

Thema: Hemmung der Aktivität des Enzyms α -Amylase durch Metallionen aus Amalgamfüllungen

Inhalt:

1. Einleitung
- 2.1. Entwicklung der Untersuchungsmethode
- 2.2. Experimentelle Ergebnisse
- 2.3. Diskussion der Ergebnisse
3. Schluss
- 4.1. Literaturverzeichnis
- 4.2. Danksagung

1. Einleitung

1.1. Problemstellung

Das Problem der Gesundheitsverträglichkeit von Amalgamfüllungen ist ebenso bekannt wie umstritten. Angeregt durch Fernsehbeiträge, Aushänge beim Zahnarzt etc. beschlossen wir, uns selbst mit diesem Thema zu beschäftigen.

Da Untersuchungen über die toxikologische Wirkung von Quecksilberionen und Quecksilberderivaten zum einen weit außerhalb unserer Möglichkeiten liegen und diese zum anderen von weitaus qualifizierteren Stellen ausführlich durchgeführt wurden und werden, entschlossen wir uns auf Anregung unseres betreuenden Lehrers, die Wirkungen der verwendeten Metalle auf die Aktivität von Enzymen zu untersuchen.

Wir entschieden uns, die Wirkung von Quecksilber auf das Enzym α -Amylase zu untersuchen, da dies mit unseren Mitteln gut durchgeführt werden kann.

1.2. Stand der Forschung

Die bisherige Forschung über eine mögliche Gesundheitsbelastung durch Amalgam konzentrierte sich bisher auf den toxikologischen Effekt und somit auf Untersuchungen über Aufnahme, Abgabe, Konzentration und Ablagerung von Quecksilber im Körper.

Es ist bekannt, dass Quecksilber diverse Enzyme in ihrer Aktivität beeinflussen kann.

Vornehmlich wird die Enzymaktivität gehemmt, sie kann jedoch auch gesteigert werden (z.B. bei 2,3-Diphosphoglyceromutase). Effekte auf die Aktivität eines Enzyms werden oftmals durch Reaktionen von Quecksilber mit Thiol- oder Dithiolgruppen hervorgerufen, sei es dass diese Reaktion die Funktion essentieller Thiolgruppen beeinflusst (Enzymhemmung) oder dass diese Reaktion mit unessentiellen Thiolgruppen eine Konformationsänderung bewirkt (Aktivierung).

Speziell Untersuchungen zur Aktivität der α -Amylase wurden bisher jedoch nicht durchgeführt, zumindest ist uns nichts darüber bekannt.

1.3. Zielsetzung des Projekts

Die Aufgabe dieser Arbeit ist, zu ermitteln, ob und in welchem Ausmaß Amalgam Einfluß auf die Aktivität der α -Amylase in ihrer Funktion der Zersetzung von Stärke zu Maltose nimmt. Dazu werden zwei Untersuchungen durchgeführt: Zum ersten soll untersucht werden, ob ein statistischer Zusammenhang zwischen der Anzahl Amalgamfüllungen eines Probanden und der Aktivität seines Speichels bei der Zersetzung von Stärke besteht, zum zweiten soll α -Amylaseaktivität, die mit verschiedenen Mengen Amalgam belastet wird, auf ihre Aktivität untersucht werden, um festzustellen, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen Amalgambelastung und einer eventuellen Reduzierung der Speichelaktivität besteht.

2.1.1. Entwicklung einer klinischen Untersuchungsreihe

2.1.1.1.

Ausgehend von unserer Zielsetzung suchten wir nun nach einem Indikator für die Aktivität von α -Amylase. Da α -Amylase Stärke zu Maltose zersetzt, war unsere erste Idee, eine standardisierte Stärkelösung mit einer bestimmten Testmenge Speichel zu versetzen und im Nachhinein die Konzentration der Maltose zu ermitteln. Maltose ist jedoch mit unseren Mitteln nicht nachzuweisen, deshalb dachten wir uns einen Trick aus: Maltose kann weiter zersetzt werden zu Glucose. Diese ist mit Teststäbchen sehr gut nachzuweisen. Diese Teststäbchen zu besorgen, stellte kein Problem dar: Die Bayer-AG erklärte sich sofort bereit, uns zu unterstützen. Ein Problem blieb: die Umwandlung von Maltose in Glucose. Dieses Problem erwies sich als unlösbar. Bei Preisen von über 60 DM pro Gramm Maltase (das Enzym, das Maltose in Glucose umsetzt) waren unsere finanziellen Grenzen überschritten. Anfragen nach günstigerer Abgabe blieben ohne Zusage. Somit war unsere erste Überlegung gescheitert.

