



universität
wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Bestimmung von anti-inflammatorischen und
antioxidativen Biomarkern in humanen
Zahnfleischepithelzellen nach Kauen eines mit 0,1%
Magnolienrindenextrakts angereicherten
Kaugummi“

Verfasserin

Julia Maria Imböck, Bakk.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt: Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreuerin / Betreuer: o.-Univ.-Prof.Mag.Dr Veronika Somoza

Inhaltsverzeichnis

I. Abbildungsverzeichnis	I
II. Tabellenverzeichnis.....	II
III. Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Einleitung	VII
2. Theoretischer Hintergrund	2
2.1 Entzündungsreaktionen und Marker zur Quantifizierung von Entzündungsreaktionen....	2
2.2 Entzündungskrankheiten in der Mundhöhle – Vorkommen, Entstehung und Behandlung.	7
2.3. Der Magnolienrindenextrakt (MBE) als antibakterielle und antiinflammatorische Substanz für den Einsatz in Zahnpflegekaugummi.....	9
2.4 Oxidativer Stress im Organismus	13
2.4.1. Zusammenhang zwischen Entzündungsreaktionen und oxidativem Stress.....	13
2.4.2. Auswirkungen von oxidativem Stress auf den Organismus.....	15
3. Fragestellung der Arbeit	19
4. Material und Methoden.....	21
4.1. Studiendesign.....	21
4.1.1. Studienpopulation	21
4.1.2. Charakterisierung des mit Magnolienrindenextrakts angereicherten Kaugummi..	22
4.1.3. Studienaufbau	23
4.1.4. Zielparameter.....	26
4.2 Materialien und Chemikalien.....	28
4.3. Methoden	30
4.3.1 Ermittlung der Compliance der Probanden/Probandinnen.....	30
4.3.2. Photometrische Bestimmung der Katalaseaktivität	30
4.3.3. Bestimmung von oxidativen DNA-Schäden mittels Comet Assay	32
4.3.4. Bestimmung der Genexpression der Entzündungsmarker mittels qPCR.....	38
4.3.5. Bestimmung der Zytokin-Freisetzung mittels Luminex-Technologie	44
4.4. Statistik.....	49
5. Ergebnisse	52
5.1. Probandencharakterisierung und Zellviabilität.....	52
5.2. Compliance der Probanden/Probandinnen	53

5.3. Photometrische Bestimmung der Katalaseaktivität	55
5.4. Bestimmung der DNA-Schäden mittels Comet Assay	56
5.5 Der Entzündungsmarker IL-8.....	61
5.5.1. Einfluss der sechsstündigen PG-LPS-Inkubation auf die Genexpression und die Exkretion von IL-8	61
5.5.2. Einfluss des Kaugummikauens auf das Chemokin IL-8 auf der Genebene.....	63
5.5.3. Einfluss des Kaugummikauens auf das Chemokin IL-8 auf funktioneller Ebene	66
5.6 Einfluss der Kaugummis auf weitere Entzündungsmarker auf der Genebene.....	68
5.7. Einfluss der Kaugummis auf weitere Entzündungsmarker auf funktioneller Ebene	73
6. Diskussion	78
7. Zusammenfassung:.....	92
8. Literaturverzeichnis	94
9. Anhang.....	102
9.1. Messdaten	102
9.1.1. Zellzahlen und Viabilität	102
9.1.2. Bestimmung der photometrischen Katalaseaktivität [MU/l]	106
9.1.3. Bestimmung der DNA-Schäden mittels Comet Assay	107
9.1.4. Bestimmung der Zytokin-/Chemokinausschüttung mittels Luminex-Technologie .	109
9.1.4. Bestimmung der Genexpression mittels qPCR	120
9.2. Graphen und Kurven	128
Lebenslauf	143

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Erkennung von LPS durch TLR-4	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Chemotaxis zur Rekrutierung von Leukozyten	5
Abbildung 3: Strukturformeln von Magnolol und Honokiol	9
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Produktion von RNS/ROS.....	14
Abbildung 5: Strukturformeln von Guanin und der Oxidationsprodukte 8-oxo-G und Fapy-G	16
Abbildung 6: Folgen der oxidativen DNA-Schädigungen	17
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Studiendesigns.....	25
Abbildung 8: Zusammenfassung der durchgeführten Analysen und der Zielparameter	27
Abbildung 9: Reaktionsmechanismus des Enzyms Fpg.....	32
Abbildung 10: Darstellung eines Comets in Pixelform	36
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Prinzips der Fluoreszenzmessung mit SYBRGreen	43
Abbildung 12: Fluoreszierende Farbkodierung der Mikrosphären.....	45
Abbildung 13: Schematische Darstellung des Prinzips der LUMINEX Technologie	45
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Detektion	48
Abbildung 15: Einfluss von PG-LPS auf die Katalaseaktivität.....	55
Abbildung 16: Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf die Katalaseaktivität.....	56
Abbildung 17: Einfluss von PG-LPS auf das Auftreten von DNA-Strangbrüchen	57
Abbildung 18: Einfluss von PG-LPS auf das Auftreten von oxidativen DNA Schäden.....	58
Abbildung 19: Einfluss der Interventionsphase auf das Auftreten von DNA-Strangbrüchen.....	60
Abbildung 20: Einfluss von PG-LPS auf die Genexpression und die Freisetzung von IL-8	62
Abbildung 21: Einfluss der Interventionsphase auf die Genexpression von <i>IL-8</i>	64
Abbildung 22: Einfluss der Interventionsphase auf die durch PG-LPS ausgelöste Erhöhung der Genexpression von <i>IL-8</i>	65
Abbildung 23: Einfluss der Interventionsphase auf die IL-8-Ausschüttung.....	67
Abbildung 24: Einfluss der Interventionsphase auf die durch PG-LPS ausgelöste Erhöhung der IL-8 Freisetzung.....	68
Abbildung 25: Einfluss von PG-LPS auf die Genexpression von <i>IL-1α</i> , <i>IL-1β</i> und <i>CCR1</i>	69
Abbildung 26: Einfluss der Interventionsphase auf die Genexpression von <i>IL-1α</i> , <i>IL-1β</i> und <i>CCR1</i>	70

Abbildung 27: Einfluss der Interventionsphase auf die durch PG-LPS ausgelöste Genexpression von <i>IL-1α</i> und <i>IL-1β</i>	71
Abbildung 28: Einfluss der Interventionsphase auf die durch PG-LPS ausgelöste Genexpression von <i>CCR1</i>	72
Abbildung 29: Einfluss von PG-LPS auf die Freisetzung von <i>IL-1α</i> , <i>IL-1β</i> , <i>MIP-1β</i> und <i>TNF-α</i>	73
Abbildung 30: Einfluss der Interventionsphase auf die Ausschüttung von <i>IL-1α</i> , <i>IL-1β</i>	75
Abbildung 31: Einfluss der Interventionsphase auf die Ausschüttung von <i>TNF-α</i> und <i>MIP-1β</i>	75
Abbildung 32: Einfluss der Interventionsphase auf die durch PG-LPS ausgelöste erhöhte Ausschüttung von <i>IL-1α</i> , <i>IL-1β</i> , <i>MIP-1β</i> und <i>TNF-α</i>	76

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung einiger proinflammatorischer und anti-inflammatorischer Zytokine.....	7
Tabelle 2: Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die im Organismus gebildet werden	13
Tabelle 3: Katalysierte Reaktionen der Katalase und der Superoxiddismutase.....	15
Tabelle 4: Spezifikationen des als Novel-Food zugelassenen Magnolienrindenextrakts.....	22
Tabelle 5: Gensequenzen der eingesetzten Primer	41
Tabelle 6: Softwareeinstellungen für die PCR-Messung	42
Tabelle 7: Mittelwerte der gemessenen Schmelztemperaturen der PCR-Produkte.....	44
Tabelle 8: Erwarteter Bereich für die Qualitätskontrollen und Mittelwert (Minimum - Maximum) der tatsächlich gemessenen Werte	49
Tabelle 9: Detektionsschwellen (LOD) der Bestimmung der Entzündungsmediatoren mittel Luminex-Technologie	49
Tabelle 10: Zellviabilität [%] der vier Gruppen vor (t_0) und nach (t_1) der Interventionsphase ...	53
Tabelle 11: Durchschnittlicher Verbrauch an Kontrollzahnpaste und der Zahnpaste Colgate total® in [g/Tag]	53
Tabelle 12: Durchschnittlicher Verbrauch an Kontrollzahnpaste pro Gruppe	53
Tabelle 13: Schweißintensitätswerte (%) der vier Gruppen zum Zeitpunkt t_0 und t_1 und die relative Veränderung in % nach der zweiwöchigen Interventionsphase	60
Tabelle 14: Mittelwert und Schwankungsbreite der IL-8-Freisetzung aus den Zahnfleischepithelzellen zu Beginn der Interventionsphase (t_0).....	66

III. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
8-oxo G	8-oxo-7,8-dihydroguanin (=8-Oxoguanin)
A	Adenin
AAP	American Academy of Periodontology
Abb	Abbildung
Akt	Proteinkinase B
AP-1	Aktivatorprotein-1
AP-Stelle	apurinic/apyrimidinic site
BER	base excision repair
BSA	bovine serum albumin (=Rinderalbumin)
c	Konzentration
C	Cytosin
CCR1	CC-Chemokinrezeptor 1
CD	Cluster of differentiation
CD 14	Teil des LPS-Rezeptors
CD 18	Integrin-β2
CD11 a, b, c	α-Unterheiten der Integrine
CDC	Center for Disease Control
cDNA	complementary DNA (=komplementäre DNA)
CON	Kontrolle
CPI	Community Periodontal Index
c _T -Wert	Cycle Treshold
df	Freiheitsgrade
DMS	Deutsche Mundgesundheitsstudie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate

E	Extinktion
E-coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extrazelluläre signalregulierte Kinase
et al.	<i>et alii</i> (Maskulinum), <i>et aliae</i> (Femininum) oder <i>et alia</i> (Neutrum),
EU	Europäische Union
FapyG	2,6-diamino-4-hydroxy-5-foramidopyrimidin
FBS	Fetales Kälberserum (fetal bovine serum)
fMPL/ CB	N-Formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanin/ Cytochalasin B
Fpg	Formamidopyrimidinglykosylase
FSA	britische Lebensmittelprüfbehörde (Food Standard Agency)
g	Erdbeschleunigung $g \approx 9,81 \text{ m/s}^2$
G	Guanin
g, mg, µg, ng, pg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm, Pikogramm
HEPES	4,2-Hydroxyethyl-1-piperazinethansulfonsäure
HGF-Zellen	humane gingivale Fibroblasten
HPLC	High performance liquid chromatography
IKK	Inhibitorische-κB-Kinase
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
IRAK	IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase
IκB	Inhibitor-κB
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KG	Kaugummi
l / ml/ µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LMA	Low Melting Agarose
LPS	Lipopolysaccharid

LTB4	Leukotrien B4
M /mM /nM	Molar / millimolar / nanomolar
mA	Milliampere
Mac-1	Makrophagen-1-Antigen (=Komplementrezeptor 3)
MAP3K	Mitogen aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase (=MEKK-1)
max	maximal
MCP-1	Monozyten chemotaktisches Protein-1
MEK	MAPK/ERK-Kinase
MFI	Median der Fluoreszenzintensität
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	mindestens
MIP-1 β	Macrophage Inflammatory Protein -1 β (= CCL 4; CC-Chemokin 4)
MM	Molekulargewicht
MMP	Matrixmetalloprotease
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
MyD88	Myeloid Differenzierungsfaktor 88
n	Anzahl der Probanden/Probandinnen (außer im Text anders angegeben)
N ₀	Anfangsgehalt der cDNA
NADPH	reduzierte Form des Nicotinsäureamidadenindinukleotidphosphat
NER	Nucleotide excision repair
NFW	Nukleasefreies Wasser
NF- κ B	Nukleärer Faktor- κ B
nm	Nanometer
NMA	Normal Melting Agarose
N _n	cDNA-Gehalt nach n PCR Zyklen
NOAEL	no observed adverse effect level

OD	Optische Dichte
p	Signifikanzwert
p38	stressaktivierte MAP-Kinase mit 38kD
p65, p50	Untereinheiten von NF-κB
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular pattern)
PBS	Phosphate-Buffered-Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction (= Polymerase-Kettenreaktion)
PG-LPS	Lipopolysaccharid von <i>Porphyromonas gingivalis</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pmol	picomol
ppm	Parts per million
QK 1/ QK 2	Qualitätskontrolle 1/ 2
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
R	Spannweite
Raf	(rapidly accelerated fibrosarcoma); = Proteinkinase
Ras	(Rat sarcoma), = G-Protein
RIP	Rezeptorinteragierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
Rn-Werte	Fluoreszenzsignal-Werte bei der pPCR
ROS	Reactive Oxygen Species (reaktive Sauerstoffspezies)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Medium
RT	Reverse Transkriptase
s	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwert (standard error of means)
STAT	Signaltransducer und Aktivator der Transkription
T	Thymin
t ₀	Zeitpunkt vor der Interventionsphase

t ₁	Zeitpunkt nach der Interventionsphase
Tab	Tabelle
TAC	Totale antioxidative Kapazität
TAK	TGF- β -aktivierte Kinase
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TI	Tail Intensity (=Schweifintensität)
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
TRAIP	TRAF-interagierendes Protein
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U /MU	Units/ Megaunits
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	Volt
W	Watt
ZP	Zahnpasta
β -ME	β -Mercaptoethanol
ϵ	Extinktionskoeffizient

1. Einleitung

Entzündungsreaktionen werden durch die Immunantwort des Organismus auf schädigende Stimuli ausgelöst und spielen bei vielen Krankheiten, unter anderem auch bei rheumatischen Erkrankungen, Arteriosklerose, Asthma, Hepatitis wie auch bei den Parodontalerkrankungen Gingivitis (Entzündung des Zahnfleischs) und Parodontitis (Entzündung des Zahnhalteapparats) eine wichtige Rolle.

Die vierte deutsche Zahngesundheitsstudie (DMS IV) zeigte, dass etwa die Hälfte der deutschen Bevölkerung an moderater Parodontitis leidet und daher aufgrund der weiten Verbreitung der Entzündungserkrankungen der Mundhöhle ein Handlungsbedarf in der Prävention besteht [Holtfreter et al., 2010].

Gingivitis wird durch Bakterienansammlungen im Zahnplaque ausgelöst und kann bei Nichtbehandlung und Übergreifen der Entzündungsreaktion auf den Zahnhalteapparat zu Parodontitis und dabei im schwersten Fall zu Zahnverlust führen [Pihlstrom et al., 2005].

Da diese Erkrankungen der Mundhöhle durch Entzündungsreaktionen auf orale Bakterien ausgelöst werden, ist eine gründliche Mundhygiene zur Entfernung der Bakterienansammlungen im Zahnplaque notwendig, um die Zahnfleischentzündungen einzudämmen. Darüber hinaus können antibakterielle oder entzündungshemmende Substanzen eingesetzt werden, um orale Bakterien abzutöten und entzündliche Reaktionen im Zahnfleisch zu vermindern.

Zuckerfreie Kaugummis werden häufig als Zahnhygieneartikel vor allem in der Kariesprävention genutzt und können durch Anreicherung mit entzündungshemmenden sowie antibakteriellen Wirkstoffen auch als Vorbeugungsmaßnahme gegen Parodontitis eingesetzt werden. Dabei wäre vor allem der Einsatz von natürlichen Wirkstoffen, wie zum Beispiel die Anreicherung mit Pflanzenextrakten, wünschenswert, da die Produkte für den menschlichen Verzehr geeignet sein müssen.

2. Theoretischer Hintergrund

2.1 Entzündungsreaktionen und Marker zur Quantifizierung von Entzündungsreaktionen

Unter Entzündungsreaktionen wird die komplexe Antwort eines Organismus auf schädigende Stimuli verstanden, um diese Reize zu entfernen und das Gewebe zu schützen. Entzündungen entstehen zum Beispiel durch die Immunantwort des Organismus auf eine bakterielle Infektion des Gewebes und sind charakterisiert durch das Eindringen von Leukozyten, wie neutrophile Granulozyten und Monozyten, aus dem Blutstrom in das betroffene Gewebe. Diese Zelltypen werden zu den Phagozyten gezählt und können Bakterien in ihr Inneres aufnehmen, um sie dort abzutöten. Dadurch werden die typischen Anzeichen einer Entzündung, nämlich *tumor* (Schwellung), *rubor* (Rötung), *calor* (Erhitzung) und *dolor* (Schmerz), verursacht.

Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen oder neutrophile Granulozyten, können Bakterien anhand konservierter Strukturen, sogenannter Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMP), erkennen und diese über spezifische Rezeptoren, die an ihrer Zelloberfläche exprimiert sind, binden. Zu diesen Rezeptoren, die als Pattern Recognition Rezeptoren bezeichnet werden, zählen unter anderem die Toll-Like-Rezeptoren (TLR) [Medzhitov et al., 1997].

Zu den Strukturen, die erkannt werden, zählen unter anderem die Lipopolysaccharide (LPS) der Zellaußenmembran gramnegativer Bakterien. Lipid A, eine Teilkomponente der Lipopolysaccharide, wird von dem Toll-Like-Rezeptor 4 (TLR4) gebunden, wodurch in der Zelle über eine Signalkaskade der Transkriptionsfaktor NF- κ B (Nukleärer Faktor - κ B) von seinem Inhibitor (I κ B) freigesetzt und in den Nukleus transloziert wird. Dort bewirkt er die Transkription und in weiterer Folge die Sezernierung von Entzündungsmediatoren, wie die der Zytokine oder Chemokine (Abb. 1). Durch die Stimulation der Zellen mit LPS kann daher eine Entzündungsreaktion ausgelöst werden [Darveau et al., 2004; Ogawa et al., 2002].

Unter dem Begriff Zytokin wird eine Gruppe von Proteinen zusammengefasst, die von Zellen ausgeschüttet werden, um eine Reaktion anderer Zellen auszulösen, wenn sie an spezifische Rezeptoren gebunden werden. Zytokine sind daher entscheidend für die Kommunikation zwischen den an der Immunantwort beteiligten Zellen.

Als Chemokine werden Zytokine bezeichnet, die eine chemotaktische Wirkung auf spezifische Zelltypen haben und diese aus dem Blutstrom in das betroffene Gewebe rekrutieren können [Dinarello, 2000; Groves und Jiang, 1995].

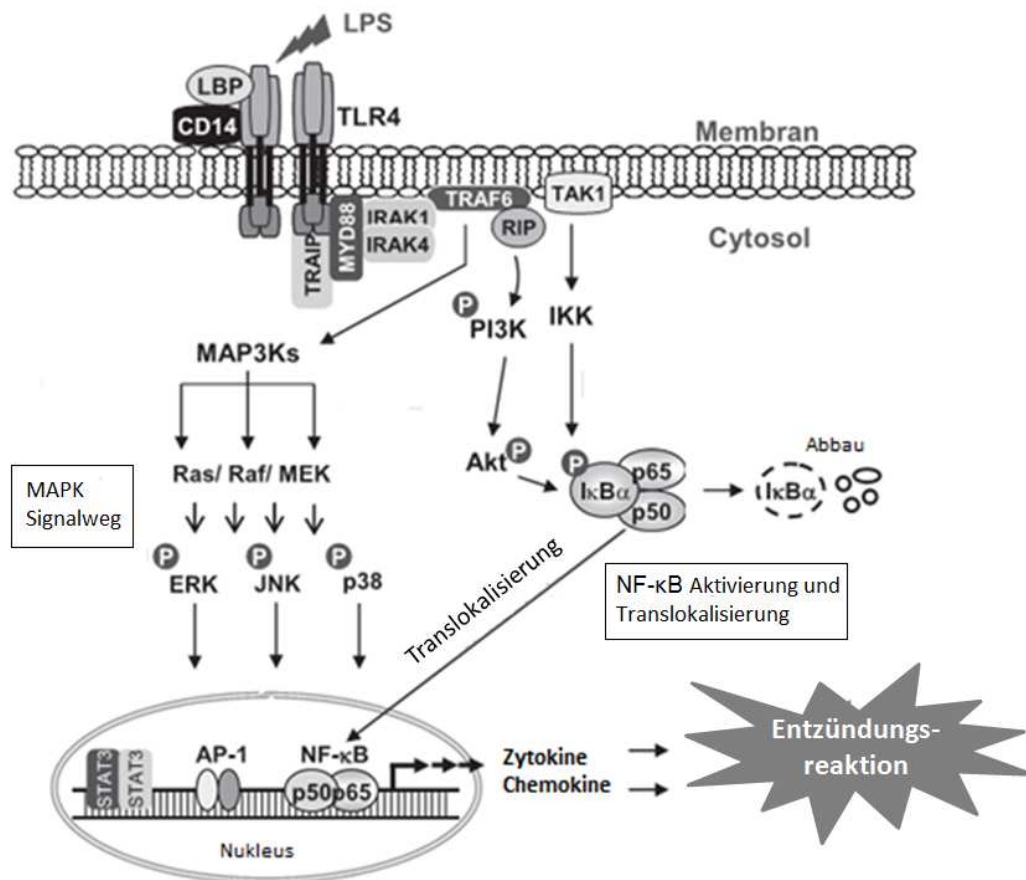


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Erkennung von LPS durch den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR-4) und der Transkription von Cytokinen und Chemokinen über den NF-κB Signalweg; LPS = Lipopolysaccharide, LBP = Lipopolysaccharid-bindendes-Protein, CD14 = Teil des LPS-Rezeptors, TRAF = Tumornekrosefaktor-Rezeptor assoziierter Faktor, TRAF6 = TRAF-interagierendes-Protein, MyD88 = Myeloid Differenzierungsfaktor 88, IRAK 1/IRAK 4 = Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Kinase 1/4, RIP = Rezeptor-interagierendes Protein, PI3K = Phosphoinositid-3-Kinase, TAK 1 = TGF-β-aktivierte Kinase 1, TGF = transformierender Wachstumsfaktor, IKK = Inhibitorische-κB-Kinase, Akt = Proteinkinase B, IκBα = Inhibitor κBα, p65, p50 = Untereinheiten von NFκB, NFκB = Nukleärer Faktor κB, MAP3K = Mitogen-aktivierte Proteinkinase, Ras = G-Protein, Raf = Serin/Threonin-Proteinkinasen, MEK = MAPK/ERK-Kinase, ERK = extrazelluläre signalregulierte Kinase, JNK = c-Jun N-terminale Kinase, p38 = stressaktivierte MAPK mit 38 kD, AP-1 = Aktivatorprotein-1, STAT3 = Signaltransducer und Aktivator der Transkription-3 [modifiziert nach Lai et al., 2011]

Dringen Bakterien in ein Gewebe ein, werden sie durch im Gewebe lokalisierte Makrophagen anhand konservierter Muster erkannt, wodurch diese aktiviert werden und Zytokine ausschütten, die weitere Leukozyten zur Bekämpfung der Bakterien an die betroffene Stelle rekrutieren können.

Zu diesen Zytokinen zählen unter anderem der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und das Interleukin-1 (IL-1). Diese Zytokine stimulieren die Endothelzellen, die dadurch Adhäsionsmoleküle, wie die Selektine, produzieren und dadurch im Blut zirkulierende Leukozyten an das Endothelium binden und diese in ihrer Bewegung im Blutstrom bremsen [Hahne et al., 1993]. Auf der Zelloberfläche der Leukozyten werden Adhäsionsrezeptoren, wie die Integrine, exprimiert. Durch die Chemokine, wie beispielsweise Interleukin-8 (IL-8), die von den Makrophagen und den Endothelzellen ausgeschüttet werden, wird die Bindungsaktivität dieser Adhäsionsrezeptoren für die entsprechenden Liganden am Endothelium erhöht [Detmers et al, 1990]. Dadurch werden die Leukozyten fest gebunden, können durch das Endothelium wandern und dem Chemokingradienten bis zum Infektionsherd im Gewebe folgen (Abb. 2).

Dieser Vorgang gewährleistet, dass Zellen, die an der Bakterienabwehr beteiligt sind, an den Ort der Infektion gelangen.

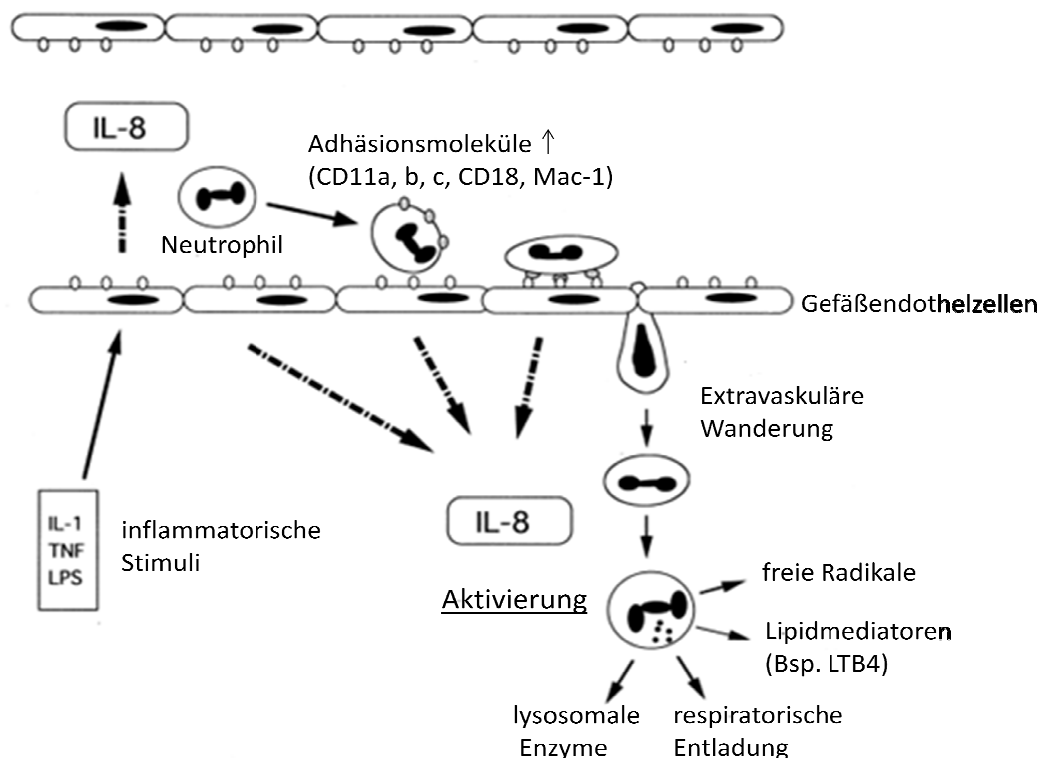
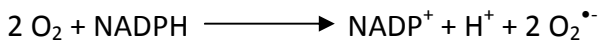


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Chemotaxis zur Rekrutierung von Leukozyten in das Gewebe am Beispiel des Chemokins IL-8; Mac-1 = Makrophage-1 Antigen (=Komplementrezeptor-3), CD11 a,b,c = α -Untereinheiten von Integrinen, CD18 = Intergrin- β 2, LTB-4 = Leukotrien B4 [Mukaida et al, 1998]

Die Chemokine, zu denen neben dem IL-8 (CXCL-8) auch MIP-1 β (CCL-4, Macrophage inflammatory protein-1 β) zählt, üben jeweils eine chemotaktische Wirkung auf spezifische Zelltypen aus. Interleukin-8 rekrutiert vor allem neutrophile Granulozyten [Leonard et al., 1991], aber auch basophile Granulozyten [White et al., 1989] und T-Lymphozyten [Larsen et al., 1989], an den Infektionsherd im Gewebe und kann diese außerdem aktivieren.

Die Hauptaufgabe der Phagozyten ist eindringende Bakterien im Blut und im Gewebe abzutöten. Die Bakterien werden aufgrund der konservierten Muster gebunden und durch Phagozytose in die Zellen aufgenommen. Dadurch werden die Zellen aktiviert und es werden Enzyme, die zur Verdauung der Bakterien eingesetzt werden, wie zum Beispiel die NADPH-Oxidase, aktiviert. Dieses Enzym katalysiert die Reaktion von Sauerstoff, unter Aufnahme eines Elektrons von NADPH, zum Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$)

[siehe Reaktionsgleichung]. Diese vermehrte Produktion an Sauerstoffspezies wird als respiratorische Entladung bezeichnet (respiratory burst) [DeLeo et al., 1999].



Superoxidanionen sind Radikale und werden zu den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gezählt.

Außerdem wird durch die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) aus Arginin Stickstoffmonoxid (NO) gebildet. Die aufgenommenen Bakterien werden mit diesen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beziehungsweise reaktiven Stickstoffspezies (RNS) in Verbindung gebracht und dadurch abgetötet.

Dieser Vorgang findet in den Lysosomen der Phagozyten statt. Werden ROS allerdings auch an den extrazellulären Raum abgegeben, kann dies zu Gewebeschädigungen führen [Babior, 2000].

Marker zur Quantifizierung von Entzündungsreaktionen

Eine Entzündungsreaktion ist durch das Eindringen von Leukozyten aus dem Blutstrom in das infizierte Gewebe gekennzeichnet. Eine wichtige Rolle bei diesen Prozessen der angeborenen Immunantwort spielen die Zytokine und Chemokine, die für die Signalübertragung und die Kommunikation zwischen den Zellen verantwortlich sind und unter anderem auch von Leukozyten ausgeschüttet werden. Kommt es daher in einem Gewebe zu einer Entzündungsreaktion, so hat dies eine erhöhte Ausschüttung von Zytokinen beziehungsweise von Chemokinen zur Folge.

Deshalb kann das Ausmaß einer Entzündung anhand dieser Entzündungsmediatoren beurteilt werden.

Es wird zwischen pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α oder IL-1, sowie den Chemokinen IL-8 oder MIP-1 β , welche zum Auftreten beziehungsweise zum Fortschreiten der Entzündung beitragen und anti-inflammatorischen Zytokinen, die eine inhibierende Wirkung auf die proinflammatorischen Zytokine haben, unterschieden (Tab. 1).

Tabelle 1: Auflistung einiger proinflammatorischer und anti-inflammatorischer Zytokine

proinflammatorische Zytokine	antiinflammatorische Zytokine
TNF- α	IL-4
IL-1 α , IL-1 β	IL-10
IL-6	IL-11
MIP-1 β	IL-13
IL-8	

Außerdem können noch weitere Entzündungsmediatoren, wie Adhäsionsmoleküle, Akut-Phase-Proteine oder Proteasen, wie Matrixmetalloproteasen, zur Beschreibung einer Entzündungsreaktion herangezogen werden.

2.2 Entzündungskrankheiten in der Mundhöhle – Vorkommen, Entstehung und Behandlung

Entzündliche Erkrankungen in der Mundhöhle, wie Gingivitis oder Parodontitis, sind in der Bevölkerung weit verbreitet. Die vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV) im Jahr 2005 zeigte, dass je nach zugrundeliegender Parodontitisdefinition zwischen 7,8 % laut CDC-AAP (Center for Disease Control, American Academy of Periodontology) und 20,5 % laut CPI (Community Periodontal Index) der 35 – 44 Jährigen in Deutschland an schwerer und zwischen 45,4 % (CDC-AAP) und 52,7% (CPI) an moderater Parodontitis leiden [Holtfreter et al., 2010].

Bei mangelnder Mundhygiene kann es zu einer Akkumulation von Zahnplaque und einer Vermehrung oraler, potenziell pathogener Bakterien und hiermit zu einer Veränderungen in der bakteriellen Zusammensetzung kommen [Kumar et al., 2003; Kumar et al., 2006].

Ein Bakterium, das mit der Entstehung von entzündlichen Erkrankungen in der Mundhöhle in Zusammenhang gebracht wird, ist *Porphyromonas gingivalis*. Dabei handelt es sich um ein gramnegatives Bakterium, das Lipopolysaccharide produziert und im Zahnplaque vorkommt [Griffen et al., 1998].

