdünnung 1:2250)**

In der Auswertung der immunhistologischen Scores zeigten sich insgesamt bis auf die Epithelzellen mit der Basalzellschicht mit vorwiegend mittleren immunhistologischen Scores niedrige Scorewerte. Hierbei waren die Werte der Fibrozyten/-blasten, der Entzündungszellen und perivaskulären entzündlichen Infiltrate sowie die immunhistologischen Scores für die Mastzellen sehr niedrig (Abbildung 25).



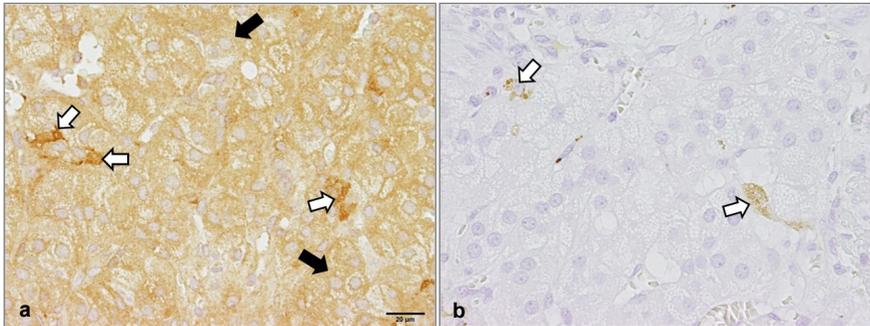
**Abbildung 25: Scorewerte für MMP-8 (Mittelwert und Standardabweichung). Ep=Epithel, Bz=Basalzellschicht, Lp=Lamina propria gesamt, Fzb=Fibrozyten/-blasten, End=Endothel, Ent=Entzündungszellen, peri=perivaskuläre Infiltrate, Mast=Mastzellen.**

In der dreifaktoriellen Varianzanalyse war der p-Wert des Wechselwirkungsterms der Scores von MMP-8 und den Mastzellen mit  $p < 0,0001$  hochsignifikant und zeigte mit  $-0,36$  einen deutlich negativen Effektschätzer. Weiterhin war der p-Wert der Scorewerte von MMP-8 und den Fibrozyten/-blasten signifikant mit  $p = 0,043$  und einem ebenfalls negativen Effektschätzer von  $-0,109$ .

Die histologischen Gingivitisgruppen zeigten keine statistisch signifikanten Zusammenhänge in Bezug auf die MMP-8-Expression.

#### 4.2.4 TIMP-1

Im Kontrollgewebe, einem infiltrativ und destruierend wachsenden Osteosarkom mit Osteolyse (E 4361), waren ca. 70 % der Zellen positiv markiert. Das Signal war goldbraun und zeigte eine feingranuläre bis -körnige, deutliche zytoplasmatische Reaktion (Abb. 26a). Die Zellkerne waren frei von Reaktion. Sämtliche Negativkontrollen waren frei von spezifischem Signal (Abb. 26b).

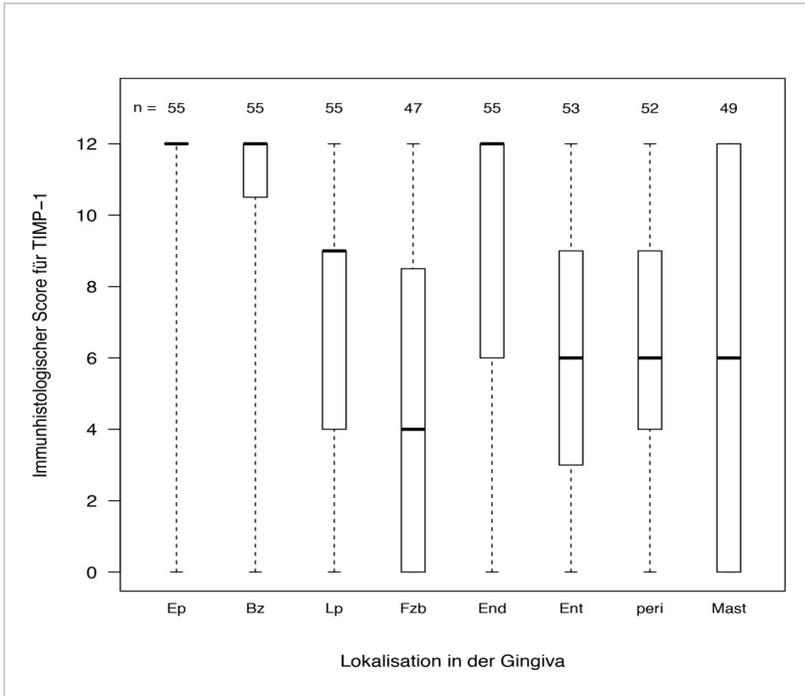


**Abbildung 26a und b: Osteosarkom, 40fache Vergrößerung.**

**a) Positivkontrolle für TIMP-1, schwarze Pfeile: positiv markiertes Zytoplasma mit freien Zellkernen, weiße Pfeile: Hämosiderinablagerungen**

**b) Negativkontrolle mit Kaninchennormalserum (Verdünnung 1:2250), weiße Pfeile: Hämosiderinablagerungen**

In der Auswertung der immunhistologischen Scores zeigte das Epithel inklusive Basalzellschicht sowie die Endothelzellen sehr hohe, die Lamina propria hohe, die Entzündungszellen inklusive perivaskulärer Infiltrate mittlere bis hohe Werte. Die Scores der Fibrozyten/-blasten und der Mastzellen zeigten mittlere Werte, wobei die Mastzellen eine gleichmäßig verteilte Streuung über alle Scorewerte zeigten (Abb. 27).



**Abbildung 27: Scorewerte für TIMP-1 (Mittelwert und Standardabweichung).**

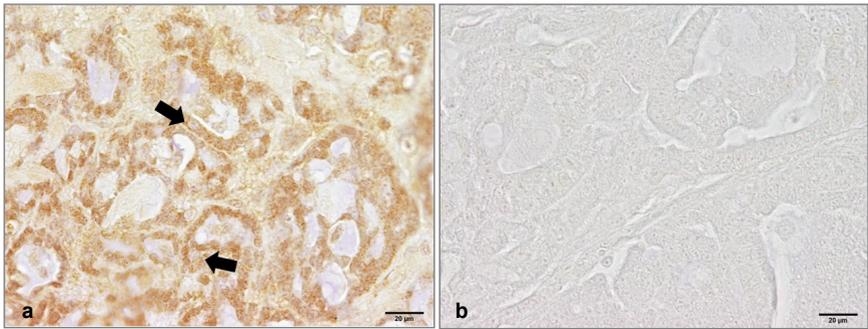
**Ep=Epithel, Bz=Basalzellschicht, Lp=Lamina propria gesamt, Fzb=Fibrozyten/-blasten, End=Endothel, Ent=Entzündungszellen, peri=perivaskuläre Infiltrate, Mast=Mastzellen.**

Für den Wechselwirkungsterm der dreifaktoriellen Varianzanalyse zwischen TIMP-1 und den Fibrozyten bzw. -blasten besteht ein signifikantes  $p$  mit  $p = 0,0012$  und einem negativen Effektschätzer von  $-0,17$ . Die Scorewerte des Wechselwirkungsterms von TIMP-1 und den Entzündungszellen zeigten ebenfalls ein signifikantes  $p$  mit  $p = 0,016$  und einem negativen Effektschätzer von  $-0,12$ .

Die histologischen Gingivitisgruppen zeigten keine statistisch signifikanten Zusammenhänge in Bezug auf die TIMP-1-Expression.

#### 4.2.5 TIMP-2

Im Kontrollgewebe, einem einfachen, lokal invasiven, papillären Adenokarzinom der Mamma (E 6073), waren ca. 70 % der Duktalepithelien und Gefäßendothelien positiv markiert. Das Signal war goldbraun und zeigte eine feingranuläre, deutliche zytoplasmatische Reaktion (Abb. 28a). Die Zellkerne waren frei von Reaktion. Sämtliche Negativkontrollen waren frei von spezifischem Signal (Abb. 28b).

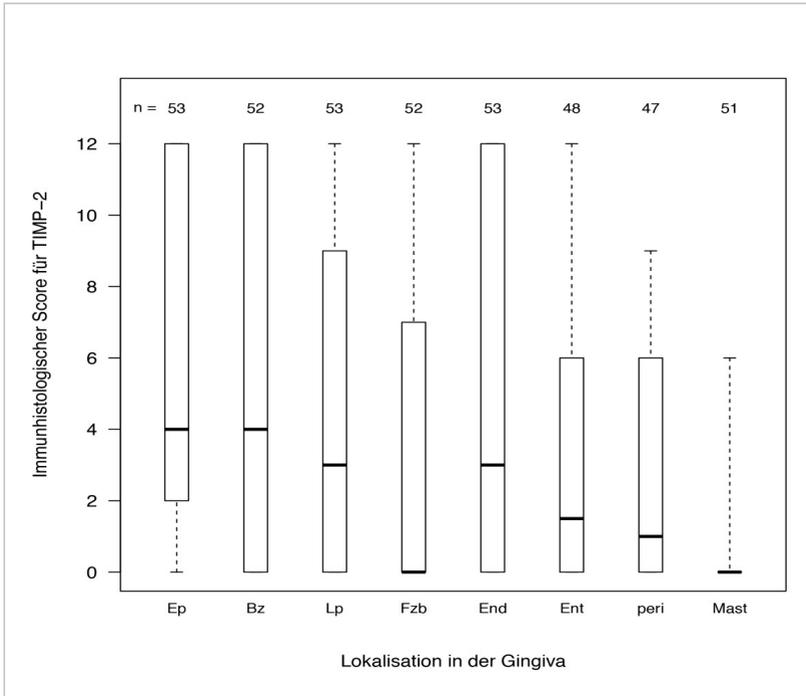


**Abbildung 28a und b: Adenokarzinom, 40fache Vergrößerung.**

**a) Positivkontrolle für TIMP-2, schwarze Pfeile: positiv markierte Duktalepithelzellen mit freien Zellkernen**

**b) Negativkontrolle mit Kaninchennormalserum (Verdünnung 1:2250)**

In der Auswertung der immunhistologischen Scores fanden sich außer bei den Werten des Epithels und der Basalzellschicht mit mittleren Scorewerten vorwiegend niedrige Werte, allerdings mit einer sehr großen Streuung bezüglich des Epithels, der Basalzellschicht des Epithels und den Endothelzellen (Abb. 29).



**Abbildung 29: Scorewerte für TIMP-2 (Mittelwert und Standardabweichung).**

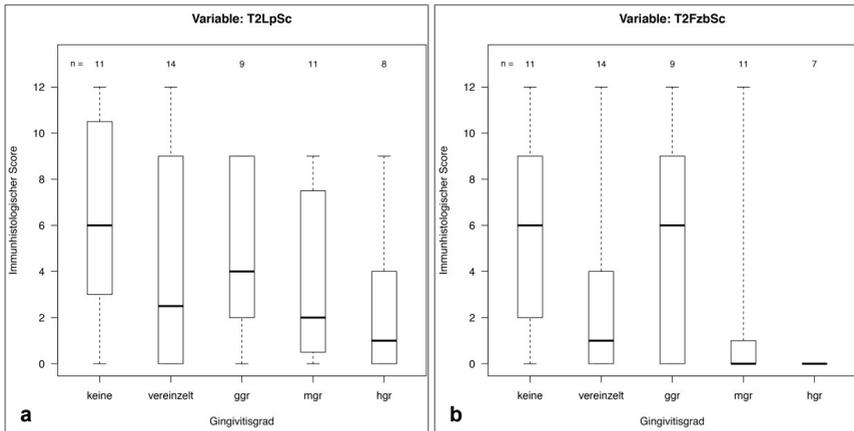
**Ep=Epithel, Bz=Basalzellschicht, Lp=Lamina propria gesamt, Fzb=Fibrozyten/-blasten, End=Endothel, Ent=Entzündungszellen, peri=perivaskuläre Infiltrate, Mast=Mastzellen.**

Die dreifaktorielle Varianzanalyse ergab bezüglich des Wechselwirkungsterms der Scores von TIMP-2 und den Fibrozyten bzw. -blasten einen noch signifikanten p-Wert ( $p = 0,0428$ ) mit einem Effektschätzer von 0,102. Alle anderen Lokalisationen zeigten deutlich höhere p-Werte.

Die histologischen Gingivitisgruppen zeigten für die Lamina propria ( $p = 0,042$ ) sowie Fibrozyten/-blasten ( $p = 0,042$ ) signifikante Zusammenhänge (siehe Tabelle 20, Kapitel 9.8 im Anhang). Da die Scorewerte der Lamina propria monoton waren, wurde der Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient zugrunde gelegt. Da die Zusammenhänge des Fibrozyten/-blastenscores nicht monoton waren, wurde hier der Kruskal-Wallis-Test zugrunde gelegt. Diese Zusammenhänge wurden durch die entsprechenden Box-and-Whisker-Plots verdeutlicht (Abb.30a und b). Insgesamt lassen sich sowohl in der gesamten Lamina propria

## 4 ERGEBNISSE

als auch bei den Fibrozyten- und blasten bei einem höheren Grad der Gingivitis niedrigere Scorewerte der Mediane vermerken. Die Streuung ist jedoch bis auf die Scores der Fibrozyten und –blasten bei den mittel- und hochgradigen Gingivitiden sehr groß.



**Abbildung 30a und b: Box-and-Whisker-Plots der Scores für TIMP-2 aufgetragen auf die histologisch ermittelten Gingivitisgrade (ggr = geringgradig, mgr = mittelgradig, hgr = hochgradig; T2LpSc = Lamina propria gesamt Score für TIMP-2, T2FzbSc = Fibrozyten-/blastenscore für TIMP-2).**

### 4.3 Fotodokumentation der Befunde

#### 4.3.1 Histologische Befunde

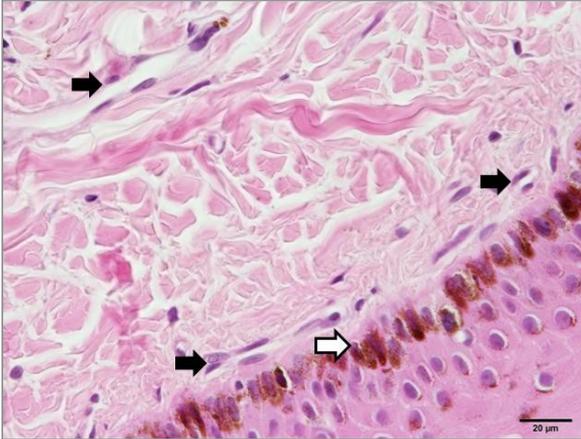


Abbildung 31: Ausschnitt aus einer histologisch als gesund klassifizierten Gingiva, Vergrößerung 40fach, Messbalken 20µm. Schwarze Pfeile: Gefäßendothelien, weißer Pfeil: Melanin in der Basalzellschicht des Epithels.

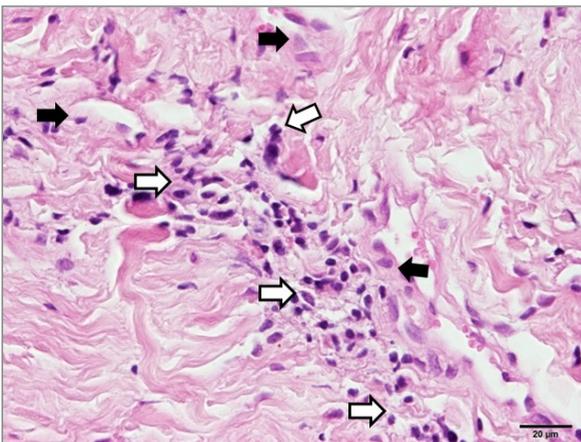
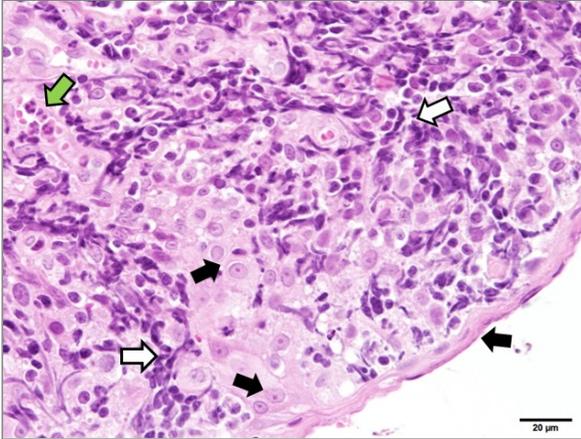
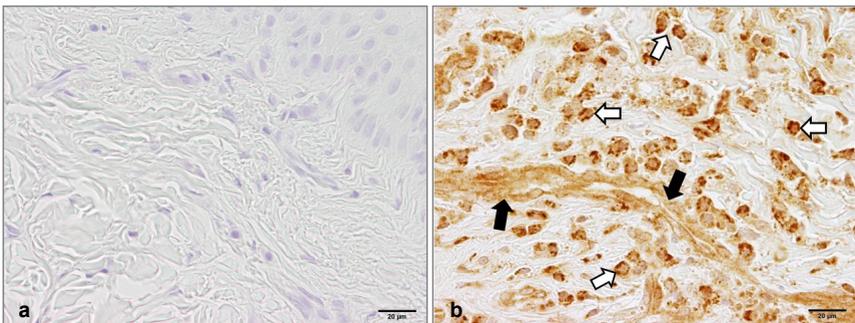


Abbildung 32: Ausschnitt aus einem histologisch als mittelgradige Gingivitis klassifizierten Präparat, Vergrößerung 40fach, Messbalken 20µm. Schwarze Pfeile: Gefäßendothelien, weiße Pfeile: perivaskuläre Entzündungszellaggregate aus Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten.

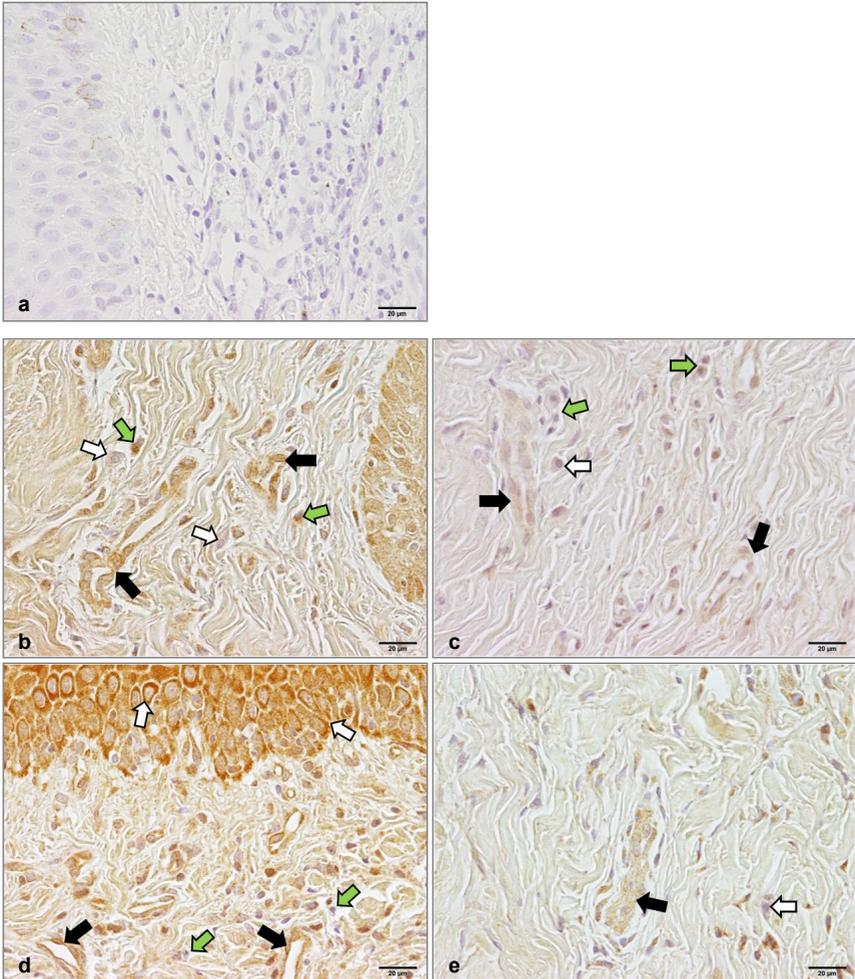


**Abbildung 33:** Ausschnitt aus einem histologisch als hochgradige Gingivitis klassifizierten Präparat, Vergrößerung 40fach, Messbalken 20µm. Schwarze Pfeile: Epithelzellen, weiße Pfeile: Entzündungszellaggregate vorwiegend aus Lymphozyten bestehend, grüner Pfeil: Aggregat neutrophiler Granulozyten.

#### 4.3.3 Immunhistologische Befunde der Gingiva



**Abbildung 34a und b:** Gingiva, Vergrößerung 40fach  
a) Negativkontrolle für MMP-2 mit Balb/cJ-Maus Aszites, keine immunhistochemische Reaktion b) MMP-2 (1:200) in hochgradig entzündeter Gingiva, Entzündungszellen grob granuliert mit starker Färbeintensität (weiße Pfeile), Endothelzellen deutlich positiv markiert (schwarze Pfeile).



**Abbildung 35a-e: Gingiva, Vergrößerung 40fach, schwarze Pfeile: Endothelzellen, grüne Pfeile: Entzündungszellen, weiße Pfeile in b,c,e: Mastzellen, weiße Pfeile in d: Epithelzellen a) Exemplarische Negativkontrolle mit Kaninchennormalserum, da alle Antikörper in gleicher Verdünnungsstufe verwendet wurden b) MMP-1 in geringgradig entzündeter Gingiva c) MMP-8 in geringgradig entzündeter Gingiva d) TIMP-1 in mittelgradig entzündeter Gingiva e) TIMP-2 in mittelgradig entzündeter Gingiva**

## 5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Vorhandensein von Matrix-Metalloproteinasen und ihrer Gewebehinhibitoren in feliner Gingiva mittels Immunhistochemie nachzuweisen. Weiterhin sollte ein möglicher Zusammenhang mit dem Schweregrad der Erkrankung und der Auf- bzw. Herunterregulierung bestimmter MMPs und TIMPs an Gingiva von Katzen, die an resorptiven Läsionen leiden, festgestellt werden. Die Ergebnisse dienen als Grundlage für weitere Untersuchungen.

### 5.1 Methodik der Untersuchung

#### 5.1.1 Studiendesign, Patientengut

Da in der vorliegenden Arbeit eine prospektive Studie am Patientengut einer universitären Kleintierklinik durchgeführt worden ist, stellt sich in der untersuchten Katzenpopulation eine gewisse Heterogenität hinsichtlich des Geschlechts und des Alters ein. Diese Gruppenzusammensetzung stellt jedoch aufgrund der praxisnahen Verteilung einen Vorteil dar. Die Gruppengröße ist, mit Ausnahme der an Parodontitis erkrankten Tiere (Gruppe vier), annähernd gleich groß und somit vergleichbar. Die Größe der Gruppen eins bis drei, welche vorher mit statistischen Verfahren ermittelt worden ist, ist mit 15-20 Tieren ausreichend zur Beantwortung der Fragestellung. Die annähernd gleiche Gruppengröße der RL-Typ 1 Tiere (n = 15) und der RL-Typ 2 Tiere (n = 16) stimmt mit den Angaben von DUPONT und DEBOWES (2002) überein. In der Studie von GIRARD und Mitarbeitern (2008) finden sich zu 60% an Typ 2 erkrankte Tiere. Innerhalb der eigenen, gesunden Kontrollgruppe zeigt das Alter der untersuchten Tiere zwar ein niedrigeres Mittel als das der Vergleichsgruppen, jedoch befindet sich in dieser Gruppe sowohl das älteste als auch das jüngste untersuchte Tier, so dass eine Verteilung über alle Altersklassen gegeben ist. Die Gruppen der an RL erkrankten Tiere zeigen ein höheres mittleres Alter, was sich mit den Ergebnissen in der Literatur deckt (VAN WESSUM et al., 1992; INGHAM et al., 2001; PETTERSSON und MANNERFELT, 2003).

Limitationen werden durch die Ein- bzw. Ausschlusskriterien vorgegeben, da vorbehandelte Tiere ausgeschlossen wurden. Hierdurch können keine Tiere mit chronischer und nur wenige Tiere mit akuter Schmerzsymptomatik untersucht werden, da diese zumeist unter Schmerztherapie, Antibiose oder Behandlung mit Glukokortikoiden stehen und eine Beeinflussung der MMP-Expression durch diese Substanzen möglich ist (SADOWSKI und STEINMEYER, 2001; LEE et al., 2004; ASANO et al., 2006; CURY et al., 2007). Bei einer entsprechenden Änderung dieser Kriterien wäre es also möglich, auch Tiere mit wesentlich

schwerwiegenderen Erkrankungszuständen untersuchen zu können. Es wird ein einheitliches Narkosemanagement verfolgt, um Einflüsse der Narkotika auf die MMP und TIMP-Expression zu vermeiden. Unter anderem wird auf den Einsatz von Propofol verzichtet, da nach Gabe dieses Medikamentes eine rasche Herunterregulierung von MMPs nachweisbar ist (JUN et al., 2011; LI et al., 2012). Die Gabe eines NSAIDs erfolgt nach der Probenentnahme, so dass zunächst mit der Prämedikation ein Opioid als analgetische Komponente verabreicht wird, da NSAIDs nachweislich MMP-Inhibitoren, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, darstellen (BUDUNELI et al., 2002; DE GRAUW et al., 2009).

