

Mikrotest zur Bestimmung der Elastaseaktivität bei marginaler Parodontitis

Sprache: Deutsch

Autoren: Dr. Jens Martin Herrmann, Andreas Kleinstüber, Dr. José Gonzáles, Dr. Julia Vonholdt, Ekaterini Panagiotou, Dr. Ralf Roessler, Prof. Dr. Jörg Meyle
Klinikum der Justus Liebig Universität Poliklinik für Parodontologie, Gießen

Datum/Veranstaltung/Ort:

Wissenschaftliche Jahrestagung der DGP
27.09.97
Leipzig

Poster Award

Posterbestpreis

Abstract

Elastase, eine Serinprotease, kann durch ihre proteolytische Wirkung entscheidend zur Zerstörung parodontaler Strukturen beitragen [1]. Frühere Untersuchungen zeigten, daß bei einer Parodontitis die Elastaseaktivität in der Sulkusflüssigkeit (SF) erhöht ist [3]. Es wurde ein Mikrotest etabliert, um mit Hilfe von fluorogenen Substraten die elastolytische Aktivität messen zu können. Die Probenentnahme erfolgte mit Periopaper® die Sulkusflüssigkeitsvolumenbestimmung durch das Periotron 8000®. Die elastolytische Aktivität wurde mit einem fluorogenen Substrat MeO-Succ-Ala-Ala-Pro-Val-AMC im Mikrotestplattenleser Fluostar® gemessen. Zur Qualitätskontrolle der Nachweismethode erfolgte die Bestimmung der Wiederfindungsquote bei Aktivitäten von 200, 1600 und 3200 µU/µl (n=150). Die mittlere Wiederfindungsquote in diesem Bereich lag bei 93,7%. Eine erste Anwendung dieses Verfahrens bei Patienten mit marginaler Parodontitis (AP) erbrachte eine mittlere Elastaseaktivität von 3727 µU/µl. Die Vorteile dieser neuen Testmethode liegen in der Möglichkeit der Einzelzahnmessung, dem Nachweis geringster Enzymaktivitäten, Untersuchung minimaler Probenvolumina sowie der Mehrfachbestimmung. In einem Ansatz können mit dem Fluostar® bis zu 96 Patientenproben gleichzeitig untersucht werden.

Einführung

Die proteolytischen Enzyme der neutrophilen Granulozyten sind maßgeblich an der Zerstörung von Gewebekompartimenten beteiligt [1]. Während der Phagozytose oder bei Lysis werden sie aus den primären, azurophilen Granula freigesetzt. Neben Kathepsin D, Kathepsin G und Kollagenase ist vor allem Elastase in der Lage Kollagenfasern zu zerstören, [8] sie lysiert neben Elastin auch Proteoglykane, Hämoglobin, Fibrinogen und Kollagen. 1975 untersuchten OHLSSON und DELSHAMMER [7] in gingivalen Biopsaten den Zusammenhang zwischen Elastasekonzentration und Granulozytenzahl. Im erkrankten Gewebe wiesen sie durchschnittlich 0,1 µg/mm³; Elastase nach. Dies entspricht einem Gehalt von 25.000 Granulozyten. Zusammenhänge zwischen parodontaler Destruktion und proteolytischer Aktivität in der Sulkusflüssigkeit wurde in Untersuchungen von CIMASONI und KOWASHI [6] beschrieben. Entscheidend für Abbau und Gewebszerstörung ist nicht allein die Enzymkonzentration, sondern die Aktivität. [4] KENNETT et al. beschreiben eine parodontale Erkrankungsprogredienz oberhalb einer elastolytischen Aktivität von 300 µU/µl. Elastase kann inaktiv als Komplex mit alpha-1-Proteinaseinhibitor bzw. alpha-2-Makroglobulin vorkommen [5].