Schließlich gingen wir den umgekehrten Weg. Statt das Endprodukt nachzuweisen, wiesen wir die Abnahme der Stärkekonzentration nach. Stärke läßt sich mit Jod-Kaliumjodid-Lösung leicht qualitativ nachweisen, ein quantitativer Nachweis ist jedoch für uns nicht möglich. Ein Trick half weiter: nicht die Mengenabnahme zu einer bestimmten Zeit wird gemessen, sondern die Zeit bis zum vollständigen Abbau der Stärke. Sie ist ein Maß für die Amylaseaktivität. So ergibt sich folgendes Experiment:

2.1.1.2. Versuchsvorschrift

Stärkelösung:

In 0.75l kaltes Wasser werden 40 Gramm Kartoffelmehl gegeben. Diese Mischung wird unter stetem Rühren aufgekocht. Die Lösung wird abgekühlt, abgeseiht und in ein luftdicht verschließbares Gefäß abgefüllt und gekühlt gelagert.

Speichel:

Der Speichel eines Probanden wird nach etwa 3minütigen Kauen eines zuckerfreien Kaugummis entnommen.

Experiment:

Beim Einzelerperiment wird die Stärkelösung im Wasserbad auf Raumtemperatur gebracht. Zwei ml Stärkelösung werden mit 1ml gerade entnommenen Speichel in ein Becherglas gegeben. Stärkelösung und Speichel werden durch Schütteln gemischt. Ab 90 Sekunden nach Mischung werden alle 15 Sekunden zwei Tropfen der Mischung entnommen und auf einer Tüpfelplatte mit zwei Tropfen Jod-Kaliumjodid-Lösung vermischt. Sobald diese Mischung keine violette Färbung mehr zeigt, ist das Experiment beendet. Es werden die Anzahl Plomben, die benötigte Zeit, das Alter der Testperson und eventuelle Besonderheiten notiert.

Anmerkungen:

Der Speichel jedes Probanden wird, wenn dies möglich ist, mindestens zweimal getestet. Dies soll gewährleisten, dass die Ergebnisse reproduzierbar sind.

Speichel wird im Allgemeinen direkt nach der Spende verwendet oder gelagerter Speichel vor dem Experiment auf 25°C erhitzt.

Testpersonen sollten direkt vor dem Kauen des Kaugummis den Mund zumindest kurz ausspülen.

2.1.1.4. Messreihen

Neben mehreren Messreihen nach obiger Vorschrift bietet sich noch eine andere Testreihe an, um eine bessere Aussagekraft und Vergleichbarkeit zu erreichen:

Die Speichelaktivität kann im Tagesverlauf schwanken. Eventuell ist deshalb eine Eichung der Testzeit nötig, vielleicht muß sogar ein Mindestabstand zur letzten Mahlzeit eingehalten werden.

Zu diesem Zweck ist es angebracht, bei einem Spender über den ganzen Tag hinweg Speichel zu testen.

2.1.2. Entwicklung einer Labortestreihe

2.1.2.1.

Bei einem Gespräch mit Herrn Prof. Dr. Ott, dem Leiter der zahnärztlichen Fakultät der Universität Münster, ergab sich, dass die Aussagekraft unserer klinischen Testreihe zumindest angezweifelt werden muß (s.u.).

Deshalb soll die klinische Untersuchungsreihe durch ein Laborexperiment ergänzt werden. Anstatt die Reaktion mit menschlichem Speichel, der großen Störeinflüssen ausgesetzt ist, durchzuführen, soll eine α -Amylase Standardlösung verwendet werden. Diese wird mit einer verschiedenen Anzahl von Amalgamprobekörpern über verschieden lange Zeiträume versetzt, um die Amalgambelastung des Speichels zu simulieren.

Die Fa. Merck erklärte sich freundlicherweise bereit, uns die α -Amylase kostenlos zur Verfügung zu stellen.

2.1.2.2. Versuchsvorschrift

α -Amylase-Lösung:

0,125 Gramm α -Amylase werden in 0,25 Liter kaltes Leitungswasser gegeben und durch Schütteln verteilt.

Verwendet wird α -Amylase (aus *Bacillus subtilis*) lyophilisiert der Fa. Merck (Aktivität: 130 Units/mg Lyophilisat, Bestell-Nr. 1329.0001).

Amalgam-Probekörper:

In eine Form der Größe 1 cm x 0,5 cm werden zwei Kapseln Silberamalgam gegeben und möglichst kompakt gestopft. Wenn das Amalgam fest ist wird es der Form entnommen.

Die Amalgamprobekörper werden, wenn sie vollständig ausgehärtet sind, mit einem möglichst feinen Naßschleifgerät abgeschliffen (aber nicht poliert).

Die verwendeten Probekörper sind ca. 8 mm x 2 mm x 3 mm groß.