Es konnte gezeigt werden, dass die Lipopolysaccharide dieses Bakteriums (PG-LPS) über die Toll-like-Rezeptoren 2 und 4 (TLR-2/ TLR-4) den NF- κ B-Signalweg aktivieren und zur vermehrten Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen führten. PG-

LPS kann daher eine Entzündungsreaktion des Zahnfleisches hervorrufen [Ogawa et al., 2002; Darveau et al., 2004].

Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Stimulation von humanen gingivalen Fibroblasten mit 10 µg/ml PG-LPS eine vermehrte Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 zur Folge hat [Walker et al., 2013].

Typische Anzeichen von Zahnfleischentzündungen sind gerötetes und geschwollenes Zahnfleisch sowie eine Blutungsneigung des Zahnfleisches.

Werden in der Folge der Entzündungsreaktion von den Leukozyten Matrixmetalloproteasen, wie die neutrophile Kollagenase MMP-8, ausgeschüttet [Romanelli et al., 1999], kann auch der Zahnhalteapparat, wie Zahnknochen und Sehnen, angegriffen werden. Dadurch entstehen außerdem sogenannte Zahnfleischtaschen zwischen dem Zahn und dem umliegenden Zahnfleisch, worin sich wiederum Bakterien ansammeln können. Aufgrund der Freisetzung der Proteasen kann es zur Lockerung und im schlimmsten Fall zum Ausfallen der Zähne kommen. Wenn auch der Zahnhalteapparat von der Entzündung betroffen ist, wird dies als Parodontitis bezeichnet.

Durch gründliche Zahnhygiene kann der Zahnplaque entfernt und daher die Zahnfleischentzündung (Gingivitis) eingedämmt werden. Daher ist eine gute tägliche Mundhygiene durch Zähneputzen, Verwendung von Mundwasser oder Zahnseide wichtig, um entzündlichen Erkrankungen in der Mundhöhle vorzubeugen.

Als Zahnhygieneartikel werden oftmals auch zuckerfreie xylitolhaltige Kaugummis eingesetzt, da das Kauen von Kaugummis den Speichelfluss anregt und damit aufgrund der höheren pH-Pufferkapazität des Speichels die Demineralisierung des Zahnes vermindern und Karies vorbeugen kann [Polland et al., 2003].

Das Kaugummikauen an sich hat allerdings keinen Einfluss auf die Reduktion des Plaques an den Zahnseitenflächen, der an der Entstehung von Gingivitis beteiligt ist [Hanham und Addy, 2001]. Durch den Zusatz von antibakteriellen oder entzündungshemmenden Wirkstoffen könnten Kaugummis als

Vorbeugungsmaßnahme gegen Zahnfleischentzündungen sowie in der Parodontitisprophylaxe eingesetzt werden.

2.3. Der Magnolienrindenextrakt (MBE) als antibakterielle und antiinflammatorische Substanz für den Einsatz in Zahnpflegekaugummis

Der Magnolienrindenextrakt wird durch Extraktion mit superkritischem CO₂ aus der Rinde des Magnolienbaumes (*Magnolia officinalis ssp. biloba.*) gewonnen und besteht hauptsächlich aus den beiden Substanzen Magnolol (5,5'-diallyl-2,2'-dihydroxydiphenyl) und Honokiol (5,3'-diallyl-2,4'-dihydroxydiphenyl). Bei diesen Substanzen handelt es sich um Diphenyle mit Allylseitenketten aus der Gruppe der Neolignane [Kuo et al., 2013], deren Strukturformeln in Abbildung 3 dargestellt sind.

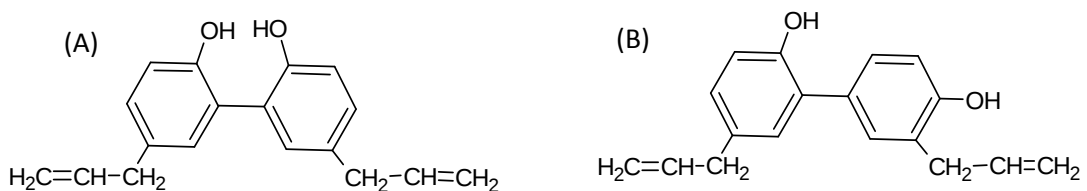


Abbildung 3: Strukturformeln von Magnolol (A) und Honokiol (B)

Toxizität des Magnolienrindenextrakts

Die akute und subchronische Toxizität des Magnolienrindenextrakts wurde an Ratten, denen über einen Zeitraum von 21 Tagen bis zu 480 mg/kg Körpergewicht beziehungsweise in einer 90-tägigen Studie bis zu 240 mg/kg Körpergewicht Magnolienrindenextrakt gefüttert wurden, getestet. Es konnte keine Toxizität bei oraler Verabreichung des Extrakts festgestellt werden. Daher wurde ein NOAEL-Wert von > 240 mg/kg Körpergewicht festgelegt [Liu et al., 2007].

Außerdem konnte weder *in vitro* noch *in vivo* in Mäusen ein genotoxisches Potential des Extrakts gezeigt werden [Li et al., 2007; Zhang et al., 2008]. Diese Studien bestätigen die Sicherheit der oralen Aufnahme des Magnolienrindenextrakts.

Außerdem wurde der Magnolienrindenextrakt 2011 durch die britische Lebensmittelprüfbehörde FSA (Food Standard Agency) als neuartige Lebensmittelzutat

laut Novel-Food-Verordnung für den Einsatz in Kaugummis zugelassen und ist daher für den menschlichen Verzehr geeignet.

Der Magnolienrindenextrakt, der auch in der traditionellen chinesischen Medizin Verwendung findet, weist laut *in vitro* und *in vivo* Studien eine antibakterielle sowie eine entzündungshemmende Wirkung auf [Greenberg et al., 2007; Walker et al., 2013].

Antimikrobielle Wirkung des Magnolienrindenextrakts sowie seiner Hauptkomponenten

In einer Studie von Greenberg et al., (2007) konnte gezeigt werden, dass nach zwanzigminütigem Kauen eines mit 2 mg Magnolienrindenextrakt angereicherten Kaugummis die Anzahl oraler Bakterien, wie *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* und *Streptococcus mutans*, um 43 % reduziert wurde ($p < 0,05$). Das Kauen eines Kontrollkaugummis führte hingegen nur zu einer 18%igen Reduzierung der Bakterienpopulation. In *in vitro*-Tests konnte außerdem eine minimale Hemmkonzentration (MHK) von 8 – 31 µg/ml je nach Bakterium bestimmt werden und ein Kill-Time Assay zeigte, dass durch die Inkubation mit 3 mg Magnolienrindenextrakt die Bakterienpopulation nach zwei Minuten um 99,9 % reduziert wurde [Greenberg et al., 2007].

In einer humanen Interventionsstudie wurde gezeigt, dass das Kauen eines zuckerfreien mit Magnolienrindenextrakt angereicherten Kaugummis über einen Zeitraum von 30 Tagen den Abfall des Plaque-pH-Werts vermindert, die *Streptococcus mutans* Konzentration reduziert und gingivales Bluten im Vergleich zu einem xylitolhaltigem und einem Kontrollkaugummi reduziert und daher die Mundgesundheit der Probanden verbessern konnte. [Campus et al., 2011].

Außerdem konnte auch *in vitro* für die isolierten Hauptkomponenten des Extrakts – Magnolol beziehungsweise Honokiol – im Agarverdünnungstest (MHK = 25µg/ml) [Ho et al., 2001] und im Mikroverdünnungstest (MHK = 20 beziehungsweise 10 µg/ml) [Chang et al 1998] eine antimikrobielle Wirkung gegen parodontitisverursachende Bakterien der Mundhöhle, wie *Prophyromonas gingivalis*, gezeigt werden.

Antiinflammatorische Wirkung des Magnolienrindenextrakts beziehungsweise seiner Hauptkomponenten Magnolol und Honokiol

Walker et al., (2013) konnten in einer *in vitro* Studie an humanen gingivalen Fibroblasten (HGF-1-Zellen) zeigen, dass eine durch PG-LPS hervorgerufene Erhöhung der Ausschüttung von IL-8 und IL-6 durch die Inkubation mit 1 sowie 10 µg/ml Magnolienrindenextrakt signifikant reduziert werden konnte. Außerdem konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass Monozyten, die mit E-coli-LPS stimuliert wurden, nach circa 12 Stunden vermehrt Metalloproteasen (MMP-2, MMP-9) ausschütten und dass dieser Anstieg durch gleichzeitige Inkubation mit Magnolienrindenextrakt vermindert werden konnte.

Die antiinflammatorische Wirkung des Magnolienrindenextrakts wird vor allem durch seine zwei Hauptkomponenten Magnolol und Honokiol hervorgerufen.

So konnte in U-937 Monozyten gezeigt werden, dass die durch E-coli-LPS hervorgerufene erhöhte Genexpression von Zytokinen, wie IL-8, TNF- α und MCP-1 sowie der Metalloprotease MMP-9, durch Inkubation mit 60 µM Magnolol signifikant reduziert wird [Tse et al., 2007]. Außerdem konnten Magnolol wie auch Honokiol (5 – 15 µM) in THP-1 Monozyten die durch *Propionibacterium acne*-Stimulation ausgelöste vermehrte Ausschüttung von IL-8 und TNF- α signifikant inhibieren [Park et al., 2004].

Studien zum molekularen Mechanismus der entzündungshemmenden Wirkung von Magnolol und Honokiol konnten zeigen, dass diese Substanzen in den nachgeschalteten Prozess der NF- κ B-Aktivierung eingreifen und daran beteiligte Komponenten, wie IKK (I κ B-Kinase) [Tse et al., 2007] oder MEKK-1 [Lee et al., 2005], inhibieren, wodurch die Expression von NF- κ B-regulierten Genprodukten vermindert wird.

Tse et al., (2007) zeigten, dass die Vorbehandlung von U-937 Promonozyten mit 30 – 80 µM Magnolol dazu führt, dass die durch TNF- α -Stimulation ausgelöste Phosphorylierung und Degradierung des NF- κ B-Inhibitors I κ B inhibiert und somit die Aktivierung und Translokalisierung von NF- κ B in den Nukleus verhindert wird.

Fu et al. (2013) konnten in RAW 264.7 Zellen zeigen, dass Magnolol (15 – 60 µg/ml) die Zytokinexpression vermindern kann, indem es die durch LPS erhöhte Genexpression von TLR-4 reduziert und somit die Aktivierung von NF-κB und der MAPK-Phosphorylierungskaskade inhibiert.

Einfluss der Hauptkomponenten des Magnolienrindenextrakts auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Folge der Phagozytenaktivierung

In vitro-Studien zeigten, dass Magnolol und Honokiol die Produktion von reaktiven Sauerstoff- sowie Stickstoffspezies durch die an der Immunantwort beteiligten Phagozyten vermindern können. Kuo et al. (2013) konnten feststellen, dass Honokiol und Magnolol die durch fMPL/CB (N-Formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanin/Cytochalasin B) ausgelöste $O_2^{\cdot-}$ -Produktion der neutrophilen Granulozyten signifikant senken können [Kuo et al., 2013]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Magnolol die Aktivierung der Phagozyten inhibieren und dadurch die Produktion von Stickstoffmonoxid reduzieren kann [Lai et al., 2011; Li et al., 2010].

Darüber hinaus wurde festgestellt, dass Magnolol wie auch Honokiol antioxidativ wirksam sind. Es konnte *in vivo* an Ratten gezeigt werden, dass die durch Paracetamol ausgelöste erhöhte Malondialdehydproduktion durch Aufnahme von 0,01 – 1 µg/kg Körpergewicht Magnolol signifikant im Vergleich zur alleinigen Verabreichung von Acetaminophen vermindert wurde [Chen et al., 2009]. Außerdem konnte *in vitro* an Mitochondrien von Ratten eine Verminderung der Lipidperoxidation [Chiu et al., 1999] sowie an Hepatozyten von Ratten eine Verminderung der intrazellulären ROS-Produktion [Park et al., 2003] durch die Inkubation mit Magnolol beziehungsweise Honokiol gezeigt werden. Dikalov et al. (2008) und Ogata et al. (1997) konnten zeigen, dass Magnolol und Honokiol Superoxidionen beziehungsweise Peroxylradikale abfangen können und daher als Radikalfänger fungieren.

2.4 Oxidativer Stress im Organismus

2.4.1. Zusammenhang zwischen Entzündungsreaktionen und oxidativem Stress

Wie bereits in Kap. 2.1 erwähnt, werden von den Phagocyten, wie den neutrophilen Granulozyten oder den Makrophagen, im Laufe der durch pathogene Bakterien ausgelösten Immunantwort reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie das Superoxidanion und das Hydrogenperoxid, produziert, um die aufgenommenen Bakterien abzutöten.

Im Organismus können ausgehend von diesen beiden Sauerstoffspezies weitere reaktive Sauerstoffspezies, wie HOCl (hypochlorige Säure) oder das Hydroxylradikal ($\text{OH}^\bullet$), gebildet werden (Abb. 4).

In der Tabelle 2 sind einige radikalische, wie auch nicht radikalische reaktive Sauerstoffspezies aufgelistet.

Tabelle 2: Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die im Organismus gebildet werden

Radikale		keine Radikale	
$\text{OH}^\bullet$	Hydroxylradikal	H_2O_2	Hydrogenperoxid
$\text{O}_2^{\bullet -}$	Superoxidanion	O_3	Ozon
$\text{NO}^\bullet$	Stickstoffmonoxid	HOCl	Hypochlorige Säure
$\text{NO}_2^\bullet$	Stickstoffdioxid	ONOO^-	Peroxynitrit
$\text{ROO}^\bullet$	Peroxyradikal	$^1\Delta\text{gO}_2$	Singulett Sauerstoff
$\text{HO}_2^\bullet$	Hydroperoxyl		
$^1\Sigma\text{g}^+\text{O}_2$	Singulett Sauerstoff		

Diese im Laufe der Phagozytenaktivierung entstehenden Sauerstoffspezies können an das Gewebe abgegeben werden und dort bei übermäßiger Produktion oder unzureichenden Abwehrmechanismen Gewebeschädigungen verursachen [Babior, 2000].

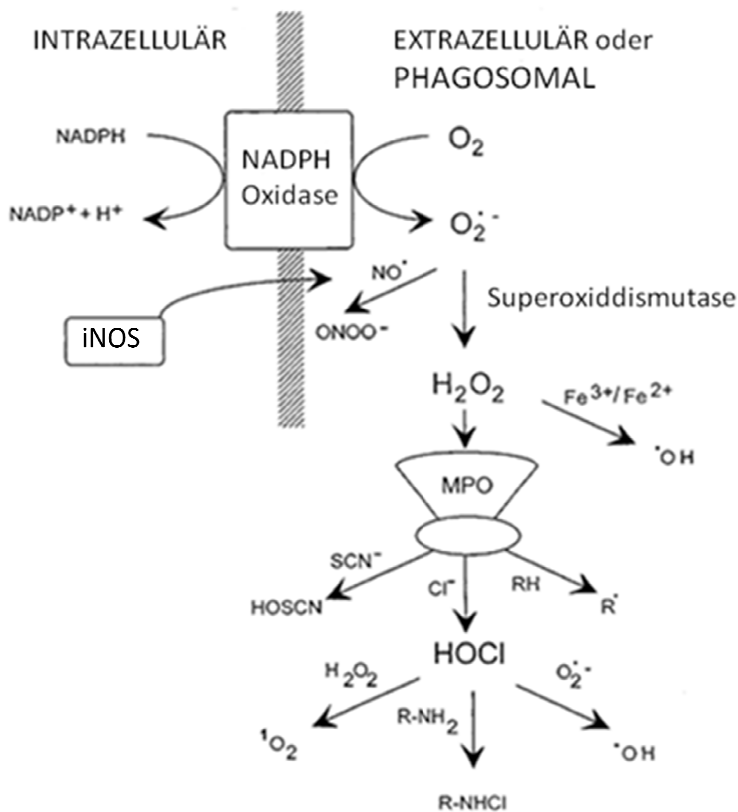


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Produktion von reaktiven Sauerstoff-/Stickstoffspezies (ROS/RNS) in Phagozyten zur Abtötung von Bakterien; MPO = Myeloperoxidase; iNOS = induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase, NADPH = reduzierte Form des Nicotinamadenindinukleotidphosphat [modifiziert nach Hampton et al., 1999]

Den potentiell schädlichen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sind antioxidative Abwehrmechanismen gegenübergestellt, um die möglichen negativen Auswirkungen verhindern zu können. Kommt es allerdings zu einem Ungleichgewicht zwischen antioxidativen Abwehrmechanismen und der Freisetzung oxidativer Spezies mit einem Überschuss an letzterem, kann es zu Zellschädigungen kommen. Dieser Ungleichgewichtszustand wird auch als oxidativer Stress bezeichnet [Sies, 1991].

Zu den antioxidativen Abwehrmechanismen zählen auf der einen Seite Enzyme, wie die Katalase oder die Superoxiddismutase, welche den Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies katalysieren, und auf der anderen Seite Substanzen, wie Vitamin E, Vitamin C oder Glutathion, welche antioxidativ wirken, indem sie stabile Radikale bilden.

Das Enzym Katalase katalysiert die Reaktion von Wasserstoffperoxid, das durch die Superoxiddismutase aus Superoxidanionen gebildet wird, zu Sauerstoff und Wasser und ist daher maßgeblich am Abbau reaktiver Sauerstoffspezies im Organismus beteiligt [Beers und Sizer, 1952] (Tab. 3).

Tabelle 3: Katalysierte Reaktionen der Katalase und der Superoxiddismutase

Reaktion	beteiligtes Enzym
$2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$	Superoxiddismutase
$2 \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	Katalase

Reaktive Sauerstoffspezies können außerdem endogen durch bestimmte Enzyme, wie durch die Xanthinoxidoreduktase, in Peroxisomen oder in Folge der Elektronentransportkette gebildet werden. Darüber hinaus entstehen reaktive Sauerstoffspezies auch exogen durch ionisierende Strahlung, Ultraschall, UV-Strahlung und durch verschiedene Chemikalien.

2.4.2. Auswirkungen von oxidativem Stress auf den Organismus

Reaktiven Sauerstoffspezies können mit Biomolekülen, wie Proteinen, Lipiden oder der DNA, reagieren, wodurch es zu Modifikationen und zu Strukturveränderungen und dadurch zum Funktionsverlust kommen kann. Diese Veränderungen können schwerwiegende Folgen für die Zellen haben.

Oxidative DNA Schäden

Das Hydroxylradikal ($\text{OH}^\bullet$) kann mit der DNA reagieren, indem es sich an eine Doppelbindung der Basen anlagert oder indem es H-Atome aus der Methylgruppe des Thymins oder aus den CH-Bindungen der Desoxyribose entzieht. Durch die Anlagerung des Hydroxylradikals ($\text{OH}^\bullet$) entstehen Basenradikale, die in Folge von Oxidationen, Reduktionen oder Desaminierungen zu vielen weiteren Oxidationsprodukten reagieren können. So entstehen zum Beispiel aus der Purinbase Guanin 8-oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxo-G) und durch Reduzierung und Öffnung des Imidazolrings 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formidopyrimidin (Fapy-G) (Abb.5) [Douki et al., 1997].

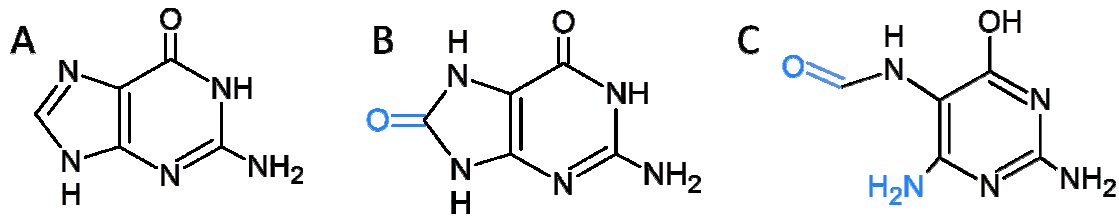


Abbildung 5: Strukturformeln von Guanin (A) und der Oxidationsprodukte 8-oxo-G (B) und Fapy-G (C)

In Folge der DNA-Oxidation und der entstandenen Veränderungen der Basen beziehungsweise der Desoxyribose kann es zu DNA-Strangbrüchen und zur Abspaltung von Basen und somit zu sogenannten AP-Stellen (apurinic/apyrimidinic sites) kommen, die zur Unterbrechung der Transkription führen können [Yu et al., 2003]. Außerdem kann es durch die oxidativ-veränderten Basen zu fehlerhaften Basenpaarungen kommen. So kann zum Beispiel das 8-oxo-G auch eine Basenpaarung mit dem Adenin eingehen, wodurch es nach der Replikation zu G – T Transversionen kommen kann [Shibutani et al., 1991].

Diese oxidativ-verursachten DNA-Schäden können zu Mutationen führen, wenn sie nicht durch entsprechende Reparaturmechanismen der Zelle beseitigt werden und werden daher mit dem Alterungsprozess und mit der Entstehung von Krankheitsbildern wie Krebs in Verbindung gebracht (Abb. 6).

Zu diesen Reparaturmechanismen zählt die „Base Excision Reparatur“, in Folge derer die geschädigten Basen durch Glykosylasen entfernt und neue Basen durch die β -Polymerase eingefügt werden.

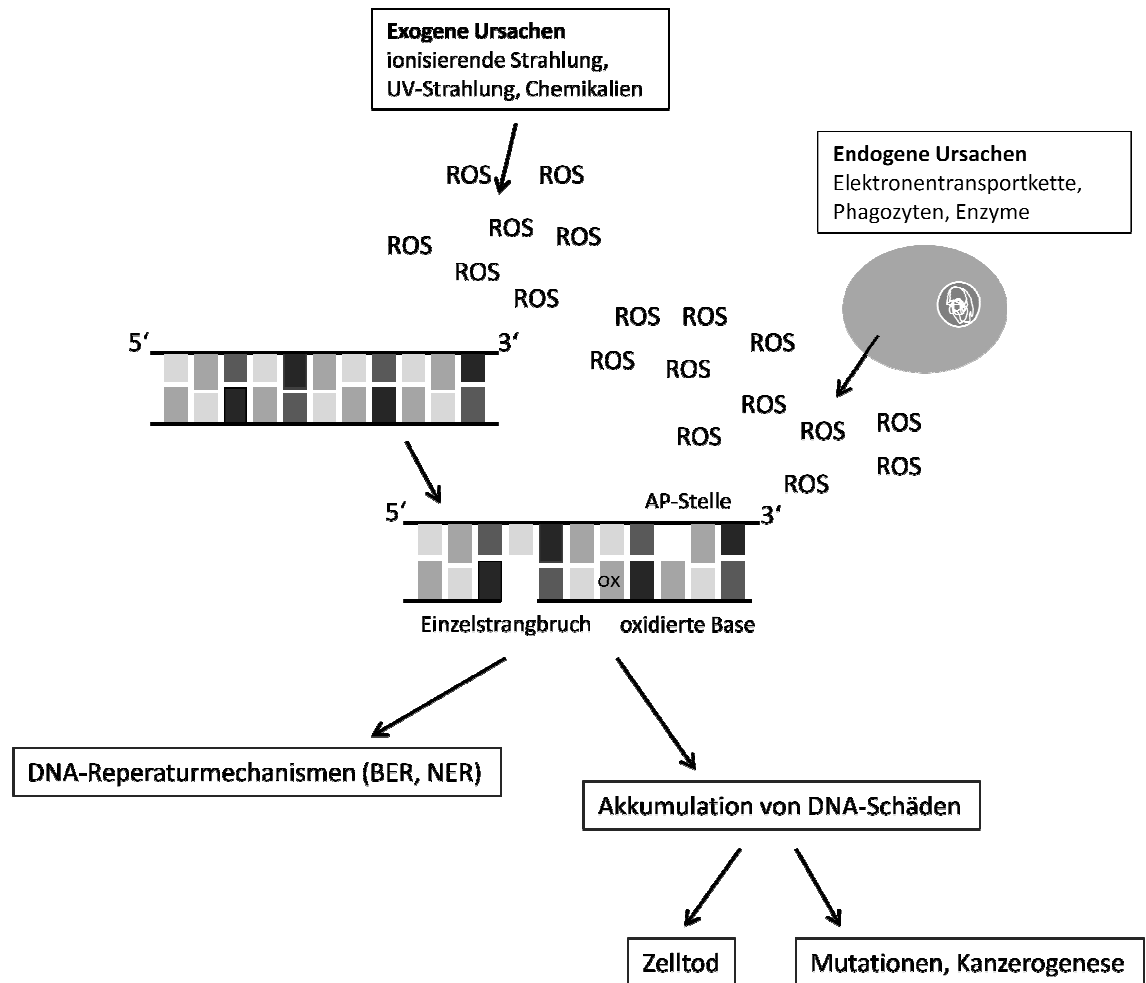


Abbildung 6: Folgen der oxidativen DNA-Schädigungen [modifiziert nach Kryston et al., 2011]

Parameter zur Bestimmung von oxidativem Stress in der Zelle

Oxidativer Stress kann anhand von einigen Biomarkern bestimmt und quantifiziert werden. Es können zum einen Oxidationsprodukte, die durch die Reaktion von ROS mit Biomolekülen, wie DNA, RNA, Proteine oder Lipide, entstanden sind, als Indikatoren für oxidativen Stress herangezogen werden. Als Marker für oxidativen Stress gelten daher zum Beispiel Proteinoxidationsprodukte, wie Proteincarbonyle, Produkte der Lipidperoxidation, wie Malondialdehyde [Pirincioğlu et al., 2010], oder oxidative DNA-beziehungsweise RNA-Schäden. Veränderungen der DNA, wie oxidierte Basen, die durch die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) verursacht werden, können mit Hilfe des Comet Assays (Einzelzellgelelektrophorese) gemessen werden. Ein häufig verwendeter Marker für oxidative DNA-Schäden ist das 8-oxo-G, das neben anderen oxidierten

Basen vom Enzym Formamidopyrimidglykosylase (Fpg) erkannt, in Einzelstrangbrüche übersetzt und somit mit Hilfe des Comet Assay detektierbar ist [Le Bihan et al., 2011].

Zum anderen können auch die intrazelluläre Konzentration an ROS, der Gehalt an antioxidativen Substanzen (TAC = total antioxidative capacity) oder die Aktivität von antioxidativen Enzymen gemessen werden, um das Ausmaß an oxidativem Stress in der Zelle zu beurteilen. So kann zum Beispiel die Aktivität des am Abbau der Superoxidanionen beteiligten Enzyms Katalase photometrisch bestimmt und als Marker für oxidativen Stress herangezogen werden.

3. Fragestellung der Arbeit

In einer *in vitro* Studie an humanen gingivalen Zellen (HGF-1) konnte gezeigt werden, dass der Magnolienrindenextrakt, welcher aus der Rinde des Baumes *Magnolia officinalis ssp.* gewonnen und in der traditionellen chinesischen Medizin eingesetzt wird, eine starke entzündungshemmende Wirkung im Vergleich mit anderen Pflanzenextrakten zeigt [Walker et al., 2013]. Außerdem konnte *in vivo* bereits eine antibakterielle Wirkung für den Magnolienrindenextrakt nachgewiesen werden [Greenberg et al., 2007].

Es ist daher von Interesse, ob der Magnolienrindenextrakt auch in einem *in vivo* Studiendesign eine entzündungshemmende Wirkung zeigt und ob die Anreicherung von Kaugummis eine geeignete Verabreichungsform darstellt.

In dieser Arbeit sollte gezeigt werden, ob der Magnolienrindenextrakt auch *in vivo* in der Mundhöhle von Probanden/Probandinnen eine entzündungshemmende Wirkung aufweist und daher prophylaktisch gegen Parodontitis eingesetzt werden kann. Dazu sollte der Extrakt handelsüblichen Kaugummis zugesetzt werden.

Die Hauptfragestellung dieser Studie war, ob ein mit Magnolienrindenextrakt angereicherter Kaugummi im Vergleich zu einem nicht angereicherten Kaugummi eine anti-inflammatorische Wirkung in humanen Zahnfleischepithelzellen zeigt, wenn die Kaugummis täglich über einen Zeitraum von zwei Wochen verzehrt werden.

Dazu sollten die Freisetzung und die Genexpression von Entzündungsmarkern vor und nach der zweiwöchigen Interventionsphase an 40 gesunden Probanden/Probandinnen ohne Zahnfleischentzündungen gemessen werden. Als Hauptparameter wurde das Zytokin IL-8 bestimmt.

Da die durch die ausgelöste Immunantwort aktivierten Phagozyten unter anderem reaktive Sauerstoffspezies zur Bekämpfung der Bakterien ausschütten und daher ein Zusammenhang zwischen Entzündungsreaktionen und oxidativem Stress in der Zelle besteht, sollte auch gezeigt werden, ob der mit Magnolienrindenextrakt angereicherte Kaugummi Marker für den oxidativen Stress in den Zahnfleischepithelzellen vermindern kann.

Es sollte daher der Einfluss des angereicherten Kaugummis im Vergleich zu einem nicht angereicherten Kaugummi auf die Aktivität des antioxidativen Enzyms Katalase und auf oxidative DNA-Schäden untersucht werden.

4. Material und Methoden

4.1. Studiendesign

4.1.1. Studienpopulation

Die Probanden und Probandinnen wurden in der Zahnklinik Wien und an der Universität Wien rekrutiert. Zwei der Probandinnen haben die Studie aus persönlichen Gründen abgebrochen. Daher wurden zwei Probanden/Probandinnen nachrekrutiert, sodass 40 Probanden und Probandinnen an der Studie teilnahmen und diese auch abschlossen.

Ein Einschlusskriterium für die Teilnahme an der Studie war ein guter allgemeiner Gesundheitszustand und eine gute Mundhygiene, die durch Dr. Hady Haririan von der Zahnklinik Wien bestätigt wurde.

Zu diesem Zweck wurden der Approximale-Plaquesindex und der Papillen-Blutungsindex bestimmt und eine parodontale Grunduntersuchung durchgeführt, bei der die Taschentiefe gemessen wurde. Als Einschlusskriterium galt ein Plaqueindex von 20-39 %. Dies entspricht einer guten Mundhygiene. Personen mit Parodontitis oder Gingivitis mit einem Wert von 4 bei der parodontalen Grunduntersuchung wurden von der Studie ausgeschlossen.

Von der Studie ausgeschlossen waren außerdem Raucher, Alkohol- und Drogenabhängige, schwangere und stillende Frauen sowie Personen, die unter Antibiotika- oder Antimikrobiotika-Behandlung standen und Personen mit einer Kiefergelenksproblematik.

Die Probanden und Probandinnen durften während der gesamten Studie keine anderen Zahnhygieneartikel, wie Mundwasser und Kaugummi, verwenden, als die von der Versuchsleitung ausgegebenen. Das Verwenden von Zahnseide war hingegen erlaubt.

Vor Eintritt in die Studie wurden die Probanden/Probandinnen ausführlich über den Ablauf und den Zweck der Studie informiert und mussten eine Einverständniserklärung unterschreiben.

4.1.2. Charakterisierung des mit Magnolienrindenextrakts angereicherten Kaugummis

Im September 2009 reichte die Firma Wm Wrigley Junior Company einen Antrag auf Zulassung des Magnolienrindenextrakts als neuartige Lebensmittelzutat gemäß Artikel 4 und 6 der Novel-Food Verordnung (EC 258/97) bei der FSA im Vereinigten Königreich ein.

Die Zulassung bezieht sich auf einen durch Extraktion mit superkritischem Kohlendioxid gewonnenen Extrakt aus der Rinde von *Magnolia officinalis ssp. biloba*. Der Extrakt darf zu maximal 0,2 % zu Kaugummis und Minzdragees für ein Frischegefühl im Mund zugesetzt werden.