Material und Methoden

Nach Isolation der zu untersuchenden Zähne mit Watterollen und Trocknen mit kurzen Luftstößen sowie vorsichtiger supragingivaler Plaqueentfernung wurde mit einer modifizierten intracreviculären Methode Sulkusflüssigkeit gewonnen. Periopaper(r) wurde lediglich 20 Sekunden am Sulkusrand plziert, jedoch nicht tiefer als 1 mm in die Tasche eingeführt, um Gewebeerirritationen zu vermeiden. Anschließend wurde der Periotronwert (PTW) ermittelt und das Probenvolumen rückberechnet. Für die Vortests diente Aqua dest., für Patientenuntersuchungen Poolserum einer Gruppe von zehn allgemeinamnestisch unauffälligen Probanden als Eichmedium. Die Kalibrierung erfolgte mit einer Präzisions-Hamilton-Spritze im Volumenbereich 0 bis 0,80 µl in Schritten von 0,10 µl. Das arithmetische Mittel aus 10 Meßwerten war die Grundlage zur Berechnung der Kurvenanpassung (vgl. Abb. 1). Die Proben wurden in 30 µl Puffer (pH 5,5) eluiert. Anschließend sind je 10 µl dieses Probenvolumens zu einem Testpuffer (pH 8,5) in die Schächte der Mikrotestplatte pipettiert worden. Nach Zugabe von 50 µl einer 10⁻³ mol/l Lösung des fluorogenen Substrates, wurden die Mikrotestplatten inkubiert und anschließend im Fluostar(r) gemessen. Die Aktivitäten der Proben wurden im direkten Vergleich zur Standardkurve bestimmt (vgl. Abb. 2). Jede Probe wurde im Doppelansatz analysiert. Die Verwendung des Substrats MeO-Succ-Ala-Ala-Pro-Val-7-Amino-4-methylcumarin bot wesentliche Vorteile [2]. Bei der Peptidspaltung durch Elastase wird AMC frei. Sein Exzitationsmaximum liegt bei 390 nm das Emmissionsmaximum bei 460 nm im UV-Spektrum. Zur Überprüfung des Verfahrens wurden Wiederfindungsquoten ermittelt (vgl. Abb. 3). Ein diskretes Probenvolumen bekannter Aktivität, aus dem Spalt zwischen einem Deckglas und einem Objektträger aufgenommen, wurde nach og. Methode untersucht.

Ergebnisse

Nachweisbare Erhöhung der elastolytischen Aktivität bei Patienten mit marginaler Parodontitis (AP) ergab sich bereits bei den ersten Messungen. Einen Auszug dieser Ergebnisse im Vergleich zu klinischen Daten findet sich in Tabelle 4. Die durchschnittliche Elastaseaktivität lag hier bei 3727 nU/µl.

Die Nachweisgrenze unseres Verfahrens liegt bei 100 nU/µl, dabei ist zu berücksichtigen, daß eine zahnflächenspezifische Probengewinnung erfolgte und SF-Volumina von nur 0,1 µl analysiert werden konnten.

Nach Verfeinerung der Methode lagen die Wiederfindungsquoten bei durchschnittlich 93,7 %.

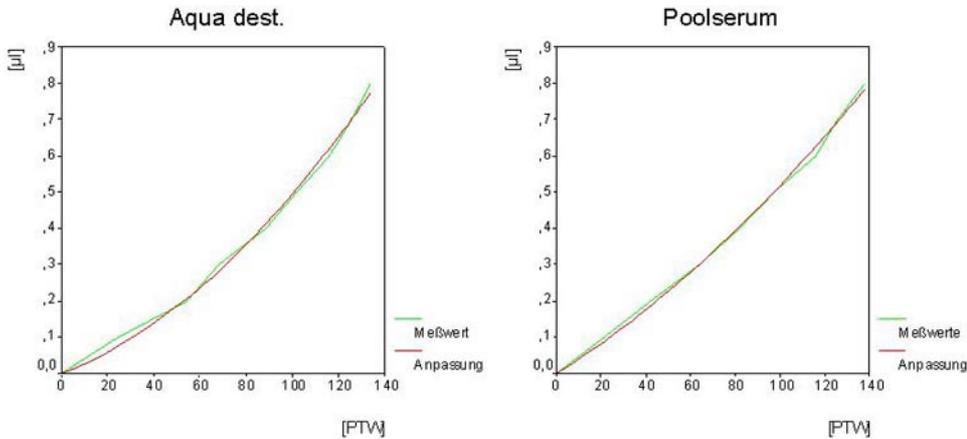


Abb. 1: Kalibrierung des Periotron 8000®

polynomiale Funktion 2. Ordnung (Statistiksoftware: SPSS®)

$$R^2_{\text{Aqua dest.}} = 0,999 \quad R^2_{\text{Poolserum}} = 0,998$$

PTW = Periotronwert

Abb. 1:

Kalibrierung des Periotron 8000®

polynomiale Funktion 2. Ordnung (Statistiksoftware SPSS®)

$$R^2_{\text{Aqua dest.}} = 0,999 \quad R^2_{\text{Poolserum}} = 0,998$$

PTW=Periotronwert

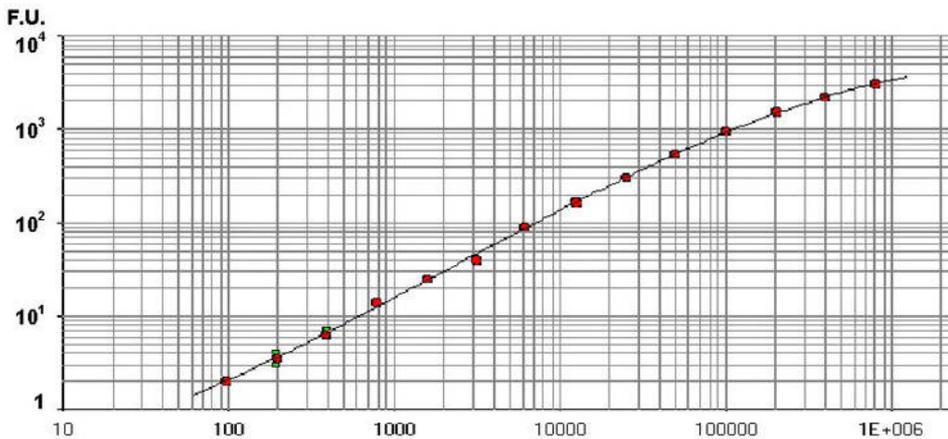


Abb. 2: Standardkurve der Elastaseaktivität

F.U. = Fluoreszenzeinheiten Aktivität = nU/µl

Abb. 2:

Standardkurve der Elastaseaktivität

F.U. = Fluoreszenzeinheiten Aktivität = nU/µl

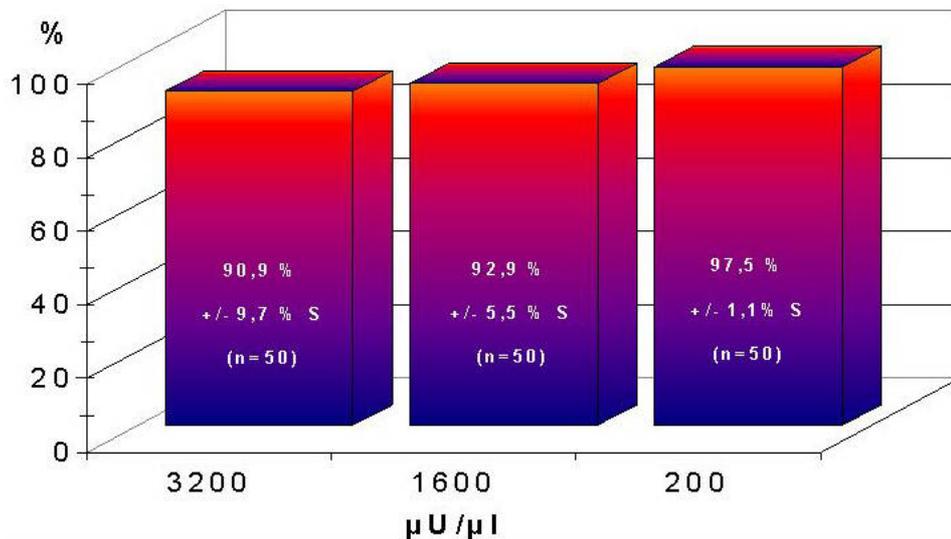


Abb. 3: Mittlere Wiederfindungsquoten mit prozentualer Standardabweichung

Abb. 3:
Mittlere Wiederfindungsquoten mit prozentualer Standardabweichung

Nr.	Zahn	Ort	ST	AL	SB	Pus	SF	Aktivität
1	16	mb	7	9	+	+	0,4	7189
2	14	db	6	7	+	+	0,55	6665
3	23	mb	5	7	+	+	0,23	7821
4	25	mb	8	8	+	+	0,17	6380
5	11	mb	4	5	+	-	0,34	1668
6	12	mb	4	6	+	-	0,65	1866
7	27	mb	5	5	+	-	0,37	2204
8	23	db	5	6	-	-	0,18	1027
9	12	db	4	4	-	-	0,69	998
10	21	mb	5	6	-	-	0,41	1031