Die Einteilung in die klinischen Gruppen erfolgt anhand der Kriterien des American Veterinary Dental College für RL Typ 1 und Typ 2 (BELLOWS et al., 2005). Auf eine Unterscheidung in Typ 3 wird bewusst verzichtet, so dass diese Patienten in die Gruppe der RL Typ 1 Tiere eingeteilt werden. Dies beruht auf dem Untersuchungsmaterial, da davon ausgegangen wird, dass Typ 3 als Mischtyp auch eine Gingivitis mit gegebenenfalls begleitender Parodontitis beinhaltet. Eine Einteilung in externe entzündliche und Ersatzresorptionen, wie die von der Arbeitsgruppe um FARCAS (2014) verwendete, wird aufgrund der zu Beginn der Untersuchung und auch zum jetzigen Zeitpunkt gültigen Einteilung des American Veterinary Dental College (AVDC) nicht verwendet. Die Gruppeneinteilung zur weiteren Untersuchung erfolgt nach Typen und nicht nach Klassen wie in der Arbeit von SENN et al. (2010), da als Untersuchungsmaterial das Zahnfleisch, nicht jedoch die Zahnhartsubstanz dient. Eine Einteilung in Klassen ist bei einer Untersuchung der Zahnhartsubstanz bzw. des Zahnhalteapparates vorzunehmen. Nicht alle Läsionen lassen sich mit Hilfe der üblichen Untersuchungsmethoden (Röntgen, klinische Untersuchung) detektieren, wie eine elektronenmikroskopische Untersuchung an 138 klinisch und radiologisch unauffälligen Katzenzähnen zeigt. Es wird bei 53% der untersuchten Zähne mindestens eine Läsion gefunden, außerdem zeigt das Wurzelkollimum, im Gegensatz zur Schmelz-Zement-Grenze, Anzeichen einer Reparatur der Zahnhartsubstanz (DELAURIER et al., 2009). Die Diagnosestellung der eigenen Untersuchung erfolgt, da das Patientengut einer Kleintierklinik verwendet wird, mittels klinischer und radiologischer Diagnostik. Bei der radiologischen Untersuchung bestehen Möglichkeiten der Optimierung, da durch die zum Untersuchungszeitpunkt gegebenen technischen Möglichkeiten keine dentale Röntgeneinheit eingesetzt werden konnte. Aufgrund der möglichen Überlagerungen der extraoralen Technik und der geringeren Bildauflösung könnte das frühe Stadium (Klasse 1) der Erkrankung übersehen werden, so dass vermeintlich gesunde Tiere eigentlich an RL erkrankt sein könnten (VERSTRAETE et al., 1998; LEMMONS, 2013). Allerdings wird in der Arbeitsgruppe von VERSTRAETE (1998) für die Oberkieferseitenzähne der Katzen ebenfalls die extraorale Technik, ähnlich der in

dieser Arbeit angewandten, verwendet. Als Grund hierfür wird die einfachere Durchführung bei ähnlichem diagnostischen Wert angegeben.

### **5.1.2 Probenbearbeitung**

Die verwendeten Färbetechniken (HE und Toluidinblau) stellen standardisierte Methoden des Labors dar. Ebenso ist die immunhistochemische Bearbeitung und Sichtbarmachung eine etablierte Methode. Allerdings müssen hierfür Testreihen und Antikörpertitrations zur Ermittlung der Positivkontrollgewebe und geeigneten Verdünnung der Antikörper durchgeführt werden, da es bezüglich MMPs auf feinem Gewebe bisher zwar einige Untersuchungen, jedoch kaum standardisierte Zelllinien oder hinreichend untersuchte Gewebearten gibt. Die Arbeitsgruppe um MANDARA (2009) verwendet feline Osteosarkome als Positivkontrolle für MMP-2 und -9. In den eigenen Vorversuchen zeigten jedoch feline Adenokarzinome der Mamma deutlichere positive Markierungen für die genannten Antikörper. MMP-2 und -9 werden von AKKOC und Mitarbeitern (2012) an feinen Mammatumoren untersucht. Die Arbeitsgruppe weist diffuse zytoplasmatische Markierungen neoplastisch veränderter Mammaepithelzellen, stromaler Fibroblasten und Entzündungszellen nach. In der eigenen Untersuchung stellte sich für die entsprechenden Zellen ein ähnliches Bild dar, wobei auch Gefäßendothelzellen des veränderten Gewebes eine deutliche zytoplasmatische Reaktion zeigten. SÖRENSEN et al. (2004a) vergleichen verschiedene tumoröse mit unveränderten Gewebeproben von Katzen und finden im tumorösen Gewebe eine Aufregulierung mehrerer MMPs und TIMPs, darunter auch MMP-1, -2, -3 sowie TIMP-1 und -2. In der vorliegenden Arbeit zeigte das feline Osteosarkom in den Vorversuchen eine deutlichere zytoplasmatische Markierung für TIMP-1 als das Adenokarzinom. Für MMP-1, -2 und TIMP-2 zeigt das feline Adenokarzinom deutlich positive Reaktionen. Studien bezüglich MMP-8 an feinem Gewebe liegen zum Beginn der Untersuchungen und bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht vor, so dass hier analog zu Untersuchungen an humanen Mammatumoren feline Adenokarzinome der Mamma verwendet wurden (KOEHRMANN et al., 2009).

Ebenfalls wird in den genannten Voruntersuchungen die Pufferkonzentration der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) ermittelt, um Fehlreaktionen der Mastzellen auszuschließen. In allen Negativkontrollen zeigen sich die Mastzellen, genau wie die anderen Zellarten, negativ, so dass eine Pufferkonzentration mit einem pH-Wert von 7,0-7,2 verwendet wird. Dies steht im Gegensatz zur Studie von HARLEY und Mitarbeitern (2002), in der bei einem Puffer-pH von 7,4 eine deutliche Fehlreaktion feiner Mastzellen auftritt, so dass diese Arbeitsgruppe einen Puffer-pH von 6,0 einsetzt.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper sind humane Antikörper aus Kaninchen, so dass hier entsprechende Unterschiede der Proteinstruktur zu falsch negativen

Ergebnissen führen könnten (SENN et al., 2010). Ursprünglich war die Untersuchung weiterer Antikörper (MMP-3, MMP-9) geplant, welche während der Vorversuche keine zuverlässigen Ergebnisse erbrachten.

### **5.1.3 Histologische und immunhistologische Auswertung**

In der histologischen Auswertung wird zunächst nach allgemein anerkannten Kriterien in drei Entzündungsgrade abhängig vom Zellgehalt unterschieden (ARZI et al., 2010). Aufgrund des vorliegenden Zellbildes wird ein weiterer Grad, nämlich vereinzelte Entzündungszellen, aufgenommen. Diese Präparate zeigen zwar keine von Entzündungszellen freie Gingiva, jedoch auch keine weiteren Anzeichen für eine generalisierte Entzündungsreaktion oder Aggregate von Entzündungszellen.

Das immunhistologische Scoring-System wird anhand bereits durchgeführter Studien übernommen (SINICROPE et al., 1995; PALTIAN, 2006). Die zu untersuchenden Gewebeschichten und Zellarten werden durch Aufbau und Bestandteile der Gingiva festgelegt. Ursprünglich sollte, wenn vorhanden, der Alveolarknochenbereich mit untersucht werden, allerdings finden sich in nur sehr wenigen Präparaten Knochenanteile, so dass diese nicht statistisch ausgewertet werden.

Die Methode selbst stellt ein semiquantitatives Verfahren dar, so dass keine exakte Angabe der Menge exprimierter MMPs oder ihrer Inhibitoren gemacht werden kann. Der Vorteil liegt jedoch darin, dass die MMP-Expression bestimmten Zellarten zugeordnet werden kann. Dies wird auch in einer Studie von NAKAICHI und Mitarbeitern (2007) diskutiert, da hier aufgrund der Homogenisierung des Gewebes für die Zymographie und mRNA-Analyse keine Zuordnung zur Zellherkunft von MMP-2 gemacht werden kann, so dass immunhistochemische Untersuchungen letztlich ebenso notwendig sind. Als Alternative zum semiquantitativen Scoring-System gilt die computerassistierte Auswertung, welche ähnliche Ergebnisse zeigt, jedoch Vorteile aufgrund ihrer technischen Objektivität besitzt (MATOS et al., 2006).

In der immunhistologischen Untersuchung sollten ursprünglich 3 Gesichtsfelder der 40fachen Vergrößerung je Präparat und Gewebeschicht untersucht und gemittelt werden. Aufgrund der geringen Probengröße ist dies jedoch zumeist nicht möglich, so dass lediglich zwei zufällig ausgewählte Gesichtsfelder pro Präparat, das Epithel und die Lamina propria, bewertet werden. Die Limitierung der Probengröße ergibt sich zum einen aus der Größe der Biopsiestanze, zum anderen aus der Schichtdicke der felines Gingiva. Bei den Untersuchungen von ARZI et al. (2011) werden Proben mit einer 6mm Biopsiestanze entnommen, so dass deutlich größere Proben vorliegen. Allerdings werden Katzen aus spezifisch-pathogenfreier Tierhaltung (SPF) verwendet, welche aus anderen Gründen getötet werden, so dass die Probengröße aufgrund des späteren Heilungsverlaufes kein

Problem darstellt. Auch in der Untersuchung von HARLEY et al. (2003) werden Schleimhaut-Proben aus der oralen Mukosa toter Tiere entnommen.

## 5.2 Ergebnisse

### 5.2.1 *Klinische und pathohistologische Befunde/Verteilung der Patienten*

Die klinisch und histologisch ermittelten Gingivitisgrade zeigen eine statistisch signifikante Korrelation, so dass hier eine gute Übereinstimmung der einzelnen Untersuchungsmethoden vorliegt. In den Tortendiagrammen wird außerdem die Verteilung der Patienten deutlich. Es finden sich vor allem keine bis wenige Entzündungszellen im HE-Präparat oder klinisch niedrige Entzündungsgrade, wohingegen die mittleren bis hochgradigen Gingivitiden gemeinsam lediglich ein Drittel des Gesamtpatientengutes darstellen. Insgesamt liegen also, ähnlich den Ergebnissen von ARZI et al. (2010), relativ geringe Entzündungsgrade auch bei RL-Tieren vor. Sicherlich interessant wären Untersuchungen an stärker entzündlich verändertem Gewebe, wie z.B. in den Studien an Patienten mit hochgradiger Gingivitis, Stomatitis oder auch Parodontitis und die Verteilung unterschiedlicher Entzündungszellen (HARLEY et al., 2011).

Da einige der Präparate zwar wenige Entzündungszellen, sonst jedoch keine Entzündungsanzeichen aufweisen, ist die Gruppe der vereinzelt Entzündungszellen hinzugefügt worden. Im Laufe der immunhistologischen Untersuchungen finden sich jedoch in manchen der Präparate, die im HE-Schnitt frei von Entzündungszellen sind, einzelne, positiv markierte Lymphozyten. Daraus ergibt sich zum Beispiel in den Untersuchungen von MMP-1 und MMP-2 ein immunhistologischer Scorewert für diese Zellen, die eigentlich nicht vorhanden sein sollten und in den HE-Schnitten nicht zu detektieren sind. Bisher existieren wenige Untersuchungen zu physiologischer feline Gingiva. Hier ist die Arbeitsgruppe um ARZI (2011) hervorzuheben, welche an 4 mundhöhlengesunden SPF-Katzen verschiedene Gewebe der oralen Kavität untersucht und in zahnnahe Gingiva solitäre T-Zellen durch spezifische immunhistochemische Markierungen nachweist. Es ist denkbar, dass diese Zellen physiologisch als Wächter-Zellen vorhanden sind (CUTLER und JOTWANI, 2006). So lässt sich in murinen T-Helfer-Zellen Typ 1 (Th1) ein deutlich höherer basaler Gehalt an MMP-2 und -9 mRNA sowie MMP-2 Protein nachweisen als in T-Helfer-Zellen Typ 2 (Th2) (OVIEDO-ORTA et al., 2007). Die Arbeitsgruppe um ABRAHAM (2005) weist ebenfalls eine vermehrte Sekretion von MMP-2 und -9 in humanen Th1 im Vergleich zu Th2 nach. Sie stellt dementsprechend die Hypothese auf, dass immunmedierte Erkrankungen, bei denen die Th1-Immunantwort eine größere Rolle als die Th2-Antwort spielt, auch abhängig von den Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 sein könnten. Da die Th1-Zellen sowohl beim Menschen

als auch bei der Maus in gesundem Gewebe vorhanden sind, wird in der eigenen Untersuchung keine rückwirkende Umklassifizierung der Patienten von der gesunden in die geringgradige Gingivitisstufe vorgenommen.

### **5.2.2 Immunhistochemische Untersuchungen**

Da es sich bei der vorliegenden Arbeit um die erste Untersuchung von Matrix-Metalloproteinasen und ihrer Gewebehinhibitoren in feliner Gingiva handelt, beziehen sich die Literaturangaben und Vergleiche auf dementsprechende Untersuchungen bei Menschen oder anderen Säugetierarten, vornehmlich Nagetieren.

Hinsichtlich des generellen Vorhandenseins der untersuchten MMPs und TIMPs ergeben sich Verteilungsmuster in der felinen Gingiva. Mit Hilfe des Wald-Tests werden global statistisch signifikante Zusammenhänge der Enzyme, der Gewebeschichten bzw. Zellarten und der nach klinischen Kriterien eingeteilten Gruppen (Gesunde, RL-Typ 1 und RL-Typ 2) detektiert. Durch die dreifaktorielle Varianzanalyse werden signifikante Zusammenhänge der Verteilung einzelner Enzyme in bestimmten Zellarten oder Gewebeschichten erkannt. Insgesamt finden sich in der dreifaktoriellen Varianzanalyse einige signifikante Werte und diese vornehmlich für Mastzellen und Fibrozyten, so dass auf diese im Folgenden zusammengefasst näher eingegangen wird.

Für die Mastzellen ist über alle klinischen Gruppen und Enzyme eine statistische Signifikanz zu vermerken. Die einzelnen Antikörper zeigen eine unterschiedliche Expression in den Mastzellen, die Matrix-Metalloproteinasen besitzen im Gegensatz zu ihren Inhibitoren signifikante Werte für diese Zellen, mit einem negativen Zusammenhang. Dieser negative Zusammenhang weist auf eine deutlich geringere Expression der MMPs in Mastzellen im Vergleich zur Expression des jeweiligen Enzyms in den anderen Zellen hin. Insgesamt auffällig sind die sehr niedrigen Scorewerte aller MMPs und TIMP-2 für die Mastzellen, welche im Gegensatz zu TIMP-1 mit einem mittleren immunhistologischen Score für diese Zellen stehen. Diese Ergebnisse widersprechen zum Teil einer Untersuchung an humaner Gingiva, welche mit einer Doppel-Immunfluoreszenzmethode sowohl Mastzelltryptase als auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten MMPs und TIMPs in Mastzellen und extrazellulär nachweist (NÆSSE et al., 2003). Die Patientengruppen bestehen aus jeweils HIV-positiven und HIV-negativen Menschen mit oder ohne chronische marginale Parodontitis, die Proben werden wie in der eigenen Untersuchung aus der zahnnahe Gingiva entnommen. Es zeigen sich in allen Präparaten positiv markierte Mastzellen für die untersuchten Antikörper, wobei die gesunden Kontrollgruppen geringere Reaktionen zeigen. Im Gegensatz zur eigenen Untersuchung finden sich vor allem für MMP-1 und -8 auch in gesunder Gingiva bis zu 60 % positive Reaktionen, aber auch für MMP-2 mit bis zu 31 %.

TIMP-1 exprimierende Mastzellen werden in nahezu allen Gruppen und Präparaten nachgewiesen. Auffällig ist, dass in der eigenen Untersuchung dieses Enzym das einzige mit deutlich nachweisbarer Expression in den Mastzellen ist. Für TIMP-2 stellen NÆSSE und Mitarbeiter (2003) nur eine sehr geringe Expression in der Gruppe der gesunden Patienten mit 8-13 % fest, in der eigenen Studie ist der immunhistologische Score für Mastzellen ebenfalls sehr niedrig. Allerdings sind die Nachweismethoden nicht vollständig vergleichbar. Zum einen generell durch die Technik der doppelten Immunfluoreszenz, vor allem aber durch die Vorbehandlung der humanen Präparate mit Proteinase K. Dieses Enzym wird insbesondere zur Darstellung von Zytokeratinen angewandt, aber auch für andere Antigene, um diese für die folgende immunhistochemische Behandlung zu demaskieren (RAMOS-VARA und BEISSENHERZ, 2000). Da die eigenen Ergebnisse bezüglich der Gewebehinhibitoren der MMPs in etwa mit der o.g. Arbeit übereinstimmen, sich jedoch im Gehalt der MMPs widersprechen, kann nun vermutet werden, dass eine Vorbehandlung der Präparate ein anderes Ergebnis hätte erbringen können. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass feline Mastzellen grundsätzlich einen anderen Enzymgehalt besitzen als die bisher bezüglich ihrer MMP-Expression und Sekretion untersuchten humanen und murinen Mastzellen. In der durchgeführten Untersuchung soll zunächst ein genereller Überblick über die Matrix-Metalloproteinasen und ihre Gewebehinhibitoren in feline Gingiva hergestellt werden, so dass spezielle Untersuchungstechniken für einzelne Zellarten im Hintergrund stehen. Für weitere Untersuchungen muss dies unbedingt beachtet werden, da Mastzellen in neueren Untersuchungen als mitverantwortlich für die Entstehung von humaner Parodontitis gelten, da sie gehäuft und auch degranuliert in Gingivaproben von Patienten mit fortgeschrittener Parodontitis nachzuweisen sind (HUANG et al., 2013). Einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Mastzellen und der Entstehung der resorptiven Läsionen der Katze vermutet auch die o.g. Arbeitsgruppe um ARZI (2010). Dass diese Zellen durch ihre Proteinase Trypsinase und Chymase in der Lage sind, sowohl pro-MMP-1 und pro-MMP-3 in ihre aktiven Formen zu überführen und auch andere MMPs zu aktivieren, ist bereits seit längerem bekannt (LEES et al., 1994; MAXOVA et al., 2010). Außerdem haben Versuche mit murinen Zellkulturen gezeigt, dass mit Immunglobulin E (IgE) stimulierte Mastzellen eine Ausschüttung von Tumornekrosefaktor (TNF) zeigen, welcher wiederum in der Lage ist, T-Zellen zu aktivieren und somit eine Kaskade der Immunantwort auszulösen (NAKAE et al., 2006). Möglicherweise sind die vorliegenden Ergebnisse hinweisend auf eine erfolgte Degranulation der Mastzellen, da für die untersuchten MMPs außer MMP-8 in der Lamina propria eine mittlere bis hohe Expression nachweisbar ist. Die abgegebenen Mastzellenenzyme könnten dann für eine Aktivierung der MMPs im Gewebe sorgen, welche dann möglicherweise die Entzündungsreaktion verstärken. Unterstützend kommt hinzu, dass die entsprechenden TIMPs in niedrigerem Ausmaß vorliegen.

Die Fibrozyten bzw. -blasten fallen durch signifikante Werte in der dreifaktoriellen Varianzanalyse auf. Im Einzelnen zeigen diese Zellen statistische Signifikanzen für alle Enzyme außer MMP-1. Eine Untersuchung an humanen Fibrozytenkulturen aus peripheren mononukleären CD14+ Zellen weist die Expression von MMP-2, -7, -8, und -9 auf Gen- und Proteinebene nach, nicht jedoch die Expression von MMP-1 (GARCÍA-DE-ALBA et al., 2010). Diese Ergebnisse decken sich nicht völlig mit dem hier erbrachten immunhistochemischen Nachweis, da zwar für MMP-2 hohe und für TIMP-1 mittlere immunhistologische Scores ermittelt werden können, für MMP-8 und TIMP-2 jedoch nur eine geringgradige bis keine Reaktion zu detektieren ist. MMP-1 zeigt im Gegensatz zur Untersuchung von GARCIA-DE-ALBA und Mitarbeitern (2010) sogar mittlere Scorewerte. Diese Unterschiede können sich aus den untersuchten Zellarten ergeben, da die oben genannte Arbeitsgruppe reine Fibrozytenzellkulturen untersucht, in der eigenen Untersuchung jedoch Fibrozyten und -blasten in einer Gruppe eingeordnet und immunhistochemisch im Gewebe bewertet werden. Auch DONG et al. (2009) weisen immunhistochemisch MMP-1 und -2 sowie deren extrazellulären Matrix-Metalloproteinasen Induktor (EMMPRIN) in Fibroblasten-ähnlichen Zellen in humaner Gingiva nach. In der vorliegenden Arbeit wird das Vorhandensein von EMMPRIN nicht untersucht. In Fibrozyten bzw. -blasten von gesunden Menschen sind geringgradige immunhistochemische Reaktionen auf MMP-8, ähnlich den eigenen Ergebnissen, und eine erhöhte Reaktion bei Menschen, die mit HIV infiziert sind, zu detektieren (MELLANEN et al., 2006). Gerade in der o.g. Arbeit von GARCIA-DE-ALBA und Mitarbeitern (2010) an Fibrozyten wird eine besonders hohe Expression von MMP-8 mRNA festgestellt, welche im Gegensatz zu den eigenen immunhistochemischen Ergebnissen steht. Insbesondere bei der Arbeit an Fibrozyten wurden Zellkulturen verwendet, so dass hier kein direkter Vergleich stattfinden kann (GARCÍA-DE-ALBA et al., 2010). In Bezug auf die immunhistochemischen Ergebnisse der Arbeitsgruppe um MELLANEN (2006), welche auch nur eine geringgradige Reaktion von MMP-8 detektieren, ist es möglich, dass aufgrund der hohen Antikörperspezifität des Kaninchen-anti-Mensch-Antikörpers das feline Antigen nicht vollständig erkannt wird oder aber nur eine geringgradige Reaktion vorhanden ist. Die eigene Positivkontrolle zeigt in Teilen des Gewebes keine immunhistochemische Reaktion. In den durchgeführten Vorversuchen und Titrationen zur Konzentrationsermittlung traten die beschriebenen Probleme für MMP-8 nicht auf. Die beiden untersuchten Gewebeinhibitoren der MMPs werden sowohl in der eigenen, als auch in anderen Untersuchungen von Fibroblasten exprimiert. So weisen OYARZÚN et al. (2010) TIMP-2 immunhistochemisch in humanen gingivalen Fibroblasten nach, CURY und Mitarbeiter (2007) detektieren eine basale Expression von mRNA für diverse MMPs sowie TIMP-1 und -2 in gingivalen Fibroblastenzellkulturen. Diese basale Expression lässt sich, außer im Fall von TIMP-2,

durch Hydrokortison zur Stresssimulation aufregulieren, so dass ein schnelleres Voranschreiten von Gingivitiden bei Stress durch Erhöhung der Aktivität der MMPs und TIMP-1 möglich ist.

Durch diese Ergebnisse kann eine mögliche erhöhte Produktion von Matrix-Metalloproteinasen vermutet werden. Es liegt aufgrund der deutlich höheren Werte von MMP-1 und MMP-2 im Vergleich zu TIMP-1 und -2 in Fibrozyten und –blasten nahe, dass eine Überproduktion der Matrix-Metalloproteinasen mit folgender Freisetzung zu einem Missverhältnis zwischen TIMPs und MMPs und infolgedessen nicht nur zu einem Gewebsumbau sondern auch zur Destruktion von intakter Gingiva führen könnte.