Im Oktober 2011 wurde die Zulassung von der FSA bestätigt und mitgeteilt, dass der Magnolienrindenextrakt die Kriterien gemäß Artikel 3 Absatz 1 der Verordnung (EG) 258/97 erfüllt und unter Einhaltung der Spezifikationen in der EU in den Verkehr gebracht werden darf (Tab. 4).

Tabelle 4: Spezifikationen des als Novel-Food zugelassenen Magnolienrindenextrakts

Parameter	Spezifikation
Äußere Beschaffenheit	Hellbraunes Pulver
Magnolol	min 92,5 %
Honokiol	min. 0,5 %
Magnolol + Honokiol	min. 94 %
Gesamt-Eudesmol	max. 2 %
Feuchte	0,5 %
Arsen (ppm)	max 0,5
Blei (ppm)	max. 0,5
Gesamt-Schwermetalle (ppm)	max. 10
Methyleugenol (ppm)	max. 10
Tubocuraine (ppm)	max. 2
Gesamt-Alkaloide (ppm)	max. 100

Greenberg et al. (2007) untersuchten die Zusammensetzung des Magnolienrindenextrakts mittels HPLC und berichteten, dass das Extrakt aus 94 % Magnolol, 1,5 % Honokiol und einer geringen Menge an essentiellen Ölen besteht. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Extrakt über drei Monate unter extremen Bedingungen (35 °C und 85 % Luftfeuchtigkeit) in Kaugummis und Minzdragees stabil und nach der Lagerung noch nahezu vollständig vorhanden ist [Greenberg et al., 2007]. Darüber hinaus konnten Greenberg et al. (2007) zeigen, dass der Extrakt nicht aus dem Kaugummi freigesetzt wird, wenn er in das Inneren des Kaugummis eingebracht wird. Wenn das Extrakt allerdings in die äußere Schicht des Kaugummis eingearbeitet wird, werden circa 50 % des Extrakts beim Kauen freigesetzt.

Exposition der Probanden/Probandinnen

In der durchgeführten Studie wurden Kaugummis von der Firma Wm Wrigley Junior Company hergestellt und mit 0,1 % Magnolienrindenextrakt angereichert.

Die Probanden/Probandinnen mussten über einen Zeitraum von 14 Tagen pro Tag fünfmal zwei Stück der Kaugummis für mindestens zehn Minuten kauen. Bei einem durchschnittlichen Gewicht von 1,5 g pro Kaugummi enthält ein Kaugummi daher circa 1,5 mg Magnolienrindenextrakt. Unter der Annahme, dass nur 50 % des Extrakts aus dem Kaugummi freigesetzt werden, nahmen die Probanden/Probandinnen 7,5 mg Magnolienextrakt pro Tag auf.

4.1.3. Studienaufbau

Die Studie wurde doppelblind und placebokontrolliert durchgeführt und war in zwei jeweils zweiwöchige Phasen untergliedert (Abb.7).

In der ersten Phase, der Konditionierungsphase, erhielten alle Probanden/Probandinnen eine Zahnpasta ohne den Zusatz von Kräutern, Geschmacksstoffen und Konservierungsmitteln (= Kontrollzahnpasta). Die Kontrollzahnpasta wurde aus 6 g Calciumcarbonat, 1 ml Sorbitol und 5 ml Wasser hergestellt und im Kühlschrank bei 4 °C gelagert, um den Verderb der Zahnpasta zu vermeiden.

Diese Phase diente dem Auswaschen des Effekts der unterschiedlichen Zahnpasten und Zahnhygieneartikel, die vor Beginn der Studie von den Probanden/Probandinnen verwendet wurden.

Dadurch sollte sichergestellt werden, dass alle Probanden/Probandinnen einen vergleichbaren Ausgangsstatus an den zu messenden Parametern aufweisen.

Außerdem erhielten alle Probanden/Probandinnen zu Beginn der Studie die gleiche Zahnbürste (Sensident Hoch-Tief, weich).

Nach der Konditionierungsphase startete die eigentliche Interventionsphase.

Zu Beginn dieser Phase wurden die Probanden/Probandinnen randomisiert einer von vier Gruppen (n = 10) zugeteilt.

Die erste Gruppe erhielt für weitere zwei Wochen die Kontrollzahnpasta und diente somit als Negativkontrollgruppe. Die zweite und die dritte Gruppe erhielten ebenfalls eine Kontrollzahnpasta und mussten zusätzlich täglich zehn Stück angereicherte beziehungsweise nicht angereicherte zuckerfreie Kaugummis für jeweils mindestens zehn Minuten kauen. Die Kaugummis waren kodiert mit „Kaugummi A“ und „Kaugummi B“ und weder die Probanden/Probandinnen noch die Versuchsleiter wussten, welcher Kaugummi angereichert worden war. Erst nach Beendigung der Studie wurde offen gelegt, dass der Magnolienrindenextrakt dem Kaugummi A zugesetzt wurde. Es handelte sich daher um ein doppelblindes Studiendesign.

Die vierte Gruppe diente als Positivkontrollgruppe und erhielt die Zahnpasta Colgate total®. Diese enthält den antibakteriellen Wirkstoff Triclosan (2,4,4-Trichloro-2-hydroxydiphenylether) (0,3 %), der den Zahnplaque vermindern und daher die Zahngesundheit erhöhen kann [Rosin et al., 2002]. Außerdem konnte in *in vitro* Studien eine anti-inflammatorische Wirkung von Triclosan bereits gezeigt werden [Wallet et al., 2013; Barros et al., 2010].

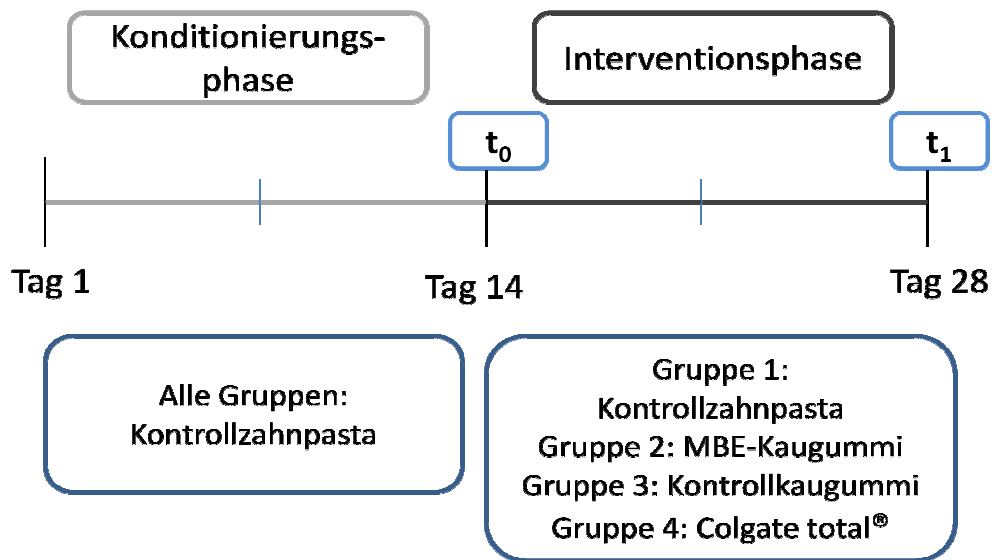


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Studiendesigns

Zellentnahme

Den Probanden/Probandinnen wurden zu Beginn (t_0) und am Ende (t_1) der zweiwöchigen Interventionsphase Zahnfleischepithelzellen mit einer Cytobrush Plus® entnommen.

Die Probanden/Probandinnen kamen in der Früh nüchtern und ohne zuvor die Zähne zu putzen zur Zellabnahme.

In den Gruppen zwei und drei, in denen die Probanden/ Probandinnen Kaugummi erhielten, wurde außerdem ein möglicher Kurzzeiteffekt getestet. Dazu wurden den Probanden/Probandinnen zuerst nur von der linken Mundhälfte Zellen entnommen. Danach mussten die Probanden/Probandinnen für zehn Minuten zwei Stück der Kaugummi kauen und nach fünf Minuten Wartezeit wurden schließlich von der rechten Seite Zellen entnommen.

Die abgeernteten Zellen wurden in 5 ml RPMI 1640 Medium überführt, welchem 10 % FBS (fetal bovine serum), 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin zugegeben wurden.

Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mittels Trypanblaufärbung mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es wurden 90 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gefärbt und anschließend mit Hilfe der Zählkammer ausgezählt.

Für jede Probe wurde die Viabilität der Zellen aufgrund der Trypanblaufärbung ermittelt, indem der prozentuelle Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt wurde.

Probenaufarbeitung

Die Proben wurden jeweils in zwei 50 ml Tubes aufgeteilt und bei 400 x *g* für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellpellets wurden mit Medium derart resuspendiert, dass jeweils 150.000 Zellen pro ml Medium vorlagen.

Eine Hälfte der Proben wurde mit LPS stimuliert, indem dem Medium 10 µg/ml *Porphyromonas gingivalis* LPS (PG-LPS) zugesetzt wurden.

Die Proben wurden in einer 6-Well-Platte für sechs Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Proben wiederum bei 400 x *g* für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und 1,2 ml des Überstandes für die Bestimmung der Zytokinausschüttung mittels Multiple Magnetic Bead Assay (Luminex-Technologie®) entnommen und eingefroren. Die Zellpellets wurden mit Medium auf 200.000 Zellen pro ml Medium resuspendiert. Diese Zellsuspensionen wurden für die weiteren Analysen verwendet (Abb.8).

4.1.4. Zielparameter

Hauptzielparameter dieser Studie war der Entzündungsmarker Interleukin-8 (IL-8), der sowohl auf funktioneller Ebene als auch auf Genebene gemessen wurde. Außerdem wurden weitere Entzündungsmarker, wie Interleukin-1α (IL-1α), Interleukin-1β (IL-1β), MIP-1β, TNF-α und der Chemokinrezeptor CCR1, gemessen. Darüber hinaus wurden das Auftreten von oxidativen DNA-Schäden und die Katalaseaktivität als Marker für den oxidativen Stress bestimmt (Abb. 8).

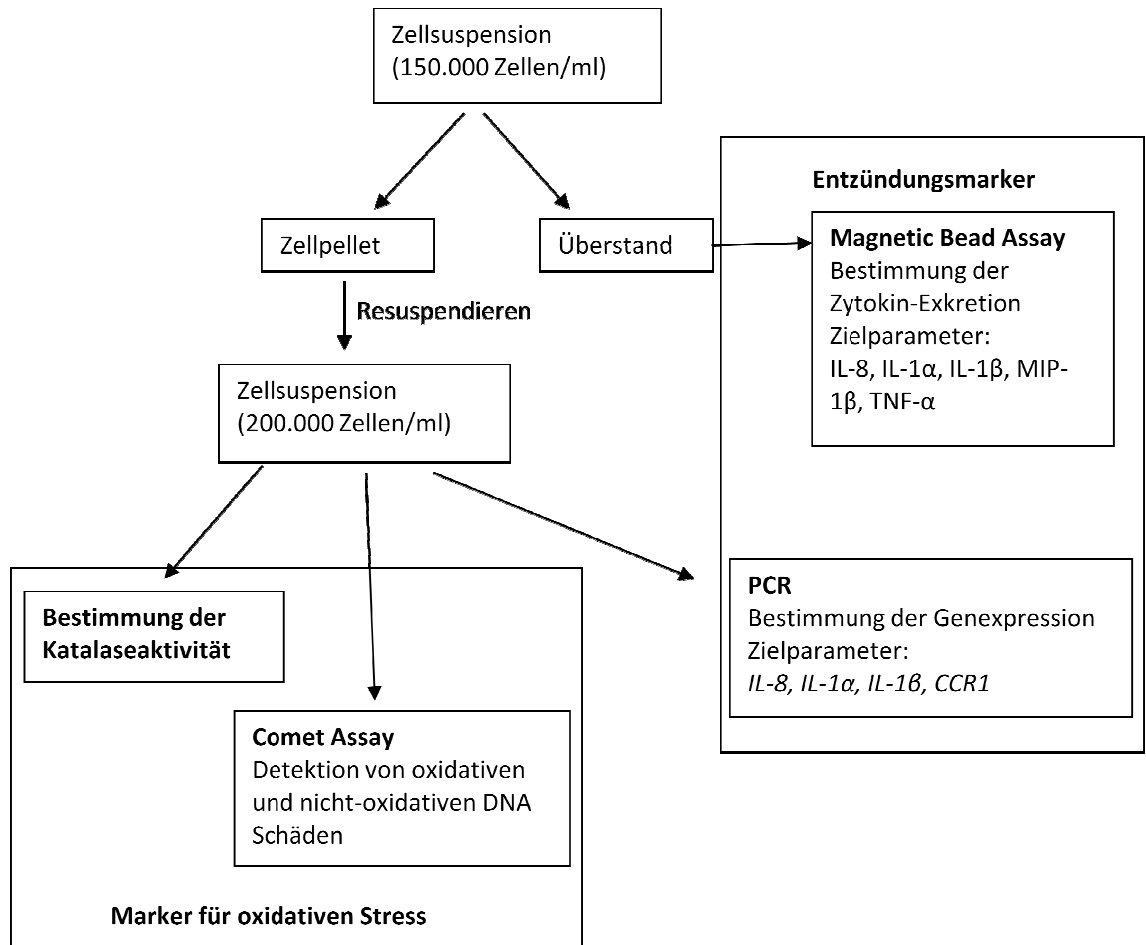


Abbildung 8: Zusammenfassung der durchgeführten Analysen und der Zielparameter

4.2 Materialien und Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
4,2-Hydroxyethyl-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES)	Roth
Agarose Broad Range	Roth
Calciumcarbonat CaCO_3	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dinatriumhydorgenphosphat Na_2HPO_4	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich
Kaliumchlorid KCl	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4	Roth
Kaliumhydroxid KOH	Roth
konz. Salzsäure HCl (37%ig)	Sigma Aldrich
Low Melting Agarose	Sigma Aldrich
Natriumchlorid NaCl	Sigma Aldrich
Natriumhydroxid NaOH (Plätzchen)	Roth
N-Laurylsarcosin-Natriumsalz	Sigma Aldrich
Sorbitol	Sigma Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth
Triton-X 100	Roth
Trypanblau	Sigma Aldrich
Wasserstoffperoxid H_2O_2	Sigma Aldrich
Biochemikalien/ Biologische Materialien	Hersteller
BSA (bovine serum albumin)	Roth
Fast SYBR-Green Master Mix	Applied Biosystems
FBS (fetal bovine serum)	Gibco
Formamidopyrimidinglykosylase (Fpg)	VWR
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich
<i>Porphyromonas gingivalis</i> LPS	Eubio/ Invivogen
Primer	VBC Biotech
RPMI 1640 Medium	Sigma Aldrich
Kits	Hersteller
HCYTOMAG-60k Kit	Merck-Millipore
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
RNeasy® Plus Micro Kit	Qiagen

Instrumente und Software	Hersteller
MAGPIX	Merck-Millipore
Software Milliplex Analyst	Merck-Millipore
Software Comet Assay IV	Perceptive Instruments
Software Step One Plus	Applied Biosystems
Software Tecan-i-control	Tecan
Software XPonent	Merck-Millipore
Tecan Reader Infinite M200	Tecan
Thermozykler/PCR Instrument Step One Plus	Applied Biosystems
Sigma Plot 11.0	Sysstat Software
Materialien	Hersteller
1,5 ml Reaktionsgefäße	Roth
50 ml Falcon Tubes	Starlab
6-Well Platte	Greiner BioLab
96-Well PCR Platte	Biozym
Cytobrush Plus	Cooper Surgival
Deckplättchen	VWR
Elektrophoresekammer (waagrecht)	Paqlab
Fluoreszenzmikroskop Olympus BX 40	Olympus
Inkubationsschrank	VWR (Binder)
Magnetplatte	Merck-Millipore
Nanoquantplatte	Tecan
Neubauer Zählkammer	Brand
Objektträger (fully frosted)	VWR
pH-Meter, Magnetrührer VMS-C4	VWR
Power Supply	Paqlab
qPCR Seal	Peqlab
RNase free 1,5 ml Reaktionsgefäße	Starlab
Roti ® Nukleinsäurefrei	Roth
UV-transparente 96-Well Platte	Greiner BioLab
Zahnbürsten Hoch-Tief, weich	Sensident
Zahnpasta Colgate total®	Colgate
Zentrifuge (Falcon Tubes/Epis)	Eppendorf

4.3. Methoden

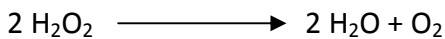
4.3.1 Ermittlung der Compliance der Probanden/Probandinnen

Zur Kontrolle der Compliance wurden die ausgegeben Zahnpastadosen, bevor sie an die Probanden/Probandinnen ausgegeben wurden, gewogen. Die Zahnpasta wurde in Rationen für eine Woche ausgegeben. Nach einer Woche mussten die Probanden/Probandinnen die Zahnpastadosen zurückbringen und sich eine neue holen. Die zurückgebrachten Dosen wurden gewogen und der durchschnittliche Verbrauch pro Woche berechnet.

Die Kaugummipackungen wurden ebenfalls zu Beginn der Interventionsphase abgewogen und enthielten die Kaugummis für zwei Wochen. Nach sieben und nach 14 Tagen mussten die Probanden/Probandinnen die Packungen mitbringen, damit sie gewogen werden konnten. Da ein Kaugummi durchschnittlich 1,5 g wiegt, konnte der vorgeschriebene Verbrauch durch die Gewichts differenzen kontrolliert werden.

4.3.2. Photometrische Bestimmung der Katalaseaktivität

Die Katalase zählt zu den antioxidativen Enzymen und katalysiert den Abbau von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Wasser und Sauerstoff.



Sie ist gemeinsam mit der Superoxiddismutase am Abbau von Superoxidionen (O_2^-) und somit an der oxidativen Abwehr beteiligt.

Die Katalaseaktivität in den Zellen wurde durch eine photometrische Bestimmung bei einer Wellenlänge von 240 nm ermittelt. Diese Wellenlänge entspricht dem Absorptionsmaximum von Wasserstoffperoxid. Die Katalaseaktivität wurde indirekt über die Abnahme der H_2O_2 -Konzentration und daher über die Abnahme der Absorption bei 240 nm berechnet [Beers und Sizer, 1952].

Durchführung

Für die Bestimmung der Katalaseaktivität wurden pro Probe 40.000 Zellen verwendet. Dazu wurden 200 µl der Zellsuspension von jeder Probe entnommen und bei Raumtemperatur für fünf Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Zellpellets wurden in 1 ml Katalasepuffer aufgenommen.

Katalasepuffer

20 mM KH_2PO_4 (M = 136,086 g/mol)

30 mM Na_2HPO_4 (wasserfrei) (M = 141,96 g/mol)

Der Phosphatpuffer wurde auf pH 7 eingestellt und mit bidestilliertem Wasser auf 1 L aufgefüllt.

Die Messung wurde in Dreifachbestimmung in einer UV-transparenten 96-Well Platte mit dem TECAN Reader Infinite M200 und der Software Tecan-i-control durchgeführt.

Es wurden jeweils 140 μl der in Katalasepuffer aufgenommenen Zellen eingesetzt.

Das Gerät wurde so programmiert, dass die Absorption bei 240 nm gemessen, anschließend automatisch 70 μl Wasserstoffperoxid zugegeben und sofort (E1) und nach 30 Sekunden (E2) die Absorption gemessen wurde.

Die Wasserstoffperoxidlösung (c = 29,39 mM) wurde kurz vor der Messung frisch hergestellt. Dazu wurde eine 30%ige H_2O_2 -Lösung mit Katalasepuffer 1:300 verdünnt.

Die Absorptionswerte wurden um die Werte vor Zugabe des Wasserstoffperoxids korrigiert und es wurde der Quotient E1/E2 gebildet.

Die Katalase-Aktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Katalaseaktivität} \left(\frac{\text{MU}}{\text{l}} \right) = \frac{V \times a \times b \times \left(\frac{E1}{E2} \right)}{v \times \varepsilon \times d \times f}$$

V ... Volumen pro Well V = 210 μl

v ... Volumen der Probe pro Well v = 140 μl

a ... Umrechnungsfaktor 1000 (von μmol auf mmol)

ε ... Molekulare Extinktionskoeffizient von Wasserstoffperoxid $\varepsilon = 0,036 \frac{\text{l}}{\text{mmol} \times \text{cm}}$

b ... Umrechnungsfaktor pro Minute b = 2

d ... Schichtdicke des durchstrahlten Körpers d = 0,65625 cm

f ... Umrechnungsfaktor 1 000 000 (von U auf MU)

MU ... Mega-Units der Katalaseaktivität $\hat{=}$ umgesetztes Wasserstoffperoxid pro Minute
Zur Beurteilung des Effekts der zweiwöchigen Interventionsphase wurden die Katalaseaktivitätswerte am Ende der Interventionsphase (t_1) auf die Werte zu Beginn der Interventionsphase (t_0) bezogen und die Veränderung als relative Katalaseaktivität dargestellt.

4.3.3. Bestimmung von oxidativen DNA-Schäden mittels Comet Assay

Der Comet Assay oder auch Einzelzellgelelektrophorese ist eine Methode um DNA-Strangbrüche in einzelnen Zellen zu detektieren. Dabei werden Zellen in Agarose aufgenommen, auf einen Objektträger aufgetragen und lysiert. Durch das Anlegen eines Spannungsfeldes bei der anschließenden Elektrophorese wandern DNA-Bruchstücke zur Anode, wohingegen die intakte DNA zu groß ist, um im Gel zu wandern. Nach Färbung der Gele mit Ethidiumbromid entsteht unter dem Fluoreszenzmikroskop ein kometenähnliches Bild, wobei die DNA-Fragmente den Schweif der Kometen bilden.

Oxidative DNA-Schäden der Purinbasen, wie 8-oxoG oder FapyG, können durch das bakterielle Enzym Formamidopyrimidinglykosylase (Fpg) erkannt und in Strangbrüche übersetzt werden [Tchou et al., 1994].

Somit sind auch oxidative DNA-Schäden mit dem Comet Assay detektierbar.

Fpg hydrolysiert die N-glykosidische Bindung zwischen der geschädigten Base und der Desoxyribose des Zucker-Phosphat-Rückgrats und entfernt somit die Base. Es entsteht eine sogenannte AP-Stelle (apurinic/apyrimidinic site). Das Enzym ist über eine N-terminale Aminogruppe kovalent an die DNA gebunden und bildet eine Schiff'sche Base als Intermediat. Durch die AP-Lyase Funktion des Enzyms Fpg entsteht durch β -Elimination ein Strangbruch an der C3' Position der AP-Stelle (Abb.9) [Le Bihan et al., 2011].

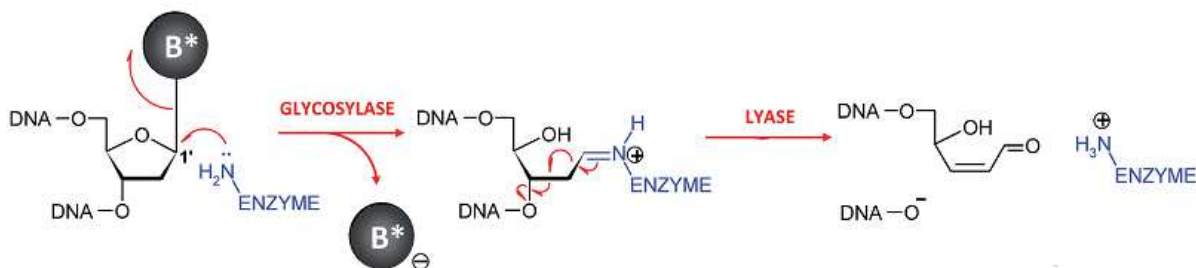


Abbildung 9: Reaktionsmechanismus des Enzyms Fpg [modifiziert nach Le Bihan et al., 2011]

Die Bestimmung der oxidativen DNA-Schäden wurde mittels alkalischem Comet Assay nach der Methode von Singh et al. (1988) - modifiziert von Collins (2000) - mit Inkubation der DNA mit dem Enzym Formamidopyrimidinglykosylase (Fpg) durchgeführt.

Durchführung

Es wurden einseitig gefrostete Objektträger mit Normal-Melting-Agarose (NMA) beschichtet und anschließend auf jeden Objektträger zwei Gele (65 µl NMA) aufgetragen, die mit Deckplättchen abgedeckt wurden. Auf die beiden Gele pro Objektträger wurde jeweils die gleiche Probe aufgetragen und die Untersuchung daher in Doppelbestimmung durchgeführt.

Durch die Beschichtung der Objektträger mit Normal-Melting-Agarose wird gewährleistet, dass die Low-Melting-Agarose (LMA), in der die Zellen aufgenommen werden, gut am Objektträger haften bleibt.

Die Objektträger wurden über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C gelagert, damit die Gele vollständig aushärten konnten, aber nicht ausgetrocknet sind.

NMA (= Normal Melting Agarose): 0,5 % NMA in 50 ml PBS gelöst

LMA (= Low Melting Agarose): 0,8 % LMA in 50 ml PBS gelöst

PBS für Agarose

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

1,5 mM KH_2PO_4

8,1 mM Na_2HPO_4

mit bidestilliertem Wasser auf 1 L aufgefüllt

Es wurden für jede Probe vier Objektträger vorbereitet: mit LPS/mit Fpg, mit LPS/ohne Fpg, ohne LPS/mit Fpg und ohne LPS/ohne Fpg.

Die Arbeitslösung des Lysepuffers wurde frisch hergestellt, indem 89 ml der Lysepuffer-Stammlösung mit 10 ml DMSO und 1 ml Triton X-100 versetzt wurden. Die Arbeitslösung wurde ebenfalls über Nacht bei 4 °C gelagert.

Lysepuffer-Stammlösung:

2,5 M NaCl

0,1 M EDTA

10 mM Tris

mit NaOH-Plätzchen auf pH 10 eingestellt

1 % N-Laurylsarcosin-Natriumsalz

mit bidestilliertem Wasser auf 1 L aufgefüllt

Für die Bestimmung der oxidativen DNA-Schäden wurden pro Gel circa 15.000 - 30.000 Zellen eingesetzt. Um die Aktivität der Enzyme zu vermeiden, die für die Reparatur der DNA-Strangbrüche verantwortlich sind, wurde durchgehend auf Eis gearbeitet.

Es wurden jeweils 600 µl der Zellsuspension entnommen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 400 x g bei 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Das Medium wurde abpipettiert, die Zellpellets in 65 µl Low-Melting-Agarose aufgenommen und sofort auf die vorbereiteten Gele aufgetragen und mit einem Deckplättchen abgedeckt.

Die Objektträger wurden für mindestens zehn Minuten auf Eis gelegt, damit die Gele vollständig aushärten konnten. Die auf den Objektträgern fixierten Zellen wurden über Nacht bei 4 °C in einem alkalischen Lysepuffer durch den hohen Salzgehalt und die nicht-ionischen Detergentien N-Laurylsarcosin-Natriumsalz und Triton-X 100 des Puffers lysiert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Objektträger dreimal für fünf Minuten bei 4 °C mit einem Enzympuffer gewaschen. Die Enzympuffer-Stammlösung wurde davor 1:10 verdünnt.

Enzympuffer-Stammlösung (10-fach konzentriert):

400 mM HEPES

1 M KCl

5 mM EDTA

2 mg/ml BSA

mit KOH auf pH 8 eingestellt

mit bidestilliertem Wasser auf 1 L aufgefüllt

Das Enzym Fpg wurde vorsichtig 1:4000 mit dem Enzympuffer verdünnt.

Die eine Hälfte der Objektträger wurde mit 50 µl der Fpg-Lösung behandelt, während auf die andere Hälfte der Objektträger 50 µl Enzympuffer pipettiert wurden.

Die Objektträger wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit für 30 Minuten inkubiert.

Nach der Inkubation mit dem Enzym wurden die Objektträger für 20 Minuten in den stark alkalischen Elektrophoresepuffer (pH 13 – 14) gestellt, um die Denaturierung der DNA-Doppelstränge zu erzielen.

Anschließend wurde die Elektrophorese bei 25 V, 300 mA und 7 W für 20 Minuten in alkalischem Milieu durchgeführt.

Elektrophoresepuffer:

60 ml NaOH (10 M)

10 ml EDTA (200 mM)

mit bidestilliertem Wasser auf 2 L aufgefüllt

Der pH-Wert wurde mittels Indikatorpapier bestimmt.

Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger dreimal für fünf Minuten bei 4 °C mit einem Neutralisationspuffer gewaschen, wodurch eine Renaturierung der intakten DNA-Stränge stattfinden konnte. Die DNA-Fragmente, die durch Strangbrüche entstanden sind, bleiben einzelsträngig.

Neutralisationspuffer:

0,4 M Tris

mit konzentrierter Salzsäure (37%ig) auf pH 7,4 eingestellt

mit bidestilliertem Wasser auf 1 L aufgefüllt

Die Gele wurden mit 40 µl Ethidiumbromid (c = 50 µg/ml) gefärbt.

Die Visualisierung und Auswertung wurde unter einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX 40) bei 40-facher Vergrößerung mit Hilfe der Software Comet Assay IV durchgeführt. Die Gele auf den Objektträgern wurden systematisch untersucht und dabei 100 DNAs pro Objektträger ausgezählt.

Auswertung

Ethidiumbromid ist ein in DNA interkalierender Fluorophor, welcher grünes Licht absorbiert und oranges Licht emittiert, wenn er an DNA gebunden ist. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Menge an DNA, der gebundenen Menge an Ethidiumbromid und der Intensität des emittierten Lichts. Daher kann durch die Messung des emittierten Lichts auf die DNA-Menge geschlossen werden.

Die Intensität des emittierten Lichts wird durch lichtensitive Elemente in der Kamera digitalisiert und in Zahlen umgewandelt. Diese Information wird an einen Computer gesendet, der die digitalen Daten in Bilder umwandelt, bei denen jedes Pixel für eine ermittelte Zahl beziehungsweise für die Information eines lichtsensitiven Elements steht und in unterschiedlichen Graustufen abgebildet wird (Abb. 10).



Abbildung 10: Darstellung eines Comets in Pixelform [Vilhar et al., 2004]

Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen den Graustufen der Pixel und dem DNA-Gehalt in diesem Bereich.

Bei der Bildanalyse werden der Kopf und der Schweif des jeweiligen Comets definiert und die in den Pixeln enthaltenen Informationen ausgewertet. Dabei müssen die Werte im Kopf und im Schweif des Comets um die Hintergrundwerte korrigiert werden, da diese nie gleich null sind.

Als Intensitätsparameter wurde die relative Schweifintensität (Tail Intensity) herangezogen. Diese berechnet sich aus dem Quotienten der totalen Intensität im Schweif (Summe der Graustufen im Schweif) und der Gesamtintensität des Comets (Summe der Graustufen im Schweif und im Kopf) und wird in Prozent angegeben.

$$TI [\%] = \frac{Intensität_{Schweif}}{Gesamtintensität} \times 100$$

Für jeden Objektträger wurde ein Mittelwert aus den 50 Schweifintensitätswerten je Gel berechnet und für die Beurteilung des Einflusses der Intervention wurden die relativen TI-Werte gebildet, indem die Werte zum Zeitpunkt t_1 auf die Werte zum Zeitpunkt t_0 bezogen wurden.

4.3.4. Bestimmung der Genexpression der Entzündungsmarker mittels qPCR

Die momentane Genexpression in der Zelle kann durch die Quantifizierung der mRNA untersucht werden. Dafür wird zuerst die RNA aus den Zellen isoliert und diese dann durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA kann schließlich durch eine Real-Time qPCR quantifiziert werden.

Durchführung

Für die Bestimmung der Genexpression von *IL-8*, *IL-1 α* , *IL-1 β* und *CCR1* wurden 1 ml der Zellsuspension und somit circa 200.000 Zellen eingesetzt.