Verwendet wird Silberamalgam der Marke Tytin der Fa. Kerr. Eine Kapsel enthält 595 mg Quecksilber und 800 mg Zusätze (Zusammensetzung: 60% Silber, 12% Zinn, 28% Kupfer).

Stärkelösung:

Die Stärkelösung ist dieselbe wie unter 2.1.1.2. beschrieben.

Geräte:

Es werden ein Magnetrührer des Fabrikats Ikamag RH der Fa. Janke & Kunkel Labortechnik und eine Wasserwanne mit einem handelsüblichen Aquariumheizstab verwendet.

Versuchsaufbau:

Der Magnetrührer wird unterhalb der Wasserwanne plaziert. Diese wird bis zu einer Höhe von etwa 4 cm mit Wasser gefüllt, das mit dem Aquariumheizstab auf einer konstanten Temperatur von 24°C gehalten wird. Die α -Amylase-Lösung, die Stärkelösung und die Amalgamprobekörper werden in diesem Wasserbad ebenfalls auf dieser Temperatur gehalten.

In ein 25ml-Becherglas werden 4 ml α -Amylase-Lösung, eine bestimmte Anzahl n Amalgamprobekörper und ein Magnetrührstäbchen (Länge: 2,5 cm) gegeben. Dieses Becherglas wird im Wasserbad über dem Magnetrührer plaziert und der Inhalt wird dann auf Stufe 2,5 verrührt. Nach einer bestimmten Zeit t ab der Zugabe der Probekörper zu der α -Amylase-Lösung wird 1,5 ml der Lösung entnommen und mit 2 ml der Stärkelösung in ein Becherglas gegeben und durch ca. zehnekündiges Schütteln vermischt. Ab 240 Sekunden nach Mischung werden alle 15 Sekunden 2 Tropfen der Mischung entnommen und mit 2 Tropfen Jod-Kaliumjodid-Lösung auf einer Tüpfelplatte vermischt. Sobald diese Mischung keine violette Färbung mehr zeigt, ist das Experiment beendet. Die Anzahl Amalgamprobekörper n , die Expositionszeit t und die beobachtete Reaktionszeit werden notiert.

Anmerkung:

Der Magnetrührer dient dazu, die Abradierung von Amalgam beim Kauen zu simulieren.

2.2. Ergebnisse

2.2.1. Ergebnisse der klinischen Versuche

Diese Testreihe wurde aufgenommen in der Zeit vom 19. November bis zum 28. November 1997 (Lfd. Nr. 1 - 25) und in der Zeit vom 9. bis zum 13. Februar 1998 (Lfd. Nr. 26 - 35).

Tabelle 1:

Lfd. Nr.	Anzahl Amalgamfüllungen	Zeit 1 [sec]	Zeit 2 [sec]
3	0	210	210
4	0	270	285
5	0	270	270
7	0	240	255
13	0	270	285
14	0	210	195
15	0	240	255
21	0	270	240
28	0	180	
34	0 (6 Keramikplomben)	90	
35	0 (2 Keramikplomben)	240	
10	1	195	
19	1	225	225
2	2	210	
11	2	285	
26	2	180	
33	2	150	
12	3	270	210
17	3	270	255
23	3	285	
27	3	180	
30	3	210	
2	4	240	
8	4	285	285
9	4	240	
31	4	180	
32	4	180	
16	6	210	210
18	6	330	300
25	7		
29	8	270	
24	11	330	330
6	20	300	315

Ein Vergleich der Zeiten 1 und 2 jedes Versuchs zeigt, dass die Ergebnisse im allgemeinen gut reproduzierbar sind.

2.2.2. Ergebnisse der Labortestreihe

Diese Messungen wurden aufgenommen in der Zeit vom 7. bis zum 9. Januar 1998.

Tabelle 2: Variation der Anzahl der Amalgamprobekörper n

Belastungszeit t [min]	Anzahl Amalgamprobekörper n	Zeit 1 [sec]
0	0	315
2	2	345
2	4	345
2	6	345
2	8	360
2	10	375
5	0	345
5	2	360
5	4	375
5	6	375
5	8	375
5	10	390
7	2	360
7	5	360
7	8	360

Tabelle 3: Variation der Belastungszeit t

Anzahl Amalgamprobekörper n	Belastungszeit t [min]	Zeit 1 [sec]
2	0	315
2	2	345
2	5	360
2	7	360
5	0	315
5	1	360
5	2	360
5	4	360
5	7	360
8	0	315
8	2	360
8	5	375
8	7	360

Diese Messungen wurden aufgenommen am 10. und 11. Februar 1998.