Interessanterweise scheinen in anderen Anteilen des Verdauungstraktes wie dem Darm Mastzellen und Fibroblasten eine Rolle durch gegenseitige Interaktion über Zytokine zu spielen: MONTIER und Mitarbeiter (2012) weisen in humanen intestinalen Fibroblastenkulturen einen Anstieg der Produktion von Interleukin-6 (IL-6) nach, indem diese direkt durch ko-kultivierte Mastzellen oder durch Mastzellmediatoren wie z.B. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Tryptase oder Histamin aktiviert werden. Da zum Beispiel TNF-  $\alpha$  an Bestandteile der EZM gebunden vorliegt, erfolgt dessen Aktivierung durch Proteolyse mit Hilfe von unter anderem MMP-1, -2 und -9 (GEARING et al., 1995). IL-6 dient wiederum der Unterdrückung der Mastzellapoptose, so dass Mastzellen sich durch ihre Zytokine vor einer frühzeitigen Apoptose schützen können. Weiterhin wird eine Aufregulierung von MMP-1 durch Mastzellmediatoren in Fibroblasten nachgewiesen. Diese MMP sorgt für einen Anstieg der Fibrolyse, also auch für eine Erhöhung der Apoptoserate dieser Fibroblastenkultur. Außerdem werden TIMP-1 und -2 sowie Kollagen nicht von den Mastzellen beeinflusst, so dass die Schlussfolgerung gezogen wird, dass Mastzellen eher für eine fibrolytische, also den Umbau des Gewebes fördernde, Reaktion zuständig sind (MONTIER et al., 2012). Im Folgenden ist, in Relation zu den Ergebnissen der eigenen Studie, denkbar, dass eine Dysregulierung dieser Interaktionen oder erhöhte Aktivität von Mastzellen zu einer übersteigerten Fibrolyse und somit einem Abbau gingivalen und auch parodontalen Gewebes führen könnte.

In der Auswertung der immunhistochemischen Reaktion für jeden Antikörper in Bezug auf die histologischen Gingivitisgruppen, welche eine signifikante Korrelation mit den klinisch ermittelten Gingivitisgraden aufweisen, zeigen sich einige signifikante Ergebnisse. Im Weiteren wird nach Enzym getrennt auf diese Ergebnisse eingegangen.

### 5.2.3 MMP-1

Besonders auffällig an den Ergebnissen des Vorhandenseins von MMP-1 in Bezug auf die histologischen Gingivitisgrade ist die Höhe der medianen Scorewerte der Gruppen. Außer den perivaskulären entzündlichen Infiltraten und den Mastzellen weisen alle anderen Lokalisationen die niedrigsten immunhistologischen Scores für die geringgradigen Gingivitiden auf. In gesunder Gingiva zeigt sich eine höhere basale MMP-1-Expression als in geringgradig entzündetem Gewebe. Die Patienten mit mittel- und hochgradigen Gingivitiden besitzen die höchsten immunhistologischen Scores an allen Lokalisationen und in allen Zellen außer den Mastzellen. Allerdings ist hier der Scorewert für die Fibrozyten und –blasten im Vergleich zu den anderen Lokalisationen deutlich niedriger, also die Expression von MMP-1 in diesen Zellen insgesamt geringer.

BORSANI und Mitarbeiter (2005) detektieren immunhistochemisch MMP-1, -3, -8, -13 und TIMP-1 sowie Kollagen I, III, IV und V in humaner Gingiva von Patienten mit Zahnimplantaten mit und ohne peri-Implantitis sowie in einer gesunden Kontrollgruppe. Sie können lediglich für MMP-13 und Kollagen V Veränderungen bei Implantatreaktionen nachweisen, die Reaktion von MMP-1, welche auch in der vorliegenden Arbeit untersucht wird, zeigt sich schwach und in der Lamina propria lokalisiert, nicht jedoch im Epithel.

Die bereits erwähnte Untersuchung von DONG et al. (2009) weist MMP-1, -2 und EMMPRIN nicht nur in Fibroblasten, sondern auch in Entzündungszellen und mit moderater Reaktion in Epithelzellen nach, weniger in der Lamina propria. Interessant hierbei ist, dass MMP-1 nicht in der Gingiva aller gesunder Patienten nachweisbar ist. In der eigenen Untersuchung ist MMP-1 regelmässig in allen Zellen, außer den Mastzellen, zu detektieren. Ähnlich der eigenen Arbeit finden DONG und Mitarbeiter eine Erhöhung der untersuchten Enzyme in entzündlich veränderter Gingiva, in dieser reagieren die Entzündungszellen auch deutlicher, ebenso wie in den eigenen Untersuchungen.

Es kann in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass MMP-1 in feliner Gingiva sowohl in gesunden als auch an Gingivitis erkrankten Patienten in unterschiedlichem Gehalt vorliegt. Es findet eine Aufregulierung dieses Enzyms bei steigendem Erkrankungsgrad statt. Der niedrigere Gehalt an MMP-1 in der felinen Gingiva bei geringgradigen entzündlichen Veränderungen könnte im Zusammenhang mit bestehenden Umbauprozessen vor der Entstehung der hochgradigen Entzündung stehen. Es lässt sich zum Beispiel beim Hund oder der Ratte durch Einwirkung physikalischer Kräfte wie einer kieferorthopädischen Apparatur eine Aufregulierung von MMP-1 durch Messung des mRNA-Gehaltes nachweisen. Einige Tage nach Entfernen der Kräfte zeigt sich ein Absinken des MMP-1 Gehaltes, so dass eine Beteiligung am Umbau des Zahnhalteapparates vermutet wird (DOMON et al., 1999; REDLICH et al., 2001). Ebenso ist die Beteiligung von MMP-1 am natürlichen Umbau des Zahnhalteapparates der hypsodonten, also nachschiebenden, Zähne des Pferdes durch

immunhistochemischen Nachweis von MMP-1 in einzelnen, nicht jedoch allen, kollagenen Faserbündeln des Zahnhalteapparates nachgewiesen (WARHONOWICZ et al., 2006). Die eigenen Ergebnisse zeigen eine deutlich erhöhte Präsenz von MMP-1 in entzündlich veränderter Gingiva auf. Diese kann durch eine Aufregulierung dieser Kollagenase oder aber durch eine ungenügende Aktivität ihrer Inhibitoren entstehen. Daraus resultiert letztlich nicht nur der Um- sondern auch der Abbau des gingivalen und in letzter Konsequenz auch parodontalen Gewebes.

### **5.2.4 MMP-2**

In der Auswertung der histologischen Gingivitisgruppen in Bezug auf das Vorhandensein von MMP-2 in feliner Gingiva haben sich für die Lamina propria, die Entzündungszellen und die perivaskulären entzündlichen Infiltrate signifikante Unterschiede ergeben. Dieses Enzym zeigt eine deutlich erhöhte Expression in den Gruppen mit mittel- und hochgradiger Gingivitis. Die Entzündungszellen weisen für die gesunden und geringgradig entzündeten Patienten eine geringgradige Expression auf, so dass hier von einer Aufregulierung von MMP-2 in den Entzündungszellen entsprechend der gingivalen Veränderungen ausgegangen werden kann. Ebenso liegt eine deutlichere Reaktion in der gesamten Lamina propria vor. Die bereits zitierte Studie von DONG et al. (2009) zeigt ähnliche Ergebnisse, MMP-2 wird in den Epithelzellen regelmässig exprimiert, mit einem schwachen Signal in der Basalzellschicht des Epithels und der Lamina propria, aber auch in Fibroblasten und Entzündungszellen. Die Entzündungszellen in entzündlich veränderter Gingiva zeigen eine deutlich stärkere immunhistochemische Reaktion für MMP-2 als in unverändertem Gewebe, ebenso wie in der eigenen Untersuchung.

TERVAHARTIALA und Mitarbeiter (2000) können mit Hilfe der *in-situ*-Hybridisierung MMP-2 im Sulkusepithel sowohl von gesunden als auch parodontal erkrankten Individuen nachweisen, hier findet sich eine deutlich geringere Signalintensität für die gesunden Individuen. Auch dies entspricht den Ergebnissen der eigenen Untersuchung, da MMP-2 eine deutliche Aufregulierung bei stärkerem Entzündungsgrad zeigt. Auch bei parodontal erkrankten Hunden lässt sich immunhistochemisch mit steigendem histologischen Gingivitisgrad eine Aufregulierung von MMP-2 in Entzündungszellen und der Lamina propria nachweisen (KAISER, 2014).

Eine Untersuchung von GONÇALVES et al. (2008) weist MMP-2-mRNA an Gingiva gesunder, an Gingivitis sowie chronischer und aggressiver Parodontitis leidender Menschen nach. Mittels Western-blotting, RT-PCR und Zymographie wird zwar ein erhöhter Gehalt von MMP-2 in Gingivitisgewebe im Vergleich zum Gesunden nachgewiesen, jedoch ohne statistische Signifikanz. Bei den Proben parodontal erkrankter Individuen wird sogar weniger

MMP-2 mRNA nachgewiesen (GONÇALVES et al., 2008). Die Ergebnisse bezüglich der Gingivitisgruppe im Vergleich zur gesunden Gruppe ähneln den eigenen, es werden jedoch andere Methoden verwendet. Bezüglich der Parodontalerkrankung lässt sich aufgrund der Einteilung der eigenen Patienten nach histologischem Gingivitisgrad keine Aussage treffen. MMP-2 verhält sich bei steigendem Entzündungsgrad also ähnlich MMP-1, nur dass hier kein basal höherer Wert vorliegt. Die steigenden Scorewerte bei mittel-hochgradiger Gingivitis weisen ebenfalls auf eine Aufregulierung und gegebenenfalls Fehlfunktion der Hemmung von MMP-2 hin. Da auch dieses Enzym vorwiegend kollagenolytische Aktivität zeigt, ist ein Abbau der Gingiva und auch des Zahnhalteapparates denkbar.

### **5.2.5 MMP-8**

Die Untersuchung an MMP-8 zeigt im Vergleich der Gingivitisgruppen keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Insgesamt ist die Signalintensität und Anzahl der immunhistologisch markierten Zellen gering, die ermittelten Scorewerte befinden sich im niedrigen bis sehr niedrigen Bereich. In diversen Untersuchungen an humaner Gingiva zeigen sich häufig sehr schwache Signale für MMP-8 (TERVAHARTIALA et al., 2000; BORSANI et al., 2005; MELLANEN et al., 2006). So finden sich in immunhistochemischen Untersuchungen zum Teil nur schwache und in der Lamina propria sichtbare Signale, ebenfalls ohne Unterschiede der erkrankten zur gesunden Gruppe (BORSANI et al., 2005). Die Arbeitsgruppe um TERVAHARTIALA findet in der Gingiva einer gesunden Kontrollgruppe nur zufällige, für MMP-8 positive, Signale. In der Gruppe der parodontal Erkrankten können sie MMP-8 in neutrophilen Granulozyten, in Sulkusepithelzellen und in der subepithelialen Basalmembran immunhistologisch nachweisen. KAISER (2014) weist eine verstärkte Expression von MMP-8 in Entzündungszellen im Zusammenhang mit entzündlichen Veränderungen der Gingiva nach.

In der eigenen Untersuchung finden sich vornehmlich im Epithel inklusive der Basalzellschicht positive Reaktionen, im Gegensatz zu den o.g. Untersuchungen kaum Reaktionen der Entzündungszellen. Dies kann darin begründet sein, dass die Hauptzusammensetzung der Entzündungszellen in den eigenen Präparaten weniger aus neutrophilen Granulozyten und mehr aus Lymphozyten sowie Plasmazellen besteht. Dennoch sollte MMP-8 auch in Plasmazellen, wie in der Untersuchung von KIILLI et al. (2002) gezeigt wird, immunhistochemisch nachweisbar sein. Es ist möglich, dass aufgrund der sehr hohen Antikörperspezifität von MMP-8 zu humanem MMP-8-Antigen keine korrekte Reaktion auf feliner Gingiva stattgefunden haben könnte. Da bis dato keine weiteren Untersuchungen von MMP-8 auf felinem Gewebe existieren, kann hier leider keine Untersuchung zum Vergleich herangezogen werden. Die eigenen Voruntersuchungen an felinem, tumorös

verändertem Gewebe zeigen deutlich positive Reaktionen in Adenokarzinomen. In der eigenen Untersuchung weist das Positivkontrollgewebe einzelne Lokalisationen ohne immunhistochemische Reaktionen auf, das restliche Gewebe zeigt jedoch eine gleichmäßige Reaktion. Grundsätzlich ist eine, wie in den o.g. humanmedizinischen Untersuchungen auch, geringgradige Produktion von MMP-8 in den untersuchten Zellarten und Gewebeschichten ohne Beteiligung an den Entzündungsreaktionen in der Gingiva möglich.

### **5.2.6 TIMP-1**

Ähnlich den Ergebnissen von MMP-8 zeigt TIMP-1 keine statistisch signifikanten Ergebnisse bezüglich der histologisch ermittelten Gingivitisgrade. Insgesamt sind die immunhistologischen Scorewerte für TIMP-1 deutlich höher als für MMP-8, das Epithel inklusive der Basalzellschicht zeigt sehr hohe Scorewerte. Die niedrigsten Werte finden sich gesamt für die Entzündungszellen und perivaskulären entzündlichen Infiltrate. Diese Verteilung findet sich, wie auch bereits für MMP-1, nicht in der Untersuchung von BORSANI und Mitarbeitern (2005) wieder. Diese Arbeitsgruppe findet nur gering ausgeprägte Reaktionen in der Lamina propria, nicht jedoch im Epithel. Allerdings werden auch hier, wie in der eigenen Untersuchung, keine Unterschiede zwischen einzelnen Untersuchungsgruppen (gesund/gesund mit Implantat/peri-Implantitis) erkannt.

Weitere Untersuchungen an gingivaler Sulkusflüssigkeit parodontal erkrankter Individuen im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe durch MARCACCINI et al. (2010) zeigen höhere Level von MMP-8, TIMP-2 und Myeloperoxidase in dieser Sulkusflüssigkeit. TIMP-1 weist keinerlei Unterschiede im Vergleich der Sulkusflüssigkeit der gesunden mit der erkrankten Gruppe auf. Die Untersuchungen werden mit Hilfe eines ELISA (enzyme linked immunoabsorbent assay) durchgeführt, da es sich hier um in einer Flüssigkeit zirkulierende Enzyme und nicht um im Gewebe vorhandene Enzyme wie in der eigenen Untersuchung handelt. Dennoch ist zu vermerken, dass TIMP-1 in der eigenen Untersuchung ebenso wie in der Untersuchung der Arbeitsgruppe um MARCACCINI (2010) keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich des Entzündungsgrades aufweist. Eine immunhistologische Untersuchung an caniner Gingiva kann ebenfalls keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen der Expression von TIMP-1 mit dem Grad der Parodontalerkrankung oder dem histologischen Gingivitisgrad ermitteln (KAISER, 2014). In Bezug auf die eigenen Ergebnisse kann schlussgefolgert werden, dass die TIMP-1 Expression nicht durch die entzündlichen Veränderungen der Gingiva beeinflusst wird beziehungsweise umgekehrt nicht an der Pathogenese der Gingivitis beteiligt zu sein scheint. Allerdings ist es möglich, dass der unveränderte TIMP-1 Gehalt nicht ausreichend

für die Inhibierung der entsprechenden MMPs sein könnte und somit das Voranschreiten des Gewebsum- und abbaus verstärkt werden könnte.

### **5.2.7 TIMP-2**

Das Vorkommen von TIMP-2 in feliner Gingiva, bezogen auf die histologischen Gingivitisgrade, zeigt statistisch signifikante Zusammenhänge für die gesamte Lamina propria und die Fibrozyten bzw. -blasten. Im Median zeigt der Antikörper eher niedrige bis mittlere immunhistologische Scorewerte in feliner Gingiva. Sehr auffällig sind in Bezug auf die Fibrozyten die sehr niedrigen Scorewerte der mittel- bis hochgradigen Gingivitiden im Vergleich zu den mittleren Werten der gesunden und geringgradig entzündeten Gingiva. In der Lamina propria zeigt sich mit steigendem Entzündungsgrad ein sinkender medianer Scorewert, welcher auf eine mögliche Herunterregulierung oder vermehrten Verbrauch von TIMP-2 hinweist. Dieser könnte zum Beispiel durch die Komplexbildung von TIMP-2 mit MMP-2 entstehen (GOLDBERG et al., 1989).

Die Arbeitsgruppe um OYARZÚN (2010) weist immunhistochemisch TIMP-2 in Epithelzellen, mononukleären Zellen und Fibroblasten humaner Gingiva nach, ähnlich der eigenen Arbeit. Widersprüchlich zur eigenen Untersuchung findet sie jedoch mit Hilfe von Western-blotting eine Erhöhung von TIMP-2 in parodontal erkrankter und entzündlich veränderter Gingiva im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Dennoch wird ein verändertes MMP-14 (MT1-MMP) zu TIMP-2 Verhältnis detektiert, was einen geringeren Anstieg von TIMP-2 im Verhältnis zu MMP-14 aufzeigt. In einer deutlich älteren Untersuchung von NOMURA et al. (1993) wird eine Erhöhung von TIMP-1 mRNA in Gingiva von parodontal erkrankten Individuen mittels RT-PCR im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen, aber ein nicht signifikanter Unterschied der Expression von TIMP-2 mRNA. Die bereits für TIMP-1 zitierte Untersuchung von MARCACCINI et al. (2010) weist für TIMP-2 ebenfalls eine Erhöhung im Fall der parodontal erkrankten Individuen auf. Gegebenenfalls sind die Veränderungen in der vorliegenden Untersuchung in Bezug auf die bisher nachgewiesenen Verhältnisse bei der Parodontitis des Menschen nicht vollständig mit der Gingivitis der Katze vergleichbar und es liegt ein geringgradig anderes Verhalten des Enzyms vor, auch aufgrund der Art der Erkrankung.

In der Gingiva von Hunden, deren Zähne einer festgelegten orthodontischen Krafteinwirkung ausgesetzt waren, lässt sich eine vermehrte Aktivität von MMP-1 während der Krafteinwirkung mit anschließendem Abfall des Gehaltes an MMP-1 mRNA nach Entfernung der kieferorthopädischen Apparatur feststellen. Parallel dazu bleibt während der Periode der Krafteinwirkung der mRNA Gehalt von TIMP-1 und -2 annähernd gleich. Nach Entfernung der Kraft zeigen die beiden Gewebeinhibitoren einen stufenweisen Anstieg, Abfall und

erneuten Anstieg bis zum 28. Tag danach (REDLICH et al., 2001). Diese Ergebnisse bezüglich der Gewebeinhibitoren stellen jedoch lediglich Tendenzen dar und sind nicht durch statistische Signifikanzen belegt. Die Nachweismethode unterscheidet sich von der in der vorliegenden Arbeit verwendeten, dennoch kann eine ähnliche Tendenz des Enzymverhaltens detektiert werden, da TIMP-2 in den Phasen des Gewebsumbaus einen Anstieg zeigt. Die bereits genannte immunhistochemische Untersuchung an Gingiva von parodontal erkrankten Hunden weist statistisch auffällige, aber nicht signifikante, Zusammenhänge zwischen TIMP-2 in der Lamina propria und dem Gingivitisgrad nach, so dass hier bei zunehmendem Erkrankungsgrad eine fragliche Aufregulierung dieses Enzyms vorzuliegen scheint (KAISER, 2014).

Insgesamt zeigt sich also ein sehr unterschiedliches, zum Teil widersprüchliches, Verhalten von TIMP-2 in unterschiedlichen Untersuchungen, so dass diesem Enzym eine nicht ganz eindeutige Rolle zukommt. Dennoch ist in der eigenen Untersuchung eine deutliche Tendenz durch den Abfall der Signalintensität der immunhistologischen Reaktion in entzündlich verändertem Gewebe der Lamina propria zu erkennen, was auf eine Herunterregulierung oder einen erhöhten Verbrauch dieses Enzyms während einer Gingivitis hinweisen kann. Gerade im Zusammenspiel mit den Ergebnissen von MMP-1 und -2 ist hier ein Zusammenhang zu erkennen.

### **5.3 Schlussfolgerung und Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit werden drei Matrixmetalloproteinasen, MMP-1, -2 und -8 sowie ihre Gewebeinhibitoren, TIMP-1 und -2, erstmals in feliner Gingiva nachgewiesen. Hierbei scheinen Fibrozyten bzw. -blasten und Mastzellen eine besondere Rolle zu spielen. Weiterhin zeigen sich bezüglich der histologisch ermittelten Gingivitisgrade, welche mit den klinisch ermittelten Gingivitisgraden korrelieren, für MMP-1 und -2 sowie TIMP-2 signifikante Unterschiede in einigen Zellarten beziehungsweise Gewebeschichten.

Im Vergleich der eigenen Ergebnisse mit der existierenden Literatur zeigt vor allem MMP-1 eine auch beim Menschen oder anderen Tierarten zu findende Verteilung in der Gingiva sowie eine Aufregulierung dieses Enzymes bei entzündlichen Veränderungen (REDLICH et al., 2001; DONG et al., 2009). Die Untersuchung von WARHONOWICZ und Mitarbeitern (2006) weisen das Vorhandensein von MMP-1 im equinen Zahnhalteapparat, d.h. in den kollagenen Fasern des Parodonts nach. In Anbetracht des Auftretens der felinen resorptiven Läsionen sowohl im Zahnhalsbereich, als auch an den Zahnwurzeln (DELAURIER et al., 2009), erscheint es im Zusammenhang mit den eigenen Ergebnissen sinnvoll, weitere Untersuchungen bezüglich MMP-1 am Zahnhalteapparat von Katzen durchzuführen. Selten und unregelmässig werden auch Läsionen im Bereich des

Kronendentins ohne Verbindung zum Parodont nachgewiesen, eventuell sind diese durch aktivierte Odontoblasten der Pulpahöhle oder aber durch Reparaturprozesse entstanden (HARVEY et al., 2004). In solchen Fällen bietet sich wiederum die immunhistochemische Untersuchung auch der Zahnhartsubstanz auf MMPs und TIMPs an. Diese könnte ähnlich der Untersuchungen von SENN et al. (2010) von Osteoprotegerin (OPG), des Rezeptoraktivators des NF- $\kappa$ B (RANK) und seines Liganden (RANKL) durchgeführt werden. Die genannte Arbeitsgruppe weist nicht nur in Resorptionslakunen, sondern auch in der Gingiva erkrankter Katzen in frühen Stadien eine positive immunhistochemische Reaktion für RANKL nach, nicht jedoch in späten Stadien. In gesunden Zähnen wird kein OPG-Antigen nachgewiesen. OPG kann zu einer Herabsetzung der MMP-9 Expression in murinen Osteoklastenzellkulturen führen (FU et al., 2013). Für weitere Untersuchungen ist eine Modellstudie an feline Osteoklastenkulturen denkbar. Eine mögliche Zellkulturlinie könnte die von MUZYLAK und Mitarbeitern (2002) aus mononukleären peripheren Blutzellen von Katzen generierte Osteoklastenlinie sein, welche unter anderem Kathepsin K und MMP-9 exprimiert.

Das auffälligste Ergebnis hinsichtlich des Zusammenspiels von MMPs und TIMPs stellt die Aufregulierung von MMP-1 in der Lamina propria und den Fibrozyten bzw. -blasten mit steigendem Entzündungsgrad in Kombination mit dem Abfall von TIMP-2 bei steigendem Entzündungsgrad dar. Bemerkenswert ist auch der mittlere immunhistologische Scorewert für die unveränderte Gingiva, welcher für beide Enzyme annähernd gleich ist und sich dann mit steigendem Entzündungsgrad deutlich in entgegengesetzte Richtungen bewegt.

Es liegt hier ein gemeinsamer basaler Wert der beiden Enzyme vor, jedoch findet mit steigendem Entzündungsgrad eine Aufregulierung von MMP-1 bei gleichzeitiger Abregulierung von TIMP-2 statt. Diese Ergebnisse weisen auf eine fehlende Inhibierung der MMP-1 durch TIMP-2 hin. Dies legt die Vermutung nahe, dass ein Missverhältnis der beiden Enzyme vorliegt, so dass die kollagenolytische MMP-1 an der Entzündungsreaktion und dem dazugehörenden Gewebsumbau beteiligt ist. Ähnliche Ergebnisse legt die Arbeitsgruppe um CURY (2007) dar, die vor der Behandlung einer Fibroblastenkultur eine basale mRNA Expression für unter anderem MMP-1, -2 und TIMP-1 sowie -2 nachweisen. Bei einer Behandlung dieser Zellkultur mit Hydrokortison zeigen alle Enzyme außer TIMP-2 eine deutliche Aufregulierung. Die Arbeitsgruppe vermutet nun Stress als Auslöser beziehungsweise Trigger für Entzündungen des Zahnfleisches und Zahnhalteapparates.