RNA-Isolation

Die RNA der Zellen wurde mit dem RNeasy® Plus Micro Kit von Qiagen isoliert.

Die Zellsuspensionen wurden für fünf Minuten bei Raumtemperatur bei 500 x *g* zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Die Zellpellets wurden lysiert, indem sie in 350 μ l RLT Puffer, der zuvor mit 10 μ l β -Mercaptoethanol (β -ME) versetzt wurde, resuspendiert wurden. Das Lysat wurde eine Minute lang gevortext und damit homogenisiert.

Danach wurde das homogenisierte Lysat auf genomic DNA Eliminator Spin Columns (kleine Chromatographie-Säulen) aufgetragen, die in 2 ml Collection Tubes gestellt und für 30 Sekunden bei 8000 x *g* zentrifugiert wurden. Die genomische DNA wird dadurch in den Säulen zurückgehalten und die RNA befindet sich im Eluat. Die Säule wurde verworfen und zum Eluat wurden 350 μ l 70%iger Ethanol hinzu pipettiert, um das Bindungsvermögen der RNA an die Säule zu erhöhen. Danach wurde das Eluat auf Spin Columns überführt, die wiederum in 2 ml Collection Tubes gesteckt und bei 8000 x *g* für 15 Sekunden zentrifugiert wurden.

Die RNA bindet spezifisch an die Membran der Säulen und das Eluat kann verworfen werden. Die Säulen wurden mit 700 μ l RW1 Puffer gewaschen, bei 8000 x *g* für 15 Sekunden zentrifugiert und das Eluat wiederum verworfen.

Im nächsten Schritt wurden 500 μ l RPE Puffer auf die Säulenmembran pipettiert und fünf Minuten gewartet, bevor bei 8000 x *g* für 15 Sekunden zentrifugiert und das Eluat verworfen wurde. Danach wurden 500 μ l 80%iger Ethanol auf die Säule aufgetragen

und für fünf Minuten gewartet. Durch diese Inkubation kann die Reinheit der isolierten RNA erhöht werden. Die Säulen wurden für zwei Minuten bei 8000 x g zentrifugiert, in neue Collection Tubes gestellt und mit offenem Deckel für fünf Minuten bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert, um zu gewährleisten, dass sich kein Ethanol mehr in den Säulenmembranen befindet.

Die aufgereinigte RNA wurde mit 15 µl RNase-freiem Wasser eluiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen. Um den RNA-Ertrag zu erhöhen wurde nach dem Auftragen des RNase-freien Wasser zehn Minuten gewartet, bevor die Säulen für eine Minute bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert wurden.

Das Eluat, in dem sich die isolierte RNA befand, wurde bei – 80 °C eingefroren.

RNA-Messung

Die RNA-Konzentration wurde mittels photometrischer Messung mit dem TECAN Reader Infinite M200 und der Software Tecan-i-control auf einer Nanoquant-Platte ermittelt. Es wurden 2 µl RNA eingesetzt und die Absorption bei 260 nm bestimmt, da bei dieser Wellenlänge Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum zeigen [Tataurov et al., 2008].

Außerdem wurde zur Beurteilung der Reinheit der RNA auch die Absorption bei 280 nm gemessen und der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} gebildet. Es wird von einer reinen RNA-Lösung gesprochen, wenn der Quotient zwischen 1,8 und 2,2 liegt. Proteine haben ein Absorptionsmaximum bei 280 nm und würden daher den Wert verringern.

Als Blindwert wurde bidestilliertes Wasser eingesetzt. Die RNA-Konzentration wurde von der verwendeten Software anhand der OD_{260nm} – Werte mit Hilfe der Lambert-Beer'sche Formel ermittelt.

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

E ... Extinktion

ε ... Extinktionskoeffizient ($\varepsilon_{RNA} = 0,025 (\mu g/ml)^{-1} \cdot cm^{-1}$; $\varepsilon_{DNA} = 0,02 (\mu g/ml)^{-1} \cdot cm^{-1}$)

c ... Konzentration

d ... Schichtdicke

Umschreiben *in* cDNA

Die isolierte RNA wurde mit dem Enzym Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerasen) inkubiert und somit in einzelsträngige cDNA umgeschrieben.

Es wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems verwendet. Alle Komponenten des Kits und die Proben wurden auf Eis aufgetaut.

Herstellung des Mastermix

Pro Reaktion wurden

2 µl	10x RT Puffer
0,8 µl	25x dNTP Mix (100 mM)
2 µl	10x Random Primer
1 µl	Reverse Transkriptase (MultiScribe™), (50 U/µL)
1 µl	RNase-Inhibitor
3,2 µl	Nukleasefreies Wasser (NFW)

eingesetzt, wobei ein Sicherheitszuschlag von mindestens einer Reaktion eingerechnet wurde.

Es wurden 10 µl der isolierten RNA mit 10 µl des RT-Mastermix versetzt.

Die Proben wurden für eine Minute bei 1000 x *g* zentrifugiert und schließlich im Thermozykler inkubiert. Zuerst wurden für zehn Minuten 25 °C gehalten und anschließend wurden die Proben für zwei Stunden bei 37 °C – dem Temperaturoptimum der Transkriptase – inkubiert und schließlich für fünf Minuten auf 85 °C erhitzt, um die Reaktion wieder zu stoppen.

Anschließend wurde die cDNA-Konzentration ermittelt. Die cDNA Messung erfolgte analog zur RNA-Bestimmung mit dem TECAN Reader Infinite M200 bei 260 nm.

Der Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} zur Beurteilung der Reinheit der cDNA lag im Durchschnitt knapp unter 1,8 bei $1,75 \pm 0,06$.

Die cDNA Konzentration betrug im Durchschnitt $1962,21 \pm 267,90$ ng/µl.

Die cDNA Proben wurden bei – 20 °C eingefroren.

Durchführung der qPCR

Durch die Polymerase-Kettenreaktion wird die Amplifikation von bestimmten DNA-Abschnitten erzielt. Die doppelsträngige DNA wird zuerst durch hohe Temperaturen denaturiert, sodass zwei Einzelstränge entstehen. Anschließend binden spezifisch synthetisierte Primer (Oligonukleotide) antiparallel zueinander an die beiden Stränge der DNA an die gewünschten Abschnitte und beschränken somit die Amplifikation auf diese Bereiche. Danach synthetisiert eine thermophile Polymerase an die Primer anschließend einen neuen Strang und verdoppelt somit die DNA. Der dreistufige Zyklus wird wiederholt und die DNA Stränge erneut denaturiert.

Dadurch ergibt sich bei der Polymerase-Kettenreaktion eine exponentielle DNA-Amplifikation mit $N_n = N_0 \cdot 2^n$; für n = Anzahl der PCR-Zyklen.

Durchführung

Die cDNA Proben wurden derart verdünnt, dass ungefähr 200 ng/μl cDNA (zwischen 196 ng/μl und 298 ng/μl) eingesetzt wurden.

Die quantitative PCR wurde mit dem Instrument StepOnePlus™ von Applied Biosystems und der Software StepOne v2.1 durchgeführt.

Die Proben und die Primer wurden auf Eis aufgetaut.

Der Reaction Mix wurde laut Reaction Setup der Software für jedes der zu messenden Gene in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß hergestellt, indem zu dem Fast SYBR® Green Master Mix von Applied Biosystems die entsprechenden Primer ($c = 20 \text{ pmol}/\mu\text{l}$) und nukleasefreies Wasser hinzugegeben wurden. In der Tabelle 5 sind die Genfrequenzen der eingesetzten Primer aufgeführt.

Tabelle 5: Gensequenzen der eingesetzten Primer [Walker et al., 2014]

Primer		Sequenz
<i>β-Aktin</i>	Forward	5'-ACA GAG CCT CGC CTT TGC CG-3'
	Reverse	5'-ACC ATC ACG CCC TGG TGC C-3'
<i>IL-8</i>	Forward	5'-ACT GAG AGT GAT TGA GAG TGG AC-3'
	Reverse	5'-AAC CCT CTG CAC CCA GTT TTC-3'
<i>IL-1α</i>	Forward	5'-CCA GTG CTG CTG AAG GAG ATG CC-3'
	Reverse	5'-AGT GCC GTG AGT TTC CCA GAA GA-3'
<i>IL-1β</i>	Forward	5'-ACT GCA CGC TCC GGG ACT CA-3'
	Reverse	5'-GGA GAA CAC CAC TTG TTG CTC CAT-3'
<i>CCR1</i>	Forward	5'-GGA ACC AGA GAG AAG CCG GGA-3'
	Reverse	5'-CCC AAA GGC CCT CTC GTT CAC C-3'

Anschließend wurden 3,24 μl der cDNA-Proben in 1,5 ml Reaktionsgefäße vorgelegt und mit 29,2 μl Reaction Mix versetzt. Die Reaktionen wurden in drei Replikaten zu je 10 μl in eine 96-Well PCR Platte pipettiert. Die Platte wurde mit einer Schutzfolie zugeklebt und bei 800 x *g* für eine Minute zentrifugiert, bevor sie im PCR-Instrument gemessen wurde. Die verwendeten Softwareeinstellungen sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Softwareeinstellungen für die PCR-Messung

Instrument	Step One Plus
Platte	96-Well PCR Platte
Experiment	quantization-comparative c_T ($\Delta\Delta c_T$) Fast (< 40min to complete a run)
Fluoreszenzfarbstoff	SYBR-Green Reagenz
Reaktionsvolumen pro Well	10 μl
Primer Konzentration	200 nM
Anzahl der Zyklen	48
Temperatur-Set Up	95 °C für 23 Sekunden (Denaturierung) 60 °C für 30 Sekunden (Annealing der Primer und Polymerisation)
Schmelzkurve	In 0,5 °C-Schritten
Konzentration der Proben	200 ng/ μl

Auswertung

Bei der Real-Time qPCR (quantitativen PCR) wird durch Fluoreszenzmessungen während der Amplifikation die Quantifizierung der DNA ermöglicht.

In dieser Arbeit wurde der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green zur Quantifizierung verwendet. Dieser Farbstoff besitzt eine stark erhöhte Fluoreszenz, wenn er an doppelsträngige DNA gebunden ist (Abb. 11) [Singer et al., 1999]. Das Fluoreszenzsignal des Farbstoffs nimmt daher proportional mit der Amplifikation der DNA zu. Das emittierte Licht wird durch das PCR-Instrument nach jedem Zyklus gemessen (Rn-Werte) und in einem Graphen dargestellt.

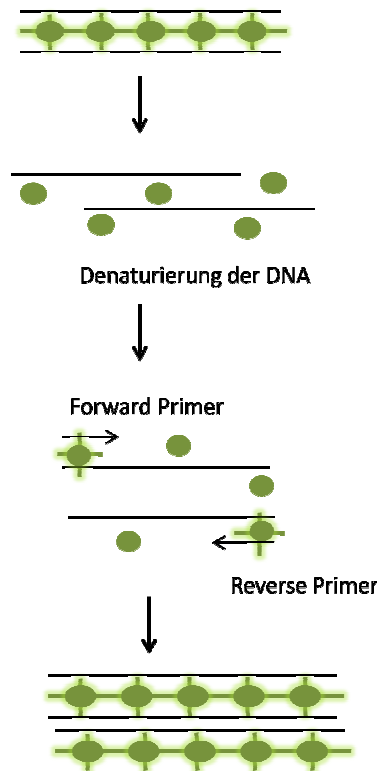


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Prinzips der Fluoreszenzmessung mit SYBR Green [Handbuch StepOnePlus]

Es wurde eine relative Quantifizierung im Vergleich zu Referenzproben (unbehandelte Proben) und im Vergleich zu dem Referenzgen β -Aktin, welches als endogene Kontrolle eingesetzt wurde, durchgeführt (komparative c_T ($\Delta\Delta c_T$) Methode). Referenzgene werden nicht reguliert und werden daher nicht durch die Behandlung beeinflusst.

Die c_T (Cycle Treshold)-Werte wurden von der Software StepOne berechnet und geben an, ab welchem Zyklus die gemessene Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz übersteigt.

Die Ausgangswerte der DNA (N_0) wurden mit Hilfe der Software LinRegPCR anhand der R_n -Werte berechnet. Die Software führt eine Baseline-Korrektur der Daten durch, ermittelt den Bereich exponentiellen Wachstums der Amplifikationskurven und berechnet durch eine lineare Regression die PCR Effizienz in diesem Bereich. Die PCR Effizienz gibt die Vervielfachung der DNA pro Zyklus an und ist daher idealerweise 2.

Die N_0 -Werte werden aus den PCR Effizienzen und den c_T -Werten berechnet und als Fluoreszenzeinheiten angegeben [Ruijter et al., 2009].

$$N_0 = \frac{\text{Fluoreszenz Treshhold}}{\text{PCR Effizienz}^{C_T}}$$

Um sicherzugehen, dass die gemessene Fluoreszenzerhöhung durch die spezifischen DNA-Fragmente und nicht durch unspezifische Primerdimere bedingt ist, wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Schmelztemperaturen der Produkte sind in der Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Mittelwerte der gemessenen Schmelztemperaturen der PCR-Produkte

β-Aktin	86,4°C
IL-8	77,2°C
IL-1α	76,6°C
IL-1β	77,9°C
CCR 1	78,9°C

Die berechneten N_0 -Werte der Gene wurden für jede Probe auf die entsprechenden N_0 -Werte von β-Aktin bezogen. Es wurden wiederum die relativen Genexpressionswerte gebildet, indem die zu vergleichenden Werte aufeinander bezogen wurden.

4.3.5. Bestimmung der Zytokin-Freisetzung mittels Luminex-Technologie

Die Luminex® xMAP® Technologie ermöglicht es, mehrere Proteine simultan in einer Probe zu messen. Um dies zu erreichen, werden kleine Partikel, sogenannte Beads oder Mikrosphären, die sich durch einen eindeutigen durch zwei fluoreszierende Farben festgelegten Farbcode voneinander unterscheiden, eingesetzt. Durch Mischung der beiden fluoreszierenden Farben in verschiedenen Konzentrationen können 100 verschiedene Bead-Sets hergestellt werden, die bei unterschiedlichen Wellenlängen Licht emittieren. Die einzelnen Bead-Sets tragen je einen spezifischen Antikörper, der an den gewünschten Analyten bindet (Abb. 12).

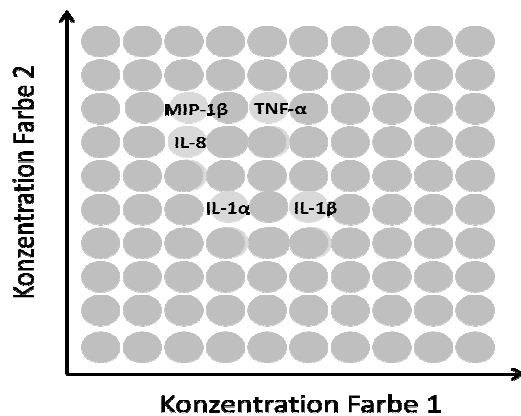


Abbildung 12: Fluoreszierende Farbkodierung der Mikrosphären [modifiziert von www.millipore.at]

Daher können in einer Probe mehrere Analyten gleichzeitig gemessen werden, wenn zu den Proben für jeden zu messenden Analyten Bead-Sets mit verschiedenen Antikörpern im sogenannten Bead-Mix zugegeben werden.

Nachdem die Analyten in den Proben an den entsprechenden Antikörper auf dem Bead gebunden haben, wird ein biotinylierter Detektionsantikörper zugegeben. Dieser bindet spezifisch an den Analyten. Anschließend wird als Reportermolekül der an Streptavidin gebundene Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin zugegeben. Streptavidin bindet sehr spezifisch an das Biotin auf dem Detektionsantikörper und Phycoerythrin ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der durch Aktivierung im grünen Bereich des Lichtspektrums Licht emittiert (Abb. 13).

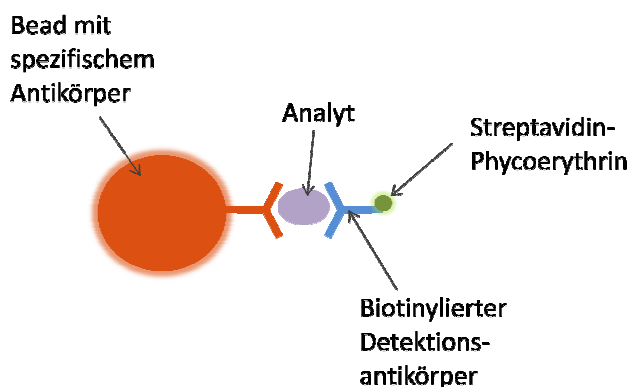


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Prinzips der LUMINEX Technologie

Durchführung

Die Messung wurde anhand des Milliplex MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel Protokolls (HCYTOMAG-60K) durchgeführt.

Es wurden die Zytokine IL-8 (Bead-Nr. 63), IL-1 α (Bead-Nr. 44), IL-1 β (Bead-Nr.46), MIP-1 β (Bead-Nr. 73) und TNF- α (Bead-Nr. 75) gemessen.

Alle Puffer und Reagenzien wurden vor der Durchführung der Messung auf Raumtemperatur aufgewärmt und die Proben wurden auf Eis aufgetaut. Außerdem wurde im Dunklen gearbeitet, da die Fluoreszenzfarbstoffe der Mikrosphären und der Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin lichtsensitiv sind.

Alle Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen. Auf die Platte wurden neben den Proben zwei Blindproben, eine Standardreihe in 1:5 Verdünnung in Doppelbestimmung und jeweils eine der Qualitätskontrollen aufgetragen.

Die Standard-Stammlösung hatte eine Konzentration von 10.000 pg/ml und wurde mit Assay-Puffer in fünf Verdünnungsschritten bis zu 3,2 pg/ml verdünnt.

Die Messung wurde in einer 96-Well Platte durchgeführt, die zuvor für zehn Minuten mit 200 μ l Waschpuffer auf einem Schüttler gewaschen wurde.

Der Waschpuffer wurde verworfen und es wurden 25 μ l der Proben, Standards und Qualitätskontrollen in die entsprechenden Wells pipettiert. Die Proben wurden außerdem mit 25 μ l Assay-Puffer versetzt. Die Zytokine in den Proben waren in RPMI 1640 Medium gelöst, daher wurde auch zu den Standard- und Kontrollproben 25 μ l des Mediums zugegeben, um mögliche Matrixeffekte mit einzubeziehen.

Die Blindwerte enthielten nur Assay-Puffer und Medium.

Für den Bead-Mix wurden 60 μ l von jedem Bead-Set (IL-8, IL-1 α , IL-1 β , MIP-1 β und TNF- α) entnommen und mit Bead-Diluent auf insgesamt 3 ml verdünnt. In jedes Well wurden 25 μ l des Bead-Mix pipettiert.

Die Platte wurde über Nacht bei 4 °C im Dunklen auf dem Schüttler inkubiert.

Am darauffolgenden Tag - nach 17h Inkubation - wurde die Platte zweimal mit je 200 μ l Waschpuffer mit Hilfe einer Magnetplatte, welche die Beads zurückhielt, gewaschen. Die Proben wurden mit 25 μ l der Detektionsantikörper auf dem Schüttler

für eine Stunde inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 25 µl Streptavidin-Phycoerythrin zugegeben und die Platte für 30 min auf dem Schüttler inkubiert.

Die Platte wurde wiederum zweimal mit Waschpuffer gewaschen, um nichtgebundene Antikörper beziehungsweise nichtgebundenes Streptavidin-Phycoerythrin zu entfernen.

Die Beads wurden in 150 µl Drive-Fluid resuspendiert, indem die Platte für fünf Minuten auf den Schüttler gestellt wurde.

Zur Messung und Auswertung wurde das Instrument MAGPIX und die Software LUMINEX XPonent sowie die Software MILLIPLEX Analyst von Millipore verwendet.

In der Software LUMINEX XPonent wurde eingestellt, dass 100 µl der Proben aufgesaugt werden und mindestens 50 Beads pro Well gezählt werden.

Auswertung

Die Fluoreszenzintensität der Kodierungsfarbstoffe und des Reportermoleküls Phycoerythrin unterscheiden sich voneinander. Dadurch können die Klassifizierung der Beads und die Quantifizierung der Analyten durch zwei verschiedene Laserstrahlen mit unterschiedlichen Energien erfolgen.

Die Beads werden vom Analysesystem aufgesaugt und im Falle des Geräts MAGPIX durch eine Magnetplatte den Laserstrahlen als Monolayer zugänglich gemacht.

Ein roter Laserstrahl regt die Emittierung der Kodierungsfarbstoffe an und ein grüner Laserstrahl regt das Phycoerythrin an. Das emittierte Licht wird schließlich von Detektoren (Photodioden, Photomultiplier) aufgefangen, an den Signalprozessor weitergeleitet und digitalisiert (Abb. 14).

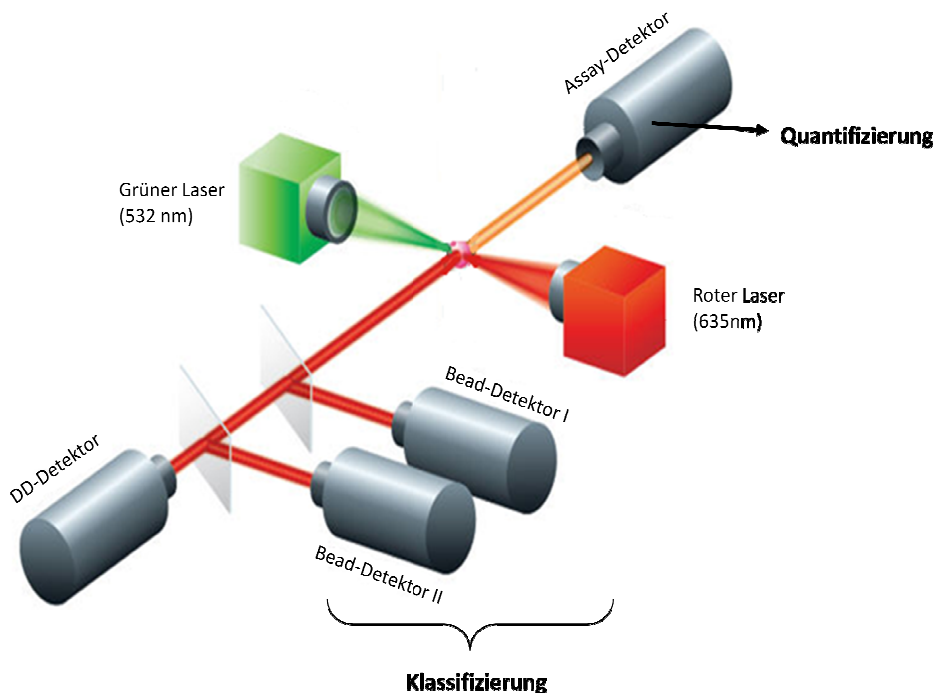


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Detektion [modifiziert nach www.panomics.com]

Die Software MILLIPLEX Analyst erstellt durch fünfp-parametrische Kurvenanpassung anhand der gemessenen Standards Standardkurven mit der Konzentration [pg/ml] der Analyten auf der x-Achse und dem Median der Fluoreszenzintensität (MFI) auf der y-Achse. Über diese Standardkurven wurden die gemessenen Lichtemissionswerte in Konzentrationen [pg/ml] umgerechnet [siehe Anhang 9.2].

Um den Einfluss der Intervention zu bestimmen, wurden wiederum Quotienten aus den zu vergleichenden Werten gebildet und somit die relative Zytokinexkretion dargestellt.

In der Tabelle 8 sind die gemessenen Werte für die beiden Qualitätskontrollen, sowie die erwarteten Werte laut Hersteller des Bead Kits [Milliplex® MAP Kit, Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel] angegeben und in der Tabelle 9 sind die gemessenen Detektionsschwellen (limit of detection, LOD) für die gemessenen Entzündungsmediatoren angeführt.

Tabelle 8: Erwarteter Bereich für die Qualitätskontrollen [Milliplex® MAP Kit, Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel] und Mittelwert (Minimum - Maximum) der tatsächlich gemessenen Werte

Zytokine		Erwarteter Bereich [pg/ml]	Mittelwert (Minimum – Maximum)
IL-8	QK 1	102 – 212	150 (119 – 188)
	QK 2	508 – 1055	827 (567 – 971)
IL-1α	QK 1	97 – 201	147 (107 – 202)
	QK 2	536 – 1114	878 (634 – 996)
IL-1β	QK 1	93 – 192	126 (95,0 – 154)
	QK 2	497 – 1032	835 (509 – 1128)
MIP-1β	QK 1	89 – 184	141 (119 – 157)
	QK 2	520 – 1080	830 (642 – 1293)
TNF-α	QK 1	90 – 186	126 (62,5 – 244)
	QK 2	492 – 1023	859 (386 – 1468)

Tabelle 9: Detektionsschwellen (LOD) der Bestimmung der Entzündungsmediatoren mittels Luminex-Technologie

Entzündungsparameter	LOD
IL-1α	< 2,32 pg/ml
IL-1β	< 1,57 pg/ml
IL-8	< 2,37 pg/ml
MIP-1β	< 1,43 pg/ml
TNF-α	< 1,92 pg/ml

4.4. Statistik

Alle Daten wurden mit Hilfe des Nalimov-Tests auf Ausreißer überprüft ($p < 0,05$; $df = n - 2$; $q < q_{\text{krit}}$). Signifikante Ausreißer wurden von den Analysen ausgeschlossen.

$$q = \left(\frac{x_i - \bar{x}}{s} \right) * \sqrt{\frac{n}{n-1}}$$

Für die Berechnung und die statistische Auswertung der Daten und die Erstellung der Graphen wurden das Statistikprogramm SigmaPlot 11.0 (Sysstat Software) und Microsoft Excel verwendet. SigmaPlot 11.0 wurde so eingestellt, dass es automatisch

die Daten auf Normalverteilung mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests ($p < 0,05$) und auf Varianzhomogenität mit dem Levene-Median-Test ($p < 0,05$) überprüft.

Für die Darstellung in den Graphen wurden für jede Gruppe der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) berechnet und als Mittelwert $\pm$ SEM abgebildet.

Der Einfluss von PG-LPS auf die Katalaseaktivität und auf DNA-Strangbrüche wurde ermittelt, indem die Katalaseaktivitätswerte [MU/l] beziehungsweise die Schweifintensitäten [%] der Kontrollproben mittels zweiseitigem t -Test mit den mit LPS stimulierten Proben verglichen wurden ($p < 0,05$). Bei Nichteinhalten der Voraussetzungen für parametrische Tests (keine Normalverteilung, keine Varianzhomogenität) wurde ein Mann-Whitney Rangsummen- t -Test durchgeführt.

Der Einfluss von PG-LPS auf die Immunantwort der Zelle (Genexpression und Ausschüttung der Zytokine) wurde berechnet, indem die ausreißerbereinigten Werte der mit LPS stimulierten Proben auf die Kontrollproben bezogen wurden und die signifikante Abweichung zu 1 (entspricht keiner Veränderung) mit Hilfe des zweiseitigen Einstichproben- t -Tests ($p < 0,05$) ermittelt wurde.

Um den Effekt der zweiwöchigen Interventionsphase auf die Immunantwort der Zelle und auf die oxidative Reaktion zu untersuchen wurde ebenfalls ein Einstichproben- t -Test verwendet. Dazu wurden die Werte zum Zeitpunkt t_1 auf die Werte zum Zeitpunkt t_0 bezogen und der signifikante Unterschied zu 1 ermittelt ($p < 0,05$). Mit einer einfaktoriellen ANOVA ($p < 0,05$) wurde berechnet, ob sich die vier Gruppen in der relativen Veränderung der Werte nach der Interventionsphase unterscheiden. Konnten in den Stichproben keine Normalverteilung und keine Varianzhomogenität festgestellt und somit die Voraussetzungen für eine parametrische einfaktorielle ANOVA nicht eingehalten werden, wurde der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test (Rangsummen-ANOVA) durchgeführt.

Um bei einem signifikanten Ergebnis der ANOVA feststellen zu können, welche Gruppen sich voneinander unterscheiden, wurden paarweise Vergleiche mittels post-hoc-Tests (Holm-Sidak-Methode) durchgeführt.

Der Einfluss der Gruppen auf die Veränderung der Reaktion der Zelle auf die LPS-Stimulation wurde mittels Einstichproben- t -Tests ($p < 0,05$) ermittelt, indem die

Differenz der relativen Veränderungen durch die LPS-Stimulation vor und nach der Interventionsphase mit 0 verglichen wurde. Der Unterschied zwischen den Gruppen wurde mit einer einfaktoriellen ANOVA beziehungsweise mit einem Kruskal-Wallis-Test untersucht.

5. Ergebnisse

5.1. Probandencharakterisierung und Zellviabilität

Probandencharakterisierung

An der Studie nahmen 40 gesunde Probanden/Probandinnen zwischen 21 und 52 Jahren teil, wobei das Durchschnittsalter bei $26,5 \pm 7$ Jahren lag. Die Studienpopulation setzte sich aus 31 weiblichen und neun männlichen Probanden/Probandinnen zusammen.

Bis auf eine Probandin, die von einem leicht abführenden Effekt des Kaugummikonsums berichtete, klagte keine/r der Probanden/Probandinnen über Nebenwirkungen, bis auf leichte Schmerzen der Kiefermuskulatur an den ersten paar Tagen der Interventionsphase in den Kaugummigruppen, die sich aber wieder legten.

Zellzahl

Die Anzahl der entnommenen Zahnfleischepithelzellen wurden mit der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Es konnten durchschnittlich $7,27 \cdot 10^5 \pm 1,44 \cdot 10^5$ Zellen für die Ermittlung des Langzeiteffekts abgeerntet werden. Die Zellausbeute nach der zehnminütigen Kurzzeitintervention war allerdings mit $6,20 \cdot 10^5 \pm 1,51 \cdot 10^5$ Zellen signifikant (zweiseitiger t -Test $p < 0,05$) geringer.

Zellviabilität

Die Viabilität der Zahnfleischepithelzellen wurde vor (t_0) und nach (t_1) der zweiwöchigen Interventionsphase mittels Trypanblau-Test ermittelt. Die vier Gruppen unterschieden sich zu Beginn der Interventionsphase (t_0) in der Zellviabilität nicht voneinander. In keiner der vier Gruppen konnte nach den zwei Wochen eine Abnahme oder Zunahme der Zellviabilität festgestellt werden. Außerdem wurde in den Gruppen 2 und 3 (MBE-Kaugummi und Kontrollkaugummi) die Zellviabilität vor und nach dem zehnminütigen Kauen der Kaugummis bestimmt. Auch hier konnte keine Veränderung der Viabilität gezeigt werden (Tab. 10).

Tabelle 10: Zellviabilität [%] der vier Gruppen vor (t_0) und nach (t_1) der Interventionsphase

		t_0	t_1	t_{0_10min}	t_{1_10min}
Kontrollzahnpaste	Mittelwert	91,5 %	95,8 %		
	St.abw.	2,72 %	3,30 %		
MBE-Kaugummi	Mittelwert	91,7 %	94,1 %	91,8 %	95,4 %
	St.abw.	3,44 %	2,54 %	4,75 %	5,67 %
Kontrollkaugummi	Mittelwert	91,2 %	92,7 %	94,0 %	93,5 %
	St.abw.	5,17 %	4,87 %	4,53 %	4,08 %
Colgate®	Mittelwert	93,9 %	93,7 %		
	St.abw.	4,56 %	3,99 %		

5.2. Compliance der Probanden/Probandinnen

Zur Überprüfung der Compliance der Probanden/Probandinnen wurden die Zahnpasta- und Kaugummirationen jeweils nach einer Woche gewogen und die tatsächlich verbrauchten Mengen mit dem idealen Verbrauch verglichen.

Der durchschnittliche Verbrauch der Kontrollzahnpaste [g/Tag] und der Zahnpasta Colgate total® [g/Tag] sind in der Tabelle 11 angeführt. In der Tabelle 12 ist der durchschnittliche Verbrauch an Kontrollzahnpaste in die vier Gruppen aufgegliedert.