Tabelle 4: Variation der Anzahl der Amalgamprobekörper n

Lfd. Nr.	Belastungszeit t [min]	Anzahl Amalgamprobekörper n	Zeit 1 [sec]
1	0	0	345
6	3	0	360
2	3	2	360
3	3	4	375
4	3	6	390
5	3	8	390

Tabelle 5: Variation der Belastungszeit t

Lfd. Nr.	Anzahl Amalgamprobekörper n	Belastungszeit t [min]	Zeit 1 [sec]
1	0	0	345
7	4	1	345
8	4	2	360
3	4	3	375
9	4	5	375
10	4	8	375

2.3. Diskussion der Ergebnisse

2.3.1. Diskussion der Ergebnisse aus 2.2.1.

Aufgrund der leider kleinen Zahl der Probanden ist die Aussagekraft dieser Ergebnisse sehr gering (siehe 2.3.3.). Besonders in den interessanten Bereichen der Personen mit vielen Füllungen fanden sich kaum Testpersonen. Es zeigt sich allenfalls ein leichter Trend zu längeren Zeiten bei einer größeren Anzahl von Amalgamfüllungen. Diesen Trend bestätigt zwar auch die Ausgleichsrechnung, jedoch hat diese wegen der wenigen Daten wenig Aussagekraft.

Als Ergebnis scheint eine Korrelation zwischen der Speichelaktivität und der Plombenzahl wahrscheinlich.

Hierfür ergeben sich neben reiner Zufälligkeit diverse Erklärungsmöglichkeiten:

1. könnte sich eine Hemmung der α -Amylase durch Quecksilberionen aus Amalgamfüllungen zeigen
2. umgekehrt könnte aus einer großen Anzahl Füllungen auf eine allgemein schlechte Qualität des Speichels geschlossen werden
3. könnte man aus einer großen Anzahl Füllungen auf eine schlechte Mundhygiene und somit auf das Vorhandensein von Plaque schließen. Eine Beeinträchtigung des Speichels durch Plaquebakterien ist wahrscheinlich.

Keinesfalls lassen sich aus diesem Experiment eindeutige Aussagen über einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Amalgam im Mundraum und einer Hemmung der α -Amylase machen

2.3.2. Diskussion der Ergebnisse aus 2.2.2.

Als erstes Ergebnis kann formuliert werden, dass das Vorhandensein von Amalgam eindeutig die Aktivität der α -Amylase hemmt. Sowohl mit steigender Expositionsdauer als auch mit einer steigenden Anzahl Amalgamkörper nimmt die Aktivität der α -Amylase ab.

Dieses Ergebnis kann unter Beachtung aller möglichen Fehlerquellen als gesichert angesehen werden.

Zur Betrachtung der graphischen Darstellung (siehe Seite 8 - 10) muß zunächst auf die grobe Auflösung des Versuches hingewiesen werden. Da nur in einem 15 Sekunden Abstand getüpfelt wurde muß für jede gemessene Reaktionszeit eine Toleranz angenommen werden. Dieses Problem bestätigte sich bei der Durchführung des Versuchs. Bei einigen Versuchen lies sich die Reaktionszeit eindeutig bestimmen, da beim Tüpfeln 15 Sekunden vor der als Ergebnis angenommenen Zeit noch eine eindeutige violette Färbung vorhanden war. Bei anderen Versuchen war schon 15 Sekunden vor der als Ergebnis angenommenen Zeit kaum mehr eine violette Färbung vorhanden. Darum muß als tatsächliche Reaktionszeit das Ergebnis minus 0 bis minus 15 Sekunden angenommen werden.

(Im Folgenden konzentriert sich diese Diskussion bei der Auswertung der Ergebnisse aus Tabelle 2 auf die Expositionsdauern von zwei und fünf Minuten.

Dies hat folgende Gründe:

1. Es fehlt bei der Expositionsdauer von sieben Minuten der Vergleichswert für eine Anzahl von 0 Amalgamkörpern.
2. Für eine Expositionsdauer von zwei bzw. fünf Minuten wurden je doppelt so viele Versuche durchgeführt wie für eine Expositionsdauer von sieben Minuten. Daher wurde diese Messreihe als weniger verlässlich angesehen.
3. Die Reaktionszeit, die bei der Verwendung von acht Amalgamkörpern über eine Expositionszeit von sieben Minuten ermittelt wurde, muß zumindest angezweifelt werden, da sie als einzige dem Trend der Ergebnisse aus Tabelle 2 und 3 stark widerspricht.)

Bei der graphischen Auswertung der Ergebnisse aus Tabelle 2 wurden verschiedene Ausgleichsgraphen errechnet. Als sinnvoll werden einerseits eine lineare Regression (proportionaler Zusammenhang) und andererseits ein Polynom 2. Grades (Sättigungstendenz) angesehen. Es wurden jeweils die Ausgleichskurven mit dem geringsten mittleren Fehler errechnet. Es ergibt sich für ein Polynom 2. Grades ein nur wenig kleinerer mittlerer Fehler als bei einer linearen Regression, weiterhin ergeben sich (besonders bei einer Expositionsdauer von zwei Minuten) nahezu lineare Kurven.