In diesem Zusammenhang ist eine andere Mundhöhlenerkrankung der Katze, nämlich die feline chronische Gingivitis und Stomatitis (FCGS), zu nennen. Am Wahrscheinlichsten ist, dass es sich um einen multifaktoriellen Symptomkomplex handelt, bei welchem als Ursache sowohl eine unangemessene Immunreaktion vorliegt, als auch eine Infektion mit dem feline Calicivirus (FCV) und exogene Stressoren unterstützend wirken (LYON, 2005; BELGARD et

al., 2010). Immunhistologische Untersuchungen an glossopalatiner Schleimhaut von Katzen mit chronischer Stomatitis zeigen eine signifikante Erhöhung von Entzündungszellen, Plasmazellen vor allem des IgG (Immunglobulin G) Typs und Mastzellen. Die Anzahl der Zellen korreliert mit dem Grad der Entzündung (HARLEY et al., 2011). Weiterhin zeigen Tiere, die an FCGS leiden, deutlich häufiger radiologische Anzeichen einer Parodontitis und entzündlicher Wurzelresorptionen, die annähernd äquivalent mit RL-Typ 1 zu betrachten sind (FARCAS et al., 2014). Da in entsprechend veränderten Geweben des Menschen deutliche Imbalancen verschiedener Matrix-Metalloproteinasen beziehungsweise ihrer Gewebeinhibitoren zu detektieren sind, müssen entsprechende Studien an diesem Patientengut für die Zukunft in Betracht gezogen werden. Auch interessant ist, gerade in Bezug auf die Untersuchungen an HIV-infizierten Menschen (NÆSSE et al., 2003), die MMP-Produktion sowohl in gingivalen Mastzellen als auch im Speichel FIV-infizierter Katzen im Vergleich zu gesunden Tieren zu ermitteln. Bei FIV-infizierten Katzen lassen sich MMP-2 und -9 in erhöhtem Maße in Gehirngewebe im Vergleich mit gesunden Tieren nachweisen. Beide MMPs werden in infizierten Makrophagen detektiert (JOHNSTON et al., 2000; JOHNSTON et al., 2002).

Im Rahmen weiterer klinischer Studien sollten die Einschlusskriterien erweitert werden, so dass bereits vorbehandelte und chronisch erkrankte Tiere untersucht werden können. Hierbei ist es sicherlich interessant, medikamentell vorbehandelte Individuen mit nicht-vorbehandelten Individuen zu vergleichen.

In Bezug auf die ursprüngliche Intention, einen Zusammenhang zwischen der Dysregulation von MMPs und TIMPs in feliner Gingiva von Tieren, die an resorptiven Läsionen erkrankt sind oder Unterschiede der Gruppen der an RL Typ 1 oder RL Typ 2 erkrankten Tiere zu ermitteln, lässt sich hier keine statistische Signifikanz zwischen den Gruppen nachweisen, so dass weitere Untersuchungen anderer Gewebe des Zahnhalteapparates sinnvoll erscheinen. Zum Einen ergibt sich nun die Schlussfolgerung, dass ein Beginn der Erkrankung vom Zahnfleisch aus mit Beteiligung von MMPs eher unwahrscheinlich sind. Bei der Auswahl des zu untersuchenden Gewebes erschien dies, auch in Bezug auf die Studie von ARZI und Mitarbeitern (2010), welche die potenzielle Rolle von gingivalen Mastzellen bei der Pathogenese der RL vermutet, ein sinnvoller Ansatz um mit Untersuchungen zu MMPs an Geweben des felinen Zahnhalteapparates zu beginnen. Es könnten andere Untersuchungsmethoden als die Immunhistologie, wie zum Beispiel die Doppel-Immunfluoreszenz, zur Sichtbarmachung von intra- und extrazellulären MMPs und TIMPs sowie Mastzelltryptase, verwendet werden (NÆSSE et al., 2003). In weiteren Untersuchungen müssen nun weitere Komponenten des Zahnhalteapparates, also Alveolarknochen, Zahnzement und kollagene Fasern des Zahnhalteapparates auf MMPs an

gesunden und an RL erkrankten Zähnen untersucht werden. Geeignete Untersuchungsmethoden an humanem Dentin existieren bereits (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000; SULKALA et al., 2007). Es ist auch bekannt, dass MMP-2 in der Lage ist, *in vitro* humane organische Dentinmatrix zu degradieren (TJADERHANE et al., 1998). Einige MMPs des Menschen, unter anderem MMP-8 und -20, liegen an die organische Dentinmatrix gebunden vor (SULKALA et al., 2002; SULKALA et al., 2007). Analog hierzu könnten zunächst Untersuchungen an unveränderten, dann an Katzenzähnen mit resorptiven Läsionen auf den MMP-Gehalt im Dentin durchgeführt werden. Bezüglich des Zahnhalteapparates müssten zunächst Versuche an frisch toten Tieren erfolgen, um den Zahn inklusive seiner Alveole *in toto* zu entfernen. Dies war, aufgrund des vorliegenden regulären Patientengutes einer Kleintierklinik, in der eigenen Arbeit nicht möglich.

Die eigenen Ergebnisse weisen deutliche Tendenzen einer Interaktion der Matrix-Metalloproteinase-1 mit ihrem Gewebehinhibitor TIMP-2 auf. Ob das mit steigendem Gingivitisgrad gegenläufige Verhalten dieser Enzyme auf einen erhöhten Verbrauch oder eine ungenügende Produktion des TIMP-2 oder ausschließlich durch die erhöhte Expression von MMP-1 zurückzuführen ist, lässt sich nicht eindeutig festlegen. Dennoch lassen diese Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass MMP-1 und, in geringerem Maße, MMP-2 eine Aufregulierung mit steigendem Gingivitisgrad in feliner Gingiva erfahren. Der korrespondierende Gewebehinhibitor TIMP-2 zeigt ein umgekehrtes Verhalten bezüglich des Entzündungsgrades. Diese Interaktion kann dann in der Folge verantwortlich für den Gewebsab- und umbau der felinen Gingiva und der kollagenen Fasern des Zahnhalteapparates sein. Im Gegensatz zu TIMP-2 scheint TIMP-1 keine Veränderungen im Expressionsmuster bei unterschiedlichen Entzündungsgraden zu zeigen und somit keinen Einfluss auf die Entzündungsreaktion feliner Gingiva zu haben. Ähnliche Ergebnisse finden sich auch für MMP-8, wobei hier zum einen auf die hohe Antikörperspezifität als auch auf die Reaktion der Positivkontrolle verwiesen werden muss und gegebenenfalls weitere Untersuchungen notwendig sind.

Weiterhin kann eine Interaktion zwischen Mastzellen und Fibrozyten bzw. -blasten in der felinen Gingiva vermutet werden. Diese Zellen zeigen statistisch signifikante Unterschiede bezüglich des Vorkommens der MMPs und TIMPs. Der höhere Gehalt an MMPs im Vergleich zu TIMPs in Fibrozyten und -blasten lässt die Vermutung einer höheren Beteiligung am Umbau der extrazellulären Matrix zu. Das geringe Vorhandensein der MMPs und TIMP-2 in den Mastzellen bei mittlerem bis hohem Vorkommen in der Lamina propria könnte auf eine Degranulation der Mastzellen mit Aktivierung der genannten Enzyme durch Mastzellmediatoren hinweisen.

## 6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und ihre Gewebeinhibitoren (TIMPs) in feliner Gingiva immunhistologisch nachzuweisen und einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein dieser Enzyme mit dem Auftreten von resorptiven Läsionen (RL) oder einer Gingivitis darzulegen.

Es wird ein Überblick über die Literatur zur Anatomie des Zahnes und des Zahnhalteapparates sowie den resorptiven Läsionen der Katze und anderer Spezies gegeben. Weiterhin wird auf Matrix-Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren, insbesondere in Bezug auf Mundhöhlenerkrankungen des Menschen, aber auch auf ihr Vorkommen in der Veterinärmedizin, vor allem bei Erkrankungen der Katze, eingegangen.

Nach einer klinischen und radiologischen Untersuchung und Diagnosestellung wurde bei 55 Katzen unter Allgemeinanästhesie jeweils mindestens eine Gingivastanzbiopsie von 3 mm Durchmesser zur weiteren Aufarbeitung und Untersuchung entnommen. Bei an RL erkrankten Tieren erfolgte die Probennahme unmittelbar an der zahnnahe Gingiva. Die Proben wurden histologisch im HE-Schnitt ausgewertet und immunohistochemisch auf MMP-1, -2, -8 sowie TIMP-1 und -2 untersucht. Die Erfassung der Ergebnisse erfolgte semiquantitativ und wurde mit Hilfe statistischer Verfahren ausgewertet.

Es wurden sowohl klinisch als auch histologisch Gingivitisgrade erhoben. Diese wiesen eine signifikante Korrelation auf. In der klinischen Untersuchung wurden bei 29 % der Patienten mittel- und hochgradige Gingivitiden diagnostiziert, in der histologischen Untersuchung wurden 35 % der Gingivaproben als mittel- bzw. hochgradig entzündet eingestuft. Die Mehrheit der Patienten zeigte dementsprechend keine beziehungsweise nur geringgradige Entzündungsanzeichen der Gingiva.

Die untersuchten Enzyme zeigten eine starke Expression in den Epithel- und Endothelzellen und ein mittelgradiges Vorkommen in Fibrozyten bzw. -blasten der felinen Gingiva, mit Ausnahme von MMP-8, welche generell in geringerem Maße nachweisbar war. Die Entzündungszellen exprimierten vor allem MMP-1 und -2, aber auch TIMP-1. Sehr auffällig war das geringe Vorhandensein der MMPs und von TIMP-2 in den Mastzellen.

In der dreifaktoriellen Varianzanalyse wurden statistische Signifikanzen vor allem für Mastzellen und Fibrozyten bzw. -blasten in Bezug auf die einzelnen Enzyme vermerkt. Hierbei wiesen die untersuchten MMPs eine sehr geringe Expression in den Mastzellen mit hoher statistischer Signifikanz im Vergleich zu den anderen Zellarten und Lokalisationen auf. Die Fibrozyten und -blasten zeigten für alle Enzyme außer MMP-1 statistisch signifikante Werte für ihre Expression im Vergleich zu den anderen Zellarten und Gewebeschichten. Die

Expression von MMP-2 war in Fibrozyten bzw. -blasten deutlich höher als die der übrigen Enzyme in diesen Zellen.

Insbesondere MMP-1 wies signifikante Unterschiede in Bezug auf die ermittelten Gingivitisgrade auf. Diese MMP war in allen untersuchten Zellarten und Gewebeschichten außer den Mastzellen bei höherem Entzündungsgrad aufreguliert. MMP-2 zeigte ebenfalls eine erhöhte Expression in der Lamina propria, den Entzündungszellen und den perivaskulären entzündlichen Infiltraten mit steigendem Gingivitisgrad. TIMP-2 wies mit dem Anstieg der Entzündung ein deutlich vermindertes Vorkommen in der Lamina propria und den Fibrozyten bzw. -blasten auf. Vergleichbare Zusammenhänge bezüglich der Gingivitisgrade ließen sich für MMP-8 und TIMP-1 nicht ermitteln.

Die Ergebnisse der Fibrozyten und -blasten sowie der Mastzellen könnten auf eine Interaktion dieser Zellarten durch zum Beispiel Mastzellmediatoren hinweisen. Diese könnte zu einer übersteigerten MMP-1 Expression der Fibrozyten und -blasten sowie dem Umbau von gingivalem und parodontalem Gewebe führen.

Die deutliche Aufregulierung von MMP-1 in entzündeter feliner Gingiva spricht für einen Gewebsum- und abbau. Dies wird durch das gegenläufige, verminderte Vorkommen von TIMP-2 als MMP-Inhibitor gestützt, da dieses Enzym nun entweder einem erhöhten Verbrauch oder einer mangelhaften Produktion unterliegt, so dass die Entzündungsreaktion verstärkt wird. Ähnliche Rückschlüsse können für MMP-2 gezogen werden. Es wird vermutet, dass TIMP-1 nicht in den Um- und Abbau der Gingiva involviert ist. Bezüglich MMP-8 ist hinsichtlich der in einzelnen Gewebeanteilen der Positivkontrolle unklaren immunhistochemischen Reaktion möglich, dass die Reaktion für diesen Antikörper, auch aufgrund der hohen Speziespezifität, nicht durchgehend erfolgreich war.

Bezüglich der resorptiven Läsionen ließen sich an der zahnnahe Gingiva keine Unterschiede in der MMP- bzw. TIMP-Expression nachweisen, so dass ein Zusammenhang unwahrscheinlich erscheint. Hier sollten jedoch weitere Untersuchungen an der Zahnhartsubstanz erfolgen.

Insgesamt wurden MMP-1 und -2 sowie TIMP-1 und -2 und unregelmäßig MMP-8 in unterschiedlichen Zelltypen feliner Gingiva nachgewiesen. Es konnte ein Verteilungsprofil dieser Enzyme in feliner Gingiva erstellt werden, insbesondere Mastzellen und Fibrozyten zeigten signifikante Unterschiede im Vergleich zu den anderen Zelltypen. Signifikante Ergebnisse bezüglich der Grade der Zahnfleischentzündung wiesen vor allem MMP-1 und -2 sowie TIMP-2 auf. Diese Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf eine Interaktion bei der Entstehung der Gingivitis zu.

## 7 Summary

The aim of this study was to immunohistochemically evaluate the presence of matrix-metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in feline gingival tissue and to find a relationship between these enzymes and the occurrence of resorptive lesions (RL) or gingivitis.

An overview is given of the anatomy of teeth and the periodontium as well as the resorptive lesions in cats and other species. Furthermore, the incidence of MMPs and their TIMPs in human oral disease but also in veterinary medicine, particularly in cats, is presented.

For this purpose, gingival punch biopsies were taken from 55 cats after clinical and radiological examinations of their oral cavity for histological and immunohistochemical evaluation. From patients that suffered from RL the biopsies were taken at the gingival margin of affected teeth. These samples were histologically evaluated with hematoxylin-eosine and by immunohistochemistry to detect MMP-1, -2, -8 and TIMP-1 and -2. The results were semiquantitatively evaluated for statistical analysis.

The grading of gingivitis based on clinical and histological observations. These grades showed a significant correlation. The clinical evaluation showed in 29 % of cats a moderate to severe gingivitis, histologically moderate to severe inflammatory signs were observed in 35 % of the samples. Thus, the majority of cats examined showed none or moderate signs of gingival inflammation.

The enzymes examined were highly expressed in epithelial and endothelial cells and moderately in fibrocytes and fibroblasts of feline gingiva, except MMP-8, which was generally expressed slightly. The inflammatory cells were producing MMP-1 and -2, but also TIMP-1. Remarkably, the MMPs and TIMP-2 were showing nearly no presence in mast cells.

Statistically significant results were demonstrated for mast cells and fibrocytes or fibroblasts related to the enzymes. In detail the examined MMPs showed, in comparison to other structures or cells, a very low expression with statistical significance in mast cells. The fibrocytes and –blasts were showing statistically significant expression values compared to other structures and cells for all enzymes except for MMP-1. The expression of MMP-2 was significantly higher in fibrocytes and –blasts than the expression of other examined enzymes in these cells.

Particularly MMP-1 was showing significant results in relation to the grading of gingivitis. This MMP was upregulated in all cells and structures examined except for mast cells. Similarly, MMP-2 was showing an increased expression with higher degree of inflammation in the lamina propria, the inflammatory cells and the perivascular inflammatory infiltrates. The

degree of inflammation negatively correlated to TIMP-2 expression in the lamina propria and fibrocytes and -blasts. For MMP-8 and TIMP-1 no similar relationships were detected.

The results regarding fibrocytes/-blasts and mast cells are suggestive of an interaction between these cells by mast cell mediators. These mediators might lead to an overexpression of MMP-1 in fibrocytes/-blasts and the remodeling of gingival and periodontal tissues.

The simultaneous inverted downregulation of TIMP-2 supports this hypothesis. Exhaustion or lower production of this enzyme might trigger the inflammatory process. Similar results are available for MMP-2. Assumingly, TIMP-1 is not involved in the remodeling of feline gingiva. Regarding the ambiguous immunohistochemical reaction of MMP-8 in some parts of the positive control tissue, it is possible that the reaction of this antibody, perhaps because of the high species specificity, was not consistently successful.

No significant results of MMP and TIMP expression in gingiva were shown concerning the resorptive lesions, indicating that a correlation between resorptive lesions and the presence of MMP and TIMP in gingiva is unlikely. Further investigations are required in dental hard tissues.

Overall, it was possible to detect MMP-1 and -2 and also TIMP-1 and -2 plus MMP-8 irregularly in different cell types of feline gingival tissue. A distribution profile of these enzymes in feline gingiva was created, particularly mast cells and fibrocytes/-blasts showed significant differences in comparison to other cell types. MMP-1 and -2 and also TIMP-2 showed significant results with regard to gingivitis grading. These results indicate an interaction between these enzymes in the pathogenesis of gingivitis.

## 8 Literaturübersicht

1. ABRAHAM, M., SHAPIRO, S., KARNI, A., WEINER, H. L. & MILLER, A. (2005) Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) are preferentially expressed by Th1 vs. Th2 cells. *Journal of Neuroimmunology* 163, S. 157-164
2. AKKOC, A., INAN, S. & SONMEZ, G. (2012) Matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and steroid receptor expressions in feline mammary tumors. *Biotechnic and Histochemistry* 87, S. 312-319
3. AL-AZRI, A. R., GIBSON, R. J., KEEFE, D. M. K. & LOGAN, R. M. (2013) Matrix metalloproteinases: do they play a role in mucosal pathology of the oral cavity? *Oral Diseases* 19, S. 347-359
4. 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, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover (Habilitation)
5. ALLDINGER, S., WÜNSCHMANN, A., BAUMGÄRTNER, W., VOSS, C. & KREMMER, E. (1996) Up-regulation of major histocompatibility complex class II antigen expression in the central nervous system of dogs with spontaneous canine distemper virus encephalitis. *Acta Neuropathologica* 92, S. 273-280
6. ANGERER, L., HUSSAIN, S., WEI, Z. & LIVINGSTON, B. T. (2006) Sea urchin metalloproteases: A genomic survey of the BMP-1/tolloid-like, MMP and ADAM families. *Developmental Biology* 300, S. 267-281

7. ARZI, B., MURPHY, B., BAUMGARTH, N., VAPNIARSKY, N., NEMEC, A., NAYDAN, D. K., COX, D. P. & VERSTRAETE, F. J. M. (2011) Analysis of immune cells within the healthy oral mucosa of specific pathogen-free cats. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 40, S. 1-10

8. ARZI, B., MURPHY, B., COX, D. P., VAPNIARSKY, N., KASS, P. H. & VERSTRAETE, F. J. (2010) Presence and quantification of mast cells in the gingiva of cats with tooth resorption, periodontitis and chronic stomatitis. *Archives of Oral Biology* 55, S. 148-154

9. ASANO, K., SAKAI, M., MATSUDA, T., TANAKA, H., FUJII, K. & HISAMITSU, T. (2006) Suppression of matrix metalloproteinase production from synovial fibroblasts by meloxicam in-vitro. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 58, S. 359-366

10. ATKINSON, J. J. & SENIOR, R. M. (2003) Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 28, S. 12-24

11. AUPPERLE, H., BALDAUF, K. & MARZ, I. (2011) An immunohistochemical study of feline myocardial fibrosis. *Journal of Comparative Pathology* 145, S. 158-173

12. AUPPERLE, H., THIELEBEIN, J., KIEFER, B., MARZ, I., DINGES, G. & SCHOON, H. A. (2009) An immunohistochemical study of the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in chronic mitral valvular disease (valvular endocardiosis) in dogs. *The Veterinary Journal* 180, S. 88-94

13. BAKER, A. H., EDWARDS, D. R. & MURPHY, G. (2002) Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of Cell Science* 115, S. 3719-3727

14. BAKER, A. H., ZALTSMAN, A. B., GEORGE, S. J. & NEWBY, A. C. (1998) Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. *The Journal of Clinical Investigation* 101, S. 1478-1487
  
15. BARTLETT, J. D. & SIMMER, J. P. (1999) Proteinases in developing dental enamel. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 10, S. 425-441
  
16. BELGARD, S., TRUYEN, U., THIBAUT, J. C., SAUTER-LOUIS, C. & HARTMANN, K. (2010) Relevance of feline calicivirus, feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus, feline herpesvirus and *Bartonella henselae* in cats with chronic gingivostomatitis. In *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* S. 369-376
  
17. BELLOWS, J. (2010) *Feline Dentistry*. Ames, Iowa, Wiley-Blackwell
  
18. BELLOWS, J., DUMAIS, Y., GIOSO, M., REITER, A. & VERSTRAETE, F. (2005) Clarification of Veterinary Dental Nomenclature. *Journal of Veterinary Dentistry* 22, S. 272-279
  
19. BENYON, R. C., HOVELL, C. J., DA GACA, M., JONES, E. H., IREDALE, J. P. & ARTHUR, M. J. (1999) Progelatinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation. *Hepatology* 30, S. 977-986
  
20. BERGER, M., SCHAWALDER, P., STICH, H. & LUSSI, A. (1996) Differentialdiagnose von Resorptiven Zahnerkrankungen (FORL) und Karies. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 138, S. 546-551

21. BERGER, M., SCHAWALDER, P., STICH, H. & LUSSI, A. (1997) Neue diagnostische und ätiopathogenetische Aspekte zu den resorptiven Zahnerkrankungen (FORL) bei wildlebenden und im Zoo gehaltenen grossen Raubkatzen. *Verh. ber. Erkr. Zootiere* 38, S. 205-208
22. BERGER, M., STICH, H., HUSTER, H., ROUX, P. & SCHAWALDER, P. (2004) Feline dental resorptive lesions in the 13th to 14th centuries. *Journal of Veterinary Dentistry* 21, S. 206-213
23. BIRKEDAL-HANSEN, H. (1993) Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *Journal of Periodontology* 64, S. 474-484
24. BISHOP, M. A. (1987) An investigation of pulp capillaries and tight junctions between odontoblasts in cats. *Anatomy and Embryology* 177, S. 131-138
25. BLAVIER, L., LAZARYEV, A., GROFFEN, J., HEISTERKAMP, N., DECLERCK, Y. A. & KAARTINEN, V. (2001) TGF-beta3-induced Palatogenesis Requires Matrix Metalloproteinases. *Molecular Biology of the Cell* 12, S. 1457-1466
26. BODE, W., GOMIS-RÜTH, F.-X. & STÖCKLER, W. (1993) Astacins, serralysins, 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
27. BOOIJ-VRIELING, H. E., DE VRIES, T. J., SCHOENMAKER, T., TRYFONIDOU, M. A., PENNING, L. C., HAZEWINKEL, H. A. W. & EVERTS, V. (2012) Osteoclast progenitors from cats with and without tooth resorption respond differently to 1,25-dihydroxyvitamin D and interleukin-6. *Research in Veterinary Science* 92, S. 311-316

28. BORSANI, E., SALGARELLO, S., MENSI, M., BONINSEGNA, R., STACCHIOTTI, A., REZZANI, R., SAPELLI, P., BIANCHI, R. & RODELLA, L. F. (2005) Histochemical and immunohistochemical evaluation of gingival collagen and metalloproteinases in peri-implantitis. *Acta Histochemica* 107, S. 231-240

29. BOSMAN, F. T. & STAMENKOVIC, I. (2003) Functional structure and composition of the extracellular matrix. *The Journal of Pathology* 200, S. 423-428

30. BREW, K., DINAKARPANDIAN, D. & NAGASE, H. (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477, S. 267-283

31. BUDRAS, K.-D., FRICKE, W. & RICHTER, R. (2007) *Atlas der Anatomie des Hundes*. Hannover, Schlütersche

32. BUDUNELI, N., VARDAR, S., ATILLA, G. L., SORSA, T., LUOTO, H. & BAYLAS, H. (2002) Gingival Crevicular Fluid Matrix Metalloproteinase-8 Levels Following Adjunctive Use of Meloxicam and Initial Phase of Periodontal Therapy. *Journal of Periodontology* 73, S. 103-109

33. CHIRCO, R., LIU, X. W., JUNG, K. K. & KIM, H. R. (2006) Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Review* 25, S. 99-113

34. CLARK, I. M., SWINGLER, T. E., SAMPIERI, C. L. & EDWARDS, D. R. (2008) The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40, S. 1362-1378

35. CLUTTERBUCK, A. L., ASPLIN, K. E., HARRIS, P., ALLAWAY, D. & MOBASHERI, A. (2009) Targeting matrix metalloproteinases in inflammatory conditions. *Current Drug Targets* 10, S. 1245-1254
36. CLUTTERBUCK, A. L., HARRIS, P., ALLAWAY, D. & MOBASHERI, A. (2010) Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. *The Veterinary Journal* 183, S. 27-38
37. COLLEY, P. A., VERSTRAETE, F. J. M., KASS, P. H. & SCHIFFMAN, P. (2002) Elemental composition of teeth with and without odontoclastic resorption lesions in cats. *American Journal of Veterinary Research* 63, S. 546-550
38. COROTTI, M. V., ZAMBUZZI, W. F., PAIVA, K. B. S., MENEZES, R., PINTO, L. C., LARA, V. S. & GRANJEIRO, J. M. (2009) Immunolocalization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during apical periodontitis development. *Archives of Oral Biology* 54, S. 764-771
39. CROSSLEY, D. A. (1995) Tooth enamel thickness in the mature dentition of domestic dogs and cats--preliminary study. *Journal of Veterinary Dentistry* 12, S. 111-113
40. CROSSLEY, D. A., DUBIELZIG, R. R. & BENSON, K. G. (1997) Caries and odontoclastic resorptive lesions in a chinchilla (*Chinchilla lanigera*). *The Veterinary Record* 141, S. 337-339
41. CURY, P. R., ARAÚJO, V. C., CANAVEZ, F., FURUSE, C. & ARAÚJO, N. S. (2007) Hydrocortisone Affects the Expression of Matrix Metalloproteinases (MMP-1, -2, -3, -7, and -11) and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases (TIMP-1) in Human Gingival Fibroblasts. *Journal of Periodontology* 78, S. 1309-1315