Tabelle 11: Durchschnittlicher Verbrauch an Kontrollzahnpaste (Gruppen 1-3 zusammengefasst) und an der Zahnpasta Colgate total® (Gruppe 4) in [g/Tag], zweiseitiger t -Test * $p < 0,05$ zum Vergleich der Gruppen

Verbrauch [g/Tag]	Kontroll-zahnpaste	Colgate®
Mittelwert	5,02	2,89*
Median	4,95	2,26
Standard-abweichung	2,10	1,29
SEM	0,66	0,41

Tabelle 12: Durchschnittlicher Verbrauch der Kontrollzahnpaste pro Gruppe (in der Colgate®-Gruppe wurden die ersten beiden Wochen zur Berechnung herangezogen) in [g/Tag]; $n = 10$ pro Gruppe, einfaktorielle ANOVA * $p < 0,05$ zum Vergleich der Gruppen

Verbrauch [g/Tag]	Kontroll-zahnpaste-Gruppe	MBE-Kaugummi-Gruppe	Kontroll-kaugummi-Gruppe	Colgate®-Gruppe
Mittelwert	4,72	5,51	4,26	5,59
Median	5,16	5,26	4,07	5,46
Standard-abweichung	0,19	1,96	1,02	3,37
SEM	0,38	0,62	0,32	1,07

Zu Beginn der Studie wurde davon ausgegangen, dass circa 1 g Zahnpasta pro Zähneputzen verbraucht wird. Daher kann bei dem Verbrauch von durchschnittlich 5,13 g/ Tag der Kontrollzahnpasta beziehungsweise 3,12 g/Tag der Zahnpasta Colgate total® angenommen werden, dass sich die Probanden/Probandinnen an die Anweisungen der Versuchsleiter gehalten haben und mit der ausgegebenen Zahnpasta die Zähne geputzt haben.

Der Verbrauch der Kontrollzahnpasta in der Studienpopulation ist normalverteilt (Kolmogorov-Smirnov-Test; $p < 0,05$). Außerdem unterscheidet sich der Verbrauch der Kontrollzahnpasta in den vier Gruppen nicht voneinander (einfaktorielle ANOVA $p < 0,05$).

Aufgrund der wöchentlichen Wiegung der Kaugummirationen konnte in einem Fall festgestellt werden, dass die Probandin nach einer Woche nur die Hälfte der vorgesehenen Kaugummi verzehrt hatte. Die Probandin wurde darauf hingewiesen und hielt sich in der zweiten Woche an die Anweisungen der Versuchsleiter.

Alle anderen Probanden/Probandinnen haben die Kaugummirationen für die zwei Wochen vollständig aufgebraucht.

Daher kann auf eine gute Compliance der Probanden/Probandinnen geschlossen werden.

5.3. Aktivität der Katalase in Mundschleimhautzellen nach zweiwöchiger Interventionsphase

Einfluss von PG-LPS auf die Katalaseaktivität

Es wurde der Einfluss von PG-LPS auf die Katalaseaktivität untersucht, um festzustellen, ob eine durch LPS induzierte Entzündungsreaktion den oxidativen Stress in der Zelle erhöht und somit die Aktivität des antioxidativen Enzyms Katalase verändert.

In Abbildung 15 sind die Mittelwerte der Katalaseaktivität in MU/l für die Kontrollproben (hellgrauer Balken) und die für sechs Stunden mit 10 µg/ml PG-LPS stimulierten Proben (dunkelgrauer Balken) abgebildet. Die mit LPS stimulierten Proben unterscheiden sich nicht von den Kontrollproben. Es wurde daher im weiteren darauf verzichtet, einen Einfluss der Behandlungen auf die LPS-induzierte Katalaseaktivität zu messen.

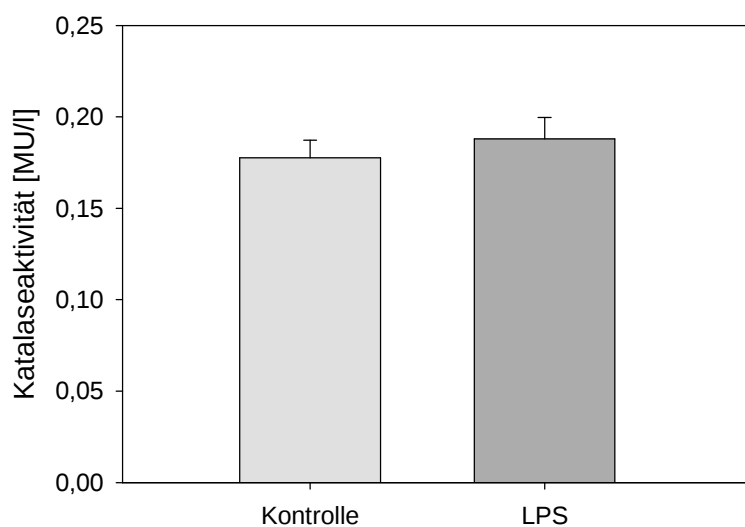


Abbildung 15: Einfluss von 10 µg/ml PG-LPS auf die Katalaseaktivität in humanen Zahnfleischepithelzellen; Vergleich der Katalaseaktivitätswerte [MU/l] der Kontrollproben und der mit LPS inkubierten Proben zu Beginn der Interventionsphase (t_0); Mittelwert $\pm$ SEM; zweiseitiger t -Test $p < 0,05$; $n = 40$

Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf die Katalaseaktivität

Zur Beurteilung des Einflusses der zweiwöchigen Interventionsphase auf die Katalaseaktivität wurden die gemessenen Werte [MU/l] zum Zeitpunkt t_1 (Ende der Interventionsphase) auf die Werte zum Zeitpunkt t_0 (Beginn der Interventionsphase) bezogen (CON_{t_1}/CON_{t_0}) und somit die relative Katalaseaktivität berechnet. In der Abbildung 16 sind für jede der vier Gruppen die Mittelwerte der relativen Katalaseaktivität abgebildet.

In keiner der vier Gruppen hat sich die Aktivität des Enzyms nach der zweiwöchigen Interventionsphase verändert. Weder das Kauen der Kaugummis noch die Verwendung der Colgate total® Zahnpasta hatte einen Effekt auf die Katalaseaktivität.

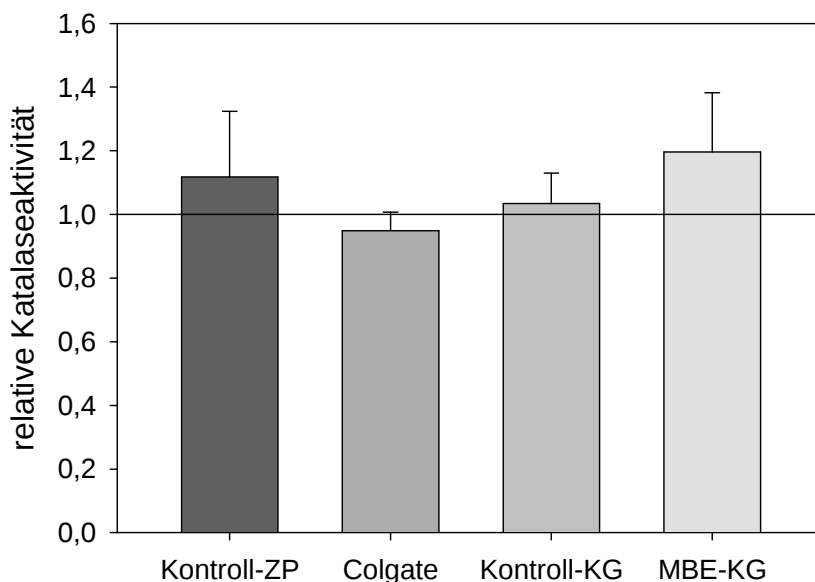


Abbildung 16: Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf die Katalaseaktivität in humanen Zahnfleischepithelzellen; Vergleich der relativen Katalaseaktivität der vier Gruppen (t_1/t_0); Mittelwert $\pm$ SEM; zum Vergleich von t_0 zu t_1 : zweiseitiger Einstichproben- t -Test; zum Vergleich der Gruppen: einfaktorielle ANOVA; $n = 9 - 10$ pro Gruppe; ZP = Zahnpasta, KG = Kaugummi.

5.4. Auftreten von DNA-Schäden in humanen Zahnfleischepithelzellen

Einfluss von PG-LPS auf das Auftreten von DNA-Strangbrüchen

Um festzustellen ob 10 $\mu\text{g/ml}$ PG-LPS DNA-Strangbrüche verursachen, wurden die Proben in je zwei Aliquote aufgeteilt, jeweils ein Aliquot mit LPS für sechs Stunden inkubiert und die Schweifintensitätswerte (TI-Werte) mittels Comet Assay ermittelt.

In der Abbildung 17 sind die Mittelwerte der Schweifintensitäten [%] der Kontrollproben und der mit LPS inkubierten Proben abgebildet. Die mit LPS stimulierten Proben hatten im Durchschnitt TI-Werte von $5,11 \pm 0,24$ % und unterschieden sich nicht von den Kontrollproben ($5,00 \pm 0,19$ %). LPS verursachte daher unter den vorliegenden Bedingungen keine DNA-Strangbrüche.

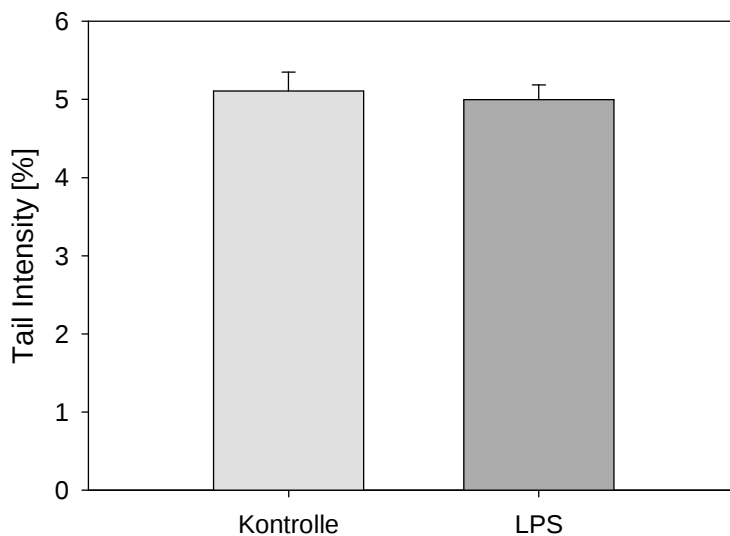


Abbildung 17: Einfluss von PG-LPS auf das Auftreten von DNA-Strangbrüchen in humanen Zahnfleischepithelzellen; Vergleich der Schweifintensitätswerte der Kontrollproben und der mit LPS stimulierten Proben zu Beginn der Interventionsphase (t_0); Mittelwert $\pm$ SEM; zweiseitiger t -Test ($p < 0,05$); $n = 40$.

Einfluss von 10 $\mu\text{g/ml}$ PG-LPS auf das Auftreten von oxidativen DNA Schäden

Der eigentliche Fokus dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung der anti-inflammatorischen Wirkung des Magnolienrindenextrakts. Da über die Freisetzung von ROS der in der Immunantwort beteiligten Phagozyten ein Zusammenhang zwischen Entzündungsreaktionen und oxidativem Stress besteht, wurde untersucht, ob PG-LPS einen Einfluss auf die Entstehung von oxidativen DNA-Schäden hat.

Dazu wurden die beiden Aliquote der Proben wiederum in zwei Aliquote aufgeteilt, je ein Aliquot mit dem Enzym Fpg behandelt und wiederum die Schweifintensitätswerte ermittelt. Die relativen Schweifintensitäten wurden berechnet, indem die Intensitätswerte der mit Fpg behandelten Proben auf die nicht behandelten Proben

bezogen wurden (CON_fpg/CON und LPS_fpg/LPS). In der Abbildung 18 sind die Mittelwerte der relativen Schweifintensitätswerte für die Kontrollproben und der mit LPS inkubierten Proben abgebildet.

Sowohl bei den Kontrollproben als auch bei den mit 10 µg/ml PG-LPS behandelten Proben sind die relativen Intensitäten signifikant höher als 1 und daher die TI-Werte der mit Fpg behandelten Proben signifikant höher als die der nicht behandelten Proben. Daraus lässt sich schließen, dass die DNA der Zellen oxidativ-geschädigte Basen enthielt, die in Strangbrüche übersetzt wurden.

Die mit LPS stimulierten Proben (rel. TI-Wert = $1,20 \pm 0,0636$) unterscheiden sich allerdings nicht von den Kontrollproben (rel. TI-Wert = $1,15 \pm 0,0471$). Die Inkubation mit 10 µg/ml PG-LPS erhöht daher nicht die oxidativen DNA-Schäden in den Zahnfleischepithelzellen.

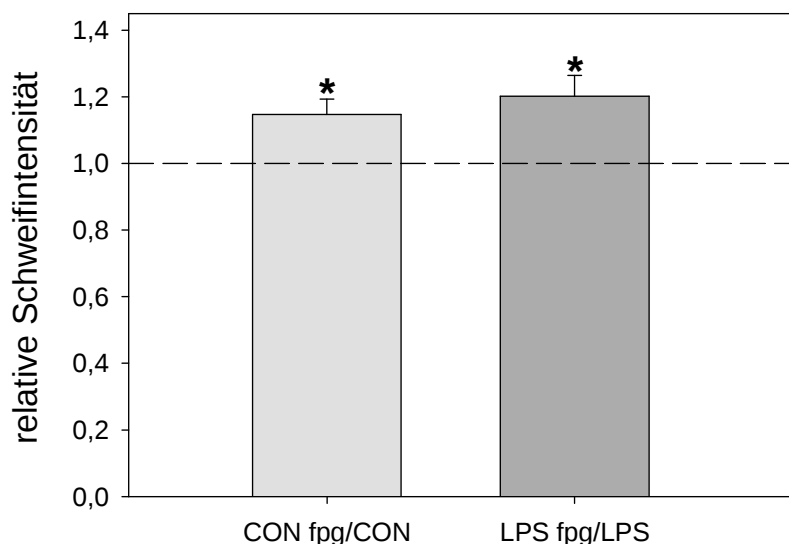


Abbildung 18: Einfluss von PG-LPS auf das Auftreten von oxidativen DNA Schäden in humanen Zahnfleischepithelzellen; Vergleich der relativen Schweifintensitätswerte der Kontrollproben und der mit LPS stimulierten Proben zum Zeitpunkt t_0 ; Mittelwert $\pm$ SEM; zweiseitiger Einstichproben- t-Test * (Vergleich CON mit CON fpg/ LPS mit LPS fpg) $p < 0,05$; zum Vergleich der Gruppen, zweiseitiger t-Test $p < 0,05$; $n = 40$ pro Behandlung

Da LPS keine oxidativen DNA-Schäden verursacht hat, hat die Stimulation mit 10 µg/ml PG-LPS keinen Einfluss auf den oxidativen Gleichgewichtszustand der Zelle. Daher wurde darauf verzichtet den Einfluss des angereicherten Kaugummis auf das Auftreten von oxidativen DNA-Schäden zu untersuchen.

Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf das Auftreten von DNA-Strangbrüchen

Um den Einfluss des Kaugummi auf das Auftreten von DNA-Schäden zu untersuchen, wurden die Schweifintensitätswerte der Kontrollproben – die weder mit LPS noch mit Fpg stimuliert worden waren – nach der zweiwöchigen Interventionsphase (t_1) mit den Werten zu Beginn der Interventionsphase t_0 für jede Gruppe miteinander verglichen.

Dazu wurden die Schweifintensitätswerte zum Zeitpunkt t_1 auf die Werte zum Zeitpunkt t_0 bezogen (CON_t_1/CON_t_0) und für jede der vier Gruppen die Mittelwerte in der Abbildung 19 dargestellt. Es kann der Abbildung entnommen werden, dass sich der für Gruppe 3 (Kontrollkaugummi) ermittelte Mittelwert und der Mittelwert der Gruppe 4 (Colgate total®) signifikant von der Negativkontrolle (Kontrollzahnpaste) unterscheiden. Außerdem konnte bei den Zahnfleischepithelzellen der Kontrollkaugummigruppe beziehungsweise der Positivkontrollgruppe eine signifikante Senkung der DNA-Schäden von 20 % beziehungsweise 34 % festgestellt werden. In der Gruppe 2, in der die Probanden/Probandinnen den mit MBE-angereicherten Kaugummi für zwei Wochen kauen sollten, konnte keine signifikante Veränderung der DNA-Strangbrüche nach der Interventionsphase festgestellt werden. Allerdings unterscheiden sich die Ergebnisse des Kontrollkaugummi nicht signifikant von denen des MBE-Kaugummi.

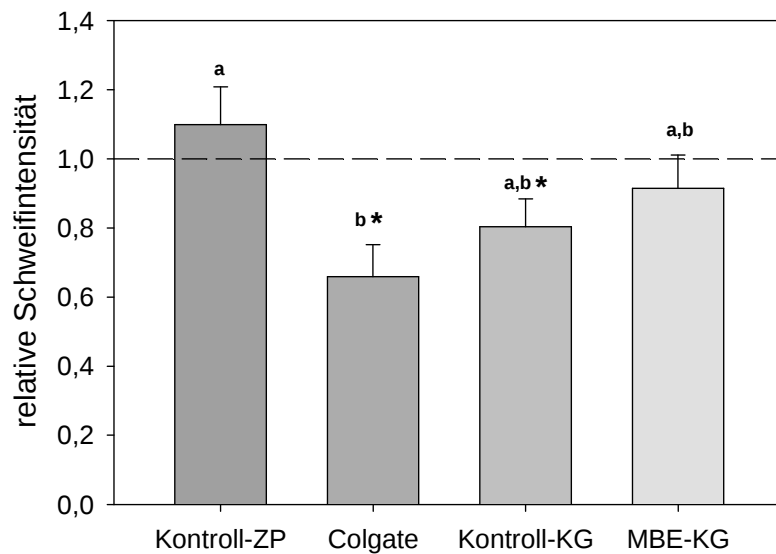


Abbildung 19: Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf das Auftreten von DNA-Strangbrüchen in humanen Zahnfleischepithelzellen; dargestellt sind die relativen Schweißintensitätswerte der vier Gruppen; Werte zum Zeitpunkt t_1 bezogen auf den Zeitpunkt t_0 (t_1/t_0); Mittelwert $\pm$ SEM; zweiseitiger Einstichproben- t -Test zum Vergleich von t_0 und t_1 (* $p < 0,05$; einfaktorielle ANOVA zum Vergleich der Gruppen, signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet ($p < 0,05$); $n = 9 - 10$ pro Gruppe; ZP = Zahnpasta, KG = Kaugummi.

In der Tabelle 12 sind die Schweißintensitätswerte [%] zum Zeitpunkt t_0 und die relative Veränderung nach der zweiwöchigen Interventionsphase in % dargestellt.

Tabelle 13: Schweißintensitätswerte (%) der vier Gruppen zum Zeitpunkt t_0 und t_1 und die relative Veränderung in % nach der zweiwöchigen Interventionsphase, zweiseitiger Einstichproben- t -Test zum Vergleich der Werte von t_0 und t_1 , * $p < 0,05$; einfaktorielle ANOVA zum Vergleich der Gruppen, Unterschiede sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet ($p < 0,05$).

Gruppe	Kontroll-zahnpasta		MBE-Kaugummi		Kontroll-kaugummi		Colgate®	
Zeitpunkt	t_0	t_1	t_0	t_1	t_0	t_1	t_0	t_1
Mittelwert [%]	4,64	5,11	4,76	4,58	4,86	4,04*	6,17	3,65 *
Standard-abweichung [%]	1,52	1,04	1,19	1,53	0,92	0,99	1,96	0,91
SEM [%]	0,48	0,33	0,37	0,48	0,29	0,31	0,62	0,29
Relative Veränderung [%]	+ 10 ^a		- 9 ^{a,b}		- 20 ^{a,b}		- 34 ^b	

5.5 Bestimmung des Entzündungsmarkers IL-8 in humanen Zahnfleischepithelzellen

Das proinflammatorische Chemokin IL-8 wurde in dieser Arbeit als Hauptzielparameter zur Bestimmung der anti-inflammatorischen Wirkung des in die Kaugummi eingebrachten Magnolienrindenextrakts herangezogen und wurde sowohl auf funktioneller wie auch auf der Genebene gemessen.

5.5.1. Einfluss der sechsstündigen Inkubation von humanen Zahnfleischepithelzellen mit PG-LPS auf die Genexpression und die Exkretion von IL-8

Lipopolysaccharide der Zellaußenmembran von *Porphyromonas gingivalis* werden vom Immunsystem des Wirts erkannt und können eine Immunantwort auslösen, in Folge dieser die Produktion von Entzündungsmediatoren, wie IL-8, gesteigert wird [Tse et al., 2007].

Es wurde untersucht, ob durch eine sechsstündige Inkubation der abgeernteten Zahnfleischepithelzellen mit 10 µg/ml PG-LPS die Genexpression und die Ausschüttung von IL-8 erhöht werden.

Die IL-8 Freisetzung der Zellen wurde mit Hilfe der Luminex-Technologie gemessen und um Veränderungen in der Genexpression des für IL-8 kodierenden Gens zu untersuchen, wurde eine quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) durchgeführt.

Der Einfluss der PG-LPS Stimulation wurde ermittelt, indem jeweils ein Aliquot der Proben mit 10 µg/ml *Porphyromonas gingivalis*-LPS inkubiert und die Proben anschließend zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und für die Messung der IL-8 Ausschüttung verwendet wurde. Aus dem Zellpellet wurde die RNA isoliert, welche in cDNA umgeschrieben und für die qPCR verwendet wurde.

Die relative Veränderung der Genexpression beziehungsweise der IL-8-Exkretion durch die Inkubation mit LPS wurde berechnet, indem die Werte der mit LPS stimulierten Proben auf die Kontrollproben bezogen wurden (LPS_{t_0}/CON_{t_0}). Diese Werte sind in der Abbildung 20 dargestellt.

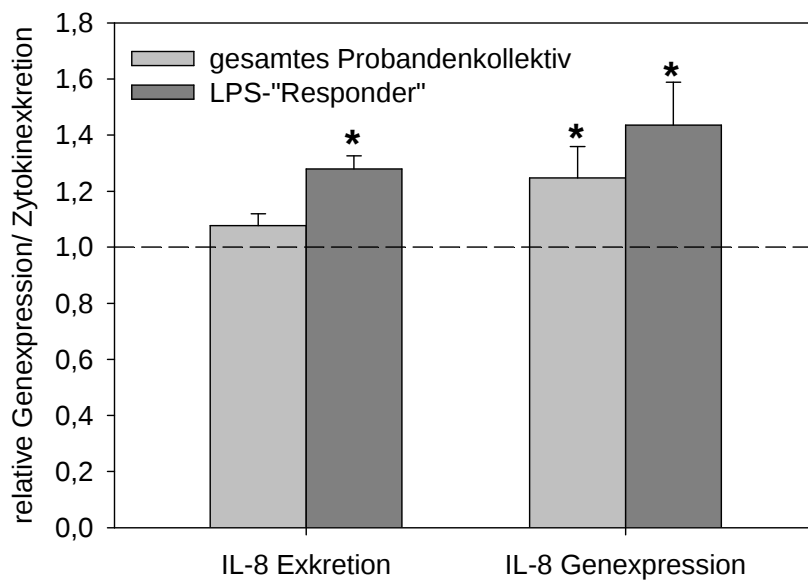


Abbildung 20: Einfluss von 10 µg/ml PG-LPS auf die Genexpression und die IL-8 Freisetzung in humanen Zahnfleischepithelzellen; dargestellt ist die relative Expression/Exkretion bezogen auf die nicht stimulierten Proben (LPS_t₀/CON_t₀); Mittelwert ± SEM; zweiseitiger Einstichproben-t-Test
* p < 0,05; gesamtes Probandenkollektiv: n = 40; Gruppe der Responder: n= 21 - 27

Es zeigte sich, dass die Zahnfleischepithelzellen einiger Probanden auf die sechsstündige Inkubation mit PG-LPS nicht mit einer vermehrten Ausschüttung oder einer erhöhten Genexpression der Entzündungsmediatoren reagierten. Diese Gruppe von Probanden/Probandinnen wurde daher als „Non-Responder“ auf PG-LPS bezeichnet. Die Probanden/Probandinnen deren Zahnfleischepithelzellen hingegen auf die Inkubation mit PG-LPS mit einer gesteigerten Ausschüttung beziehungsweise mit einer vermehrten Genexpression der untersuchten Marker reagierten, wurden als Gruppe der „Responder“ zusammengefasst. Die statistische Auswertung wurde gesondert nur für die Gruppe der „Responder“ durchgeführt. In der Abbildung 20 sind die relative Genexpression sowie die relative Freisetzung des Entzündungsmarkers IL-8 sowohl für das gesamte Probandenkollektiv, wie auch für die Gruppe der „Responder“ dargestellt.

In der Gruppe der „Responder“ wurde eine signifikante Steigerung der IL-8 Sekretion um $27,9 \pm 4,73$ % sowie der Genexpression um $43,5 \pm 15,4$ % durch die Inkubation mit PG-LPS festgestellt. Werden allerdings die „Non-Responder“ nicht ausgeschlossen, so konnte keine signifikante Erhöhung der IL-8 Sekretion festgestellt werden.

Diese Daten zeigen, dass bei „Respondern“ durch PG-LPS eine Immunantwort hervorgerufen und dass dadurch das proinflammatorische Chemokin IL-8 hochreguliert und vermehrt ausgeschüttet wird.

Die „Non-Responder“ auf LPS wurden von den weiteren statistischen Auswertungen ausgeschlossen. Über alle Gruppen hinweg reagierten die Zahnfleischepithelzellen von 19 Probanden/Probandinnen nach der Stimulation mit PG-LPS nicht mit einer erhöhten Ausschüttung von IL-8 (47,5 %) und bei 13 Probanden/Probandinnen zeigten die Zellen keine vermehrte Genexpression von IL-8 (32,5 %) und wurden daher von den statistischen Analysen ausgeschlossen.

5.5.2. Einfluss des Kaugummikauens auf das Zytokin IL-8 auf der Genebene

Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf die Genexpression von IL-8

Um zu untersuchen, ob das Kauen des mit MBE-angereicherten Kaugummi eine anti-inflammatorische Wirkung in den Zahnfleischepithelzellen aufweist, wurde der Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf die Genexpression von IL-8 ermittelt. Dazu mussten die Probanden/Probandinnen zwei Wochen lang fünf mal zwei Stück Kaugummi täglich für mindestens zehn Minuten kauen. Zu Beginn (t_0) und am Ende der Interventionsphase (t_1) wurden den Probanden/Probandinnen mit einer kleinen sterilen Bürste Zahnfleischepithelzellen entnommen, aus denen die RNA isoliert und durch die qPCR der relative Gehalt an transkribierter mRNA des für IL-8 kodierenden Gens ermittelt wurde. Für jede der vier Gruppen wurden die relativen N_0 -Werte auf die endogene Kontrolle (β -Aktin) normalisiert und die Quotienten aus den Werten zum Zeitpunkt t_1 und zum Zeitpunkt t_0 gebildet ($CON\ t_0/CON\ t_1$) und miteinander verglichen (Abb. 21).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Genexpression in den Zahnfleischepithelzellen der Probanden/Probandinnen in der Gruppe 2 (MBE-Kaugummi) nach der zweiwöchigen Interventionsphase durch das Kauen des Kaugummi circa um das Doppelte (1,97-fache) angestiegen ist ($p < 0,05$), während bei den Probanden/Probandinnen der anderen Gruppen keine signifikante Veränderung der Genexpression festgestellt werden konnte.

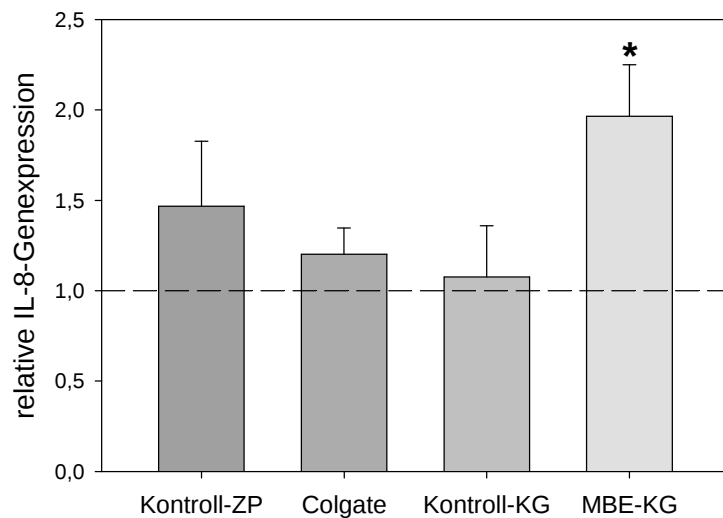


Abbildung 21: Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf die Genexpression von IL-8 in humanen Zahnfleischepithelzellen; Vergleich der relativen Genexpression ($CON\ t_1 / CON\ t_0$) der vier Gruppen; nur „Responder“; zweiseitiger Einstichproben-t-Test * $p < 0,05$ zum Vergleich von t_0 und t_1 ; einfaktorielle ANOVA zum Vergleich der Gruppen; $n = 4 - 7$ pro Gruppe; ZP = Zahnpasta, KG = Kaugummi.

Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf die durch LPS ausgelöste Reaktion in den Zahnfleischepithelzellen auf der Genebene

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der Gruppe der „Responder“ auf PG-LPS die Zahnfleischepithelzellen als Reaktion auf die LPS-Stimulation die Expression des für IL-8 kodierenden Gens hochreguliert haben. Um zu ermitteln, ob die zweiwöchige Interventionsphase diese Reaktion auf LPS vermindern kann, wurden die berechneten N_0 -Werte der eingesetzten cDNA auf die endogene Kontrolle (β -Aktin) normalisiert und für jeden der beiden Zeitpunkte jeweils die Werte der mit LPS stimulierten Proben auf die Kontrollproben (LPS/CON) bezogen. In der Abbildung 22 ist für jede der vier Gruppen die Differenz aus dem Quotienten ($LPS/CON\ t_1$) am Ende der Interventionsphase und dem Quotienten ($LPS/CON\ t_0$) zu Beginn der Interventionsphase abgebildet.

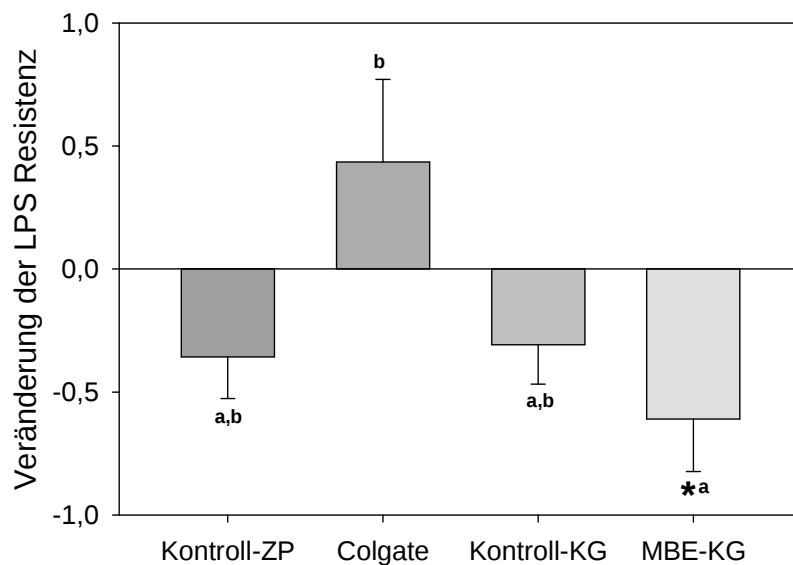


Abbildung 22: Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf die durch PG-LPS ausgelöste Erhöhung der Genexpression von IL-8 in humanen Zahnfleischepithelzellen; Vergleich der Veränderung der LPS-Reaktion ($LPS/CON\ t_1 - LPS/CON\ t_0$) der vier Gruppen; nur „Responder“; Mittelwert $\pm$ SEM; zweiseitiger Einstichproben-t-Test * $p < 0,05$ zum Vergleich von t_0 und t_1 ; einfaktorielle ANOVA zum Vergleich der Gruppen - signifikante Unterschiede sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet $p < 0,05$; $n = 4 - 8$ pro Gruppe; ZP = Zahnpasta, KG = Kaugummi.