Tab. 4: Ergebnisse der Patientenuntersuchung

b =bukkal d =distal m =mesial
o =oral Aktivität =µU/µl AL(mm) =Attachmentniveau
SB =Sondierungsblutung SF(µl) =Sulkusflüssigkeitsvolumen
Pus =parodontale Exsudation

Schlussfolgerungen

Die Messung der Elastaseaktivität erweitert die klinische Befunderhebung wesentlich. Bei lokalisierter Entzündung und ortsspezifischem Gewebeverlust können aktive Taschen durch diesen Test ausgemacht und eine Weiterbehandlung eingeleitet werden.

Literatur

1. Barrett, A.J.: Capacity of leukocyte elastase and cathepsin G to degrade mature collagen fibers. In: Neutral proteases in human neutrophil leukocytes (Hrsg.): Urban & Schwarzenberg, Baltimore 1978, S. 385
2. Castillo, M.J., Nakajima, K., Zimmerman, M., Powers, J.C.: Sensitive substrates for human leukocyte and porcine pancreatic elastase: a study of the merits of various chromophoric and fluorogenic leaving groups in assays for serine proteases. Anal Biochem 99, 53 (1979)
3. Cox, S.W., Eley, B.M.: Preliminary studies on cysteine and serine proteinase activities in inflamed human gingiva using different 7-amino-4- trifluoromethyl coumarin substrates and protease inhibitors. Arch Oral Biol 32, (1987)
4. Giannopoulou, C., Andersen, E., Demeurisse, C., Cimasoni, G.: Neutrophil elastase and its inhibitors in human gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. J Dent Res 71, 359 (1992)

- Kennett, C.N., Cox, S.W., Eley, B.M.: Localization of active and inactive elastase, alpha-1-proteinase inhibitor, and alpha-2-macroglobulin in human gingiva. *J Dent Res* 74, 667 (1995)
- Kowashi, Y., Cimasoni, G., Matter, J.: Collagen breakdown by gingival collagenase and elastase. *Experientia* 36, 395 (1980)
- Ohlsson, K., Delshammar, M. Interactions between granulocyte elastase and collagenase and the plasma proteinase inhibitors in vitro and in vivo. In: *Dynamics of connective tissue macromolecules.* (Hrsg.): Burleigh, P. M., Poole, A. R., Amsterdam, North-Holland, 1975 S. 259
- Tzamouranis, A., Matthys, J., Ishikawa, I., Cimasoni, G.: Increase of extracellular cathepsin D activity in gingival washings during experimental gingivitis in man. *Arch Oral Biol* 22, 375 (1977)

Dieses Poster wurde übertragen von Dr. Jens Martin Herrmann.

Kontakt-Adresse:

Dr. Jens Martin Herrmann.
 Klinikum der Justus Liebig Universität
 Poliklinik für Parodontologie
 Schlangenzahl 14
 D-35392 Gießen

Poster Faksimile:

Mikrotest zur Bestimmung der Elastaseaktivität bei marginaler Parodontitis

J.M.HERRMANN, A.KLEINSTEUBER, J.R.GONZALEZ, J.VONHOLT, E.PANIGOTOL, R.ROSSLER, J.MEYLE

Medizinisches Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Abteilung für Parodontologie
Justus Liebig Universität Gießen



ABSTRACT

Elastase, eine Serineprotease, kann durch ihre proteolytische Wirkung entscheidend zur Zerstörung parodontaler Strukturen beitragen [1]. Frühere Untersuchungen zeigten, daß bei einer Parodontitis die Elastaseaktivität in der Subduktionsflüssigkeit (SF) erhöht ist [2]. Es wurde ein Mikrotest entwickelt, um mit Hilfe von Kationischen Substraten die elastolytische Aktivität messen zu können.