42. CUTLER, C. W. & JOTWANI, R. (2006) Dendritic cells at the oral mucosal interface. *Journal of Dental Research* 85, S. 678-689
43. DE GRAUW, J. C., VAN DE LEST, C. H. A., BRAMA, P. A. J., RAMBAGS, B. P. B. & VAN WEEREN, P. R. (2009) In vivo effects of meloxicam on inflammatory mediators, MMP activity and cartilage biomarkers in equine joints with acute synovitis. *Equine Veterinary Journal* 41, S. 693-699
44. DE LAAT, M. A., KYAW-TANNER, M. T., NOURIAN, A. R., MCGOWAN, C. M., SILLENCE, M. N. & POLLITT, C. C. (2011) The developmental and acute phases of insulin-induced laminitis involve minimal metalloproteinase activity. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 140, S. 275-281
45. DELAURIER, A., ALLEN, S., DEFLANDRE, C., HORTON, M. A. & PRICE, J. S. (2002) Cytokine Expression in Feline Osteoclastic Resorptive Lesions. *Journal of Comparative Pathology* 127, S. 169-177
46. DELAURIER, A., BOYDE, A., JACKSON, B., HORTON, M. A. & PRICE, J. S. (2009) Identifying early osteoclastic resorptive lesions in feline teeth: a model for understanding the origin of multiple idiopathic root resorption. *Journal of Periodontal Research* 44, S. 248-257
47. DING, Y., UITTO, V. J., FIRTH, J., SALO, T., HAAPASALO, M., KONTTINEN, Y. T. & SORSA, T. (1995) Modulation of host matrix metalloproteinases by bacterial virulence factors relevant in human periodontal diseases. *Oral Diseases* 1, S. 279-286
48. DIXON, W. J. (1993) *BMDP Statistical Software Manual*. Berkeley, Los Angeles, London, University of California Press

49. DOMON, S., SHIMOKAWA, H., MATSUMOTO, Y., YAMAGUCHI, S. & SOMA, K. (1999) In situ hybridization for matrix metalloproteinase-1 and cathepsin K in rat root-resorbing tissue induced by tooth movement. *Archives of Oral Biology* 44, S. 907-915
50. DONG, W., XIANG, J., LI, C., CAO, Z. & HUANG, Z. (2009) Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer is associated with matrix metalloproteinase-1 and -2 in gingival tissues from patients with periodontitis. *Journal of Periodontal Research* 44, S. 125-132
51. DONOGHUE, S., SCARLETT, J. M., WILLIAMS, C. A. & SAIDLA, J. (1994) Diet as a risk factor for feline external odontoclastic resorption. *The Journal of Nutrition* 124, S. 2693S-2694S
52. DUPONT, G. (1995) Crown amputation with intentional root retention for advanced feline resorptive lesions--a clinical study. *Journal of Veterinary Dentistry* 12, S. 9-13
53. DUPONT, G. & DEBOWES, L. J. (2002) Comparison of Periodontitis and Root Replacement in Cat Teeth with Resorptive Lesions. *Journal of Veterinary Dentistry* 19, S. 71-75
54. EGEBLAD, M. & WERB, Z. (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature reviews. Cancer* 2, S. 161-174
55. EISENMENGER, E. & ZETNER, K. (1982) *Tierärztliche Zahnheilkunde*. Berlin und Hamburg, Paul Parey Verlag

56. FANJUL-FERNÁNDEZ, M., FOLGUERAS, A. R., CABRERA, S. & LÓPEZ-OTÍN, C. (2009) Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1803, S. 3-19
57. FARCAS, N., LOMMER, M. J., KASS, P. H. & VERSTRAETE, F. J. M. (2014) Dental radiographic findings in cats with chronic gingivostomatitis (2002-2012). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 244, S. 339-345
58. FEDARKO, N. S., JAIN, A., KARADAG, A. & FISHER, L. W. (2004) Three small integrin binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGS) bind and activate specific matrix metalloproteinases. *FASEB Journal* 18, S. 734-736
59. FERNANDES, M., DE ATAIDE, I. & WAGLE, R. (2013) Tooth resorption part I - pathogenesis and case series of internal resorption. *Journal of Conservative Dentistry: JCD* 16, S. 4-8
60. FLOYD, M. R. (1991) The modified Triadan system: nomenclature for veterinary dentistry. *Journal of Veterinary Dentistry* 8, S. 18-19
61. FONFARA, S., HETZEL, U., TEW, S. R., CRIPPS, P., DUKES-MCEWAN, J. & CLEGG, P. D. (2013) Expression of matrix metalloproteinases, their inhibitors, and lysyl oxidase in myocardial samples from dogs with end-stage systemic and cardiac diseases. *American Journal of Veterinary Research* 74, S. 216-223
62. FOWLKES, J. L., THRAILKILL, K. M., SERRA, D. M., SUZUKI, K. & NAGASE, H. (1995) Matrix metalloproteinases as insulin-like growth factor binding protein-degrading proteinases. *Progress in Growth Factor Research* 6, S. 255-263

63. FU, Y. X., GU, J. H., ZHANG, Y. R., TONG, X. S., ZHAO, H. Y., YUAN, Y., LIU, X. Z., BIAN, J. C. & LIU, Z. P. (2013) Osteoprotegerin influences the bone resorption activity of osteoclasts. *International Journal of Molecular Medicine* 31, S. 1411-1417

64. FULLMER, H. M. & GIBSON, W. (1966) Collagenolytic Activity in Gingivae of Man. *Nature* 209, S. 728-729

65. GARCÍA-DE-ALBA, C., BECERRIL, C., RUIZ, V., GONZÁLEZ, Y., REYES, S., GARCÍA-ALVAREZ, J., SELMAN, M. & PARDO, A. (2010) Expression of Matrix Metalloproteases by Fibrocytes. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 182, S. 1144-1152

66. GEARING, A. J., BECKETT, P., CHRISTODOULOU, M., CHURCHILL, M., CLEMENTS, J. M., CRIMMIN, M., DAVIDSON, A. H., DRUMMOND, A. H., GALLOWAY, W. A., GILBERT, R. & ET AL. (1995) Matrix metalloproteinases and processing of pro-TNF-alpha. *Journal of Leukocyte Biology* 57, S. 774-777

67. GIOSO, M. A. & CARVALHO, V. G. (2005) Oral anatomy of the dog and cat in veterinary dentistry practice. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 35, S. 763-780, v

68. GIRARD, N., SERVET, E., BIOURGE, V. & HENNET, P. (2008) Feline tooth resorption in a colony of 109 cats. *Journal of Veterinary Dentistry* 25, S. 166-174

69. GIRARD, N., SERVET, E., HENNET, P. & BIOURGE, V. (2010) Tooth resorption and vitamin D3 status in cats fed premium dry diets. *Journal of Veterinary Dentistry* 27, S. 142-147

70. GOLDBERG, G. I., MARMER, B. L., GRANT, G. A., EISEN, A. Z., WILHELM, S. & HE, C. S. (1989) Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteases designated TIMP-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86, S. 8207-8211

71. GOMEZ, D. E., ALONSO, D. F., YOSHIJI, H. & THORGEIRSSON, U. P. (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, regulation and biological functions. *European Journal of Cell Biology* 74, S. 111-122

72. GOMIS-RÜTH, F. X. (2009) Catalytic Domain Architecture of Metzincin Metalloproteases. *Journal of Biological Chemistry* 284, S. 15353-15357

73. GONÇALVES, L. D. R., OLIVEIRA, G., HURTADO, P. A., FEITOSA, A., TAKIYA, C. M., GRANJEIRO, J. M., TRACKMAN, P. C., OTAZÚ, I. & FERES-FILHO, E. J. (2008) Expression of metalloproteinases and their tissue inhibitors in inflamed gingival biopsies. *Journal of Periodontal Research* 43, S. 570-577

74. GORREL, C. (2006) *Zahnmedizin bei Klein- und Heimtieren*. München, Elsevier

75. GORREL, C. & LARSSON, Å. (2002) Feline odontoclastic resorptive lesions: unveiling the early lesion. *Journal of Small Animal Practice* 43, S. 482-488

76. GROSS, J. & LAPIÈRE, C. M. (1962) Collagenolytic Activity in Amphibian Tissues - a Tissue Culture Assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48, S. 1014-&

77. HANNAS, A. R., PEREIRA, J. C., GRANJEIRO, J. M. & TJADERHANE, L. (2007) The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontologica Scandinavica* 65, S. 1-13

78. HARLEY, R., GRUFFYDD-JONES, T. J. & DAY, M. J. (2002) Non-specific labelling of mast cells in feline oral mucosa--a potential problem in immunohistochemical studies. *Journal of Comparative Pathology* 127, S. 228-231

79. HARLEY, R., GRUFFYDD-JONES, T. J. & DAY, M. J. (2003) Characterization of immune cell populations in oral mucosal tissue of healthy adult cats. *Journal of Comparative Pathology* 128, S. 146-155

80. HARLEY, R., GRUFFYDD-JONES, T. J. & DAY, M. J. (2011) Immunohistochemical Characterization of Oral Mucosal Lesions in Cats with Chronic Gingivostomatitis. *Journal of Comparative Pathology* 144, S. 239-250

81. HARVEY, C. E., ORSINI, P., MCLAHAN, C. & SCHUSTER, C. (2004) Mapping of the radiographic central point of feline dental resorptive lesions. *Journal of Veterinary Dentistry* 21, S. 15-21

82. HEATON, M., WILKINSON, J., GORREL, C. & BUTTERWICK, R. (2004) A rapid screening technique for feline odontoclastic resorptive lesions. *Journal of Small Animal Practice* 45, S. 596-601

83. HOFMANN-LEHMANN, R., BERGER, M., SIGRIST, B., SCHAWALDER, P. & LUTZ, H. (1998) Feline immunodeficiency virus (FIV) infection leads to increased incidence of feline odontoclastic resorptive lesions (FORL). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 65, S. 299-308

84. HSU, S. M., RAINE, L. & FANGER, H. (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 29, S. 577-580

85. HUANG, S., LU, F., CHEN, Y., HUANG, B. & LIU, M. (2013) Mast cell degranulation in human periodontitis. *Journal of Periodontology* 84, S. 248-255

86. INGHAM, K. E., GORREL, C., BLACKBURN, J. & FARNSWORTH, W. (2001) Prevalence of odontoclastic resorptive lesions in a population of clinically healthy cats. *The Journal of Small Animal Practice* 42, S. 439-443

87. IYER, R. P., PATTERSON, N. L., FIELDS, G. B. & LINDSEY, M. L. (2012) The history of matrix metalloproteinases: milestones, myths, and misperceptions. *American Journal of Physiology. Heart and Circulation Physiology* 303, S. H919-H930

88. JANKOWSKI, M. K., OGILVIE, G. K., LANA, S. E., FETTMAN, M. J., HANSEN, R. A., POWERS, B. E., MITCHENER, K. M., LOVETT, S. D., RICHARDSON, K. L., PARSLEY, L. & WALTON, J. A. (2002) Matrix metalloproteinase activity in tumor, stromal tissue, and serum from cats with malignancies. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 16, S. 105-108

89. JOHNSTON, J. B., JIANG, Y., VAN MARLE, G., MAYNE, M. B., NI, W., HOLDEN, J., MCARTHUR, J. C. & POWER, C. (2000) Lentivirus infection in the brain induces matrix metalloproteinase expression: role of envelope diversity. *Journal of Virology* 74, S. 7211-7220

90. JOHNSTON, J. B., SILVA, C. & POWER, C. (2002) Envelope gene-mediated neurovirulence in feline immunodeficiency virus infection: induction of matrix metalloproteinases and neuronal injury. *Journal of Virology* 76, S. 2622-2633

91. JUN, J. H., CHO, J. E., SHIM, Y. H., SHIM, J. K. & KWAK, Y. L. (2011) Effects of propofol on the expression of matrix metalloproteinases in rat cardiac fibroblasts after hypoxia and reoxygenation. *British Journal of Anesthesia* 106, S. 650-658
92. 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 (Dissertation)
93. KATZ, S., PARK, K. K. & PALENIK, C. J. (1987) In-vitro root surface caries studies. *Journal of Oral Medicine* 42, S. 40-48
94. KIILI, M., COX, S. W., CHEN, H. W., WAHLGREN, J., MAISI, P., ELEY, B. M., SALO, T. & SORSA, T. (2002) Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue. *Journal of Clinical Periodontology* 29, S. 224-232
95. KIRSCHVINK, N., LEEMANS, J., DELVAUX, F., SNAPS, F., CLERCX, C. & GUSTIN, P. (2007) Functional, inflammatory and morphological characterisation of a cat model of allergic airway inflammation. *The Veterinary Journal* 174, S. 541-553
96. KOEHRMANN, A., KAMMERER, U., KAPP, M., DIETL, J. & ANACKER, J. (2009) Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BioMed Central Cancer* 9,
97. KÖNIG, H. E., SÓTONYI, P., RUBERTE, J. & LIEBICH, H.-G. (2012) Verdauungsapparat (apparatus digestorius). In *Anatomie der Haussäugetiere*. Hrsg. KÖNIG, H. E., LIEBICH, H.-G. Stuttgart, Schattauer. S. 301-366

98. KUBOTA, T., NOMURA, T., TAKAHASHI, T. & 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
99. KYAW-TANNER, M. T., WATTLE, O., VAN EPS, A. W. & POLLITT, C. C. (2008) Equine laminitis: membrane type matrix metalloproteinase-1 (MMP-14) is involved in acute phase onset. *Equine Veterinary Journal* 40, S. 482-487
100. LEE, H.-M., CIANCIO, S. G., TÜTER, G., RYAN, M. E., KOMAROFF, E. & GOLUB, L. M. (2004) Subantimicrobial Dose Doxycycline Efficacy as a Matrix Metalloproteinase Inhibitor in Chronic Periodontitis Patients Is Enhanced When Combined With a Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug. *Journal of Periodontology* 75, S. 453-463
101. LEES, M., TAYLOR, D. J. & WOOLLEY, D. E. (1994) Mast cell proteinases activate precursor forms of collagenase and stromelysin, but not of gelatinases A and B. *European Journal of Biochemistry* 223, S. 171-177
102. LEMMONS, M. (2013) Clinical Feline Dental Radiography. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 43, S. 533-554
103. LEWIS, J. R., OKUDA, A., SHOFER, F. S., PACHTINGER, G., HARVEY, C. E. & REITER, A. M. (2008) Significant association between tooth extrusion and tooth resorption in domestic cats. *Journal of Veterinary Dentistry* 25, S. 86-95
104. LI, Q., ZHANG, L., HAN, Y., JIANG, Z. & WANG, Q. (2012) Propofol reduces MMPs expression by inhibiting NF- $\kappa$ B activity in human MDA-MB-231 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 66, S. 52-56

105. LI, W., GIBSON, C. W., ABRAMS, W. R., ANDREWS, D. W. & DENBESTEN, P. K. (2001) Reduced hydrolysis of amelogenin may result in X-linked amelogenesis imperfecta. *Matrix Biology* 19, S. 755-760
106. LIEBICH, H.-G. (2010) Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel. Stuttgart, Schattauer GmbH
107. LOE, H. & SILNESS, J. (1963) Periodontal Disease in Pregnancy. I. Prevalence and Severity. *Acta Odontologica Scandinavica* 21, S. 533-551
108. LOMMER, M. J. & VERSTRAETE, F. J. (2000) Prevalence of odontoclastic resorption lesions and periapical radiographic lucencies in cats: 265 cases (1995-1998). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 217, S. 1866-1869
109. LORENZ, R. J. (1996) Grundbegriffe der Biometrie. Stuttgart, New York, Gustav Fischer Verlag
110. LOUKOPOULOS, P., O'BRIEN, T., GHODDUSI, M., MUNGALL, B. A. & ROBINSON, W. F. (2004) Characterisation of three novel canine osteosarcoma cell lines producing high levels of matrix metalloproteinases. *Research in Veterinary Science* 77, S. 131-141
111. LUQUE, P. L., PIERCE, G. J., LEARMONTH, J. A., IENO, E., SANTOS, B., LÓPEZ, A., REID, R. J., ROGAN, E., BOON, J. & LOCKYER, C. H. (2013) Are mineralization anomalies in common dolphin teeth associated with life-history events and/or the exposure to anthropogenic pollutants? *Journal of Zoology* 291, S. 194-204

112. LYON, K. F. (1992) Subgingival odontoclastic resorptive lesions. Classification, treatment, and results in 58 cats. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 22, S. 1417-1432

113. LYON, K. F. (2005) Gingivostomatitis. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 35, S. 891-911, vii

114. MAEDA, A. & SOBEL, R. A. (1996) Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 55, S. 300-309

115. MAIDMENT, J. M., MOORE, D., MURPHY, G. P., MURPHY, G. & CLARK, I. M. (1999) Matrix metalloproteinase homologues from *Arabidopsis thaliana*. Expression and activity. *The Journal of Biological Chemistry* 274, S. 34706-34710

116. MANDARA, M. T., PAVONE, S., MANDRIOLI, L., BETTINI, G., FALZONE, C. & BARONI, M. (2009) Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression in canine and feline meningioma. *Veterinary Pathology* 46, S. 836-845

117. MARCACCINI, A. M., MESCHIARI, C. A., ZUARDI, L. R., DE SOUSA, T. S., TABA, M., JR., TEOFILLO, J. M., JACOB-FERREIRA, A. L., TANUS-SANTOS, J. E., NOVAES, A. B., JR. & 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

118. MARCACCINI, A. M., NOVAES JR, A. B., MESCHIARI, C. A., SOUZA, S. L., PALIOTO, D. B., SORGI, C. A., FACCIOLI, L. H., TANUS-SANTOS, J. E. & 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

119. MARTIN-DE LAS HERAS, S., VALENZUELA, A. & OVERALL, C. M. (2000) The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Archives of Oral Biology* 45, S. 757-765

120. MATOS, L. L. D., STABENOW, E., TAVARES, M. R., FERRAZ, A. R., CAPELOZZI, V. L. & PINHAL, M. A. D. S. (2006) Immunohistochemistry quantification by a digital computer-assisted method compared to semiquantitative analysis. *Clinics* 61, S. 417-424

121. MAXOVA, H., BACAKOVA, L., LISA, V., NOVOTNA, J., TOMASOVA, H., VIZEK, M. & HERGET, J. (2010) Production of proteolytic enzymes in mast cells, fibroblasts, vascular smooth muscle and endothelial cells cultivated under normoxic or hypoxic conditions. *Physiological Research* 59, S. 711-719

122. MCCAWLEY, L. J. & MATRISIAN, L. M. (2000) Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Molecular Medicine Today* 6, S. 149-156

123. MCCAWLEY, L. J. & MATRISIAN, L. M. (2001) Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Current Opinion in Cell Biology* 13, S. 534-540

124. MELLANEN, L., LÄHDEVIRTA, J., TERVAHARTIALA, T., MEURMAN, J. H. & SORSA, T. (2006) Matrix metalloproteinase-7, -8, -9, -25, and -26 and CD43, -45, and -68 cell-markers in HIV-infected patients' saliva and gingival tissue. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 35, S. 530-539

125. MIAO, Q., BAUMGÄRTNER, W., FAILING, K. & ALLDINGER, S. (2003) Phase-dependent expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in demyelinating canine distemper encephalitis. *Acta Neuropathologica* 106, S. 486-494
126. MIHALJEVIC, S.-Y. (2009) Feline odontoclastic resorptive lesions (FORL): Radiologische Diagnostik und therapeutische Maßnahmen. *Praktischer Tierarzt* 90, S. 522-525
127. MIHALJEVIC, S. Y., KERNMAIER, A. & MERTENS-JENTSCH, S. (2011) Radiographic changes associated with tooth resorption type 2 in cats. *Journal of Veterinary Dentistry* 29, S. 20-26
128. MÖLLENBECK, S. (2004) Histologische Untersuchungen zu Frühveränderungen der Felinen Odontoklastischen Resorptiven Läsionen (FORL) an klinisch gesunden Zähnen. *Praktischer Tierarzt* 85, S. 174-181
129. MONTIER, Y., LORENTZ, A., KRÄMER, S., SELLGE, G., SCHOCK, M., BAUER, M., SCHUPPAN, D. & BISCHOFF, S. C. (2012) Central role of IL-6 and MMP-1 for cross talk between human intestinal mast cells and human intestinal fibroblasts. *Immunobiology* 217, S. 912-919
130. MUIR, P., DANOVA, N. A., ARGYLE, D. J., MANLEY, P. A. & HAO, Z. (2005) Collagenolytic protease expression in cranial cruciate ligament and stifle synovial fluid in dogs with cranial cruciate ligament rupture. *Veterinary Surgery* 34, S. 482-490
131. MURPHY, G. & KNÄUPER, V. (1997) Relating matrix metalloproteinase structure to function: Why the "hemopexin" domain? *Matrix Biology* 15, S. 511-518

132. MUZYLAK, M., ARNETT, T. R., PRICE, J. S. & HORTON, M. A. (2007) The in vitro effect of pH on osteoclasts and bone resorption in the cat: Implications for the pathogenesis of FORL. *Journal of Cellular Physiology* 213, S. 144-150
133. MUZYLAK, M., FLANAGAN, A. M., INGHAM, K., GUNN, N., PRICE, J. & HORTON, M. A. (2002) A feline assay using osteoclasts generated in vitro from peripheral blood for screening anti-resorptive agents. *Research in Veterinary Science* 73, S. 283-290
134. MUZYLAK, M., PRICE, J. & HORTON, M. (2006) Hypoxia Induces Giant Osteoclast Formation and Extensive Bone Resorption in the Cat. *Calcified Tissue International* 79, S. 301-309
135. NÆSSE, E. P., SCHREURS, O., HELGELAND, K., SCHENCK, K. & STEINSVOLL, S. (2003) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival mast cells in persons with and without human immunodeficiency virus infection. *Journal of Periodontal Research* 38, S. 575-582
136. NAGASE, H. (1997) Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biological Chemistry* 378, S. 151-160
137. NAGASE, H. & WOESSNER, J. F. (1999) Matrix Metalloproteinases. S. 21491-21494
138. NAKAE, S., SUTO, H., IIKURA, M., KAKURAI, M., SEDGWICK, J. D., TSAI, M. & GALLI, S. J. (2006) Mast Cells Enhance T Cell Activation: Importance of Mast Cell Costimulatory Molecules and Secreted TNF. *The Journal of Immunology* 176, S. 2238-2248

139. NAKAICHI, M., YUNUKI, T., OKUDA, M., UNE, S. & TAURA, Y. (2007) Activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in canine oronasal tumors. *Research in Veterinary Science* 82, S. 271-279
140. NEGRO, V. B., HERNANDEZ, S. Z., MARESCA, B. M. & LORENZO, C. E. (2004) Furcation canals of the maxillary fourth premolar and the mandibular first molar teeth in cats. *Journal of Veterinary Dentistry* 21, S. 10-14
141. NOMURA, T., TAKAHASHI, T. & HARA, K. (1993) Expression of TIMP-1, TIMP-2 and collagenase mRNA in periodontitis-affected human gingival tissue. *Journal of Periodontal Research* 28, S. 354-362
142. OH, J., TAKAHASHI, R., KONDO, S., MIZOGUCHI, A., ADACHI, E., SASAHARA, R. M., NISHIMURA, S., IMAMURA, Y., KITAYAMA, H., ALEXANDER, D. B., IDE, C., HORAN, T. P., ARAKAWA, T., YOSHIDA, H., NISHIKAWA, S.-I., ITOH, Y., SEIKI, M., ITOHARA, S., TAKAHASHI, C. & NODA, M. (2001) The Membrane-Anchored MMP Inhibitor RECK Is a Key Regulator of Extracellular Matrix Integrity and Angiogenesis. *Cell* 107, S. 789-800
143. OKUDA, A. & HARVEY, C. E. (1992) Etiopathogenesis of feline dental resorptive lesions. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 22, S. 1385-1404
144. ORSINI, P. & HENNET, P. (1992) Anatomy of the mouth and teeth of the cat. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 22, S. 1265-1277
145. OVIEDO-ORTA, E., BERMUDEZ-FAJARDO, A., KARANAM, S., BENBOW, U. & NEWBY, A. C. (2007) Comparison of MMP-2 and MMP-9 secretion from T helper 0, 1 and 2 lymphocytes alone and in coculture with macrophages. *Immunology* 124, S. 42-50