Eine signifikante Verminderung der durch die Stimulation mit PG-LPS verstärkten IL-8 Genexpression konnte nur durch das Kauen der mit MBE-angereicherten Kaugummi erzielt werden. Diese Gruppe unterscheidet sich signifikant von der Positivkontrollgruppe (Colgate total®), in welcher allerdings keine Reduktion der Reaktion auf LPS zu sehen war. Allerdings konnte auch hier kein Unterschied zwischen der Kontrollkaugummigruppe und der MBE-Kaugummigruppe festgestellt werden.

5.5.3. Einfluss des Kaugummikauens auf das Chemokin IL-8 auf funktioneller Ebene

Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf die Freisetzung von IL-8 aus isolierten Zahnfleischepithelzellen

Zur Bestimmung der anti-inflammatorischen Wirkung des Magnolienrindenextrakts wurde neben der Ermittlung der Veränderung der Genexpression von IL-8 durch die Interventionsphase auch die IL-8-Ausschüttung der Zahnfleischepithelzellen untersucht.

Die mittels Luminex-Technologie gemessenen IL-8-Konzentrationen zum Zeitpunkt t_0 unterlagen trotz zweiwöchiger Konditionierungsphase großer interindividueller Schwankungen. Daher wurden die Werte am Ende der Interventionsphase auf die zu Beginn der Interventionsphase bezogen ($CON\ t_1 / CON\ t_0$) und die relative Veränderung der IL-8 Freisetzung zur Analyse herangezogen.

Das Ausmaß der interindividuellen Unterschiede ist am Beispiel von IL-8 in der Tab.13 dargestellt.

Tabelle 14: Mittelwert und Schwankungsbreite der IL-8-Freisetzung aus den Zahnfleischepithelzellen zu Beginn der Interventionsphase (t_0)

MW	72,9 pg/ml
s	82,1 pg/ml
SEM	13,0
Min	8,92 pg/ml
Max	404 pg/ml
Range	395 pg/ml
n	40

Die relativen IL-8 Exkretionswerte der vier Gruppen sind in der Abbildung 23 zusammengefasst.

Wie in der Abbildung zu sehen ist, konnten keine signifikanten Veränderungen durch die Interventionsphase im Vergleich zum Zeitpunkt t_0 und keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Weder die Zahnpasta Colgate total® (Positivkontrollgruppe) noch der angereicherte beziehungsweise der Kontrollkaugummi konnten in den zwei Wochen der Interventionsphase die IL-8 Exkretion der Zahnfleischepithelzellen vermindern.

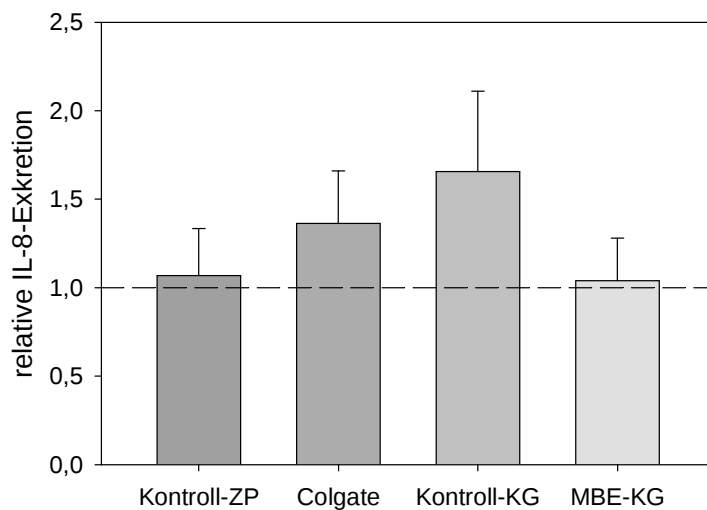


Abbildung 23: Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf die IL-8-Ausschüttung in humanen Zahnfleischepithelzellen; Vergleich der relativen Genexpression ($CON\ t_1 / CON\ t_0$) der vier Gruppen; nur „Responder“; zweiseitiger Einstichproben- t -Test zum Vergleich von t_0 und t_1 ; einfaktorielle ANOVA zum Vergleich der Gruppen; $n = 4-7$ pro Gruppe; ZP = Zahnpasta, KG = Kaugummi.

Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf die durch LPS ausgelöste Reaktion in den Zahnfleischepithelzellen auf funktioneller Ebene

Um festzustellen, ob das Kauen der Kaugummis einen Einfluss auf die durch PG-LPS erhöhte IL-8-Ausschüttung hat, wurden die ermittelten IL-8-Konzentrationen der mit LPS stimulierten Proben für jeden der beiden Zeitpunkte auf die Kontrollproben bezogen. Der Quotient aus den mit LPS stimulierten Proben und den Kontrollproben zu Beginn der Interventionsphase ($LPS/CON\ t_0$) wurde vom Quotienten der Werte zum Zeitpunkt t_1 ($LPS/CON\ t_1$) abgezogen. Die daraus resultierenden relativen Veränderungen der Reaktion auf LPS sind in der Abbildung 24 veranschaulicht ($LPS/CON\ t_1 - LPS/CON\ t_0$).

Das Kauen des MBE-Kaugummis hatte eine Verminderung der Reaktion auf LPS zur Folge und konnte nach der zweiwöchigen Interventionsphase die durch die LPS Stimulation erhöhte IL-8 Sekretion signifikant senken. Die unterschiedlichen Behandlungen in den vier Gruppen unterscheiden sich allerdings nicht in ihrer Wirkung.

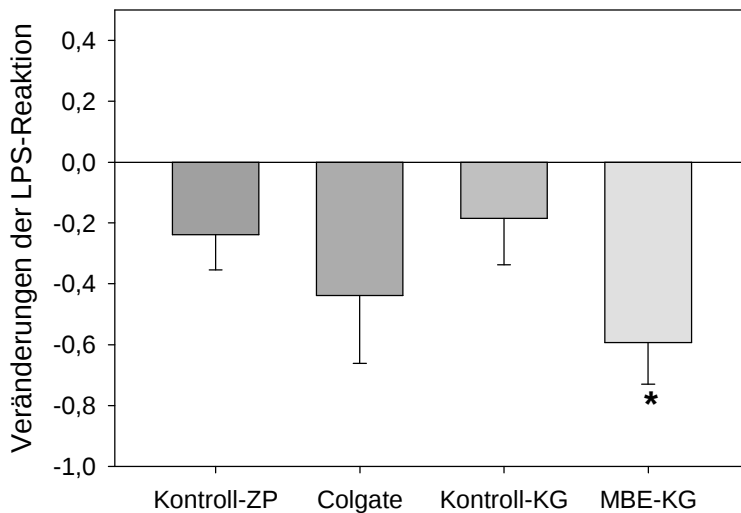


Abbildung 24: Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf die durch PG-LPS ausgelöste Erhöhung der IL-8 Freisetzung in human Zahnfleischepithelzellen; Vergleich der relativen Veränderungen der LPS-Reaktion ($LPS/CON\ t_1 - LPS/CON\ t_0$) der vier Gruppen; nur „Responder“; Mittelwert $\pm$ SEM; zweiseitiger Einstichproben-t-Test * $p < 0,05$ zum Vergleich von t_0 und t_1 ; einfaktorielle ANOVA zum Vergleich der Gruppen; $n = 4 - 7$ pro Gruppe; ZP = Zahnpasta, KG = Kaugummi.

5.6 Einfluss der Kaugummis auf die Genexpression weiterer Entzündungsmarker

Auf Genebene wurde neben dem für IL-8 kodierenden Gens auch die Genexpression der für IL-1 α , IL-1 β und CCR1 kodierenden Gene untersucht.

Einfluss der Inkubation mit PG-LPS auf die Genexpression von IL-1 α , IL-1 β und CCR1 in den Zahnfleischepithelzellen

Um den Einfluss von PG-LPS auf die Genexpression von *IL-1 α* , *IL-1 β* und *CCR1* zu untersuchen, wurden die Zahnfleischepithelzellen mit 10 μ g/ml PG-LPS für sechs Stunden inkubiert und anschließend der jeweilige relative mRNA-Gehalt in den Zellen mittels qPCR bestimmt. Die Werte der mit LPS stimulierten Proben wurden auf die Kontrollproben bezogen und sind in der Abbildung 25 für die drei Gene *IL-1 α* , *IL-1 β* und *CCR1* dargestellt. Es wurde wiederum die relative Genexpression für alle Probanden/Probandinnen und nur für die „Responder“ auf PG-LPS berechnet. In der Gruppe der „Responder“ wurde die Genexpression der Zytokine durch die Inkubation

mit 10 µg/ml PG-LPS signifikant um $56,5 \pm 12,4 \%$, $52,1 \pm 12,2 \%$ beziehungsweise $90,0 \pm 18,7 \%$ erhöht. Die „Non-Responder“ wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen.

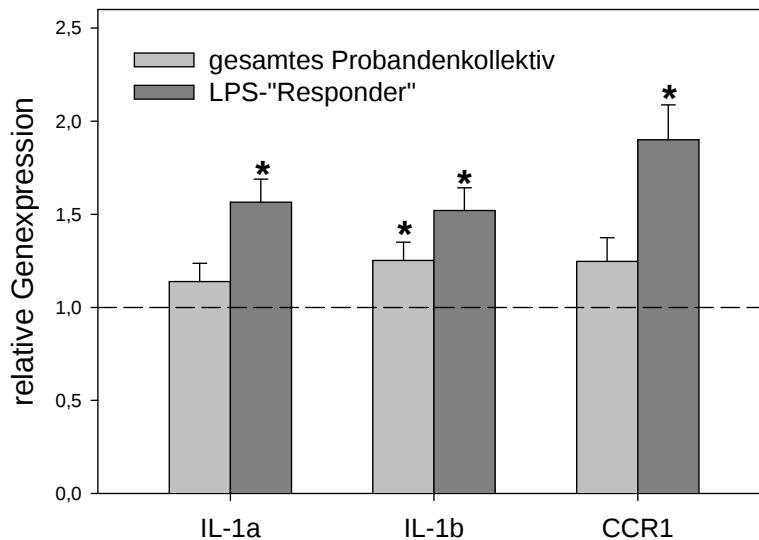


Abbildung 25: Einfluss von 10 µg/ml PG-LPS auf die Genexpression von *IL-1α*, *IL-1β* und *CCR1* in humanen Zahnfleischepithelzellen; relative Genexpression der mit LPS inkubierten Proben bezogen auf die nicht stimulierten Proben zum Zeitpunkt t_0 (LPS/CON_ t_0); Mittelwert $\pm$ SEM; zweiseitiger Einstichproben-*t*-Test * $p < 0,05$; gesamtes Probandenkollektiv: $n = 39 - 40$; „Responder“: $n = 18 - 25$

Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf die Genexpression der Zytokine IL-1α, IL-1β und CCR1 in den Zahnfleischepithelzellen

Die Wirkung der Kaugummis auf die Genexpression der proinflammatorischen Zytokine IL-1α, IL-1β und CCR1 wurde getestet, indem den Probanden/Probandinnen vor (t_0) und nach (t_1) der Interventionsphase Zahnfleischepithelzellen entnommen wurden und der relative mRNA-Gehalt mittels qPCR bestimmt wurde.

Der relative mRNA-Gehalt zum Zeitpunkt t_1 wurde auf die Werte zu Beginn der Interventionsphase (t_0) bezogen und als relative Veränderung des mRNA-Gehalts in der Abbildung 26 dargestellt.

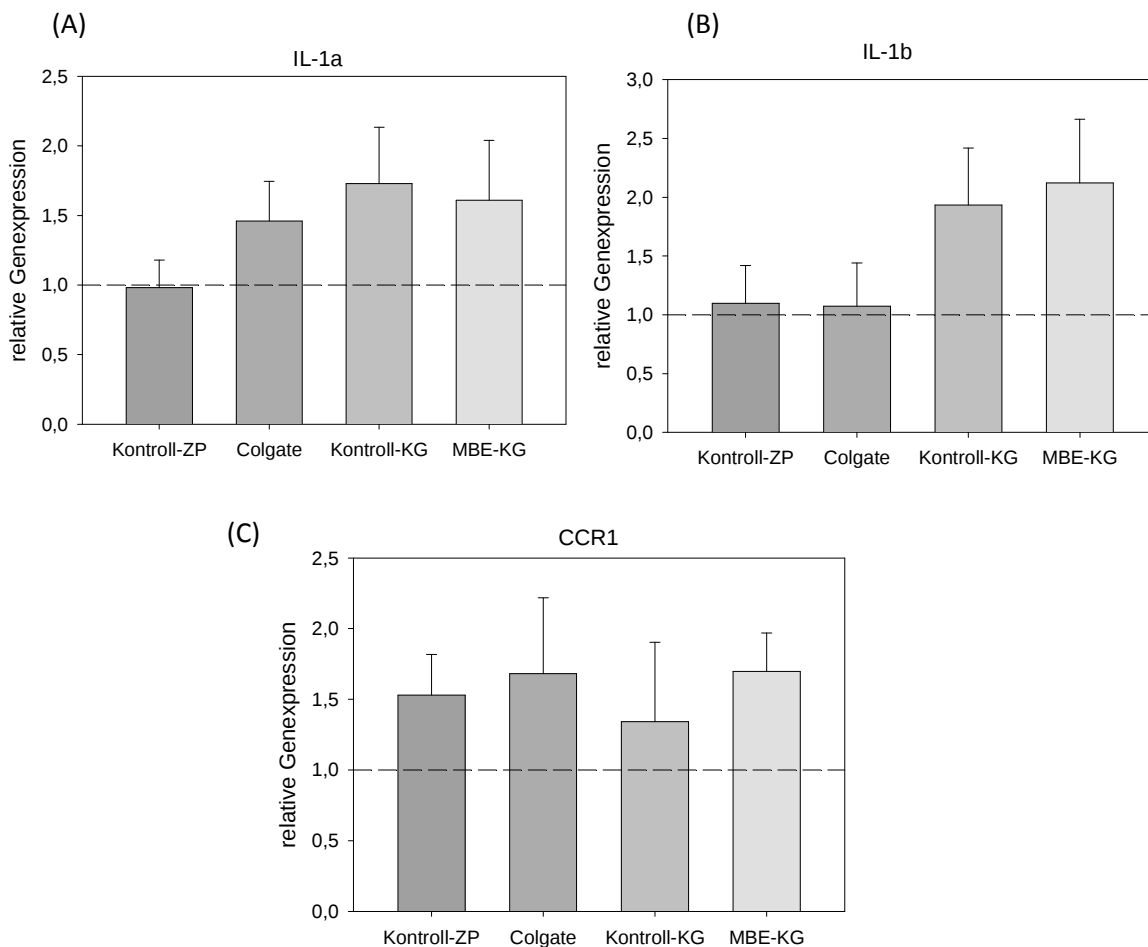


Abbildung 26: Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf die Genexpression in humanen Zahnfleischepithelzellen; relative Genexpression der Zytokine IL-1 α (A), IL-1 β (B) und des Chemokinrezeptors CCR1 (C) bezogen auf die Werte zum Zeitpunkt t_0 ; nur „Responder“; Mittelwert $\pm$ SEM; zweiseitiger Einstichproben-t-Test zum Vergleich von t_0 und t_1 ; einfaktorielle ANOVA zum Vergleich der Gruppen; IL-1 α : n = 3 - 7 pro Gruppe, IL-1 β : n = 5 - 8 pro Gruppe; CCR1: n = 3 - 6 pro Gruppe; ZP = Zahnpasta, KG = Kaugummi.

Die Interventionsphase und somit das Kauen der Kaugummi hatte keinen Einfluss auf die Genexpression von IL-1 α , IL-1 β und CCR1. In keiner der vier Gruppen unterscheidet sich der relative mRNA-Gehalt zu Beginn der Interventionsphase t_0 signifikant von dem am Ende der Interventionsphase (t_1). Außerdem unterscheiden sich auch die Ergebnisse in den vier Gruppen nicht voneinander.

Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf die durch PG-LPS ausgelöste Reaktion der Zahnfleischepithelzellen auf der Genebene

Durch die Inkubation mit 10 µg/ml PG-LPS wurde in den Zahnfleischepithelzellen die Transkription der für *IL-1α*, *IL-1β* und *CCR1* hochreguliert.

Die Reaktion der Zellen auf die Inkubation mit PG-LPS zum Zeitpunkt t_1 und zum Zeitpunkt t_0 wurden miteinander verglichen, um zu zeigen, ob das Kauen der angereicherten Kaugummis einen Einfluss auf die LPS-Resistenz hat. Dazu wurde die aus den Zahnfleischepithelzellen isolierte mRNA mittels qPCR quantifiziert und für jeden der beiden Zeitpunkte die relative Veränderung der Genexpression durch PG-LPS bestimmt, indem die mit LPS inkubierten Proben auf die Kontrollproben bezogen wurden. Die Differenzen aus den beiden Quotienten ($LPS/CON_{t_0} - LPS/CON_{t_1}$) für die vier Gruppen sind in Abb. 27 und 28 abgebildet.

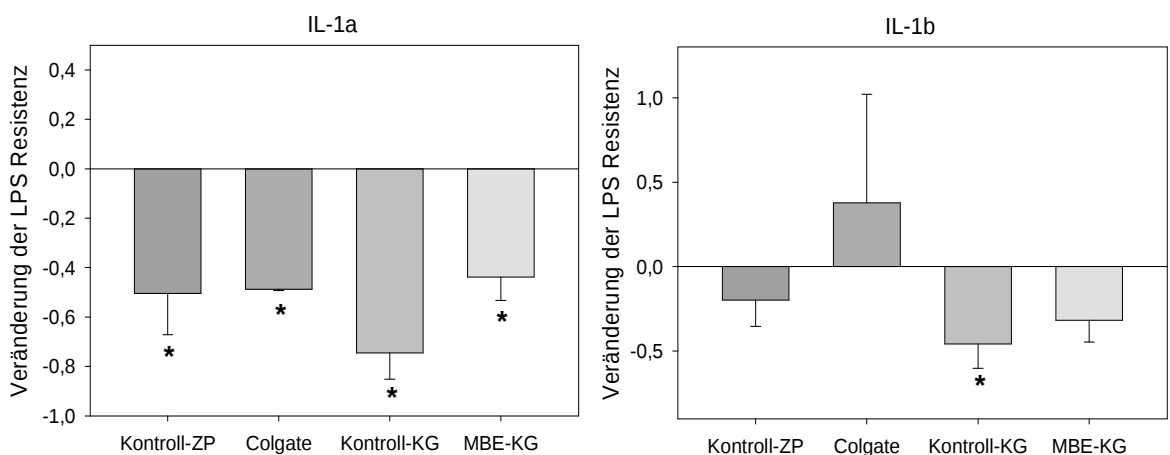


Abbildung 27: Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf die durch PG-LPS ausgelöste Genexpression von *IL-1α* (A) und *IL-1β* (B) in Zahnfleischepithelzellen; Vergleich der relativen Veränderung der Reaktion auf LPS ($LPS/CON_{t_1} - LPS/CON_{t_0}$) der vier Gruppen; nur „Responder“; Mittelwert $\pm$ SEM; zweiseitiger Einstichproben-*t*-Test * $p < 0,05$ zum Vergleich von t_0 und t_1 ; einfaktorielle ANOVA zum Vergleich der Gruppen; *IL-1α*: $n = 2 - 6$ pro Gruppe; *IL-1β*: $n = 5 - 6$ pro Gruppe; ZP = Zahnpasta, KG = Kaugummi.

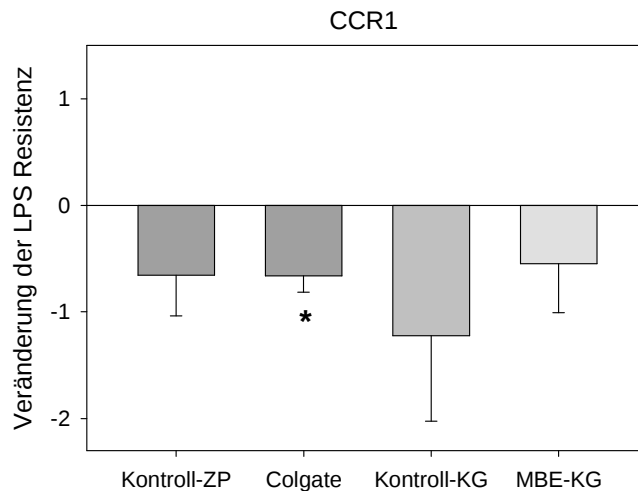


Abbildung 28: Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf die durch PG-LPS ausgelöste Genexpression von CCR1 in Zahnfleischepithelzellen; Vergleich der relativen Veränderung der Reaktion auf LPS (LPS/CON_t1 - LPS/CON_t0) der vier Gruppen; Mittelwert $\pm$ SEM; zweiseitiger Einstichproben-t-Test * $p < 0,05$ (Vergleich t_0 und t_1); einfaktorielle ANOVA $p < 0,05$ (Vergleich der Gruppen)– signifikante Unterschiede mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet; $n = 3 - 6$ pro Gruppe

Die vermehrte Ausschüttung von IL-1 α konnte nach der zweiwöchigen Interventionsphase in allen vier Gruppen signifikant gesenkt werden. Bei dem Zytokin IL-1 β zeigte sich für die Kontrollzahnpastagruppe und für beide Kaugummigruppen eine ähnliche Tendenz, wie bei IL-1 α , wobei allerdings nur der Effekt in der Gruppe 3 (Kontrollkaugummi) signifikant wurde. Die durch die LPS-Stimulation ausgelöste erhöhte Genexpression des Chemokinrezeptors CCR 1 wurde nur bei Probanden/Probandinnen der Gruppe 4 (Colgate total®) signifikant vermindert. Allerdings unterscheiden sich auch hier die Ergebnisse in den vier Gruppen nicht voneinander.

5.7. Einfluss der Kaugummis auf weitere Entzündungsmarker auf funktioneller Ebene

Auf funktioneller Ebene wurde mit der Luminex-Technologie außerdem die Ausschüttung der Zytokine IL-1 α , IL-1 β , TNF- α beziehungsweise des Chemokins MIP-1 β gemessen.

Einfluss der Inkubation mit PG-LPS auf die Freisetzung von IL-1 α , IL-1 β , TNF- α und MIP-1 β in den Zahnfleischepithelzellen

Um den Einfluss der sechsstündigen Inkubation mit 10 $\mu\text{g/ml}$ PG-LPS auf die Ausschüttung der Zytokine zu untersuchen, wurden die durch die Luminex-Technologie ermittelten Zytokinkonzentrationen der mit PG-LPS stimulierten Proben auf die der Kontrollproben bezogen (Abb. 29). Die Auswertung wurde wiederum für alle Probanden/Probandinnen und nur für die Gruppe der „Responder“ auf PG-LPS durchgeführt.

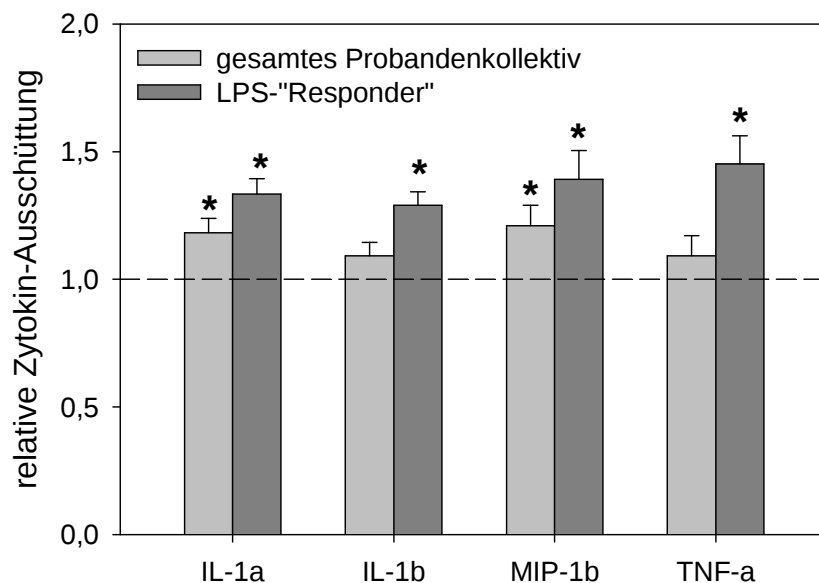


Abbildung 29: Einfluss von 10 $\mu\text{g/ml}$ PG-LPS auf die Zytokin-Freisetzung in humanen Zahnfleischepithelzellen; relative Zytokin-Ausschüttung der mit LPS inkubierten Proben bezogen auf die nicht stimulierten Proben zum Zeitpunkt t_0 (LPS/CON_ t_0); Mittelwert $\pm$ SEM; zweiseitiger Einstichproben- t -Test * $p < 0,05$; gesamtes Probandenkollektiv: $n = 40$; „Responder“: $n = 19 - 28$

In der Gruppe der „Responder“ konnte durch die sechsstündige Inkubation der Zellen mit PG-LPS eine signifikante Steigerung der Ausschüttung von IL-1 α , IL-1 β , MIP-1 β sowie TNF- α von $33,4 \pm 6,05 \%$, $29,1 \pm 5,22 \%$, $39,2 \pm 11,3 \%$ beziehungsweise $45,2 \pm 11,0 \%$ festgestellt werden. Bei den zwei Zytokinen IL-1 β und bei TNF- α konnte keine signifikante Steigerung der Zytokinfreisetzung gezeigt werden, wenn alle Probanden und Probandinnen zur Analyse herangezogen worden sind. Die „Non-Responder“ wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen.

Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf die Zytokinausschüttung in den Zahnfleischepithelzellen

Die Ausschüttung der Entzündungsmarker IL-1 α , IL-1 β , MIP-1 β und TNF- α wurde in den Zahnfleischepithelzellen mit der Luminex-Technologie zu Beginn (t_0) und nach der zweiwöchigen Interventionsphase (t_1) gemessen. In den Abbildungen 30 und 31 ist die relative Ausschüttung der Zytokine am Ende der Interventionsphase - bezogen auf die Werte zum Zeitpunkt t_0 – für die vier Gruppen dargestellt.

Die Freisetzung des Zytokins IL-1 α wurde in der Positivkontrollgruppe (Colgate total®-Zahnpasta) signifikant gesenkt, wohingegen in der Negativkontrollgruppe (Kontrollzahnpasta) die IL-1 α -Ausschüttung signifikant gestiegen ist. Die Veränderungen der Zytokinausschüttung nach der zweiwöchigen Interventionsphase unterscheiden sich in der Gruppe 3 (Kontrollkaugummi) sowie der Positivkontrollgruppe signifikant von der Negativkontrollgruppe. Die beiden Kaugummigruppen unterscheiden sich allerdings nicht voneinander und in keiner der beiden Gruppen unterscheiden sich die Werte nach der Interventionsphase von den Werten zu Beginn der Interventionsphase. Bei den anderen gemessenen Parametern IL-1 β , MIP-1 β und TNF- α konnten keine signifikanten Unterschiede der relativen Zytokinfreisetzung festgestellt werden.

Es konnte wiederum bei keinem der gemessenen Entzündungsmediatoren ein Unterschied der Wirkung in den beiden Kaugummigruppen festgestellt werden.

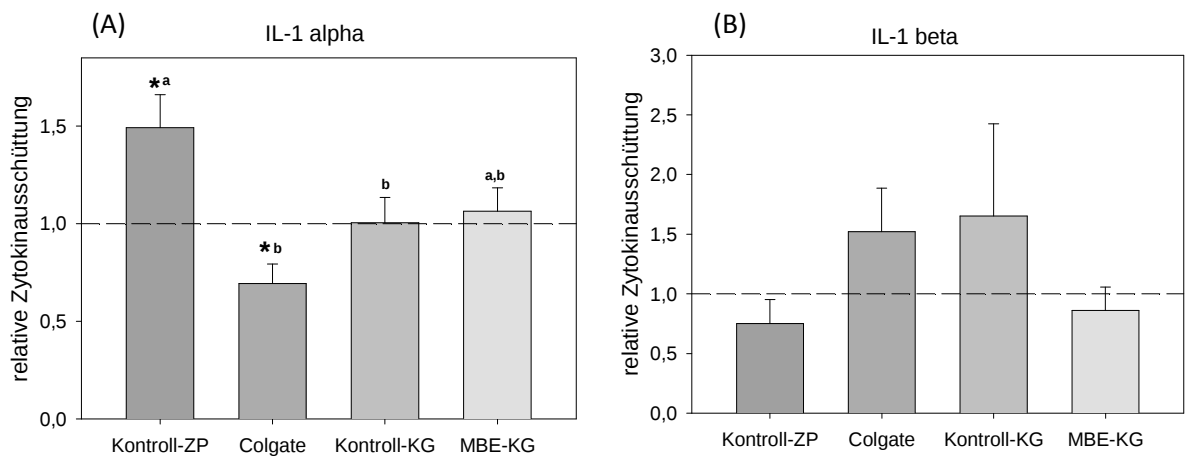


Abbildung 30: Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf die Ausschüttung von Zytokinen in humanen Zahnfleischepithelzellen; Vergleich der relativen Ausschüttung der Zytokine IL-1 α (A) und IL-1 β (B) bezogen auf den Zeitpunkt t_0 der vier Gruppen; nur „Responder“; Mittelwert $\pm$ SEM; zweiseitiger Einstichproben- t -Test * $p < 0,05$ zum Vergleich von t_0 und t_1 ; einfaktorielle ANOVA $p < 0,05$ zum Vergleich der Gruppen - signifikante Unterschiede sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet; IL-1 α : $n = 6 - 8$ pro Gruppe; IL-1 β : $n = 4 - 9$; ZP = Zahnpasta, KG = Kaugummi.

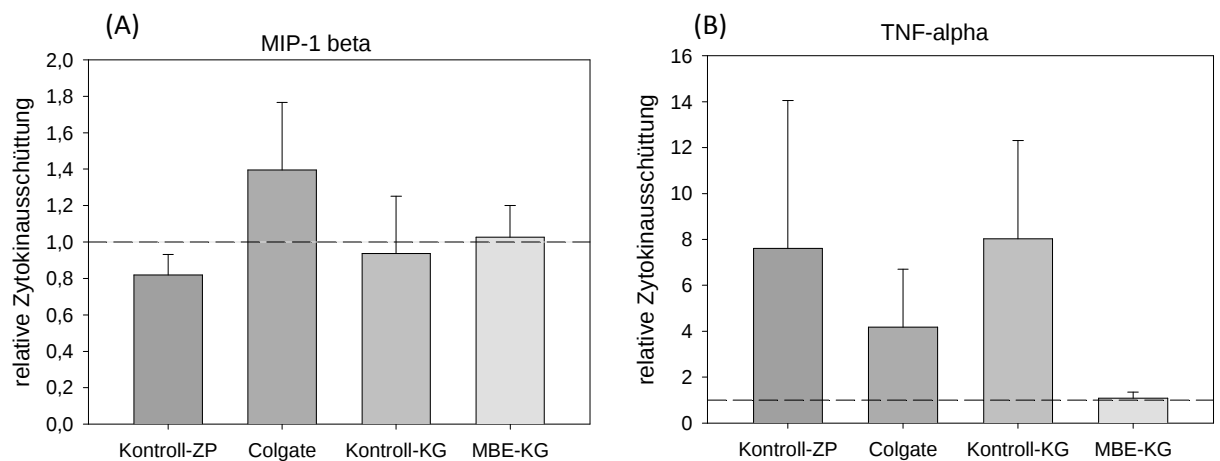


Abbildung 31: Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf die Ausschüttung von Zytokinen/Chemokinen in humanen Zahnfleischepithelzellen; Vergleich der relativen Ausschüttung des Zytokins TNF- α (A) und des Chemokins MIP-1 β (B) bezogen auf den Zeitpunkt t_0 der vier Gruppen; nur „Responder“; Mittelwert $\pm$ SEM; zweiseitiger Einstichproben- t -Test zum Vergleich von t_0 und t_1 ; einfaktorielle ANOVA zum Vergleich der Gruppen); MIP-1 β : $n = 6 - 8$; TNF- α : $n = 4 - 6$; ZP = Zahnpasta, KG = Kaugummi.

Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf die durch LPS ausgelöste Reaktion der Zahnfleischepithelzellen auf funktioneller Ebene

Die Ausschüttung der Zytokine beziehungsweise Chemokine IL-1 α , IL-1 β , TNF- α und MIP-1 β wurde durch die sechsstündige Inkubation mit 10 $\mu\text{g/ml}$ PG-LPS signifikant erhöht. Der Einfluss der Kaugummis auf diese durch PG-LPS ausgelöste vermehrte Zytokinausschüttung wurde untersucht, indem zu jedem der beiden Zeitpunkte ein Aliquot der Proben mit PG-LPS stimuliert wurde und anschließend die Zytokinkonzentrationen mittels Luminex-Technologie gemessen wurden. Die relative Zytokinfreisetzung der mit LPS inkubierten Proben – bezogen auf die Kontrollproben – zu Beginn der Interventionsphase (t_0) wurde von den Werten zum Zeitpunkt t_1 subtrahiert ($\text{LPS/CON}_{t_1} - \text{LPS/CON}_{t_0}$) und in der Abbildung 32 dargestellt.

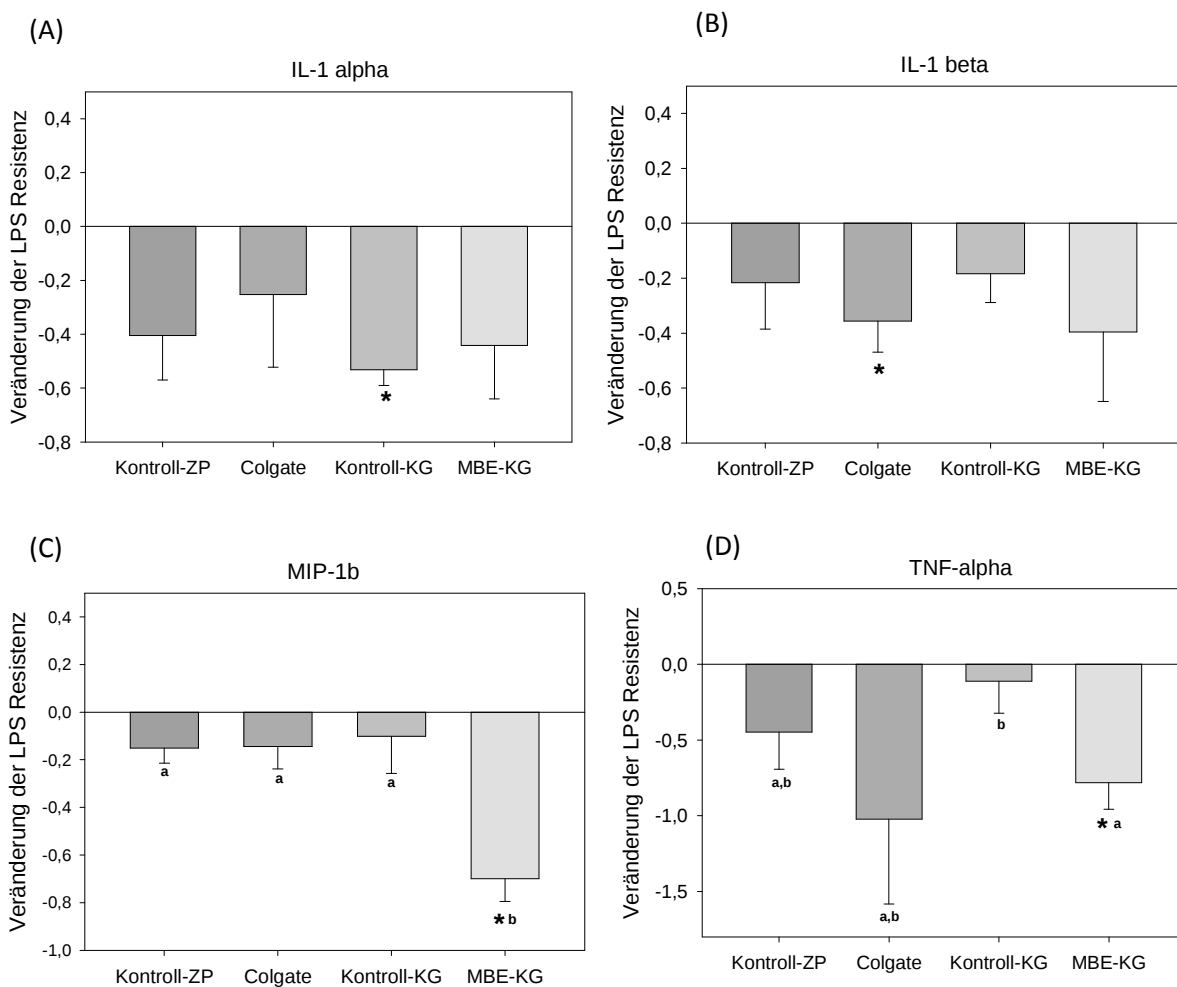


Abbildung 32: Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf die Reaktion der Zahnfleischepithelzellen auf 10 $\mu\text{g/ml}$ PG-LPS ($\text{LPS/CON}_{t_1} - \text{LPS/CON}_{t_0}$); Vergleich der vier Gruppen; (A) IL-1 α , (B) IL-1 β , (C) MIP-1 β und (D) TNF- α , nur „Responder“; Mittelwert $\pm$ SEM; zweiseitiger Einstichproben-t-Test * $p < 0,05$ zum Vergleich von t_0 und t_1 ; einfaktorielle ANOVA $p < 0,05$ zum Vergleich der Gruppen – signifikante Unterschiede sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet; $n = 4 - 9$ pro Gruppe

Die durch LPS-verursachte vermehrte Ausschüttung von IL-1 α konnte bei den Probanden/Probandinnen der Gruppe 3 (Kaugummi B) und die von IL-1 β bei jenen der Gruppe 4 (Colgate total®) signifikant gesenkt werden.

Bei dem Chemokin MIP-1 β und dem Zytokin TNF- α wurde die Reaktion auf PG-LPS nach dem Kauen des mit MBE-angereicherten Kaugummis signifikant gesenkt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich bei beiden Entzündungsmediatoren die Ergebnisse in den beiden Kaugummigruppen voneinander unterscheiden.

6. Diskussion

Entzündliche Erkrankungen der Mundhöhle, wie Gingivitis oder Parodontitis, sind in der Bevölkerung weit verbreitet und können zu schwerwiegenden Folgen, wie Zahnausfall führen. Da die Hauptursache dieser Krankheiten durch Bakterien im Zahnplaque verursachte Entzündungen sind, könnten antibakterielle beziehungsweise entzündungshemmende Substanzen als vorbeugende Maßnahmen eingesetzt werden. Kaugummis werden bereits vielfach zur Zahnhygiene eingesetzt und bieten sich durch Anreicherung mit entzündungshemmenden beziehungsweise antibakteriellen Wirkstoffen zum Einsatz in der Vorbeugung von Entzündungen in der Mundhöhle an. Daher wäre es wünschenswert einen natürlichen entzündungshemmenden Wirkstoff zu identifizieren, der zum menschlichen Verzehr geeignet ist und Kaugummis zur Verringerung von entzündlichen Erkrankungen in der Mundhöhle zugesetzt werden kann.

Der Ausgangspunkt dieser humanen Interventionsstudie war, dass in einer *in vitro* Studie gezeigt werden konnte, dass ein Magnolienrindenextrakt (MBE), der aus der Rinde des Baumes *Magnolia officinalis ssp.* gewonnen wird, im Vergleich zu anderen pflanzlichen Extrakten, die stärkste entzündungshemmende Wirkung besitzt [Walker et al., 2013]. Walker, et al. (2013) untersuchten die entzündungshemmende Wirkung des - in dieser Arbeit verwendeten - Magnolienrindenextrakts (1 – 10 µg/ml) an humanen gingivalen Fibroblasten. Die HGF-1 Zellen wurden entweder nur mit 10 µg/ml *Porphyromonas gingivalis*-LPS oder mit dem PG-LPS und dem Magnolienrindenextrakt gleichzeitig für sechs beziehungsweise neun Stunden inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Inkubation mit dem Magnolienrindenextrakt die durch PG-LPS ausgelöste erhöhte IL-8-Ausschüttung nach sechsständiger Inkubation im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit PG-LPS reduziert hat.

Daher sollte in dieser humanen *ex vivo* Studie gezeigt werden, ob der Magnolienrindenextrakt auch Entzündungsmarker in Zahnfleischepithelzellen reduzieren kann, wenn er zu 0,1 % in Kaugummis eingebracht wird und ob die angereicherten Kaugummis daher als Zahnhygieneartikel in der Parodontitisprophylaxe eingesetzt werden können.

Außerdem sollte untersucht werden, ob der Extrakt einen Einfluss auf den oxidativen Gleichgewichtszustand der Zahnfleischepithelzellen hat, da in Folge der Immunreaktion auf die oralen Bakterien durch die Phagozyten reaktive Sauerstoffspezies produziert werden.

Dazu wurden mit sterilen Bürsten Zellen aus dem Zahnfleisch von gesunden Probanden/Probandinnen vor und nach einer zweiwöchigen Interventionsphase abgebürstet und zu beiden Zeitpunkten Entzündungsmediatoren sowie Marker für oxidativen Stress gemessen.

Für diese zweiwöchige Interventionsphase wurden die Probanden/Probandinnen zufällig einer von vier Gruppen zu jeweils zehn Personen zugeteilt. Neben einer Negativkontrollgruppe, in der die Probanden/Probandinnen mit einer Kontrollzahnpaste ohne Zusätze die Zähne putzten und einer Positivkontrollgruppe, in der die Probanden/Probandinnen die Zahnpasta Colgate total® verwendeten, gab es eine Kontrollkaugummigruppe sowie eine MBE-Kaugummigruppe. In der MBE-Kaugummigruppe mussten die Probanden/Probandinnen täglich fünfmal zwei Stück der mit MBE-angereicherten Kaugummis für mindestens zehn Minuten kauen. Äquivalent dazu mussten die Probanden/Probandinnen in der Kontrollkaugummigruppe nicht angereicherte Kaugummis kauen.

Der zweiwöchigen Interventionsphase war eine ebenfalls zweiwöchige Konditionierungsphase vorgeschaltet, in der alle Probanden/Probandinnen mit der Kontrollzahnpaste ohne Zusätze die Zähne putzten und keine zusätzlichen Zahnhygieneartikel verwenden durften.

Es wurden 40 gesunde Probanden/Probandinnen ohne Entzündungserkrankungen in der Mundhöhle rekrutiert, wobei zwei Probanden/Probandinnen nachrekrutiert werden mussten, da zwei der Studienteilnehmerinnen aus persönlichen Gründen kurz nach Beginn der Konditionierungsphase die Studie beendet haben.

Keine/r der Probanden/Probandinnen berichtete nach der zweiwöchigen Interventionsphase über gesundheitliche Probleme oder mögliche Nebenwirkungen des Magnolienrindenextrakts. Daher kann angenommen werden, dass auch der

relativ häufige Verzehr von zehn Stück der angereicherten Kaugummis pro Tag keine negative Auswirkungen hat.

Die Compliance der Probanden/Probandinnen wurde überprüft, in dem die ausgegebenen Kaugummi- und Zahnpastarationen wöchentlich gewogen und der Verbrauch berechnet wurde. Der Zahnpastaverbrauch lag bei allen Probanden/Probandinnen über dem angenommenen durchschnittlichen Verbrauch von 1 g der Zahnpasta pro Zähneputzen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass sich die Probanden/Probandinnen täglich mindestens zweimal mit der ausgegebenen Zahnpasta die Zähne geputzt haben. Es konnte außerdem festgestellt werden, dass der Verbrauch der Kontrollzahnpasta ($5,02 \pm 2,10$ g/Tag) aufgrund ihrer flüssigeren Konsistenz signifikant höher war, als der Verbrauch der Zahnpasta Colgate total® ($2,89 \pm 1,29$ g/Tag).

Bis auf eine Probandin, die die Anweisungen falsch verstanden hatte und nach der ersten Woche der Interventionsphase darauf aufmerksam gemacht wurde, haben alle Probanden/Probandinnen in den Kaugummigruppen alle ausgegebenen Kaugummis verbraucht. Daher kann davon ausgegangen werden, dass sich die Probanden/Probandinnen an die Anweisungen der Studienleitung gehalten haben und die Compliance somit gut war. Deshalb kann der Unsicherheitsfaktor der ohne Beobachtung stattgefundenen Umsetzung und Einhaltung der Anweisungen von den Probanden/Probandinnen als gering eingeschätzt und somit gefolgert werden, dass die erwünschten Mengen der Wirkstoffe auch tatsächlich aufgenommen wurden.

In den beiden Kaugummigruppen hat sich der Zahnpastaverbrauch in der Konditionierungsphase ($4,68 \pm 1,65$ g/Tag) und der Interventionsphase ($5,18 \pm 1,93$ g/Tag), in der zusätzlich die Kaugummis gekaut werden mussten, nicht verändert. Daher kann davon ausgegangen werden, dass sich das Zahnputzverhalten durch den zusätzlichen Einsatz der Kaugummis nicht verändert hat und sich die zwei Phasen daher ausschließlich durch das Kauen der Kaugummis unterscheiden haben.

Den Probanden/Probandinnen wurden vor und nach der zweiwöchigen Interventionsphase mit sterilen Bürsten (Cytobrush Plus®) Zahnfleischepithelzellen entnommen. Die Probanden/Probandinnen kamen in der Früh nüchtern und ohne die

Zähne geputzt zu haben zur Zellabnahme. In der Positiv- und der Negativkontrollgruppe wurden jeweils zwei Bürsten pro Proband/Probandin – eine für die linke und eine für die rechte Mundhälfte - zum Abernten der Zahnfleischzellen verwendet. In den beiden Kaugummigruppen wurden den Probanden zuerst nur von der linken Seite mit jeweils zwei Bürsten Zellen abgenommen und nach zehnminütigem Kauen der Kaugummis von der rechten Hälfte ebenfalls mit jeweils zwei Bürsten Zellen abgeerntet. Die Bürsten wurden anschließend in 5ml RPMI 1640-Medium gestellt und die Zellen durch Drehen der Bürsten in das Medium überführt. Durchschnittlich konnten mit den sterilen Bürsten $7,27 \cdot 10^5 \pm 1,44 \cdot 10^5$ Zellen pro Proband/Probandin, ausgenommen der Abnahme nach der Kurzzeitintervention, abgeerntet werden.

Es konnte gezeigt werden, dass mit anderen Methoden zur Zellentnahme, wie Mundspülungen [Rogers et al., 2007; Garcia-Closas et al., 2001] beziehungsweise anderen mechanischen Instrumenten, wie Küretten [Reboiras-López et al., 2012], im direkten Vergleich mit den Cytobrush®-Bürsten bessere Ergebnisse bei der Entnahme von Zellen der Wangeninnenseite erzielt werden konnten. Die sterilen Cytobrush Plus® Bürsten sind zudem kostengünstig, einfach anzuwenden und im Vergleich zu den Küretten weniger aggressiv.

Für die durchgeführten Messungen in dieser Arbeit wurden insgesamt zwischen $6,00 \cdot 10^5$ und $7,20 \cdot 10^5$ Zellen benötigt. Mit der Cytobrush Plus® konnten daher bis auf wenige Ausnahmen ausreichend viele Zellen vom Zahnfleisch der Probanden/Probandinnen abgeerntet werden. Daher war in dieser Studie der Einsatz der Cytobrush®-Bürsten und die angewandte Vorgehensweise für das Abernten der Zahnfleischepithelzellen für den vorgesehen Zweck gut geeignet.

Nach der zehnminütigen Kurzzeitintervention in den beiden Kaugummigruppen konnten allerdings trotz der fünfminütigen Wartezeit durch das Kauen der Kaugummis signifikant weniger Zellen mit den sterilen Bürsten abgeerntet werden ($6,20 \cdot 10^5 \pm 1,51 \cdot 10^5$). Es wird daher angenommen, dass es für das Abbürsten ausreichend vieler Zellen wichtig ist, dass die Probanden/Probandinnen kurz vor der Zellabnahme nichts

essen beziehungsweise keine Kaugummis kauen. Dies sollte bei der Planung zukünftiger Interventionen berücksichtigt werden.

Die Viabilität der Zellproben wurde mittels Trypanblautest bestimmt. Die Viabilität der Proben lag zwischen 80 und 100 %. In keiner der vier Gruppen konnte nach der Interventionsphase eine signifikante Veränderung der Zellviabilität festgestellt werden. Es kann daher ausgeschlossen werden, dass beobachtete Veränderungen auf Veränderungen der Zellviabilität zurückzuführen sind.

Zur Beurteilung des oxidativen Gleichgewichtszustands in den Zahnfleischepithelzellen wurden die Katalaseaktivität sowie durch reaktive Sauerstoffspezies verursachte oxidative DNA-Schäden gemessen.

Da in Folge der Immunantwort die Phagozyten zur Bekämpfung der Bakterien reaktive Sauerstoffspezies produzieren, kann dies bei einer unzureichenden oxidativen Abwehr zu einem oxidativen Ungleichgewicht und in letzter Konsequenz zu Schädigungen, wie oxidativen DNA-Schäden führen. In dieser Studie sollte gezeigt werden, ob der mit Magnolienrindenextrakt angereicherte Kaugummi einen Einfluss auf den oxidativen Zustand der Zelle in Folge einer durch PG-LPS ausgelösten Immunantwort hat.

Dazu wurde durch sechsstündige Inkubation mit 10 µg/ml PG-LPS eine Immunantwort in den Zahnfleischepithelzellen ausgelöst und die Katalaseaktivität und das Auftreten von oxidativen DNA-Schäden gemessen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit 10 µg/ml PG-LPS und die dadurch in der Zelle ausgelöste Immunantwort nach sechsstündiger LPS-Inkubation keine Veränderung der Katalaseaktivität beziehungsweise der oxidativen DNA-Schäden zur Folge hatte. Da die Aktivität des antioxidativen Enzyms Katalase nicht durch die Inkubation mit PG-LPS verändert wurde, wird angenommen, dass die antioxidativen Abwehrmechanismen der entnommenen Zelle ausreichen, um die Freisetzung von ROS in Folge der Phagozytenaktivität und resultierende oxidative DNA-Schäden zu vermeiden.

In einer *in vitro* Studie von Speranza et al. (2010) an Monozyten (THP-1 Zellen) konnte gezeigt werden, dass durch die in dieser Arbeit eingesetzte Konzentration an LPS (10 µg/ml E.coli-LPS) nach 24 Stunden eine Steigerung der Katalaseaktivität im Vergleich zu

nicht stimulierten Zellen aufgetreten ist und die Katalaseaktivität daher durch die LPS-Stimulation beeinflusst wurde. In einer Studie an Hep G2 Zellen wurde die Katalaseaktivität allerdings 24 Stunden nach der Inkubation mit einer geringeren Konzentration an *S.typhimurium*-LPS (1 µg/ml) gesenkt [Gómez-Quinoz et al., 2003]. Der Einfluss von PG-LPS auf die Katalaseaktivität wurde allerdings noch nicht untersucht, genauso wie der Einfluss auf die Katalaseaktivität in Zahnfleischepithelzellen.

Es wurde bis jetzt noch nicht untersucht, ob die Inkubation mit LPS ein vermehrtes Auftreten von oxidativen DNA-Schäden, wie Oxidationsprodukte der Base, verursachen kann.

Zur Bestimmung der entzündungshemmenden Wirkung des in die Kaugummis eingebrachten Magnolienrindenextrakts wurden vor und nach der zweiwöchigen Interventionsphase Entzündungsmediatoren sowohl auf funktioneller Ebene mittels Luminex®-Technologie als auch die Genexpression mittels qPCR gemessen. Als Hauptzielparameter wurde das proinflammatorische Chemokin IL-8 bestimmt, das sowohl auf Genebene als auch auf funktioneller Ebene gemessen wurde. Auf funktioneller Ebene wurden außerdem IL-1α, IL-1β, TNF-α, MIP-1β und auf Genebene *IL-1α*, *IL-1β* und *CCR1* gemessen.

Bei der Messung Zytokin-/Chemokinausschüttung zu Beginn der Interventionsphase (Zeitpunkt t_0) wurde festgestellt, dass die Probanden/Probandinnen nach der zweiwöchigen Konditionierungsphase, in der alle Probanden nur die Kontrollzahnpaste ohne Zusätze verwenden durften und auf zusätzliche Zahnhygieneartikel verzichten mussten, stark unterschiedliche Werte aufwiesen. Bei der Messung des Chemokins IL-8 zum Zeitpunkt t_0 wurden bei den Probanden/Probandinnen zum Beispiel Werte zwischen 8,92 pg/ml und 404 pg/ml gemessen. Da auch bei den anderen gemessenen Entzündungsmediatoren starke interindividuelle Schwankungen festgestellt werden konnten, wurden die relativen Veränderungen nach der Interventionsphase im Vergleich zum Messzeitpunkt t_0 zur Beurteilung des Einflusses auf die Freisetzung der Entzündungsmarker herangezogen.

Daher wird angenommen, dass die zweiwöchige Interventionsphase zu kurz war, um den Effekt der unterschiedlichen Zahnhygienegewohnheiten der Probanden/Probandinnen auszuwaschen und sie auf ein ähnliches Grundlevel zu bringen. Daher müsste untersucht werden, ob durch eine längere Konditionierungsphase, in der die Zahnhygienemaßnahmen vereinheitlicht werden, die Zytokin-/Chemokinausschüttung der Zahnfleischepithelzellen der Probanden/Probandinnen auf einen ähnlichen Level gebracht werden können oder ob sich die Probanden/Probandinnen an eine kontrollierte Diät halten müssten, um auch entzündungshemmende Wirkstoffe zum Beispiel aus Kaffee [Shen et al., 2010] oder Tee [Ehrnhöfer-Ressler et al., 2013; Zhao et al., 2013] mit einzubeziehen zu können.

Bei der Messung der Zytokin-/Chemokinausschüttung ergab sich außerdem das Problem, dass die gemessenen Werte von IL-1 β auch zum Zeitpunkt t_0 nur knapp über beziehungsweise unter der Detektionsschwelle lagen und auch einige Werte von TNF- α und MIP-1 β nicht detektierbar waren. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass diese Werte, die nur knapp oberhalb beziehungsweise unterhalb der Detektionsschwelle lagen, weniger präzise und daher weniger zuverlässig sind.

Um feststellen zu können, ob PG-LPS in den abgeernteten Zahnfleischepithelzellen eine Immunantwort auslöst und somit die Ausschüttung und Transkription von proinflammatorischen Entzündungsmarkern erhöht wird, wurden die Zellen in zwei Aliquote aufgeteilt und je ein Aliquot für sechs Stunden mit 10 $\mu\text{g/ml}$ PG-LPS inkubiert. Es wurde festgestellt, dass die Zahnfleischepithelzellen einiger Probanden/Probandinnen auf die Stimulation mit PG-LPS nicht mit einer Erhöhung der Expression und der Ausschüttung der Entzündungsmarker reagierten. Diese Probande/Probandinnen wurden als „Non-Responder“ bezeichnet. Bei der Messung der Zytokin-/Chemokinfreisetzung haben die Zahnfleischepithelzellen in 19 der 40 (47,5 %) Proben bei der Messung von IL-8 auf die LPS-Stimulation nicht mit einer vermehrten Freisetzung reagiert. Bei IL-1 α waren es 12 Proben (30,0 %), bei IL-1 β 15 Proben (37,5 %), bei MIP-1 β 13 Proben (32,5 %) und bei TNF- α 21 Proben (52,5 %), die keine Reaktion auf die Inkubation mit PG-LPS zeigten. Ein ähnliches Bild ergab sich auch bei der Bestimmung der Genexpression. Hierbei konnte bei 12 Proben (30,0 %)

die IL-8 Genexpression, bei 20 Proben (50,0 %) die IL-1 α -Genexpression, bei 15 Proben die IL-1 β -Genexpression (37,5 %) und bei 22 Proben (55,0 %) die *CCR1*-Genexpression durch die Stimulation mit PG-LPS nicht hochreguliert werden. Es wird vermutet, dass diese fehlende Reaktion auf PG-LPS auf eine mögliche Toleranzbildung auf PG-LPS zurückzuführen ist, die auftritt, wenn Zellen wiederholt mit dem LPS des oralen Bakteriums *Porphyromonas gingivalis* in Berührung gekommen sind. Cohen et al., (2004) konnten diese Toleranzbildung in einer *in vitro* Studie an dendritischen Zellen zeigen. Durch die erneute Stimulation mit 10 μ g/ml PG-LPS wurde die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine MIP-1 α und RANTES sowie von Proteinen, die an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt sind, im Vergleich zur einmaligen Inkubation deutlich reduziert. Außerdem wurde die Produktion von Proteinen, die an der Toleranzentwicklung beteiligt sind, erhöht [Cohen et al., 2004]. Ähnliche Ergebnisse konnten *in vitro* auch in humanen Monozyten für die Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-8 auf Proteinebene sowie für *IL-1 β* mRNA und für die beiden Toll-like Rezeptoren TLR 2 und TLR 4 gezeigt werden [Muthukuru et al., 2005].

In dieser Arbeit wurden die „Non-Responder“ auf PG-LPS von der statistischen Auswertung ausgeschlossen. Für die Gruppe der „Responder“ konnte gezeigt werden, dass durch die sechsstündige Inkubation mit 10 μ g/ml PG-LPS in den Zahnfleischepithelzellen die Zytokinfreisetzung von IL-8, IL-1 α , IL-1 β , MIP-1 β und TNF- α sowie die Genexpression von *IL-8*, *IL-1 α* , *IL-1 β* und *CCR1* im Vergleich zu den nicht mit LPS-stimulierten Proben signifikant erhöht wurde.

Durch den Ausschluss der „Non-Responder“ auf PG-LPS ist jedoch nahezu die Hälfte aller Proben weggefallen, wodurch die statistische Power limitiert wurde.

Daher sollte für zukünftige Untersuchungen im Vorfeld ein Screening der Probanden/Probandinnen auf PG-LPS-Toleranz durchgeführt werden, um „Non-Responder“ bereits vor Beginn der Studie ausschließen zu können.

Als Positivkontrolle wurde in dieser Studie die Zahnpasta Colgate total® verwendet, mit der sich die Probanden für zwei Wochen die Zähne putzen mussten. Die Probanden/Probandinnen verwendeten im Durchschnitt 2,89 g der Colgate total® Zahnpasta (0,3 % Triclosan) pro Tag.

Bei der Messung der Freisetzung sowie der Genexpression des Hauptzielparameters IL-8 wurde festgestellt, dass die Colgate total® Zahnpasta den Entzündungsmarker IL-8 weder auf funktioneller Ebene noch auf der Genebene nach der zweiwöchigen Interventionsphase senken konnte und auch keinen Einfluss auf die Stärke der Reaktion der Zelle auf die Stimulation mit PG-LPS hatte.

Bei den weiteren gemessenen Entzündungsparametern konnte gezeigt werden, dass nach der zweiwöchigen Interventionsphase durch die Verwendung der Colgate total® Zahnpasta nur die Ausschüttung des Entzündungsmarkers IL-1 α im Vergleich zum Zeitpunkt t_0 signifikant gesenkt werden konnte und sich hierbei die Ergebnisse auch signifikant von den Ergebnissen der Negativkontrollgruppe unterscheiden. Die Verwendung der Zahnpasta Colgate total® konnte außerdem die erhöhte Ausschüttung von IL-1 β sowie die erhöhte Genexpression von *IL-1 α* und *CCR1* im Vergleich zur Messung vor der Interventionsphase signifikant reduzieren. Die Ergebnisse in der Positivkontrollgruppe haben sich jedoch von den Ergebnissen in der Negativkontrollgruppe, in der die Probanden/Probandinnen mit einer Zahnpasta ohne Zusätze die Zähne putzten, nicht unterschieden.

Es wird vermutet, dass das teilweise Ausbleiben der Wirkung damit erklärt werden kann, dass die tägliche Anwendung über zwei Wochen hinweg ein zu kurzer Zeitraum für die Entfaltung des entzündungshemmenden Effekts war, da in Langzeitstudien eine parodontitishemmende Wirkung der Colgate® Zahnpasta gezeigt werden konnte [Cullinan et al., 2003; Rosling et al., 1997a, 1997b].

In vier Studien, die die Wirkung des der Colgate total® Zahnpasta zugesetzten Wirkstoffes Triclosan in Zahnpasten auf Parameter für Parodontitis untersuchten, wurde die Zahnpasta über einen Zeitraum von mehreren Monaten bis hin zu Jahren von den Probanden/Probandinnen verwendet [Cullinan et al., 2003; Rosling et al., 1997a, 1997b; Rosin et al., 2002]. Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung der mit Triclosan angereicherten Zahnpasta erst nach der Verwendung der Zahnpasta über einen Zeitraum von zwei bis drei Jahren das Fortschreiten der Erkrankung und den damit einhergehenden Attachmentverlust verlangsamt, die Taschentiefe verringert und die Bakterienanzahl vermindert [Cullinan et al., 2003; Rosling et al., 1997a, 1997b].

In einer Studie von Rosin et al. (2002) konnte gezeigt werden, dass der Plaque-Index erst nach sechs Monaten, in denen die Triclosan-enthaltende Zahnpasta täglich verwendet wurde, signifikant im Vergleich zum Ausgangswert reduziert wurde. Außerdem konnte festgestellt werden, dass der positive Effekt der Triclosan-Zahnpasta vor allem bei Probanden/Probandinnen mit fortgeschrittener Erkrankung und einer Taschentiefe von $\geq 3,5$ mm besonders stark war [Cullinan et al., 2003].

In den Studien von Cullinan et al. (2003), Rosling et al. (1997a, 1997b) und Rosin et al. (2002) wurde der Effekt auf Symptome von Parodontitis untersucht. Wallet et al. (2013) untersuchten hingegen den Einfluss auf die Entzündungsreaktion an sich und nicht auf ihre gesundheitlichen Folgen.

Wallet et al. (2013) konnten zeigen, dass Triclosan in humanen oralen keratinisierten Epithelzellen (HOK), die den physiologischen Zahnfleischepithelzellen entsprechen, nur anti-inflammatorisch wirksam ist und die durch LPS ausgelöste erhöhte Expression von IL-8, IL-1 α und TNF- α reduziert, wenn die Zellen für 24 Stunden mit Triclosan vorbehandelt und anschließend für 24 Stunden mit LPS inkubiert wurden. In humanen Monozyten (THP-1 Zellen) und in humanen Fibroblasten (HPLF) wurde hingegen auch ohne Vorbehandlung bei gleichzeitiger Inkubation von Triclosan und LPS für 24 Stunden ein anti-inflammatorischer Effekt gezeigt. Die Autoren vermuten daher, dass der Unterschied im Aufbau zwischen den keratinisierten Epithelzellen und den Monozyten beziehungsweise Fibroblasten für die benötigte längere Einwirkzeit bei den oralen Epithelzellen verantwortlich ist [Wallet et al., 2013].