Daraus schließen wir, dass zwischen der Anzahl verwendeter Amalgamkörper und der Reaktionszeit ein nahezu proportionaler Zusammenhang besteht.

Eine eventuell geringe Sättigung kann damit erklärt werden, dass bei einer hohen Anzahl an Amalgamkörpern keine entsprechend hohe Abradierung erfolgt (siehe auch 2.3.3. unten). Bei der graphischen Darstellung der Ergebnisse aus Tabelle 3 (siehe Seite 10) deuten sich eindeutig Sättigungskurven an. (Das Ergebnis für eine Expositionsdauer von sieben Minuten bei einer Verwendung von 8 Amalgamkörpern muß angezweifelt werden s.o.).

Daraus läßt sich schließen, dass ein Großteil der eine Hemmung der Aktivität auslösenden Anlagerungsreaktionen von Quecksilberionen an das Enzym α -Amylase sofort nach Zugabe der Amalgamkörper geschieht. Zwei Erklärungen für diese Sättigung sind denkbar: eine tatsächliche Sättigung der α -Amylase-Lösung mit Quecksilberionen oder eine abnehmende Freisetzung von Quecksilberionen aus den Amalgamkörpern mit einer zunehmenden Expositionszeit. Da sich in der ersten Messreihe keine oder nur eine sehr geringe Sättigung andeutete, erscheint die zweite Möglichkeit wahrscheinlicher. Aufgrund unserer Untersuchungen kann auf diese Frage jedoch keine erschöpfende Antwort gegeben werden. Die Beurteilung des Zusammenhanges zwischen der Expositionszeit und der Anzahl Amalgamkörper zu der Reaktionszeit kann aufgrund der Toleranz der Reaktionszeit und den geringen, aber vorhandenen Fehlerquellen (z.B. Durchmischung) nicht als gesichert angesehen werden. Die oben gefolgerten Zusammenhänge sollten daher als Trends behandelt werden.

2.3.3. Diskussion der Fehlermöglichkeiten

Zu 2.2.1.

Der klinische Versuch, der unter 2.2.1. beschrieben wird, unterliegt vielen Störungen, da die Güte des Speichels unterschiedlichsten Einflüssen unterworfen ist und eine Standardisierung der Versuchsdurchführung nur in Ansätzen möglich war.

Genetische und physiologische Varianz bedingen unterschiedliche Zusammensetzungen des Speichels, die Einfluß auf die Aktivität des Speichels nehmen. Um diese Fehlermöglichkeit für das Gesamtergebnis ausschließen zu können, wäre eine größere Anzahl Probanden unbedingt erforderlich. Leider war uns dies bisher nicht möglich, da diese Untersuchungen einerseits sehr zeitaufwendig sind und es sich andererseits als schwierig herausgestellt hat, eine große Anzahl an Personen zu finden, die sich als Probanden bereitstellen. Darum ist eine Ausweitung dieser Tests auch der nächste Schritt, um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erlangen.

Eine Standardisierung war vor allem bei der Speichelspende nur in geringem Umfang möglich.

Um wenigstens grundlegende Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wird die Speichelspende nach dem Kauen eines zuckerfreien Kaugummis entnommen. Somit wird Reizspeichel getestet, der besser zu vergleichen ist, da Ruhespeichel eine noch größere Varianz in seiner Zusammensetzung aufweist.

Herr Prof. Dr. Ott machte uns darauf aufmerksam, dass Plaque ebenfalls einen großen Einfluß auf die Aktivität des Speichels hat. Die einzige Möglichkeit, diesen Einfluß auf das Ergebnis auszuschließen, wäre eine zahnärztliche Plaqueentfernung bei allen Probanden. Dies ist jedoch vollkommen utopisch.

Weiterhin wäre es erforderlich, zwischen der letzten Mahlzeit und der Speichelspende einen bestimmten Mindestabstand zu halten und die Mundhygiene der Testpersonen zu standardisieren. Auch dies erwies sich als undurchführbar.

Somit muß gesagt werden, dass die Ergebnisse dieser Versuche diversen Fehlermöglichkeiten unterworfen sind und die Aussagekraft leider sehr begrenzt ist.

Zu 2.2.2.

Um Fehler aufgrund der Versuchsumgebung zu vermeiden, wurden sämtliche Reagentien vor dem Versuch im Wasserbad auf eine Temperatur von 24°C gebracht. Während der Belastungszeit t befindet sich das Becherglas mit der α -Amylase-Lösung ebenfalls im Wasserbad. Die Raumtemperatur wurde ebenfalls konstant gehalten; sie betrug 23°C.