Die Probenherstellung erfolgt mit Paropaper® die Subduktionsflüssigkeit volumetrisch mittels des Perforator 5000®. Die elastolytische Aktivität wurde mit einem fluoreszierenden Substrat MHC-Succ-Asp-Ala-Phe-Val-AMC im Mikrotiterplattenformat gemessen.

Zur Qualitätskontrolle der Nachweismethode erfolgte die Bestimmung der Wiederfindungsrate bei Aktivitäten von 200, 1000 und 3200 µU/l (n=10). Die mittlere Wiederfindungsrate in diesem Bereich lag bei 92,7%. Eine erste Anwendung dieses Verfahrens bei Patienten mit marginaler Parodontitis (AP1) erbrachte eine mittlere Elastaseaktivität von 3727 µU/l. Die Vorteile dieser neuen Nachweisform liegen in der Einfachheit der Einzelherstellung, dem Nachweis geringster Enzymaktivitäten, Untersuchung einzelner Probenkolonien sowie der Einfachheit der Bestimmung. In einem Ansatz können mit dem Fluorator® bis zu 96 Patientenproben gleichzeitig untersucht werden.

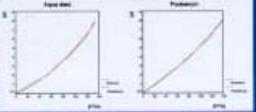


Abb. 1: Kalibrierung des Perforator 5000®
Fluoreszenz (Y-Achse) vs. Zeit (X-Achse)

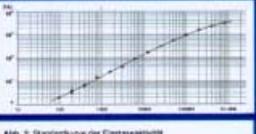


Abb. 2: Standardkurve der Elastaseaktivität
Optische Dichte (Y-Achse) vs. Elastaseaktivität (X-Achse)



Abb. 3: Mittlere Wiederfindungsquoten
Y-Achse: % Wiederfindungsquote, X-Achse: Konzentration

Enz.	Zahn	Enz.	SF	Al.	Enz.	Enz.	Enz.	Enz.
1	18	20	7	9	1	1	1	0,4
2	12	12	9	7	1	1	1	0,25
3	23	23	8	7	1	1	1	0,25
4	20	20	8	7	1	1	1	0,17
5	17	17	8	9	1	1	1	0,17
6	22	22	4	8	1	1	1	0,25
7	27	27	8	9	1	1	1	0,27
8	21	21	8	8	1	1	1	0,15
9	21	21	8	8	1	1	1	0,25
10	21	21	8	8	1	1	1	0,21

Tab. 4: Ergebnisse der Probenherstellung
1: Zahn, 2: Zahn, 3: Zahn, 4: Zahn, 5: Zahn, 6: Zahn, 7: Zahn, 8: Zahn, 9: Zahn, 10: Zahn

EINFÜHRUNG

Die proteolytischen Enzyme der neutrophilen Granulozyten sind maßgeblich an der Zerstörung von Gewebekomponenten beteiligt [1]. Während der Phagozytose oder bei Lyso werden sie aus den primären, sekundären Granula freigesetzt. Neben Kollagenase, Kollagenase G und Kollagenase ist vor allem Elastase in der Lage Polymerketten zu zerstören. [2] Sie lysiert neben Elastin auch Proteoglykane, Hyaluronsäure, Fibronectin und Fibrinogen.

1076 untersuchten Olesen und Olesen [3] in gingivalen Mikoplaten der Zusammenhang zwischen Elastasekonzentration und Granulozyten. In erhöhten Gewebe weisen sie durchschnittlich 0,1 µg/ml Elastase nach. Dies entspricht einem Gehalt von 25.000 Granulozyten.

Zusammenhänge zwischen parodontaler Destruktion und proteolytischer Aktivität in der Subduktionsflüssigkeit werden in Untersuchungen von Olesen und Finsen [4] beschrieben. Erhöhter Elastasegehalt im Subduktionsflüssigkeit ist nicht allein die Enzymkonzentration, sondern die Aktivität [4]. Kowashi et al. beschreiben eine parodontale Entzündungsreaktion ebenfalls einer elastolytischen Aktivität von 300 µU/l. Elastase kann auch als Kofaktor im alpha-1-Proteinase-Inhibitor bzw. alpha-2-Macroglobulin vorkommen [5].