146. OYARZÚN, A., ARANCIBIA, R., HIDALGO, R., PEÑAFIEL, C., CÁCERES, M., GONZÁLEZ, M. J., MARTÍNEZ, J. & SMITH, P. C. (2010) Involvement of MT1-MMP and TIMP-2 in human periodontal disease. *Oral Diseases* 16, S. 388-395
147. PAGE-MCCAW, A., EWALD, A. J. & WERB, Z. (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, S. 221-233
148. PALOSAARI, H., PENNINGTON, C. J., LARMAS, M., EDWARDS, D. R., TJÄDERHANE, L. & SALO, T. (2003) Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *European Journal of Oral Sciences* 111, S. 117-127
149. PALTIAN, V. (2006) Immunhistologische Untersuchungen zur Expression von CD44, Matrix-Metalloproteinasen und ihren Inhibitoren in Mammatumoren von Hunden, Institut für Pathologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover (Dissertation)
150. PAUL, S. S. (2005) Vergleichende Untersuchungen über die Expression von Matrix-Metalloproteinasen und ihren Inhibitoren in senilen Plaques im zentralen Nervensystem alter Hunde und Menschen, Institut für Pathologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover (Dissertation)
151. PEI, D. & WEISS, S. J. (1995) Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 375, S. 244-247
152. PERALTA, S., VERSTRAETE, F. J. & KASS, P. H. (2010a) Radiographic evaluation of the classification of the extent of tooth resorption in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 71, S. 794-798

153. PERALTA, S., VERSTRAETE, F. J. & KASS, P. H. (2010b) Radiographic evaluation of the types of tooth resorption in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 71, S. 784-793

154. PETTERSSON, A. (2010) Tooth resorption in the Swedish Eurasian lynx (*Lynx lynx*). *Journal of Veterinary Dentistry* 27, S. 222-226

155. PETTERSSON, A. & MANNERFELT, T. (2003) Prevalence of dental resorptive lesions in Swedish cats. *Journal of Veterinary Dentistry* 20, S. 140-142

156. PETZNICK, A., EVANS, M. D., MADIGAN, M. C., GARRETT, Q. & SWEENEY, D. F. (2012) A preliminary study of changes in tear film proteins in the feline eye following nictitating membrane removal. *Veterinary Ophthalmology* 15, S. 164-171

157. PILCHER, B. K., DUMIN, J. A., SUDBECK, B. D., KRANE, S. M., WELGUS, H. G. & PARKS, W. C. (1997) The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *The Journal of Cell Biology* 137, S. 1445-1457

158. PILCHER, B. K., WANG, M. I. N., QIN, X.-J., PARKS, W. C., SENIOR, R. M. & WELGUS, H. G. (1999) Role of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibition in Cutaneous Wound Healing and Allergic Contact Hypersensitivity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 878, S. 12-24

159. POWER, C., ZHANG, K. & VAN MARLE, G. (2004) Comparative neurovirulence in lentiviral infections: The roles of viral molecular diversity and select proteases. *Journal of Neurovirology* 10 Suppl 1, S. 113-117

160. PUENTE, X. S., SANCHEZ, L. M., OVERALL, C. M. & LOPEZ-OTIN, C. (2003) Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nature reviews. Genetics* 4, S. 544-558

161. RAMOS-VARA, J. A. & BEISSENHERZ, M. E. (2000) Optimization of Immunohistochemical Methods using two Different Antigen Retrieval Methods on Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues: Experience with 63 Markers. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12, S. 307-311

162. RAWLINGS, N. D., TOLLE, D. P. & BARRETT, A. J. (2004) MEROPS: the peptidase database. S. D160-D164

163. REDLICH, M., REICHENBERG, E., HARARI, D., ZAKS, B., SHOSHAN, S. & PALMON, A. (2001) The Effect of Mechanical Force on mRNA Levels of Collagenase, Collagen Type I, and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Gingivae of Dogs. *Journal of Dental Research* 80, S. 2080-2084

164. REITER, A. L., KF (2005) Evaluation of calciotropic hormones in cats with odontoclastic resorptive lesions. *American Journal of Veterinary Research* 66, S. 1446-1452

165. REITER, A. M., LEWIS, J. R. & OKUDA, A. (2005) Update on the Etiology of Tooth Resorption in Domestic Cats. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 35, S. 913-942

166. REYNOLDS, J. J., HEMBRY, R. M. & MEIKLE, M. C. (1994) Connective tissue degradation in health and periodontal disease and the roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors. *Advances in Dental Research* 8, S. 312-319

167. REYNOLDS, J. J. & MEIKLE, M. C. (1997) Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontology* 2000 14, S. 144-157

168. ROES, F. (1996) Pathogenese, Diagnostik und Therapie bei neck lesions der Katze unter Verwendung von Glas-Ionomer-Zementen, Klinik für kleine Haustiere, Freie Universität Berlin, Berlin (Dissertation)

169. ROES, F. (2004) Pathohistologie der Zahnhartsubstanzzerstörung der Katze. *Praktischer Tierarzt* 85, S. 158-165

170. ROES, F., MAUEL, S. & RUDOLPH, R. (2008) CORL - Canine odontoclastic resorptive lesion - clinical and histopathological examination - comparison with FORL. *Kleintierpraxis* 53, S. 413-

171. ROUX, P., BERGER, M., STICH, H. & SCHAWALDER, P. (2009) Oral examination and radiographic evaluation of the dentition in wild cats from Namibia. *Journal of Veterinary Dentistry* 26, S. 16-22

172. ROUX, P., BERGER, M., STOFFEL, M., STICH, H., DOHERR, M. G., BOSSHARD, D. & SCHAWALDER, P. (2005) Observations of the periodontal ligament and cementum in cats with dental resorptive lesions. *Journal of Veterinary Dentistry* 22, S. 74-85

173. SADOWSKI, T. & STEINMEYER, J. (2001) Effects of non-steroidal antiinflammatory drugs and dexamethasone on the activity and expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by bovine articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* 9, S. 407-415

174. SALINARDI, B. J., ROUSH, J. K., SCHERMERHORN, T. & MITCHELL, K. E. (2006) Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in serum and synovial fluid of osteoarthritic dogs. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology: Vcot* 19, S. 49-55

175. SALOMON, F.-V. (2008) Verdauungsapparat, *apparatus digestorius*. In *Anatomie für die Tiermedizin*. Hrsg. SALOMON, F.-V., GEYER, H., GILLE, U. Stuttgart. S. 236-323

176. SCARLETT, J. M., SAIDLA, J. & HESS, J. (1999) Risk factors for odontoclastic resorptive lesions in cats. *Journal of the American Animal Hospital Association* 35, S. 188-192

177. SCHNECK, G. W. & OSBORN, J. W. (1976) Neck lesions in the teeth of cats. *The Veterinary Record* 99, S. 100

178. SEEGER, J., HOFFMANN, A., KACZA, J. & STAHL, T. (2007) *Histologische Übungen für die Tiermedizin*. Hannover, Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG

179. SENN, D., SCHWALDER, P., ROUX, P., BOSSHARDT, D. D. & STOFFEL, M. H. (2010) Immunohistochemical Localization of Osteoclastogenic Cell Mediators in Feline Tooth Resorption and Healthy Teeth. *Journal of Veterinary Dentistry* 27, S. 75-83

180. SILNESS, J. & LOE, H. (1964) Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontologica Scandinavica* 22, S. 121-135

181. SILNESS J., L. H. (1964) Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand.* 22, S. 121-135

182. SINICROPE, F. A., RUAN, S. B., CLEARY, K. R., STEPHENS, L. C., LEE, J. J. & LEVIN, B. (1995) bcl-2 and p53 Oncoprotein Expression during Colorectal Tumorigenesis. *Cancer Research* 55, S. 237-241

183. SOELL, M., ELKAIM, R. & TENENBAUM, H. (2002) Cathepsin C, matrix metalloproteinases, and their tissue inhibitors in gingiva and gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Dent Res* 81, S. 174-178

184. SOMERVILLE, R., OBLANDER, S. & APTE, S. (2003) Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biology* 4, S. 216

185. SORENSEN, K. C., KITCHELL, B. E., SCHAEFFER, D. J. & MARDIS, P. E. (2004a) Expression of matrix metalloproteinases in feline vaccine site-associated sarcomas. *American Journal of Veterinary Research* 65, S. 373-379

186. SORENSEN, K. C., KITCHELL, B. E., SIEGEL, A. M. & MARDIS, P. (2004b) Isolation, characterization, and expression of feline stromelysin-1 in naturally developing tumors in cats. *American Journal of Veterinary Research* 65, S. 213-219

187. SORSA, T., TJÄDERHANE, L. & SALO, T. (2004) Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Diseases* 10, S. 311-318

188. SOTTRUP-JENSEN, L. & BIRKEDAL-HANSEN, H. (1989) Human fibroblast collagenase-alpha-macroglobulin interactions. Localization of cleavage sites in the bait regions of five mammalian alpha-macroglobulins. *The Journal of Biological Chemistry* 264, S. 393-401

189. STAMENKOVIC, I. (2003) Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *The Journal of Pathology* 200, S. 448-464

190. STASZYK, C., BIENERT, A., KREUTZER, R., WOHLSEIN, P. & SIMHOFER, H. (2008) Equine odontoclastic tooth resorption and hypercementosis. *The Veterinary Journal* 178, S. 372-379

191. STERNLICHT, M. D. & WERB, Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 17, S. 463-516

192. STETLER-STEVENSON, W. G., KRUTZSCH, H. C. & LIOTTA, L. A. (1989) Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *The Journal of Biological Chemistry* 264, S. 17374-17378

193. SULKALA, M., LARMAS, M., SORSA, T., SALO, T. & TJÄDERHANE, L. (2002) The Localization of Matrix Metalloproteinase-20 (MMP-20, Enamelysin) in Mature Human Teeth. *Journal of Dental Research* 81, S. 603-607

194. SULKALA, M., TERVAHARTIALA, T., SORSA, T., LARMAS, M., SALO, T. & TJÄDERHANE, L. (2007) Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Archives of Oral Biology* 52, S. 121-127

195. SULKALA, M., WAHLGREN, J., LARMAS, M., SORSA, T., TERONEN, O., SALO, T. & TJÄDERHANE, L. (2001) The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. *Journal of Dental Research* 80, S. 1545-1549

196. TAKAHASHI, C., SHENG, Z., HORAN, T. P., KITAYAMA, H., MAKI, M., HITOMI, K., KITAURA, Y., TAKAI, S., SASAHARA, R. M., HORIMOTO, A., IKAWA, Y., RATZKIN, B. J.,

ARAKAWA, T. & NODA, M. (1998) Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, S. 13221-13226

197. TANZER, J. M., LIVINGSTON, J. & THOMPSON, A. M. (2001) The microbiology of primary dental caries in humans. *Journal of Dental Education* 65, S. 1028-1037

198. TERVAHARTIALA, T., PIRILÄ, E., CEPONIS, A., MAISI, P., SALO, T., TUTER, G., KALLIO, P., TÖRNWALL, J., SRINIVAS, R., KONTTINEN, Y. T. & 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

199. THOMÉ, H. (2004) Mundhöhle und Schlundkopf. In *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band II, Eingeweide*. Hrsg. NICKEL, R., SCHUMMER, A., SEIFERLE, E. Stuttgart, Parey. S. 19-102

200. TJADERHANE, L., LARJAVA, H., SORSA, T., UITTO, V. J., LARMAS, M. & SALO, T. (1998) The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *Journal of Dental Research* 77, S. 1622-1629

201. TJADERHANE, L., PALOSAARI, H., WAHLGREN, J., LARMAS, M., SORSA, T. & SALO, T. (2001) Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). *Advances in Dental Research* 15, S. 55-58

202. TOMITA, M., ANDO, T., MINAMI, M., WATANABE, O., ISHIGURO, K., HASEGAWA, M., MIYAKE, N., KONDO, S., KATO, T., MIYAHARA, R., OHMIYA, N., NIWA, Y. & GOTO, H. (2009) Potential role for matrix metalloproteinase-3 in gastric ulcer healing. *Digestion* 79, S. 23-29

203. TRIADAN, H. (1972) Tierzahnheilkunde: Zahnerhaltung (Füllungstherapie mit 'Composite materials' und Endodontie) bei Affen und Raubtieren. Schweiz Arch Tierheilkd 114, S. 292-316

204. TWINING, S. S., KIRSCHNER, S. E., MAHNKE, L. A. & FRANK, D. W. (1993) Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase, alkaline protease, and exotoxin A on corneal proteinases and proteins. Investigative Ophthalmology & Visual Science 34, S. 2699-2712

205. VAN LINT, P. & LIBERT, C. (2007) Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. Journal of Leukocyte Biology 82, S. 1375-1381

206. VAN WESSUM, R., HARVEY, C. E. & HENNET, P. (1992) Feline dental resorptive lesions. Prevalence patterns. The Veterinary clinics of North America. Small animal practice 22, S. 1405-1416

207. VERSTAPPEN, J. & VON DEN HOFF, J. W. (2006) Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs): Their Biological Functions and Involvement in Oral Disease. Journal of Dental Research 85, S. 1074-1084

208. VERSTRAETE, F. J. M., KASS, P. H. & TERPAK, C. H. (1998) Diagnostic value of full-mouth radiography in cats. American Journal of Veterinary Research 59, S. 692-695

209. VISSE, R. & NAGASE, H. (2003) Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. Circulation Research 92, S. 827-839

210. WADA, K., SATO, H., KINOH, H., KAJITA, M., YAMAMOTO, H. & SEIKI, M. (1998) Cloning of three *Caenorhabditis elegans* genes potentially encoding novel matrix metalloproteinases. *Gene* 211, S. 57-62

211. WALTER, I. & SCHONKYPL, S. (2006) Extracellular matrix components and matrix degrading enzymes in the feline placenta during gestation. *Placenta* 27, S. 291-306

212. WARHONOWICZ, M., STASZYK, C., ROHN, K. & GASSE, H. (2006) The equine periodontium as a continuously remodeling system: morphometrical analysis of cell proliferation. *Archives of Oral Biology* 51, S. 1141-1149

213. WELTMAN, B., VIG, K. W. L., FIELDS, H. W., SHANKER, S. & KAIZAR, E. E. (2010) Root resorption associated with orthodontic tooth movement: A systematic review. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 137, S. 462-476

214. WHITELOCK, J. M., MURDOCH, A. D., IOZZO, R. V. & UNDERWOOD, P. A. (1996) The Degradation of Human Endothelial Cell-derived Perlecan and Release of Bound Basic Fibroblast Growth Factor by Stromelysin, Collagenase, Plasmin, and Heparanases. *The Journal of Biological Chemistry* 271, S. 10079-10086

215. WOESSNER, J. (2002) MMPs and TIMPs—An historical perspective. *Molecular Biotechnology* 22, S. 33-49

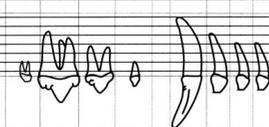
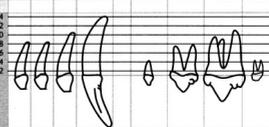
216. WOOLLEY, D. E., ROBERTS, D. R. & EVANSON, J. M. (1975) Inhibition of human collagenase activity by a small molecular weight serum protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 66, S. 747-754

217. WU, J.-L., GE, S.-Y., CAI, Z.-X., LIU, H., LIU, Y.-X., WANG, J.-H. & ZHANG, Q.-Q. (2014) Purification and characterization of a gelatinolytic matrix metalloproteinase from the skeletal muscle of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Food Chemistry* 145, S. 632-638
218. YOSHIHARA, Y., NAKAMURA, H., OBATA, K., YAMADA, H., HAYAKAWA, T., FUJIKAWA, K. & OKADA, Y. (2000) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 59, S. 455-461
219. YOUNG, D. A., PHILLIPS, B. W., LUNDY, C., NUTTALL, R. K., HOGAN, A., SCHULTZ, G. A., LECO, K. J., CLARK, I. M. & EDWARDS, D. R. (2002) Identification of an initiator-like element essential for the expression of the tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (Timp-4) gene. *Biochemical Journal* 364, S. 89-99
220. ZETNER, K. & STEURER, I. (1992) The influence of dry food on the development of feline neck lesions. *Journal of Veterinary Dentistry* 9, S. 4-6
221. ZETNER, K. & STEURER, I. (1995) Long-term results of restoration of feline resorptive lesions with micro-glass-composite. *Journal of Veterinary Dentistry* 12, S. 15-17
222. ZHAO, H., BERNARDO, M. M., OSENKOWSKI, P., SOHAIL, A., PEI, D., NAGASE, H., KASHIWAGI, M., SOLOWAY, P. D., DECLERCK, Y. A. & FRIDMAN, R. (2004) Differential Inhibition of Membrane Type 3 (MT3)-Matrix Metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 Regulates Pro-MMP-2 Activation. *The Journal of Biological Chemistry* 279, S. 8592-8601
223. ZIVKOVIC, R., ALEKSANDRA, M. L., LJILJANA, T. S. & ILIC, J. (2010) Biomechanical Aspect of Feline Dental Resorptive Lesions Formation. *Acta Veterinaria* 60, S. 303-311

224. ZIVKOVIC, R., TODOROVIC, A., TIHACEK, S. L. & MILIC, L. A. (2011) Identifying Enamel Diffusion Properties in Feline Teeth Affected with Resorptive Lesions. *Acta Veterinaria* 61, S. 653-662



### Parodontalbefund/FORL (neck lesions)

<b>RECHTS</b>																																																											
	Zahnstein Gingivitis Stomatitis Faucitis FORL Kl.1 oder 2 FORL Kl.3, Pulpeneröffnung FORL Kl.4, Wurzelrest		Zahnstein Gingivitis Stomatitis Faucitis FORL Kl.1 oder 2 FORL Kl.3, Pulpeneröffnung FORL Kl.4, Wurzelrest		<b>LINKS</b>																																																						
14 12 10 8 6 4 2		14 12 10 8 6 4 2		14 12 10 8 6 4 2	14 12 10 8 6 4 2																																																						
	<table border="0" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">109</td><td style="text-align: center;">108</td><td style="text-align: center;">107</td><td style="text-align: center;">106</td><td style="text-align: center;">105</td><td style="text-align: center;">104</td><td style="text-align: center;">103</td><td style="text-align: center;">102</td><td style="text-align: center;">101</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">M<sub>1</sub></td><td style="text-align: center;">P<sub>4</sub></td><td style="text-align: center;">P<sub>3</sub></td><td style="text-align: center;">P<sub>2</sub></td><td style="text-align: center;">P<sub>1</sub></td><td style="text-align: center;">C</td><td style="text-align: center;">I<sub>1</sub></td><td style="text-align: center;">I<sub>2</sub></td><td style="text-align: center;">I<sub>1</sub></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">409</td><td style="text-align: center;">408</td><td style="text-align: center;">407</td><td style="text-align: center;">406</td><td style="text-align: center;">405</td><td style="text-align: center;">404</td><td style="text-align: center;">403</td><td style="text-align: center;">402</td><td style="text-align: center;">401</td> </tr> </table>	109	108	107	106	105	104	103	102	101	M <sub>1</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	C	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	I <sub>1</sub>	409	408	407	406	405	404	403	402	401		<table border="0" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">201</td><td style="text-align: center;">202</td><td style="text-align: center;">203</td><td style="text-align: center;">204</td><td style="text-align: center;">205</td><td style="text-align: center;">206</td><td style="text-align: center;">207</td><td style="text-align: center;">208</td><td style="text-align: center;">209</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">I<sub>1</sub></td><td style="text-align: center;">I<sub>2</sub></td><td style="text-align: center;">I<sub>3</sub></td><td style="text-align: center;">C</td><td style="text-align: center;">P<sub>1</sub></td><td style="text-align: center;">P<sub>2</sub></td><td style="text-align: center;">P<sub>3</sub></td><td style="text-align: center;">P<sub>4</sub></td><td style="text-align: center;">M<sub>1</sub></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">301</td><td style="text-align: center;">302</td><td style="text-align: center;">303</td><td style="text-align: center;">304</td><td style="text-align: center;">305</td><td style="text-align: center;">306</td><td style="text-align: center;">307</td><td style="text-align: center;">308</td><td style="text-align: center;">309</td> </tr> </table>	201	202	203	204	205	206	207	208	209	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	I <sub>3</sub>	C	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>	M <sub>1</sub>	301	302	303	304	305	306	307	308	309	14 12 10 8 6 4 2	14 12 10 8 6 4 2
109	108	107	106	105	104	103	102	101																																																			
M <sub>1</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>	C	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	I <sub>1</sub>																																																			
409	408	407	406	405	404	403	402	401																																																			
201	202	203	204	205	206	207	208	209																																																			
I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	I <sub>3</sub>	C	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>	M <sub>1</sub>																																																			
301	302	303	304	305	306	307	308	309																																																			
2 4 6 8 10 12 14		2 4 6 8 10 12 14		2 4 6 8 10 12 14	2 4 6 8 10 12 14																																																						

#### Kieferorthopädische Analyse

Schädeltyp:    brachycephal                       mesocephal   
                   asymmetrisch

Bissverhältnisse:    obB     entspr. Rassestandard

#### Kieferfehlstellungen

Skelettaler Distalbiss (UK-Verkürzung)    X    XX    XXX

Skelettaler Mesialbiss (UK-Verlängerung)   

mit Okklusionsbehinderung   

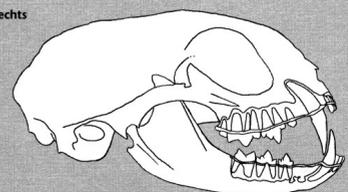
Caninusdeviation   

Besondere Befunde:

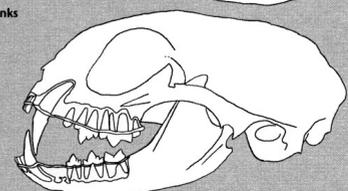
#### Schädeltrauma

Symphysentrennung  
 Kieferfraktur  
 Kieferluxation

rechts



links



© by PHARMACIA GmbH 91051 Erlangen · Telefon (091 31) 6 21-7 32/7 33 · Telefax (091 31) 6 21-7 30 · nach DDr. Fahrenkrug

## **9.2 Bezugsquellen verwendeter Medikamente und Untersuchungsmaterialien**

### **Albrecht, Aulendorf**

Isoflo®

### **B. Braun Melsungen AG, Melsungen**

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

### **Comet AG, Liebefeld, Schweiz**

X-Ray Collimator Type Collimat M

### **Firma Ethicon, Johnson&Johnson, Norderstedt**

Monocryl 4-0 (1.5 Ph. Eur.) FS-2 (19mm 3/8c) 45cm

### **Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim**

Dolorex® 10mg/ml Injektionslösung für Pferde, Hunde und Katzen

### **kai Europe GmbH, Solingen**

Einmal Biopsie-Stanze, Durchmesser 3mm

### **Medistar® Arzneimittelvertrieb GmbH, Ascheberg**

Ketamin 10% Injektionslösung für Hunde und Katzen

### **Ratiopharm GmbH, Ulm**

Diazepam-ratiopharm® 10mg/2ml Injektionslösung

### **Vetoquinol GmbH, Ravensburg**

Alfaxan® 10mg/ml Injektionslösung für Hunde und Katzen

### **Zoetis Deutschland GmbH (vorher Pfizer), Berlin**

Dorbene ad us vet.® 1mg/ml Injektionslösung für Hunde und Katzen

Parodontalsonde

Zahnsonde

### 9.3 Lösungen und Puffer für die Immunhistologie

#### **DAB (3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-dihydrat):**

0,1g DAB ad 200ml PBS auf dem Magnetrührer mischen + 250µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### **85% Ethanol mit 0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:**

197 ml 85% Ethanol und 3 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf dem Magnetrührer mischen.

#### **PBS (phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung):**

40g NaCl und 8,8g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat und 4950ml Aqua dest auf dem Magnetrührer mischen. Den pH mit ca. 52 ml Natronlauge auf 7,0-7,2 einstellen.

#### **Ziegennormalserum:**

Frisches Vollblut für 5 Stunden im Kühlschrank lagern, Serum abpipettieren und zentrifugieren (30 min, 190 x G). Überstehendes Serum abpipettieren, für 30 Minuten im Wasserbad (56°C) zur Inaktivierung von Komplementkomponenten inkubieren. Portionieren und lagern bei -20°C.