Auf die Verwendung eines pH-Puffers wurde verzichtet. Der Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität der α -Amylase ist zwar nicht unerheblich, da aber bei jedem Versuch mit denselben Reagentien gearbeitet wurde, ist der pH-Wert konstant und deshalb für das Ergebnis ohne Einfluß. Die Produkte der enzymatischen Reaktion verändern den pH-Wert nicht.

Bei der Herstellung und insbesondere beim Schleifen der Amalgamprobekörper war es nicht möglich, die Oberfläche genau konstant zu halten. Zum einen entstanden Luftbläschen im Amalgam und zum anderen konnten die Körper nicht exakt geschliffen werden. Nach unserer Ansicht sind die Unterschiede in der Oberflächengröße aber zu gering, um einen Einfluß auf das Gesamtergebnis auszuüben.

Für das Ergebnis ist ebenfalls die Durchmischung von α -Amylase-Lösung und Stärkelösung von Bedeutung. Um diese Fehlerquelle auszuschließen, wurden die Lösungen nur sofort nach der Zusammengabe für etwa zehn Sekunden und kurz vor der ersten Entnahme für etwa fünf Sekunden durch Schütteln durchmischt.

Eine weitere Fehlermöglichkeit ergibt sich aus einer möglichen Kontamination der verwendeten Gefäße mit Quecksilber. Es wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem α -Amylase-Lösung ohne Amalgamprobekörper über dem Magnetprüher plaziert wurde. Dabei wurde dasselbe Becherglas und derselbe Rührfisch verwendet wie bei allen anderen Versuchen. Es ergab sich eine um 30 Sekunden längere Zeit (345 sec für $t=5$ und $n=0$, siehe Tabelle 2) als bei unbelasteter α -Amylase-Lösung (315 sec für $t=0$ und $n=0$, siehe Tabelle 2). Der Einfluß auf das Gesamtergebnis wird jedoch als gering angesehen, weil diese Kontamination bei jedem Versuch vorlag, da schon vor der Aufnahme der ersten Messreihe Versuche mit Amalgam in diesem Becherglas gemacht wurden.

Die größte Fehlerquelle besteht in der Subjektivität der visuellen Auswertung. Die Entscheidung, zu welcher Zeit keine violette Färbung mehr vorliegt, basiert auf der Unterscheidung winziger Farbnuancen. Bei verschiedenen Lichtverhältnissen können Verfälschungen des Ergebnisses auftreten. Um dieser Fehlerquelle zu begegnen, wurden alle Versuche von der gleichen Person unter jeweils drei Lichtquellen ausgewertet.

Ein Problem ergibt sich für die Interpretation der Ergebnisse, da die Abradierung des Amalgams nicht notwendigerweise in einem Verhältnis zur Anzahl verwendeter Amalgamprobekörper n steht. Bei einer geringen Anzahl (z.B. $n=2$) kann es passieren, dass der Rührfisch die Amalgamprobekörper kaum berührt, während es bei einer grossen Anzahl (z.B. $n=8$) geschehen kann, dass der Rührfisch die Amalgamprobekörper nicht zu bewegen vermag.

3. Schluss

Schlussfolgerung:

Bei der klinischen Testreihe deutet sich eine Korrelation zwischen der Speichelaktivität und der Plombenzahl an.

Bei der Labortestreihe zeigt sich, dass mit einer erhöhten Amalgambelastung die Aktivität der α -Amylase abnimmt. Es deutet sich ein proportionaler Zusammenhang zwischen der Anzahl Amalgamkörper und eine Sättigung bei zunehmender Expositionsdauer an.

Weiterführung der Arbeit:

Zur Weiterführung der Arbeit bietet sich an, die klinische Messreihe auszuweiten. Dies ist zum einen nötig, um die Fehlerquellen zu minimieren und zum anderen, um das Ausmaß des Einflusses der Anzahl Amalgamfüllungen auf die Speichelaktivität zu bestimmen. Weiterhin wäre eine Überprüfung der Ergebnisse der Labortestreihe sinnvoll.

4.1. Literaturverzeichnis

1. A. Frankemölle: Eine Literaturübersicht zur Biochemie von Quecksilber und eine prospektive Studie über die Quecksilberbelastung von Zahnmedizinstudenten (Münster 1993)
2. H. Meiners, R. Marxkors: Taschenbuch der zahnärztlichen Werkstoffkunde, 3. Auflage (München 1988)
3. K.H.R. Ott, F. Loh, A. Kröncke, K.-H. Schaller, H. Valentin und D. Weltle: Zur Quecksilberbelastung durch Amalgamfüllungen (München 1984)
4. K.H.R. Ott: Zur Messung der Quecksilberbelastung im Speichel (Münster 1993)
5. K.H.R. Ott, T. Krafft, A. Kröncke, K.-H. Schaller, H. Valentin und D. Weltle: Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der Quecksilberfreisetzung aus Amalgamfüllungen nach dem Kauen (München 1986)
6. K.H.R. Ott: Messung der Quecksilberbelastung im Speichel (München 1993)
7. Jürgen Reiß: Experimentelle Einführung in die Pflanzencytologie und Enzymologie (Heidelberg 1977)