MATERIAL UND METHODEN

Nach Isolation der zu untersuchenden Zähne mit Wollwunden und Trümmern mit kurzer Luftblase sowie vollständiger aseptischer Präparierung wurde mit einer modifizierten intra-odontalen Methode Subduktionsflüssigkeit gewonnen. Paropaper® wurde lediglich 20 Sekunden im Subduktor platziert, jedoch nicht tiefer als 1 mm in die Tasche eingeführt, um Gewebeschäden zu vermeiden. Anschließend wurde der Perforator (PTW) erstellt und das Probenmaterial abgelesen.

Für die Vermeidung einer Aggregation des Subduktionsflüssigkeit wurde eine Gruppe von 100 µl Subduktionsflüssigkeit durch Zugabe von 10 µl einer 10% methylenblauen Lösung in 10 µl Subduktionsflüssigkeit verdünnt und anschließend im Fluorator gemessen. Die Aktivitäten der Proben wurden im direkten Vergleich zur Standardkurve bestimmt (vgl. Abb. 2). Jede Probe wurde im Doppelmaß analysiert.

Die Herleitung des Substrats MHC-Succ-Asp-Ala-Phe-Val-7-Amino-4-fluorphenyl oxycarbonyl subunit und peptidase inhibitor. Arch Oral Biol 22, 375 (1977)

Die Überprüfung des Verfahrens wurde in Wiederfindungsquoten ermittelt (vgl. Abb. 3). Ein direkter Proteinaktivitätsbestimmungsansatz, wie dem Spektroskopischen Dichtegesetz und einem Objektträger aufgenommen, wurde nach vgl. Methode untersucht.

ERGEBNISSE

Nachweisbare Erhöhung der elastolytischen Aktivität bei Patienten mit marginaler Parodontitis (AP1) ergab sich bereits bei den ersten Messungen. Einen Anstieg dieser Ergebnisse im Vergleich zu klinischer Daten findet sich in Tabelle 4. Die durchschnittliche Elastaseaktivität lag bei 3727 µU/l.

Die Nachweisgrenze unseres Verfahrens liegt bei 100 µU/l, dabei ist zu berücksichtigen, daß eine unvollständige Probenherstellung erhöhte und SF-Inhaltsverluste von nur 2,1 % einfließen werden konnten.

Nach Verbesserung der Methode liegt die Wiederfindungsrate bei durchschnittlich 92,7 %.

SCHLUSSEFOLGERUNGEN

Die Messung der Elastaseaktivität erlaubt die klinische Befundbeurteilung wesentlich. Bei lokalisierter Entzündung und orthopädischem Gewebeschaden können diese Taschen durch diesen Test ergründet und eine Weiterbehandlung eingeleitet werden.

LITERATUR

1. Kennett, J., Cimasoni, G., Matter, J.: Collagen breakdown by gingival collagenase and elastase. *Experientia* 36, 395 (1980)
2. Ohlsson, K., Delshammar, M.: Interactions between granulocyte elastase and collagenase and the plasma proteinase inhibitors in vitro and in vivo. In: *Dynamics of connective tissue macromolecules.* (Hrsg.): Burleigh, P. M., Poole, A. R., Amsterdam, North-Holland, 1975 S. 259
3. Tzamouranis, A., Matthys, J., Ishikawa, I., Cimasoni, G.: Increase of extracellular cathepsin D activity in gingival washings during experimental gingivitis in man. *Arch Oral Biol* 22, 375 (1977)

LITERATUR

1. Kennett, J., Cimasoni, G., Matter, J.: Collagen breakdown by gingival collagenase and elastase. *Experientia* 36, 395 (1980)
2. Ohlsson, K., Delshammar, M.: Interactions between granulocyte elastase and collagenase and the plasma proteinase inhibitors in vitro and in vivo. In: *Dynamics of connective tissue macromolecules.* (Hrsg.): Burleigh, P. M., Poole, A. R., Amsterdam, North-Holland, 1975 S. 259
3. Tzamouranis, A., Matthys, J., Ishikawa, I., Cimasoni, G.: Increase of extracellular cathepsin D activity in gingival washings during experimental gingivitis in man. *Arch Oral Biol* 22, 375 (1977)