### 9.4 Hersteller und Bezugsquellen verwendeter Materialien

#### **Biologo, Dr. Hartmut Schultheiß e.K., Immunbiologische Produkte, Kronshagen**

Aszitesflüssigkeit von nicht-immunisierten Balb/cJ Mäusen, CL8100

#### **Roth C. GmbH & Co. KG, Karlsruhe**

Essigsäurebutylester (EBE), 4600

Ethanol, vergällt, K928.2

Hämalaunlösung sauer nach Mayer, T865.2

2-Propanol (Isopropanol), 9866.2

Natriumchlorid, P029.2

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, K300.2

Roticlear®, A5381

Roti®-Histokitt II, T160.2

Roti®-Plast, Gewebereinbettungsmedium, 6642.6

Rotiprotect®-Nitrilhandschuhe, P777.1

Toluidinblau O, 0300.2

Wasserstoffperoxid, 8070.1

**Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen**

Bovines Serumalbumin (BSA), A-3059

3,3'-Diaminobenzidine-tetrahydrochloride Dihydrate (DAB), 32750

Kaninchenserum, R4505

**Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich**

MMP-2 (72kDa Collagenase IV) Ab-1 (Clone CA4001)

**Triple Point Biologics, Inc., Forest Grove, Oregon, USA**

RP1-MMP-1: Rabbit Antibody to Interstitial Collagenase (MMP-1); Hemopexin domain

SPA-MMP-8: Superpool of domain-specific rabbit polyclonal antibodies to human MMP-8

RM105-MMP-9: Rabbit Antibody to Gelatinase-B (MMP-9); full length MMP-9 Native Protein

RP3-TIMP-1: Rabbit Antibody to TIMP-1 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases);  
Carboxyterminal region

RP2-TIMP-2: Rabbit Antibody to TIMP-2 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases); Loop #1

**Vector Laboratories Inc., Burlingame, Kalifornien, USA, über Biologo, Kronshagen:**

Biotiniliertes Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin, BA 1000

Biotiniliertes Ziege-anti-Maus-Immunglobulin, BA 9200

Vectastain®Elite®ABC-Kit, PK 6100

## **9.5 Hersteller und Bezugsquellen verwendeter Laborgeräte**

**Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde**

Automat-Star Deckgläser für Mikroskopie (24 x 40 mm)

Starfrost® Objektträger

**Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig**

Superfrost®Plus Objektträger, 041300

**Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel**

Paraffinstreckbad 1052

**Heraeus Sepatech GmbH, Osterode**

Zentrifuge Labofuge®A, 2500

**Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch**

Färbegerät Leica ST 4040

**Leitz Biomed, Wetzlar**

Binokulares Lichtmikroskop, Typ 020-507.010

**Microm, Heidelberg**

HM 350, halbautomatisches Mikrotom

**Medite Medizintechnik, Burgdorf**

Objekträger-Eindeckautomat Promounter RCM 2000

**Olympus, Hamburg**

Olympus BX 51 Mikroskop,

Olympus DP 72 Mikroskopkamera mit U-CMAD3 Videoadapter

**Sarstedt AG & Co., Nümbrecht**

Mikro-Röhren 2,0ml mit Schraubverschluss, Bestellnr. 72.694.406

**Sartorius AG, Göttingen**

Elektronische Präzisionswaage LA 2200P

**Thermo Electron GmbH, Dreieich**

Shandon Coverplates™, 72110013

Shandon Sequenza® Slide Racks (Einsätze für Coverplates), 7331017

**Vogel GmbH & Co. Kg, Gießen**

TissueTec® TEC™ 5, Einbettssystem

## 9.7 Auswertungsbögen für die HE-Schnitte und Immunhistochemie

<b>MMPs und TIMPs auf Katzensgingiva</b> Auswertung der Schnitte Dissertation Isabelle Ritz <span style="float: right;">Datum:</span>	
<hr/>	
<b>HE-Schnitt / Kennzeichnung:</b>	
<hr/>	
<b>Qualität &amp; Auswertbarkeit</b>	
<b>Morphologische Beschreibung</b>	
<b>Infiltrierende Entzündungszellen</b>	
<b>Grad der entzündlichen Veränderungen</b>	
<b>Pathohistologische Diagnose</b>	
<b>Kommentare</b>	

**MMPs und TIMPs auf Katzensgingiva**

Auswertung der Schnitte

Dissertation Isabelle Ritz

Datum:

<b>Proben- und Schnittnummer:</b>	<b>Antikörper:</b>
<b>Diagnose und Nummer HE-Schnitt:</b>	
<b>Positivkontrolle:</b>	<b>Negativkontrolle:</b>

**Vergößerung 40x:**

Positive Zellen:	Anzahl (0-4, A)	Intensität (0-3, I)	Immunhistologischer Score
<b>Epithel</b> <i>Gesamt</i>			
<i>Stratum basale</i>			
<b>Lamina Propria</b> <i>Gesamt</i>			
<i>Entzündungszellen</i>			
<i>Fibroblasten</i>			
<i>Perivaskulär</i>			
<i>Endothel</i>			
<i>Mastzellen</i>			
<b>Periost / Alveolarknochenbereich</b> (falls vorhanden)			

**Notizen, Skizzen o.ä.:**

## 9.8 Tabellen zur Übersicht über Patienten und statistische Auswertung

**Tabelle 18: Übersicht über die untersuchten Patienten mit klinischen und pathohistologischen Befunden sowie Diagnosen in Kurzform. K in Patientenummer steht für Katze, Zahl nach Untersuchungsdatum fortlaufend von 1-55. EKH = Mischling der Europäisch Kurzhaar; m = männlich, mk = männlich-kastriert, m/w = Tier sowohl mit Hoden als auch Eierstöcken, w = weiblich, wk = weiblich-kastriert; Typ der RL: 0 = keine RL, 1 = Typ 1, 2 = Typ 2; Parodontitis: 0 = parodontal gesund, 1 = geringgradige Parodontitis, 2 = mittelgradige Parodontitis, 3 = hochgradige Parodontitis; Gingivitis: 0 = keine Gingivitis, 1 = geringgradige Gingivitis, 2 = mittelgradige Gingivitis, 3 = hochgradige Gingivitis; Pathohistologische Diagnose: 0 = keine Entzündungszellen, 1 = vereinzelte Entzündungszellen, 2 = geringgradige Gingivitis, 3 = mittelgradige Gingivitis, 4 = hochgradige Gingivitis; \* = nicht vorhandene Werte**

Patient Nummer	Alter in Monaten	Geschlecht	Rasse	Typ der RL	Parodontitis	Gingivitis	Pathohistologische Diagnose
K1	31	wk	Siam	0	2	2	1
K2	168	mk	EKH	0	0	1	2
K3	79	mk	EKH	2	0	0	0
K4	156	wk	EKH	2	0	0	0
K5	156	wk	EKH	2	0	0	2
K6	137	mk	EKH	2	0	0	1
K7	128	mk	EKH	0	0	1	1
K8	45	wk	EKH	0	0	1	1
K9	*	wk	Türkisch Angora	1	2	1	1
K10	109	wk	EKH	2	0	1	3
K11	106	mk	EKH	0	0	0	2
K12	54	mk	Ragdoll	2	0	0	1
K13	54	m/w	EKH	2	0	0	1
K14	138	mk	EKH	1	2	1	3
K15	102	mk	EKH	1	3	3	3

## 9 ANHANG

Patient Nummer	Alter in Monaten	Geschlecht	Rasse	Typ der RL	Parodontitis	Gingivitis	Pathohistologische Diagnose
K16	96	mk	EKH	1	1	1	2
K17	15	mk	EKH	0	0	0	3
K18	78	mk	EKH	0	0	0	1
K19	57	mk	EKH	1	0	1	1
K20	37	mk	EKH	0	0	1	1
K21	127	mk	EKH	2	0	1	2
K22	78	wk	EKH	2	0	1	2
K23	56	mk	EKH	0	0	0	0
K24	74	wk	EKH	1	3	2	3
K25	83	mk	EKH	1	2	2	4
K26	88	wk	Siam	1	3	2	2
K27	56	wk	Siam	1	3	3	4
K28	84	mk	EKH	0	0	2	0
K29	154	mk	Türk. Angora	2	0	1	2
K30	163	mk	EKH	2	0	1	4
K31	71	mk	EKH	1	2	2	3
K32	37	mk	Türk. Angora	0	0	1	0
K33	12	mk	Perser	0	0	1	0
K34	91	mk	EKH	0	1	2	3
K35	59	wk	EKH	0	0	0	0
K36	59	wk	EKH	1	2	2	1
K37	104	mk	Maine Coon	0	0	0	1
K38	47	mk	Perser	0	0	0	3
K39	108	mk	Maine Coon	2	0	1	2
K40	108	wk	Maine Coon	2	0	1	1
K41	60	mk	EKH	0	0	0	0

## 9 ANHANG

Patient Nummer	Alter in Monaten	Geschlecht	Rasse	Typ der RL	Parodontitis	Gingivitis	Pathohistologische Diagnose
K42	63	mk	EKH	0	0	1	1
K43	63	mk	EKH	1	3	2	3
K44	58	mk	EKH	0	0	0	0
K45	92	mk	Maine Coon	2	2	0	4
K46	129	wk	EKH	2	0	0	3
K47	95	mk	EKH	2	0	0	4
K48	13	wk	EKH	0	1	3	3
K49	105	mk	EKH	0	0	1	2
K50	42	m	Maine Coon	1	3	3	4
K51	110	w	Maine Coon	1	1	1	4
K52	123	mk	Perser	1	1	2	2
K53	81	wk	EKH	0	0	0	0
K54	63	mk	EKH	0	0	2	0
K55	74	mk	Maine Coon	0	2	3	4

**Tabelle 19: Übersicht der dreifaktoriellen Varianzanalyse nach Wald-Test. RL = resorptive Läsionen, MMP = Matrix-Metalloproteinase, TIMP = Tissue Inhibitor of Metalloproteinases, E = Enzym, L = Lokalisation.**

Parameter	Parameter kurz	Schätzwert	Standardfehler	Z-Score	p-Wert
<b>Konstante</b>	CONSTANT	0,7361	0,030979	237.617	<0,0001
<b>Gesund</b>	Gruppe 1	0,03234	0,04204	0,7692	=0,44
<b>RL Typ 1</b>	Gruppe 2	-0,00905	0,045034	-0,2009	=0,84
<b>RL Typ 2</b>	Gruppe 3	-0,02329	0,0443	-0,5257	=0,6
<b>MMP-1</b>	E1	0,02157	0,018889	11.417	=0,25
<b>MMP-2</b>	E2	0,30545	0,018922	161.424	<0,0001
<b>MMP-8</b>	E3	-0,34864	0,01923	-181.302	<0,0001
<b>TIMP-1</b>	E4	0,2116	0,018902	111.945	<0,0001
<b>TIMP-2</b>	E5	-0,18997	0,019161	-99.148	<0,0001
<b>Epithelzellscore</b>	L1	0,3117	0,024534	127.048	<0,0001
<b>Basalzellscore</b>	L2	0,30582	0,024569	124.473	<0,0001
<b>Lamina propria Score</b>	L3	0,0625	0,024525	25.483	=0,012
<b>Fibrozyten/-blastenscore</b>	L4	-0,18118	0,025672	-70.576	<0,0001
<b>Endothelzell-score</b>	L5	0,24813	0,024525	101.173	<0,0001
<b>Entzündungszell-score</b>	L6	-0,11681	0,025842	-45.202	<0,0001
<b>Perivaskuläre Infiltrate Score</b>	L7	-0,13667	0,026421	-51.728	<0,0001
<b>Mastzellscore</b>	L8	-0,49348	0,025071	-196.832	<0,0001
	E1.L1	-0,03948	0,048881	-0,8077	=0,42
	E1.L2	0,07873	0,048899	16.100	=0,11
	E1.L3	0,01143	0,048876	0,2338	=0,82
	E1.L4	-0,02317	0,049858	-0,4647	=0,64
	E1.L5	0,07842	0,048876	16.045	=0,11
	E1.L6	0,0879	0,051302	17.133	=0,087
	E1.L7	0,00867	0,053236	0,1629	=0,87
	E1.L8	-0,20249	0,049513	-40.897	<0,0001
	E2.L1	-0,0837	0,048894	-17.120	=0,087

## 9 ANHANG

Parameter	Parameter kurz	Schätzwert	Standardfehler	Z-Score	p-Wert
	E2.L2	0,02757	0,048911	0,5637	=0,57
	E2.L3	0,06855	0,048889	14.021	=0,16
	E2.L4	0,20014	0,049867	40.134	=0,0001
	E2.L5	0,0436	0,048889	0,8918	=0,37
	E2.L6	0,09647	0,051714	18.655	=0,062
	E2.L7	0,0951	0,05375	17.693	=0,077
	E2.L8	-0,65022	0,060964	-106.655	<0,0001
	E3.L1	0,05024	0,049015	10.251	=0,31
	E3.L2	-0,0618	0,049032	-12.605	=0,21
	E3.L3	-0,00466	0,049011	-0,0951	=0,92
	E3.L4	-0,10852	0,053422	-20.314	=0,042
	E3.L5	-0,07638	0,049011	-15.584	=0,12
	E3.L6	-0,05653	0,053131	-10.640	=0,29
	E3.L7	-0,03725	0,053411	-0,6974	=0,49
	E3.L8	-0,35532	0,061735	-57.555	<0,0001
	E4.L1	0,06234	0,048887	12.752	=0,202
	E4.L2	0,04846	0,048904	0,9908	=0,32
	E4.L3	-0,07167	0,048883	-14.662	=0,14
	E4.L4	-0,17084	0,052602	-32.479	=0,0012
	E4.L5	-0,03223	0,048883	-0,6594	=0,51
	E4.L6	-0,12091	0,050024	-24.170	=0,016
	E4.L7	-0,01093	0,050726	-0,2156	=0,83
	E4.L8	-0,05952	0,050701	-11.740	=0,24
	E5.L1	0,0106	0,049621	0,2136	=0,83
	E5.L2	-0,09295	0,049893	-18.630	=0,063
	E5.L3	-0,00364	0,049553	-0,0735	=0,94
	E5.L4	0,1024	0,050544	20.259	=0,043
	E5.L5	-0,01341	0,049553	-0,2706	=0,79
	E5.L6	-0,00693	0,051838	-0,1337	=0,89
	E5.L7	-0,05559	0,052573	-10.573	=0,29
	E5.L8	0,05952	0,050701	11.740	=0,24

**Tabelle 20:** Dargestellt sind die jeweiligen p-Werte des Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten sowie des Kruskal-Wallis-Test, bezogen auf die pathohistologischen Diagnosen als Gruppeneinteilung. Die Werte des Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten gelten für monotone, die des Kruskal-Wallis-Test für nicht-monotone Zusammenhänge. Fett dargestellt sind diejenigen p-Werte, welche signifikant oder hochsignifikant sind. M = Matrix-Metalloproteinase, T = Tissue Inhibitor of Metalloproteinase, Ep = Epithel, Bz = Basalzellen, Lp = Lamina propria, Fzb = Fibrozyten/-blasten, End = Endothel, Ent = Entzündungszellen, peri = perivaskuläre Infiltrate, Mast = Mastzellen, Sc = Score.

Variable	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman		Kruskal-Wallis-Test	Zusammenhang	
	Wert $r_s$	p-Wert	p-Wert	monoton	nicht-monoton
M1EpSc			<b>0,0019</b>		X
M1BzSc			<b>0,0077</b>		X
M1LpSc			<b>0,0003</b>		X
M1FzbSc			<b>0,0430</b>		X
M1EndSc			<b>0,0079</b>		X
M1EntSc			<b>0,0103</b>		X
M1periSc			<b>0,0002</b>		X
M1MastSc	-0,1234	0,3739		x	
M2EpSc	0,1792	0,1905		x	
M2BzSc	0,1588	0,2468		x	
M2LpSc			<b>0,0077</b>		X
M2FzbSc			0,7805		X
M2EndSc	0,1439	0,2947		x	
M2EntSc			<b>0,0017</b>		X
M2periSc			<b>0,0103</b>		X
M2MastSc	0,0226	0,8699		x	
M8EpSc			0,2684		X
M8BzSc			0,4487		X
M8LpSc			0,1566		X
M8FzbSc			0,6955		X
M8EndSc			0,3588		X
M8EntSc			0,3017		X
M8periSc			0,2781		X
M8MastSc			0,6014		x
T1EpSc			0,3759		x
T1BzSc			0,6431		x

Variable	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman		Kruskal-Wallis-Test	Zusammenhang	
	Wert $r_s$	p-Wert	p-Wert	monoton	nicht-monoton
T1LpSc			0,2330		x
T1FzbSc			0,2221		x
T1EndSc			0,2439		x
T1EntSc			0,2118		x
T1periSc			0,5043		x
T1MastSc			0,2490		x
T2EpSc			0,5202		x
T2BzSc	-0,0988	0,4861		x	
T2LpSc	-0,2803	<b>0,0420</b>		x	
T2FzbSc			<b>0,0421</b>		x
T2EndSc	-0,2227	0,1089		x	
T2EntSc	-0,2022	0,1682		x	
T2periSc	-0,1776	0,2322		x	
T2MastSc			0,8212		x

**Tabelle 21: Übersicht über die Mittelwerte, Standardabweichungen, -fehler, Variationskoeffizienten sowie kleinste und größte ermittelte Werte mit Z-Scores der ermittelten immunhistologischen Intensitäten und Anzahl der positiv markierten Zellen und deren immunhistologischer Scores. M = Matrix-Metalloproteinase, T = Tissue Inhibitor of Metalloproteinase, Ep = Epithel, Bz = Basalzellen, Lp = Lamina propria, Fzb = Fibrozyten/-blasten, End = Endothel, Ent = Entzündungszellen, peri = perivaskuläre Infiltrate, Mast = Mastzellen, A = Anzahl der positiv markierten Zellen, I = Intensität der immunhistochemischen Reaktion, Sc = immunhistologischer Score.**

Variable	Vorkommen	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	Variationskoeffizient	Kleinster Wert	Z-Score	Größter Wert	Z-Score
M1EpA	55	3,5273	1,2598	0,16988	0,35717	0	-2,8	4	0,38
M1Epl	55	2,0364	0,96155	0,12966	0,47219	0	-2,12	3	1
M1BzA	55	3,4727	1,3451	0,18138	0,38735	0	-2,58	4	0,39
M1Bzl	55	2,2	1,0784	0,14541	0,49019	0	-2,04	3	0,74
M1LpA	55	2,6	1,2263	0,16535	0,47164	0	-2,12	4	1,14
M1Lpl	55	2	0,92296	0,12445	0,46148	0	-2,17	3	1,08
M1FzbA	54	1,7222	1,3235	0,1801	0,76847	0	-1,3	4	1,72
M1Fzbl	54	1,4815	1,0414	0,14172	0,70296	0	-1,42	3	1,46
M1EndA	55	3,2364	1,2905	0,17401	0,39874	0	-2,51	4	0,59
M1Endl	55	2,2364	0,96155	0,12966	0,42996	0	-2,33	3	0,79
M1EntA	49	2,1633	1,4484	0,20691	0,66953	0	-1,49	4	1,27
M1Entl	49	1,8367	1,1609	0,16585	0,63207	0	-1,58	3	1
M1periA	45	1,9556	1,4609	0,21778	0,74707	0	-1,34	4	1,4

Variable	Vorkommen	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	Variationskoeffizient	Kleinster Wert	Z-Score	Größter Wert	Z-Score
M1peril	45	1,6889	1,2214	0,18208	0,72322	0	-1,38	3	1,07
M1MastA	54	0,27778	0,71154	0,09683	2,5615	0	-0,39	3	3,83
M1MastI	54	0,18519	0,43758	0,05955	2,3629	0	-0,42	2	4,15
M1A1vA	15	3,0667	1,387	0,35813	0,45229	0	-2,21	4	0,67
M1A1vI	15	2,3333	1,0465	0,27021	0,44882	0	-2,23	3	0,64
M2EpA	55	3,8364	0,63139	0,08514	0,16458	0	-6,08	4	0,26
M2EpI	55	2,4909	0,79052	0,10659	0,31736	0	-3,15	3	0,64
M2BzA	55	3,8545	0,62118	0,08376	0,16115	0	-6,21	4	0,23
M2BzI	55	2,6727	0,74671	0,10069	0,27938	0	-3,58	3	0,44
M2LpA	55	3,3273	0,90379	0,12187	0,27163	0	-3,68	4	0,74
M2LpI	55	2,6	0,73635	0,09915	0,28283	0	-3,54	3	0,54
M2FzBzA	54	3	1,1327	0,15414	0,37757	0	-2,65	4	0,88
M2FzBzI	54	2,5926	0,83595	0,11376	0,32244	0	-3,1	3	0,49
M2EndA	55	3,6545	0,79857	0,10768	0,21851	0	-4,58	4	0,43
M2EndI	55	2,7273	0,65134	0,08783	0,23882	0	-4,19	3	0,42
M2EntA	48	2,875	1,3148	0,18978	0,45732	0	-2,19	4	0,86
M2EntI	48	2,375	0,98121	0,14162	0,41314	0	-2,42	3	0,64
M2periA	44	2,9091	1,2726	0,19185	0,43745	0	-2,29	4	0,86
M2peril	44	2,3864	0,99337	0,14976	0,41627	0	-2,4	3	0,62
M2MastA	55	0,4	0,7841	0,10573	1,9603	0	-0,51	3	3,32
M2MastI	55	0,34545	0,72567	0,09785	2,1006	0	-0,48	3	3,66
M2A1vA	21	3	1,2649	0,27603	0,42164	0	-2,37	4	0,79

Variable	Vorkommen	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	Variationskoeffizient	Kleinster Wert	Z-Score	Größter Wert	Z-Score
M2Alvl	21	2,4286	0,92582	0,20203	0,38122	0	-2,62	3	0,62
M8EpA	55	2,7818	1,6181	0,21818	0,58166	0	-1,72	4	0,75
M8Epl	55	1,5455	1,015	0,13687	0,65679	0	-1,52	3	1,43
M8BzA	55	2,3636	1,8794	0,25341	0,79511	0	-1,26	4	0,87
M8Bzl	55	1,2909	1,1654	0,15715	0,90281	0	-1,11	3	1,47
M8LpA	55	1,7091	1,37	0,18472	0,80157	0	-1,25	4	1,67
M8Lpl	55	1,1818	0,98302	0,13255	0,83179	0	-1,2	3	1,85
M8Fzba	45	0,31111	0,76343	0,11381	2,4539	0	-0,41	3	3,52
M8Fzbl	45	0,26667	0,61791	0,09211	2,3172	0	-0,43	2	2,81
M8EndA	55	2,2	1,7363	0,23413	0,78924	0	-1,27	4	1,04
M8Endl	55	1,2364	1,088	0,14671	0,88004	0	-1,14	3	1,62
M8EntA	45	0,62222	0,91176	0,13592	1,4653	0	-0,68	3	2,61
M8Entl	45	0,71111	0,96818	0,14433	1,3615	0	-0,73	3	2,36
M8perlA	45	0,62222	0,88649	0,13215	1,4247	0	-0,7	3	2,68
M8peril	45	0,73333	1,009	0,15042	1,376	0	-0,73	3	2,25
M8mastA	51	0,78431	1,1544	0,16164	1,4718	0	-0,68	4	2,79
M8mastl	51	0,58824	0,8044	0,11264	1,3675	0	-0,73	3	3
M8AlvA	30	2,0333	1,3767	0,25136	0,67708	0	-1,48	4	1,43
M8Alvl	30	1,6667	1,1842	0,2162	0,71051	0	-1,41	3	1,13
T1EpA	55	3,7091	0,93636	0,12626	0,25245	0	-3,96	4	0,31
T1Epl	55	2,6182	0,82756	0,11159	0,31608	0	-3,16	3	0,46
T1BzA	55	3,7636	0,92223	0,12435	0,24504	0	-4,08	4	0,26

Variable	Vorkommen	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	Variationskoeffizient	Kleinster Wert	Z-Score	Größter Wert	Z-Score
T1Bzl	55	2,5636	0,87694	0,11825	0,34207	0	-2,92	3	0,5
T1LpA	55	2,7091	1,1332	0,1528	0,4183	0	-2,39	4	1,14
T1Lpl	55	2,4364	0,9182	0,12381	0,37687	0	-2,65	3	0,61
T1Fzba	47	1,8298	1,4343	0,20922	0,78389	0	-1,28	4	1,51
T1Fzbl	47	1,766	1,2373	0,18048	0,70066	0	-1,43	3	1
T1EndA	55	3,2545	1,2505	0,16861	0,38422	0	-2,6	4	0,6
T1Endl	55	2,5091	0,9204	0,12411	0,36683	0	-2,73	3	0,53
T1EntA	53	2,0943	1,1972	0,16445	0,57163	0	-1,75	4	1,59
T1Entl	53	2,2453	1,0173	0,13973	0,45307	0	-2,21	3	0,74
T1perlA	52	2,3462	1,2189	0,16903	0,51952	0	-1,92	4	1,36
T1peril	52	2,3462	1,0457	0,14501	0,44571	0	-2,24	3	0,63
T1MastA	49	2,102	1,6104	0,23006	0,76613	0	-1,31	4	1,18
T1Mastl	49	1,7959	1,3067	0,18667	0,7276	0	-1,37	3	0,92
T1A1vA	31	2,7419	1,1538	0,20722	0,42079	0	-2,38	4	1,09
T1A1vl	31	2,5806	0,95827	0,17211	0,37133	0	-2,69	3	0,44
T2EpA	53	2,7358	1,6071	0,22075	0,58742	0	-1,7	4	0,79
T2Epl	53	1,717	1,1828	0,16248	0,68891	0	-1,45	3	1,08
T2BzA	52	2,4038	1,7406	0,24138	0,7241	0	-1,38	4	0,92
T2Bzl	52	1,5192	1,2286	0,17037	0,80869	0	-1,24	3	1,21
T2LpA	53	1,8302	1,4242	0,19563	0,77816	0	-1,29	4	1,52
T2Lpl	53	1,6792	1,2212	0,16774	0,72722	0	-1,38	3	1,08
T2Fzba	52	1,3077	1,6153	0,22401	1,2353	0	-0,81	4	1,67