4.2. Danksagung

Wir bedanken uns

bei Herrn Rolf Kühr für die Anregung des Themas und die Betreuung,

bei Herrn Prof. Dr. K.H.R. Ott für Anregungen und Kritik sowie die Hilfe bei der Erstellung der Amalgamprobekörper und die Überlassung von diversem Literaturmaterial,

bei der Fa. Merck und insbesondere bei Frau Dr. Inge Lues für die Bereitstellung der α -Amylase,

bei der Fa. Bayer für die Bereitstellung von Labormaterial und Glucoseteststäbchen,

bei der Fa. Claas und insbesondere bei Herrn Pollmeyer für die Hilfe beim Schleifen der Amalgamprobekörper,

bei allen Probanden, die sich für diese Untersuchung zur Verfügung gestellt haben,

und bei unseren Eltern für ihre Unterstützung.

Kurzfassung und Ergänzung

Hemmung des Enzyms α -Amylase durch Metallionen aus Amalgamfüllungen

Projekt zum Regionalwettbewerb Jugend forscht '99 von Dirk Witthaut und Stefan Dutta

Einleitung und Problemstellung:

Das Problem der Gesundheitsverträglichkeit von Amalgamfüllungen ist ebenso bekannt wie umstritten. Angeregt durch Fernsehbeiträge, Aushänge beim Zahnarzt etc. beschlossen wir, uns selbst mit diesem Thema zu beschäftigen.

Auf Anregung unseres betreuenden Lehrers, Herrn Rolf Kühr, entschlossen wir uns, die Wirkungen der verwendeten Metalle auf die Aktivität von Enzymen zu untersuchen.

Wir entschieden uns, die Wirkung von Quecksilber auf das Enzym α -Amylase zu untersuchen, da dies mit unseren Mitteln gut durchgeführt werden kann

Das Enzym α -Amylase ist im menschlichen Speichel vorhanden und bewirkt dort eine Vorverdauung von Stärke zu Maltose (Malzzucker).

Die bisherige Forschung über eine mögliche Gesundheitsbelastung durch Amalgam konzentrierte sich bisher auf den toxikologischen Effekt und somit auf Untersuchungen über Aufnahme, Abgabe, Konzentration und Ablagerung von Quecksilber im Körper.

Es ist bekannt, dass Quecksilber diverse Enzyme in ihrer Aktivität beeinflussen kann.

Vornehmlich wird die Enzymaktivität gehemmt, sie kann jedoch auch gesteigert werden (z.B. bei 2,3-Diphosphoglyceromutase). Effekte auf die Aktivität eines Enzyms werden oftmals durch Reaktionen von Quecksilber mit Thiol- oder Dithiolgruppen hervorgerufen, sei es dass diese Reaktion die Funktion essentieller Thiolgruppen beeinflusst (Enzymhemmung) oder dass diese Reaktion mit unessentiellen Thiolgruppen eine Konformationsänderung bewirkt (Aktivierung).

Speziell Untersuchungen zur Aktivität der α -Amylase wurden bisher jedoch nicht durchgeführt, zumindest ist uns nichts darüber bekannt.

Durchführung:

Der wesentliche Teil des Projektes bestand aus einem Laborversuch, in dem wir die Reaktionsgeschwindigkeit einer künstliche Amylase-Lösung mit Stärke beobachteten.

Dazu stellten wir eine definierte Amylase-Lösung (0,001 g/l) her und kontaminierten diese über verschiedene Zeiträume (einige Minuten) mit einer bestimmten Anzahl von Amalgam-Probekörpern. Diese Probekörper bestanden aus handelsüblichem Amalgam und waren ausgehärtet und feingeschliffen. Dann versetzten wir 15 ml dieser kontaminierte Amylase-Lösung mit 100 ml Stärkelösung einer definierten Anfangskonzentration ($<0,2$ g/l).

Um die Reaktionsgeschwindigkeit, das heißt den zeitlichen Verlauf der Konzentrationsänderung der Stärkelösung zu bestimmen, bedienten wir uns der bekannten Nachweisreaktion von Stärke mit Lugols Lösung. Zu der zu untersuchenden Probe werden einige Tropfen Lugols Lösung (eine Jod/Kaliumjodid-Lösung) gegeben. Ist Stärke vorhanden,

verfärbt sich die Mischung intensiv violett. Diese Nachweise-Reaktion kann auch quantitativ genutzt werden.

Je nach Konzentration der Stärke verfärbt sich das Gemisch mehr oder weniger intensiv violett und transmittiert daher mehr oder weniger violettes Licht. Die Absorption der Probe ist dabei direkt proportional der Stärke-Konzentration. Eine solche Untersuchung kann mit handelsüblichen Photometern durchgeführt werden.

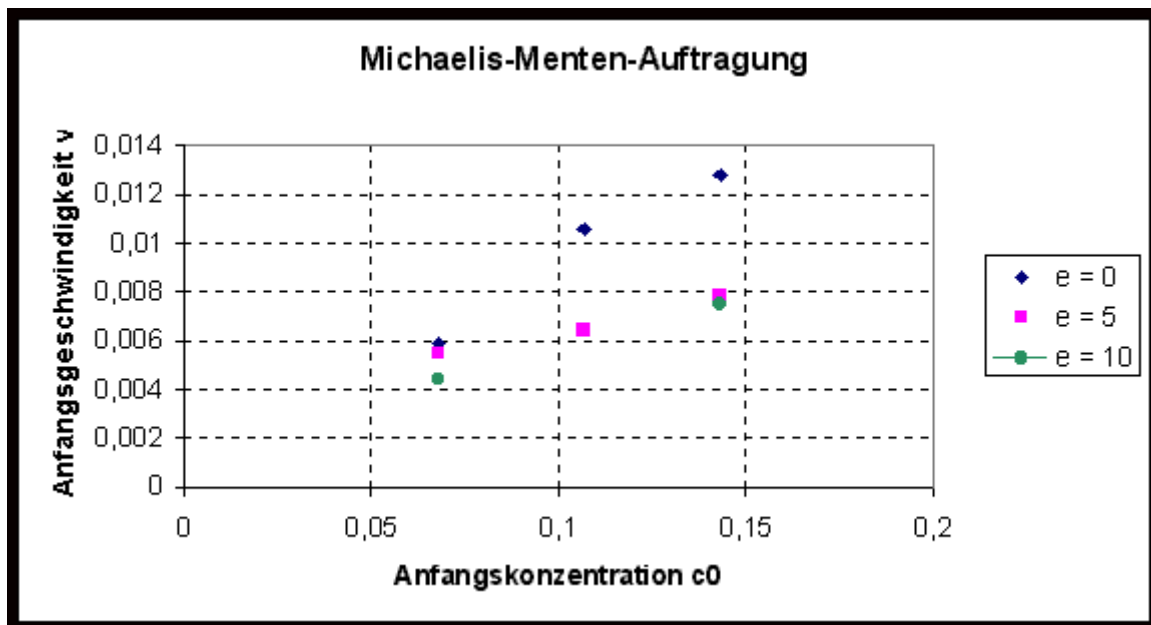
Wir entnahmen der Amylase/Stärke-Mischung nach verschiedenen Zeiten Proben und ermittelten die Konzentration der Stärke wie beschrieben. An die Messwerte für den Konzentrations-Zeit-Verlauf fitteten wir einen exponentiellen Abfall an und bestimmten so die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion. Diese Anfangsgeschwindigkeit ist der bestimmende Parameter für die Geschwindigkeit der Reaktion.

Weiterhin führte wir eine klinische Messreihe mit menschlichem Speichel durch. Leider konnten wir hier nicht genug Probanden finden, um eine Messreihe mit einer ausreichenden Signifikanz durchzuführen.

Ergebnisse:

Die Ergebnisse für die Anfangsgeschwindigkeiten der Amylase-Stärke-Reaktionen haben wir für die verschiedenen Kontaminierungszeiten der Amylase-Lösung mit Amalgam (keine Kontaminierung, 5 min, 10 min) über die Anfangsgeschwindigkeiten aufgetragen. Dies ist eine sog. "Michaelis-Menten Kinetik".

Es ergaben sich die folgenden Werte (dabei bedeutet e die Kontaminierungszeit in Minuten):



Eine solche Michaelis-Menten-Kinetik erlaubt die Bestimmung der Reaktionskonstanten. Leider ist es uns nicht gelungen, rechtzeitig zum Wettbewerb Jugend forscht ausreichend viele Messreihen durchzuführen. Bei dieser geringen Anzahl Messwerte hielten wir es nicht für sinnvoll, die Reaktionskonstanten tatsächlich anzugeben.

Man sieht jedoch bereits den Trend, dass die Anfangsgeschwindigkeit bei einer Kontamination unter denen ohne Kontamination liegen. Dies ist ein Hinweis auf eine tatsächliche Hemmung

der Enzymreaktion bei Vorhandensein von Amalgam in der Amylase-Lösung. Über eine mögliche Belastung des Speichels kann man damit noch nichts aussagen, da man nicht weiß, in wie weit Quecksilberionen von den Amalgamfüllungen in den Speichel gelangen können.