Variable	Vorkommen	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	Variationskoeffizient	Kleinster Wert	Z-Score	Größter Wert	Z-Score
T2Fzbl	52	1,0769	1,2962	0,17976	1,2037	0	-0,83	3	1,48
T2EndA	53	2,1887	1,8403	0,25279	0,84084	0	-1,19	4	0,98
T2EndI	53	1,6226	1,3189	0,18116	0,81281	0	-1,23	3	1,04
T2EntA	48	1,2292	1,3086	0,18887	1,0646	0	-0,94	4	2,12
T2EntI	48	1,2708	1,2839	0,18532	1,0103	0	-0,99	3	1,35
T2periA	47	1,0213	1,1885	0,17336	1,1638	0	-0,86	3	1,66
T2periI	47	1,1915	1,2621	0,1841	1,0593	0	-0,94	3	1,43
T2MastA	51	0,39216	0,87358	0,12233	2,2276	0	-0,45	3	2,99
T2MastI	51	0,37255	0,79902	0,11189	2,1447	0	-0,47	3	3,29
T2AlvA	16	2,5625	1,6721	0,41802	0,65252	0	-1,53	4	0,86
T2AlvI	16	2,0625	1,3401	0,33502	0,64974	0	-1,54	3	0,7
M1EpSc	55	8,1091	3,8905	0,5246	0,47977	0	-2,08	12	1
M1BzSc	55	8,7818	4,3363	0,5847	0,49378	0	-2,03	12	0,74
M1LpSc	55	6,2	3,9459	0,53207	0,63644	0	-1,57	12	1,47
M1FzBSc	54	3,7593	3,4909	0,47505	0,92861	0	-1,08	12	2,36
M1EndSc	55	8,3091	4,2769	0,57669	0,51472	0	-1,94	12	0,86
M1EntSc	49	5,4898	4,4212	0,6316	0,80534	0	-1,24	12	1,47
M1periSc	45	4,9111	4,3213	0,64418	0,87991	0	-1,14	12	1,64
M1MastSc	54	0,33333	0,99052	0,13479	2,9716	0	-0,34	6	5,72
M1AlvSc	15	8,3333	4,1861	1,0809	0,50234	0	-1,99	12	0,88
M2EpSc	55	9,8364	3,3431	0,45079	0,33987	0	-2,94	12	0,65
M2BzSc	55	10,6	3,1658	0,42687	0,29866	0	-3,35	12	0,44

Variable	Vorkommen	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	Variationskoeffizient	Kleinster Wert	Z-Score	Größter Wert	Z-Score
M2LpSc	55	9,1818	3,5957	0,48485	0,39161	0	-2,55	12	0,78
M2FzbSc	54	8,4815	3,612	0,49154	0,42587	0	-2,35	12	0,97
M2EndSc	55	10,4	3,1775	0,42845	0,30553	0	-3,27	12	0,5
M2EntSc	48	7,9375	4,2846	0,61843	0,53979	0	-1,85	12	0,95
M2periSc	44	8,0682	4,2667	0,64323	0,52883	0	-1,89	12	0,92
M2MastSc	55	0,58182	1,315	0,17732	2,2602	0	-0,44	6	4,12
M2AlvSc	21	8,0952	4,3348	0,94593	0,53548	0	-1,87	12	0,9
M8EpSc	55	5,5455	4,4423	0,599	0,80107	0	-1,25	12	1,45
M8BzSc	55	4,8364	4,4753	0,60345	0,92534	0	-1,08	12	1,6
M8LpSc	55	3,1818	2,8809	0,38846	0,90543	0	-1,1	9	2,02
M8FzbSc	45	0,48889	1,2902	0,19233	2,6391	0	-0,38	6	4,27
M8EndSc	55	4,3091	4,0955	0,55224	0,95043	0	-1,05	12	1,88
M8EntSc	45	1,2222	1,9056	0,28407	1,5591	0	-0,64	6	2,51
M8periSc	45	1,2667	1,947	0,29025	1,5371	0	-0,65	6	2,43
M8MastSc	51	1,0392	1,587	0,22222	1,5271	0	-0,65	8	4,39
M8AlvSc	30	4,8	3,6521	0,66678	0,76086	0	-1,31	9	1,15
T1EpSc	55	10,345	3,4222	0,46146	0,3308	0	-3,02	12	0,48
T1BzSc	55	10,2	3,5034	0,4724	0,34347	0	-2,91	12	0,51
T1LpSc	55	7,5091	3,746	0,50511	0,49886	0	-2	12	1,2
T1FzbSc	47	4,7234	4,0092	0,58481	0,8488	0	-1,18	12	1,81
T1EndSc	55	9,1636	4,0174	0,5417	0,43841	0	-2,28	12	0,71
T1EntSc	53	5,5849	3,6079	0,49558	0,646	0	-1,55	12	1,78

Variable	Vorkommen	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	Variationskoeffizient	Kleinster Wert	Z-Score	Größter Wert	Z-Score
T1periSc	52	6,5192	3,7442	0,51923	0,57434	0	-1,74	12	1,46
T1MastSc	49	5,6735	4,845	0,69215	0,85398	0	-1,17	12	1,31
T1AlvSc	31	7,9355	3,6872	0,66225	0,46465	0	-2,15	12	1,1
T2EpSc	53	6,2075	5,0739	0,69696	0,81738	0	-1,22	12	1,14
T2BzSc	52	5,4231	5,0734	0,70355	0,93551	0	-1,07	12	1,3
T2LpSc	53	4,5472	4,149	0,56991	0,91243	0	-1,1	12	1,8
T2FzbSc	52	3,3654	4,5591	0,63223	1,3547	0	-0,74	12	1,89
T2EndSc	53	5,6792	5,4129	0,74351	0,95309	0	-1,05	12	1,17
T2EntSc	48	3,0208	3,5759	0,51613	1,1837	0	-0,84	12	2,51
T2periSc	47	2,4043	2,9463	0,42977	1,2255	0	-0,82	9	2,24
T2MastSc	51	0,76471	1,7842	0,24984	2,3332	0	-0,43	6	2,93
T2AlvSc	16	7,25	5,1962	1,299	0,71671	0	-1,4	12	0,91

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Katzegebisses mit Bezeichnung der Zähne nach anatomischer und nach TRIADAN modifizierter Nomenklatur (modifiziert nach BELLOWS, 2010). _____	3
Abbildung 2: Schematische Anatomie des Zahnes und Zahnhalteapparates. Die grün beschrifteten Strukturen stellen in ihrer Gesamtheit den Zahnhalteapparat dar (modifiziert nach SALOMON, 2008 und BELLOWS, 2010). _____	5
Abbildung 3: Histologischer Schnitt durch einen Katzenzahn zur Darstellung des Zahnhalteapparates, Vergrößerung 4fach, Färbung mit Hämatoxylin-Eosin. _____	7
Abbildung 4: HE-Färbung, Vergrößerung 2fach, Ausschnitt 20fach. _____	12
Abbildung 5: Schematisches Beispiel für den Aufbau einer MMP mit einfacher Hämopexin-Domäne. S = Signalpeptid, Pro = Propeptid-Domäne mit Thiol-(SH)-Gruppe, KD = Katalytische Domäne mit Zink-Atom (Zn), verbunden über die „hinge“-Region mit der Hämopexin-Domäne (nach STERNLICHT und WERB, 2001; SOMERVILLE et al., 2003; PAUL, 2005). _____	21
Abbildung 6: Beispiel der Aktivierung des Proenzym durch Proteasen durch eine Kombination der Spaltung in der Pro-Domäne und ihrer Trennung von der katalytischen Domäne (C = Cystein der Pro-Domäne, Zn <sup>2+</sup> = Zinkatom) (nach PAGE-MCCAW et al., 2007). _____	25
Abbildung 7: Relative Häufigkeitsverteilung des Geschlechts der stomatologisch untersuchten und behandelten sowie beprobten Katzen (n=55). (m = männlich, w = weiblich, mk = männlich-kastriert, wk = weiblich-kastriert) _____	33
Abbildung 8: Relative Häufigkeitsverteilung des Alters der untersuchten Katzen (n=55). ____	33
Abbildung 9: Parodontalsonde (Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Firma Zoetis). _____	35
Abbildung 10: Sondierung eines RL-Defektes mit Hilfe einer Zahnsonde (Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Firma Zoetis). _____	38
Abbildung 11: Röntgenaufnahme der Oberkieferseitenzähne eines Patienten mit RL Typ 1, es zeigen sich neben vertikalem und horizontalem Knochenabbau um die distale Wurzel des 4. Prämolaren sowie um beide Wurzeln des 3. Prämolaren (jeweils grüner Pfeil) deutliche Dichteminderungen im Sinne resorptiver Läsionen aller Wurzeln des 4. Prämolaren (weißer Pfeil) und auch der distalen Wurzel des 3. Prämolaren. _____	39

Abbildung 12: Röntgenaufnahme der Unterkieferseitenzähne eines Patienten mit RL Typ 2, der 3. Prämolare fehlt, die Laminae durae aller Alveolen zeigen eine erhöhte Röntgendichte (weißer Pfeil), der Parodontalspalt ist an den Wurzeln des 4. Prämolaren kaum, am 1. Molar nicht mehr abgrenzbar (grüner Pfeil).	39
Abbildung 13: Probenentnahme mittels 3 mm-Biopsiestanze an einem an RL-erkrankten 4. Prämolaren im linken Unterkiefer einer europäischen Kurzhaarkatze (Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Firma kai Europe).	40
Abbildung 14: Alter aufgetragen auf die einzelnen, klinisch eingeteilten Gruppen. RL1 = Resorptive Läsionen Typ 1, RL2 = Resorptive Läsionen Typ 2.	50
Abbildung 15: Klinische Gingivitisgrade, prozentuale Verteilung der Patienten auf die einzelnen Gruppen.	51
Abbildung 16: Histologische Gingivitisgrade, prozentuale Verteilung der Patienten auf die unterschiedlichen Entzündungsstufen.	52
Abbildung 17a und b: Adenokarzinom, Vergrößerung 40fach, Messbalken 20µm	55
Abbildung 18: Scorewerte für MMP-1 (Mittelwert und Standardabweichung). Ep=Epithel, Bz=Basalzellschicht, Lp=Lamina propria gesamt, Fzb=Fibrozyten/-blasten, End=Endothel, Ent=Entzündungszellen, peri=perivaskuläre Infiltrate, Mast=Mastzellen.	56
Abbildung 19a-d: Box-and-Whisker-Plots der Scores für MMP-1 aufgetragen auf die histologischen Entzündungsgrade (ggr = geringgradig, mgr = mittelgradig, hgr = hochgradig; M1EpSc = Epithelzellscore für MMP-1, M1BzSc = Basalzellscore für MMP-1, M1LpSc = Lamina propria gesamt Score für MMP-1, M1FzbSc = Fibrozyten/-blastenscore für MMP-1)	58
Abbildung 20 a-d: Box-and-Whisker-Plots der Scores für MMP-1 aufgetragen auf die histologischen Entzündungsgrade (ggr = geringgradig, mgr = mittelgradig, hgr = hochgradig; M1EndSc = Endothelzellscore für MMP-1, M1EntSc = Entzündungszellscore für MMP-1, M1periSc = perivaskuläre entzündliche Infiltrate Score für MMP-1, M1MastSc = Mastzellscore für MMP-1).	59
Abbildung 21a und b: Adenokarzinom, Vergrößerung 40fach, Messbalken 20µm	60
Abbildung 22: Scorewerte für MMP-2 (Mittelwert und Standardabweichung). Ep=Epithel, Bz=Basalzellschicht, Lp=Lamina propria gesamt, Fzb=Fibrozyten/-blasten, End=Endothel, Ent=Entzündungszellen, peri=perivaskuläre Infiltrate, Mast=Mastzellen.	61
Abbildung 23a-c: Box-and-Whisker-Plots der Scores für MMP-2 aufgetragen auf die histologischen Entzündungsgrade (ggr = geringgradig, mgr = mittelgradig, hgr = hochgradig;	

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

M2LpSc = Lamina propria gesamt Score für MMP-2, M2EntSc = Entzündungszellscore für MMP-2, M2periSc = perivaskuläre entzündliche Infiltrate Score für MMP-2). _____	62
Abbildung 24a und b: Adenokarzinom, 40fache Vergrößerung. _____	63
Abbildung 25: Scorewerte für MMP-8 (Mittelwert und Standardabweichung). Ep=Epithel, Bz=Basalzellschicht, Lp=Lamina propria gesamt, Fzb=Fibrozyten/-blasten, End=Endothel, Ent=Entzündungszellen, peri=perivaskuläre Infiltrate, Mast=Mastzellen. _____	64
Abbildung 26a und b: Osteosarkom, 40fache Vergrößerung. _____	65
Abbildung 27: Scorewerte für TIMP-1 (Mittelwert und Standardabweichung). Ep=Epithel, Bz=Basalzellschicht, Lp=Lamina propria gesamt, Fzb=Fibrozyten/-blasten, End=Endothel, Ent=Entzündungszellen, peri=perivaskuläre Infiltrate, Mast=Mastzellen. _____	66
Abbildung 28a und b: Adenokarzinom, 40fache Vergrößerung. _____	67
Abbildung 29: Scorewerte für TIMP-2 (Mittelwert und Standardabweichung). Ep=Epithel, Bz=Basalzellschicht, Lp=Lamina propria gesamt, Fzb=Fibrozyten/-blasten, End=Endothel, Ent=Entzündungszellen, peri=perivaskuläre Infiltrate, Mast=Mastzellen. _____	68
Abbildung 30a und b: Box-and-Whisker-Plots der Scores für TIMP-2 aufgetragen auf die histologisch ermittelten Gingivitisgrade (ggr = geringgradig, mgr = mittelgradig, hgr = hochgradig; T2LpSc = Lamina propria gesamt Score für TIMP-2, T2FzbSc = Fibrozyten-/blastenscore für TIMP-2). _____	69
Abbildung 31: Ausschnitt aus einer histologisch als gesund klassifizierten Gingiva, Vergrößerung 40fach, Messbalken 20µm. Schwarze Pfeile: Gefäßendothelien, weißer Pfeil: Melanin in der Basalzellschicht des Epithels. _____	70
Abbildung 32: Ausschnitt aus einem histologisch als mittelgradige Gingivitis klassifizierten Präparat, Vergrößerung 40fach, Messbalken 20µm. Schwarze Pfeile: Gefäßendothelien, weiße Pfeile: perivaskuläre Entzündungszellaggregate aus Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten. _____	70
Abbildung 33: Ausschnitt aus einem histologisch als hochgradige Gingivitis klassifizierten Präparat, Vergrößerung 40fach, Messbalken 20µm. Schwarze Pfeile: Epithelzellen, weiße Pfeile: Entzündungszellaggregate vorwiegend aus Lymphozyten bestehend, grüner Pfeil: Aggregat neutrophiler Granulozyten. _____	71
Abbildung 34a und b: Gingiva, Vergrößerung 40fach _____	71
Abbildung 35a-e: Gingiva, Vergrößerung 40fach, schwarze Pfeile: Endothelzellen, grüne Pfeile: Entzündungszellen, weiße Pfeile in b,c,e: Mastzellen, weiße Pfeile in d: Epithelzellen a) Exemplarische Negativkontrolle mit Kaninchennormalserum, da alle Antikörper in gleicher Verdünnungsstufe verwendet wurden b) MMP-1 in geringgradig entzündeter Gingiva c)	

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

MMP-8 in geringgradig entzündeter Gingiva d) TIMP-1 in mittelgradig entzündeter Gingiva e)  
TIMP-2 in mittelgradig entzündeter Gingiva \_\_\_\_\_ 72

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der resorptiven Läsionen in fünf Klassen (BELLOWS et al., 2005; BELLOWS, 2010). RL = resorptive Läsionen. _____	10
Tabelle 2: Einteilung der Matrix-Metalloproteinasen (nach STERNLICHT und WERB, 2001, ALLDINGER, 2009) _____	22
Tabelle 3, Fortsetzung Tabelle 2: Einteilung der Matrix-Metalloproteinasen (nach STERNLICHT und WERB, 2001, ALLDINGER, 2009) _____	23
Tabelle 4: Plaque-Index, gibt den Grad der Plaqueakkumulation an (SILNESS und LOE, 1964) _____	36
Tabelle 5: Zahnstein-Index, Grad der Zahnsteinakkumulation (BELLOWS, 2010) _____	36
Tabelle 6: Gingivitis-Index, zur Beurteilung des Entzündungsgrades der Gingiva (LOE und SILNESS, 1963) _____	36
Tabelle 7: Graduierung des Furkationsbefalls der mehrwurzeligen Zähne (BELLOWS, 2010) _____	37
Tabelle 8: Graduierung der Zahnlockerung (BELLOWS, 2010) _____	37
Tabelle 9: Röntgenologischer Parodontal-Index (GORREL, 2006) _____	37
Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Positivkontrollgewebe und Beschreibung ihrer immunhistologischen Signale. _____	45
Tabelle 11: Einteilung zur Ermittlung der Anzahl (A) der positiv markierten Zellen. _____	47
Tabelle 12: Einteilung der Signalintensität (I) positiv markierter Zellen. _____	47
Tabelle 13: Zu untersuchende Strukturen und Zellarten (= Lokalisationen) und die verwendeten Abkürzungen. _____	47
Tabelle 14: Übersicht über die im Wald-Test ermittelten globalen Effekte mit signifikanten p-Werten. _____	53
Tabelle 15: Übersicht der globalen Lokalisationseffekte über alle Gruppen und Enzyme (= Abweichungen vom Gesamtmittelwert der <i>arcsin</i> -transformierten Werte = Abweichung vom globalen Mittelwert = Effektschätzer). _____	54
Tabelle 16: Übersicht der globalen Enzymeffekte über alle Gruppen und Lokalisationen (= Abweichungen vom Gesamtmittelwert der <i>arcsin</i> -transformierten Werte = Abweichung vom globalen Mittelwert = Effektschätzer). _____	54

Tabelle 17: Ergebnis des Kruskal-Wallis-Test zum Vergleich der mittleren Scorewerte (= Mediane) der einzelnen Lokalisationen/Zellarten für MMP-1 in Bezug auf die histologischen Gingivitisgruppen. Die signifikanten p-Werte sind fett markiert. \_\_\_\_\_ 57

Tabelle 18: Übersicht über die untersuchten Patienten mit klinischen und pathohistologischen Befunden sowie Diagnosen in Kurzform. K in Patientenummer steht für Katze, Zahl nach Untersuchungsdatum fortlaufend von 1-55. EKH = Mischling der Europäisch Kurzhaar; m = männlich, mk = männlich-kastriert, m/w = Tier sowohl mit Hoden als auch Eierstöcken, w = weiblich, wk = weiblich-kastriert; Typ der RL: 0 = keine RL, 1 = Typ 1, 2 = Typ 2; Parodontitis: 0 = parodontal gesund, 1 = geringgradige Parodontitis, 2 = mittelgradige Parodontitis, 3 = hochgradige Parodontitis; Gingivitis: 0 = keine Gingivitis, 1 = geringgradige Gingivitis, 2 = mittelgradige Gingivitis, 3 = hochgradige Gingivitis; Pathohistologische Diagnose: 0 = keine Entzündungszellen, 1 = vereinzelte Entzündungszellen, 2 = geringgradige Gingivitis, 3 = mittelgradige Gingivitis, 4 = hochgradige Gingivitis; \* = nicht vorhandene Werte \_\_\_\_\_ 136

Tabelle 19: Übersicht der dreifaktoriellen Varianzanalyse nach Wald-Test. RL = resorptive Läsionen, MMP = Matrix-Metalloproteinase, TIMP = Tissue Inhibitor of Metalloproteinases, E = Enzym, L = Lokalisation. \_\_\_\_\_ 139

Tabelle 20: Dargestellt sind die jeweiligen p-Werte des Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten sowie des Kruskal-Wallis-Test, bezogen auf die pathohistologischen Diagnosen als Gruppeneinteilung. Die Werte des Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten gelten für monotone, die des Kruskal-Wallis-Test für nicht-monotone Zusammenhänge. Fett dargestellt sind diejenigen p-Werte, welche signifikant oder hochsignifikant sind. M = Matrix-Metalloproteinase, T = Tissue Inhibitor of Metalloproteinase, Ep = Epithel, Bz = Basalzellen, Lp = Lamina propria, Fzb = Fibrozyten/-blasten, End = Endothel, Ent = Entzündungszellen, peri = perivaskuläre Infiltrate, Mast = Mastzellen, Sc = Score. \_\_\_\_\_ 141

Tabelle 21: Übersicht über die Mittelwerte, Standardabweichungen, -fehler, Variationskoeffizienten sowie kleinste und größte ermittelte Werte mit Z-Scores der ermittelten immunhistologischen Intensitäten und Anzahl der positiv markierten Zellen und deren immunhistologischer Scores. M = Matrix-Metalloproteinase, T = Tissue Inhibitor of Metalloproteinase, Ep = Epithel, Bz = Basalzellen, Lp = Lamina propria, Fzb = Fibrozyten/-blasten, End = Endothel, Ent = Entzündungszellen, peri = perivaskuläre Infiltrate, Mast = Mastzellen, A = Anzahl der positiv markierten Zellen, I = Intensität der immunhistochemischen Reaktion, Sc = immunhistologischer Score. \_\_\_\_\_ 143

## **Danksagung**

Ich danke allen, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Ein großes Dankeschön an Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer, meinen Doktorvater, für die Ermöglichung dieser Arbeit, das Lesen und Korrigieren sämtlicher Manuskripte sowie jederzeit aufmunternde Worte und Unterstützung wenn nötig.

Vielen herzlichen Dank an Frau PD Dr. Susanne Aldinger für die umfassende patho(histo)logische fachliche Betreuung, das stundenlange Mikroskopieren und die vielen geduldigen Erklärungen der Histologie für eine „Klinikerin“ sowie natürlich das Lesen und Korrigieren meiner Texte.

Ebenfalls vielen Dank an Frau Dr. Cetina Thiel für die Ideengebung und das Lesen sowie die Korrektur meiner Manuskripte – sonst wäre diese Dissertation nie zustande gekommen.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Baumgärtner und seinem Team in der Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover danke ich sehr für das komfortable und freundliche Asyl für gute drei Monate, die Anregungen und Hilfe im Labor. Hier danke ich insbesondere Frau Petra Grünig, Frau Bettina Buck und Frau Barbara Raddatz für ihre Unterstützung.

Herrn Dr. Klaus Failing und seinem Team aus der Biomathematik, Frau Marion Sparenberg und Herrn Andreas Schaubmar, danke ich für die statistische Auswertung der Daten und die freundliche Beantwortung all meiner Fragen.

Dem Institut für Anatomie, dem Zentrallabor der Klinik für Kleintiere und Frau Christiane Siebert danke ich für die Bereitstellung ihrer Mikroskope, ohne die die Auswertung bzw. Dokumentation nicht möglich gewesen wären.

Herzlichen Dank an Martina Gärtner für das Lesen und die Korrekturen von einem externen Standpunkt.

## DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei den Kollegen aus meiner „Heimat“, der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig-Universität in Gießen, die mir seelisch und moralisch beigestanden haben. Ganz besonders bei Frau Susanne Kaiser, meiner Mit-Doktorandin, für die gegenseitige Unterstützung vom Tierversuchsantrag bis zum Erstellen der letzten Fotos. Geteiltes Leid ist eben doch halbes Leid! Sehr herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Thorsten Förnges bedanken, für seine vielen Erklärungen, die zweijährige „Einführung“ in die Tierzahnheilkunde – durch dich habe ich Spaß an diesem Fachgebiet gewonnen! Und vielen Dank an meine Mädels, die von Kolleginnen zu Freundinnen geworden sind. Ohne Euch wäre das alles hier viel schwerer gewesen. Danke!

Außerdem danke ich allen Tierbesitzern, darunter ebenfalls einigen Kollegen, die mir erlaubt haben, ihren Katzen Zahnfleisch für diese Studie zu entnehmen.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Eltern, Christiane Ritz-Vigneron und Manfred Ritz, die an mich glauben und mich auf meinem Weg stets begleitet und unterstützt haben. Zuletzt möchte ich mich an dieser Stelle bei Thorsten Behrend bedanken, auf den ich stets zählen kann und der mir, zum Glück selten, aber immer im richtigen Moment, den Kopf wieder zurechtgerückt hat. Danke!

## **Erklärung**

Ich erkläre: „Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig 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.“

Isabelle Alexandra Ritz



ISBN 978-3-86345-254-4



**Verlag:**

**Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**

**35392 Gießen · Friedrichstraße 17**

**Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375**

**E-Mail: [info@dvG.de](mailto:info@dvG.de) · Internet: [www.dvG.de](http://www.dvG.de)**