Es wird daher angenommen, dass ein Grund für die schwache entzündungshemmende Wirkung der Colgate total® Zahnpasta der war, dass die Inkubation der Zahnfleischepithelzellen mit Triclosan in dieser Studie zu kurz war, um eine entzündungshemmende Wirkung zu entfalten. Wie in der Studie von Wallet et al. (2013) gezeigt wurde, kann durch eine Vorinkubation mit Triclosan auch in den keratinisierten Zellen des Zahnfleisches eine entzündungshemmende Wirkung gezeigt werden. Allerdings ist eine Vorbehandlung der Zellen mit Triclosan beim Einsatz dieses Wirkstoffes in Zahnpasten nicht praxisnah. Daher wäre es interessant zu zeigen, ob die Colgate total® Zahnpasta eine entzündungshemmende Wirkung auf die

Zahnfleischepithelzellen hat, wenn sie über einen längeren Zeitraum hinweg, wie im Hausgebrauch üblich, verwendet wird.

Zur Beurteilung des entzündungshemmenden Effekts des mit MBE-angereicherten Kaugummi sollte der angereicherte Kaugummi mit einem handelsüblichen Kontrollkaugummi verglichen werden. Dazu mussten die Probanden/Probandinnen in der zweiwöchigen Interventionsphase täglich fünfmal zwei Stück der Kaugummi für mindestens zehn Minuten kauen. Vor und nach der Interventionsphase wurden die Entzündungsmarker gemessen und die durch die Interventionsphase hervorgerufenen Veränderungen der beiden Gruppen miteinander verglichen.

Es konnte allerdings in der MBE-Kaugummigruppe beim Vergleich der Basislevel der Entzündungswerte vor und nach der Interventionsphase bei keinem der gemessenen Marker, weder auf der funktionellen Ebene noch auf der Genebene ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der Entzündungszustand der Zelle konnte somit durch das Kauen des mit MBE-angereicherten Kaugummi nicht geändert werden. Dies könnte daran liegen, dass für diese Studie gesunde Probanden ohne Gingivitis beziehungsweise Parodontitis rekrutiert wurden und die meisten Probanden eine gute Mundhygiene und daher ohnehin sehr niedrige Entzündungsparameterwerte hatten. Daher wäre es interessant, den angereicherten Kaugummi bei Probanden mit Zahnfleischentzündungen zu testen, um zu sehen, ob das Kauen des mit MBE-angereicherten Kaugummi einen direkten Einfluss auf die erhöhten Entzündungsparameter in den Zahnfleischepithelzellen von Parodontitispatienten hat.

Es sollte in dieser Studie außerdem untersucht werden, ob der mit MBE-angereicherte Kaugummi einen Einfluss auf die durch die Stimulation mit PG-LPS ausgelöste Immunantwort und damit verbundene erhöhte Zytokin-/Chemokinausschüttung und deren Genexpression hat. Dazu wurde zu jedem der zwei Zeitpunkte je ein Aliquot der Proben mit PG-LPS inkubiert und die relative Veränderung der Werte durch die PG-LPS-Inkubation der beiden Zeitpunkte miteinander verglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass der mit Magnolienrindenextrakt angereicherte Kaugummi nach der zweiwöchigen Interventionsphase die durch die Inkubation mit PG-LPS ausgelöste vermehrte Genexpression sowie die gesteigerte Ausschüttung des

Hauptzielparameters IL-8 im Vergleich zum Messzeitpunkt vor der Interventionsphase signifikant reduziert hat. Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem mit MBE-angereicherten Kaugummi und dem Kontrollkaugummi hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Ausschüttung und die Genexpression des Chemokins festgestellt werden.

Durch den Verzehr des mit MBE-angereicherten Kaugummis konnten darüber hinaus die durch PG-LPS ausgelöste vermehrte Ausschüttung von TNF- α und von MIP-1 β im Vergleich zum Kontrollkaugummi signifikant reduzieren werden. Nach der zweiwöchigen Interventionsphase konnte nur in der MBE-Kaugummigruppe eine signifikante Verminderung der Ausschüttung von TNF- α und von MIP-1 β nach der Inkubation mit LPS gezeigt werden. Die Ergebnisse in dieser Gruppe haben sich zu dem signifikant von den Ergebnissen in der Kontrollkaugummigruppe unterschieden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Reduktion der durch LPS ausgelösten, vermehrten Ausschüttung dieser Entzündungsmediatoren auf die Wirkung des Magnolienrindenextrakts zurückgeführt werden kann. Allerdings unterscheidet sich beim Zytokin TNF- α die gemessene Veränderung nicht von der in der Negativkontrollgruppe.

Bei der Bestimmung der Genexpression konnte, außer für IL-8 nur für IL-1 α eine signifikante Verminderung der Reaktion auf PG-LPS gezeigt werden. Allerdings konnte hier in allen vier Gruppen eine signifikante Verringerung festgestellt werden und die Ergebnisse der vier Gruppen unterscheiden sich nicht voneinander.

Es konnte daher in dieser humanen Interventionsstudie nur für einen der gemessenen Entzündungsparameter (MIP-1 β) gezeigt werden, dass die durch 10 $\mu\text{g/ml}$ PG-LPS erhöhte Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch den mit MBE-angereicherten Kaugummi vermindert werden konnten. Bei den anderen Parametern hat sich die Wirkung der mit MBE-angereicherten Kaugummis nicht von der Wirkung der Kontrollkaugummis beziehungsweise der Kontrollzahnpaste unterschieden.

Daher konnte mit dieser *ex vivo* Studie an humanen Zahnfleischepithelzellen die in den bereits durchgeführten *in vitro* Studien gezeigte entzündungshemmende Wirkung des Magnolienrindenextrakts beziehungsweise seiner Hauptbestandteile Magnolol und

Honokiol nicht bestätigt werden. In *in vitro* Studien konnte eine entzündungshemmende Wirkung von Magnolol in Makrophagen-ähnlichen Zellen (RAW264.7 Zellen) [Fu et al., 2013], in Monozyten (THP-1 Zellen) [Lee et al., 2005] und in Promonozyten (U937 Zellen) [Tse et al., 2007] sowie für den Magnolienrindenextrakt in humanen gingivalen Fibroblasten [Walker et al., 2013] gezeigt werden. Allerdings wurde noch in keiner Studie der Einfluss des Extrakts beziehungsweise seiner Wirkstoffe in den in dieser Arbeit verwendeten Zahnfleischepithelzellen untersucht. Wallet et al. (2013) konnten bei der Bestimmung der entzündungshemmenden Wirkung von Triclosan zeigen, dass sich die keratinisierten Epithelzellen des Zahnfleisches, vermutlich aufgrund des anderen Aufbaus, in ihrer Reaktion auf die Inkubation mit dem Wirkstoff von Monozyten und Fibroblasten unterscheiden. Dies könnte auch auf die Einwirkung des Magnolienrindenextrakts zutreffen und den in dieser Arbeit gesehenen schwachen Einfluss erklären.

In dieser Arbeit wurde das Magnolienrindenextrakt zur Verabreichung in Kaugummis eingebracht. Es konnte jedoch schon in anderen Studien mit Kaugummis gezeigt werden, dass der Magnolienrindenextrakt während des Kauens aus den Kaugummis freigesetzt wird und seine Wirkung in der Mundhöhle der Probanden/Probandinnen entfalten kann. Greenberg et al. (2007) konnten zeigen, dass durch einmaliges zwanzigminütiges Kauen von zwei Stück eines mit 2 mg Magnolienrindenextrakt angereicherten Kaugummis, die Konzentration oraler Bakterien, wie *Porphyromonas gingivalis*, die an der Entstehung von Parodontitis beteiligt sind, um 43% reduziert wurde, während der Kontrollkaugummi eine geringere Reduktion (18%) zur Folge hatte. In einer Studie von Campus et al. (2004) mussten die Probanden/Probandinnen dreimal am Tag für fünf Minuten 1 – 2 mit 0,17% Magnolienrindenextrakt angereicherte Kaugummis (2,38 mg MBE/ Kaugummi) über einen Zeitraum von 30 Tagen kauen. Im Vergleich zu einem xylitolhaltigen Kaugummi und einem Kontrollkaugummi konnte das Kauen der mit MBE-angereicherten Kaugummis Parameter der Zahngesundheit, wie den Gehalt an Bakterien, die Blutungsneigung sowie den Gingivalen Index signifikant senken.

Es kann daher ausgeschlossen werden, dass die schwache entzündungshemmende Wirkung des Magnolienrindenextrakts darauf zurückzuführen ist, dass der Extrakt nicht aus den Kaugummis freigesetzt wurde und die Verabreichung mit Kaugummis daher nicht geeignet ist. Außerdem konnten Greenberg et al. (2007) zeigen, dass der Extrakt in den Kaugummis auch über mehrere Monate stabil ist. Daher kann nicht davon ausgegangen werden, dass durch die längere Lagerung der Kaugummis ein Verlust des Extrakts aufgetreten ist.

Diese Arbeit ist die erste, die die entzündungshemmende Wirkung des Magnolienrindenextrakts in einem *ex vivo* Studiendesign an Zahnfleischepithelzellen durch Verabreichung des Extrakts in Form von Kaugummis untersucht hat. Ein entzündungshemmender Effekt konnte hierbei durch die signifikante Reduktion der durch 10 µg/ml PG-LPS ausgelösten erhöhten Ausschüttung von MIP-1β und TNF-α im Vergleich zum Kontrollkaugummi gezeigt werden. Außerdem konnten die durch PG-LPS ausgelöste erhöhte Ausschüttung sowie die gesteigerte Genexpression von IL-8 nach der zweiwöchigen Interventionsphase in der MBE-Kaugummigruppe signifikant gesenkt werden.

7. Zusammenfassung

Aus *in vitro* Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe ging hervor, dass ein Magnolienrindenextrakt in humanen gingivalen Zellen (HGF-1) entzündungshemmend wirkt [Walker et al., 2013].

In dieser humanen Interventionsstudie sollte nun gezeigt werden, ob ein mit 0,1 % Magnolienrindenextrakt angereicherter Kaugummi eine anti-inflammatorische Wirkung auf Zahnfleischepithelzellen hat. Außerdem sollte der Einfluss auf Marker für den oxidativen Stress untersucht werden. Hierfür wurden 40 gesunde Probanden/Probandinnen rekrutiert, denen vor und nach einer zweiwöchigen Interventionsphase mit sterilen Bürsten Zahnfleischepithelzellen entnommen wurden. Die Ergebnisse der Gruppe, die täglich fünfmal zwei Stück der MBE-Kaugummis kauen mussten, wurden mit denen einer Positivkontrollgruppe (Colgate total®-Zahnpasta), einer Negativkontrollgruppe (Kontrollzahnpasta) und einer Kontrollkaugummigruppe verglichen. Zur Bestimmung der entzündungshemmenden Wirkung wurden die Freisetzung der Entzündungsmediatoren IL-8, IL-1 α , IL-1 β , TNF- α und MIP-1 β und die Genexpression von *IL-8*, *IL-1 α* , *IL-1 β* und *CCR1* gemessen. Als Marker für den oxidativen Stress wurden die Aktivität des antioxidativen Enzyms Katalase und das Auftreten von oxidativen DNA-Schäden herangezogen.

Es konnte gezeigt werden, dass nicht alle Zahnfleischepithelzellen der Proben auf eine LPS-Stimulation mit einer erhöhten Ausschüttung beziehungsweise Genexpression der Entzündungsmediatoren reagierten. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass durch das Kauen der mit MBE-angereicherten Kaugummis nach der zweiwöchigen Interventionsphase weder auf funktioneller noch auf der Genebene eine signifikante Veränderung der Basislevel im Vergleich zum Messzeitpunkt t_0 erzielt werden konnte. Außerdem konnte die erhöhte Ausschüttung und die vermehrte Genexpression von IL-8 signifikant gesenkt werden, wobei allerdings kein signifikanter Unterschied zur Kontrollkaugummigruppe festgestellt werden konnte. Allerdings konnte das Kauen der MBE-Kaugummis über einen Zeitraum von zwei Wochen die durch 10 $\mu\text{g/ml}$ PG-LPS erhöhte Ausschüttung von MIP-1 β und TNF- α im Vergleich zu den Kontrollkaugummis signifikant reduzieren.

Abstract

In vitro experiments of our working group showed an anti-inflammatory effect of magnolia bark extract in human gingival cells (HGF-1) [Walker et al., 2013].

The here presented human intervention study was designed to reveal, whether a chewing gum fortified with 0.1 % magnolia bark extract reduces inflammatory reactions in gingival epithelial cells. Furthermore, it was tested if the fortified gum has an effect on parameters of oxidative stress.

For this purpose 40 healthy subjects were recruited. At the beginning and after a two week intervention period gingival epithelial cells were collected from the subjects with a sterile brush. The results of the group, in which the subjects had to chew ten pieces of chewing gum per day was compared with those of a positive control group (Colgate total®), a negative control group (control toothpaste) and a control gum group.

The anti-inflammatory effect was examined by measuring the excretion of the proinflammatory mediators IL-8, IL-1 α , IL-1 β , TNF- α and MIP-1 β and the gene expression of *IL-8*, *IL-1 α* , *IL-1 β* and *CCR1*. The activity of the enzyme catalase and oxidative DNA-damages were used as marker for oxidative stress.

This study showed that the incubation with PG-LPS did not increase the secretion and the gene expression in all samples. In the MBE-gum group the basic levels of cytokine and chemokine secretion and the mRNA expression of the tested inflammatory mediators at the beginning of the experimental period and after the two weeks were not different. Furthermore, the increased release and gene expression of IL-8 have been reduced in the MBE-chewing gum group after the intervention period. However, this effect was not significant different compared to the effect measured for the control chewing gum group. In contrast chewing the fortified chewing gum, compared to control gum, led to reduced LPS-induced increases of MIP-1 β and TNF- α release.

8. Literaturverzeichnis

- Babior, B.M. (2000):** Phagocytes and oxidative stress. *American Journal of Medicine*, 109(1), 33-44.
- Barros, S.P., Wiroichanasak, S., Barrow, D.A., Panagakos, F.S., Devizio, W., Offenbacher, S. (2010):** Triclosan inhibition of acute and chronic inflammatory gene pathways. *Journal of Clinical Periodontology*, 37(5), 412 – 418.
- Beers Jr., R.F., Sizer, I.W. (1952):** A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 195(1), 133-140.
- Campus, G., Cagetti, M.G., Cocco, F., Sale, S., Sacco, G., Strohmender, L., Lingström, P. (2011):** Effect of a sugar-free chewing gum containing magnolia bark extract on different variables related to caries and gingivitis: A randomized controlled intervention trial. *Caries Research*, 45(4), 393-399.
- Chang, B., Lee, Y., Ku, Y., Bae, K., Chung, C. (1998):** Antimicrobial activity of Magnolol and Honokiol against periodontopathic microorganisms. *Planta Medica*, 64(4), 367-369.
- Chen, Y.-H., Lin, F.-Y., Liu, P.-L., Huang, Y.-T., Chiu, J.-H., Chang, Y.-C., Man, K.-M., Hong, C.-Y., Ho, Y.-Y., Lai, M.-T. (2009):** Antioxidative and hepatoprotective effects of Magnolol on acetaminophen-induced liver damage in rats. *Archives of Pharmacal Research*, 32(2), 221 – 228.
- Chiu, J.-H., Wang, J.-C., Lui, W.-Y., Wu, C.-W., Hong, C.-Y. (1999):** Effect of Magnolol in *in vitro* mitochondrial lipid peroxidation and isolated cold-preserved warm-reperfused rat livers. *Journal of Surgical Research*, 82(1), 11-16.
- Cohen, N., Morisset, J., Emilie, D. (2004):** Induction of tolerance by *Porphyromonas gingivalis* on APCs: a mechanism implicated in periodontal infection. *Journal of Dental Research*, 83(5), 429-433.
- Collins, A. (2000):** The Comet Assay modified for detection of oxidised bases with the use of bacterial repair enzymes. Comet Assay Interest Group Website, Zugriff: Sept. 2012).
- <http://cometassay.com/COMet%20Assay%20with%20DNA%20repair%20enzymes.pdf>

Cullinan, M.P., Westerman, B., Hamlet, S.M., Palmer, J.E., Faddy, M.J., Seymour, G.J. (2003): The effect of a triclosan-containing dentifrice on the progression of periodontal disease in an adult population. *Journal of Clinical Periodontology*, 30(5), 414-419.

Darveau, R.P., Pham, T-T.T., Lemley, K., Reife, R.A., Bainbridge, B.W., Coats, S.R., Howald, W.N., Way, S.S., Hajjar, A.M. (2004): *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infection and Immunity*, 72(9), 5041-5051.

DeLeo, F.R., Allen, L.-A.H., Apicella, M., Nauseef, W.M. (1999): NADPH Oxidase activation and assembly during phagocytosis. *The Journal of Immunology*, 163(12), 6732-6740.

Detmers, P.A., Lo, S.K., Olsen-Egbert, E., Walz, A., Baggiolini, M., Cohn, Z.A. (1990): Neutrophil-activating protein 1/Interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *Journal of Experimental Medicine*, 171(4), 1155-1162.

Dikalov, S., Losik, T., Arbiser, J.L. (2008): Honokiol is a potent scavenger of superoxide and peroxy radicals. *Biochemical Pharmacology*, 76(5), 589-596.

Dinarello, C.A. (2000): Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118(2), 503-508.

Douki, T., Martini, R., Ravanat, J-L., Turesky, R.J., Cadet, J. (1997): Measurement of 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine and 8-oxo-7,8-dihydroguanine in isolated DNA exposed to gamma radiation in aqueous solution. *Carcinogenesis*, 18(12), 2385-2391.

Ehrnhöfer-Ressler, M.M., Fricke, K., Pignitter, M., Walker, J.M., Walker, J., Rychlik, M., Somoza, V. (2013): Identification of 1,8-cineole, borneol, camphor and thujone as anti-inflammatory compounds in a *Salvia officinalis* L. infusion using human gingival fibroblasts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 61(14), 3451-3459.

Fu, Y., Liu, B., Zhang, N., Liu, Z., Liang, D., Li, F., Cao, Y., Feng, X., Zhang, X., Yang, Z. (2013): Magnolol inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response by interfering with TLR4 mediated NF- κ B and MAPKs signaling pathways. *Journal of Ethnopharmacology*, 145(1), 193-199.

García-Closas, M., Egan, K.M., Abruzzo, J., Newcomb, P.A., Titus-Ernstoff, L., Franklin, T., Bender, P.K., Beck, J.C., Marchand, L.L., Lum, A., alavanja, M., Hayes, R.B., Rutter, J., Buetow, K., Brinton, L.A., Rothman, N. (2001): Collection of genomic DNA from adults in epidemiological studies by buccal cytobrush and mouthwash. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 10(6), 687-696.

Gómez-Quiroz, L., Bucio, L., Souza, V., Escobar, C., Farfán, B., Hernández, E., Konigsberg, M., Vargas-Vorackova, F., Kershenobich, D., Gutiérrez-Ruiz, Ma.C. (2003): Interleukine 8 response and oxidative stress in HepG2 cells treated with ethanol, acetaldehyde or lipopolysaccharide. *Hepatology Research*, 26(2), 134-141.

Graves, D.T., Jaing, Y. (1995): Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 6(2), 109-118.

Greenberg, M., Urnezis, P., Tian, M. (2007): Compressed mints and chewing gum containing magnolia bark extract are effective against bacteria responsible for oral malodor. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55(23), 9465-9469.

Griffen, A.L., Becker, M.R., Lyons, S.R., Moeschberger, M.L., Leys, E.J. (1998): Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status. *Journal of Clinical Microbiology*, 26 (11), 3239-3242.

Hahne, M., Jäger, U., Iseman, S., Hallmann, R., Vestweber, D. (1993): Five tumor necrosis factor-inducible cell adhesion mechanisms on the surface of mouse endothelioma cells mediate the binding of leukocytes. *The Journal of Cell Biology*, 121(3), 655-664.

Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. (1998): Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92(9), 3007-3017.

Hanham, A. und Addy M. (2001): The effect of chewing sugar-free gum on plaque regrowth at smooth and occlusal surfaces. *Journal of Clinical Periodontology*, 28(3), 255-257.

Ho, K-Y., Tsai, C-C., Chen, C-P., Huang, J-S., Lin, C-C. (2001): Antimicrobial activity of honokiol and magnolol isolated from *Magnolia officinalis*. *Phytotherapy Research*, 15(2), 139-141.

- Holtfreter, B., Kocher, T., Hoffmann, T., Desvarieux, M., Micheelis, W. (2010):** Prevalence of periodontal disease and treatment demands based on a german dental survey (DMS IV). *Journal of Clinical Periodontology*, 37(3), 211-219.
- Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P., Georgakilas, A.G. (2011):** Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research*, 711(), 193-201.
- Kumar, P.S., Griffen, A.L., Barton, J.A., Paster, B.J., Moeschberger, M.L., Leys, E.J. (2003):** New bacterial species associated with chronic periodontitis. *Journal of Dental Research*, 82(5), 338-344.
- Kumar, P.S., Leys, E.J., Bryk, J.M., Martinez, F.J., Moeschberger, M.L., Griffen, A.L. (2006):** Changes in periodontal health status are associated with bacterial community shifts as assessed by quantitative 16S cloning and sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10), 3665-3673.
- Kuo, W.-L., Chung, C.-Y., Hwang, T.-L., Chen, J.-J. (2013):** Biphenyl-type neolignans from *Magnolia officinalis* and their antiinflammatory activities. *Phytochemistry*, 85, 153-160.
- Lai, C.-S., Lai, Y.-S., Kuo, D.-H., Wu, C.-H., Ho, C.-T., Pan, M.-H. (2011):** Magnolol potently suppressed lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression via downregulating MAPK and NF- κ B signaling pathways. *Journal of Functional Food*, 3(3), 198-206.
- Le Bihan, Y.-V., Izquierdo, M.A., Coste, F., Aller, P., Culard, F., Gehrke, T.H., Essalhi, K., Carell, T., Castaing, B. (2011):** 5-Hydroxy-5-methylhydantoin DNA lesion, a molecular trap for DNA glycosylases. *Nucleic Acid Research*, 39(4), 6277-6290.
- Lee, J., Jung, E., Park, J., Jung, K., Lee, S., Hong, S., Park, J., Park, E., Kim, J., Park, S., Park, D. (2005):** Anti-inflammatory effects of magnolol and honokiol are mediated through inhibition of the downstream pathway of MEKK-1 in NF- κ B activation signaling. *Planta Medica*, 71(4), 338-343.
- Leonard, E.J., Yoshimura, T., Tanaka, S., Raffeld, M. (1991):** Neutrophil recruitment by intradermally injected neutrophil attractant/activation protein-1. *Journal of Investigative Dermatology*, 96(5), 690-694.
- Li, M.H., Kothandan, G., Cho, S.J., Huong, P.T.T., Nan, Y.H., Lee, K.Y., Shin, S.Y., Yea, S.S., Jeon, Y.J. (2010):** Magnolol inhibits LPS-induced NF- κ B/Rel activation by blocking

p38 kinase in murine macrophages. *Korean Journal of Physiological Pharmacology*, 14(6), 353-358.

Li, N., Song, Y., Zhang, W., Wang, W., Chen, J., Wong, A.W., Roberts, A. (2007): Evaluation of the in vitro and in vivo genotoxicity of magnolia bark extract. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 49(3), 154-159.

Liu, Z., Zhang, X., Cui, W., Zhang, X., Li, N., Chen, J., Wong, A.W., Roberts, A. (2007): Evaluation of short-term and subchronic toxicity of magnolia bark extract in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 49(3), 160-171.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C.A. (1997): A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640), 394-397.

Mukaida, N., Harada, A., Matsushima, K. (1998): Interleukine-8 (IL-8) and Monocyte chemotactic activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 9(1), 9-23.

Muthukuru, M., Jotwani, R., Cutler, C.W. (2005): Oral mucosal endotoxin tolerance induction in chronic periodontitis. *Infection and Immunity*, 73(2), 687-694.

Ogata, M., Hoshi, M., Shimotohno, K., Urano, S., Endo T. (1997): Antioxidant activity of Magnolol, Honokiol and related phenolic compounds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(5), 557 – 562.

Ogawa, T., Asai, Y., Hashimitot, M., Takeuchi, O., Kurita, T., Yoshikai, Y., Miyake, K., Akira, S. (2002): Cell activation by *Porphyromonas gingivalis* lipid A molecule through Toll-like receptor-4 and myeloid differentiation factor 88- dependent signaling pathway. *International Immunology*, 14(11), 1325-1332.

Park, E.-J., Zhao, Y.-Z., Na, M., Bae, K., Kim, Y.H., Lee, B.-H., Sohn, D.H. (2003): Protective effects of Honokiol and Magnolol on tertiary butyl hydroperoxide- or D-galactosamine-induced toxicity in rat primary hepatocytes. *Planta Medica*, 69(1), 33-37.

Park, J., Lee, J., Jung, E., Park, Y., Kim, K., Park, B., Jung, K., Park, E., Kim, J., Park, D. (2004): In vitro antibacterial and anti-inflammatory effects of honokiol and magnolol against *Propionibacterium sp.* *European Journal of Pharmacology*, 496(1), 189-195.

- Pihlstrom, B.L., Michalowicz, B.S., Johnson, N.W. (2005):** Periodontal diseases. *Lancet*, 366 (9499), 1809-1820.
- Pirincchioglu, A.G., Gökalp, D., Pirincchioglu, M., Kizil, G., Kizil, M. (2010):** Malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl (PCO) levels as biomarkers of oxidative stress in subjects with familial hypercholesterolemia. *Clinical Biochemistry*, 43(15), 1220-1224.
- Polland, K.E., Higgins, F., Orchardson, R. (2003):** Salivary flow rate and pH during prolonged gum chewing in humans. *Journal of Oral Rehabilitation*, 30(9), 861-865.
- Reboiras-López, M.D., Pérez-sayáns, M., Somoza-Martín, J.M., Gayoso-Diz, P., Barros-Angueira, F., Gándara-Rey, J.M., García-García, A. (2012):** Comparison of the Cytobrush®, dermatological curette and oral CDx® brush test as methods for obtaining samples of RNA for molecular analysis of oral cytology. *Cytopathology*, 23(3), 192-197.
- Rogers, N.L., Cole, S.A., Lan, H.-C., Crossa, A. (2007):** New saliva DNA collection method compared to buccal cell collection techniques for epidemiological studies. *American Journal of Human Biology*; 19839; 319-326
- Romanelli, R., Mancini, S., Laschinger, C., Overall, C.M., Sodek, J., McCulloch, C.A.G. (1999):** Activation of neutrophil collagenase in periodontitis. *Infection and Immunity*, 67(5), 2319-2326.
- Rosin, M., Kramer, A., Gradtko, D., Richter, G., Kocher, T. (2002):** The effect of SNC⁺/H₂O₂ toothpaste compared to a commercially available triclosan-containing toothpaste on oral hygiene and gingival health – a 6-month home-use study. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(12), 1086-1091.
- Rosling, B. (1997a):** The use of a triclosan/copolymer dentifrice may retard the progression of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 24(12), 873-880.
- Rosling, B. (1997b):** Effect of triclosan on the subgingival microbiota of periodontitis susceptible subjects. *Journal of Clinical Periodontology*, 24(12), 881-887.
- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W., Bakker, O., van den Hoff, M.J.B., Karlen, Y., Moorman, A.F.M. (2009):** Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acid Research*, 37(6), e45.

Shen, T., Park, Y.C., Kim, S.H., Lee, J., Cho, J.Y. (2010): Nuclear factor κ B/signal transducers and activators of transcription-1-mediated inflammatory responses in Lipopolysaccharide-activated macrophages are a major inhibitory target of kahweol, a coffee diterpene. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33(7), 1159-1164.

Shibutani, S., Takeshita, M., Grollman, A.P. (1991): Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*, 349(6308), 431-434.

Sies, H. (1991): Oxidant stress: introduction. In: *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*, ed. Sies, H., xv-xxii. Academic Press, London.

Singer, V.L., Lawlor, T.E., Yue, S. (1999): Comparison of SYBR® Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the *Salmonella*/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test). *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 439(1), 37-47.

Speranza, L., Franceschelli, S., Pesce, M., Reale, M., Menghini, L., Vinciguerra, I., De Lutiis, M.A., Felaco, M., Grilli, A. (2010): Antiinflammatory effects in THP-1 cells treated with verbascoside. *Phytotherapy Research*, 24(9), 1398-1404.

Tataurov, A.V., You, Y., Owczarzy, R. (2008): Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids. *Biophysical Chemistry*, 133(1-3), 66-70.

Tchou, J., Bodepudi, V., Shibutani, S., Antoshechkin, I., Miller, J., Grollman, A.P., Johnson, F. (1994): Substrate specificity of Fpg protein: Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(21), 15318-15324.

Tse, A.K.-W., Wan, C.-K., Zhu, G.-Y., Shen, X.-L., Cheung, H.-Y., Yang, M., Fong, W.-F. (2007): Magnolol suppresses NF- κ B activation and NF- κ B regulated gene expression through inhibition of I κ B kinase activation. *Molecular Immunology*, 44(10), 2647-2658.

Walker, J.M., Maitra, A., Walker J., Ehrnhöfer-Ressler, M.M., Inui, T., Somoza, V. (2013): Identification of *Magnolia officinalis* L. bark extract as the most potent anti-inflammatory of four plant extracts. *The American Journal of Chinese Medicine*, 41(3), 531-544.

- Walker, J., Schueller, K., Schaefer, L.-M., Pignitter, M., Esefelder, L., Somoza, V. (2014):** Resveratrol and its metabolites inhibit proinflammatory effects of lipopolysaccharides in U-937 macrophages in plasma-representative concentrations. *Food and Function*, 5(1), 74 – 84.
- Wallet, M.A., Calderon, N.L., Alonso, T.R., Choe, C.S., Catalfamo, D.L., Lalane, C.J., Neiva, K.G., Panagakos, F., Wallet, S.M. (2013):** Triclosan alters antimicrobial and anti-inflammatory responses of epithelial cells. *Oral Diseases*, 19(3), 296 – 302.
- Yu, S.-L., Lee, S.-K., Johnson, R.E., Prakash, L., Prakash, S. (2003):** The stalling of transcription at abasic sites is highly mutagenic. *Molecular and cellular biology*, 23(1), 382-388.
- Zhang, B., Maniatis, T., Song, Y., Zhang, W., Zhang, X., Li, N., Chen, J., Wong, A.W., Roberts, A. (2008):** Evaluation of magnolia bark extract in chromosomal aberration assays. *Mutation Research*, 654(2), 133-137.
- Zhao, L., La, V.D., Grenier, D. (2013):** Antibacterial, antiadherence, antiprotease and anti-inflammatory activities of various tea extracts: Potential benefits for periodontal diseases. *Journal of Medicinal Food*, 16(5), 428-436.

9. Anhang

9.1. Messdaten

9.1.1. Zellzahlen und Viabilität

Zellzahlen:

Gruppe 1 (Kontrollzahnpaste)

Proband	V1	V2
IACR43	$6,88 \cdot 10^5$	$5,63 \cdot 10^5$
ASRK70	$1,05 \cdot 10^6$	$6,53 \cdot 10^5$
AYAN61	$5,69 \cdot 10^5$	$6,04 \cdot 10^5$
LRRZ54	$7,29 \cdot 10^5$	$6,88 \cdot 10^5$
HETL96	$8,19 \cdot 10^5$	$8,89 \cdot 10^5$
OARZ85	$6,81 \cdot 10^5$	$7,15 \cdot 10^5$
LAHT77	$7,29 \cdot 10^5$	$8,54 \cdot 10^5$
IATR68	$6,67 \cdot 10^5$	$7,50 \cdot 10^5$
IETR03	$6,74 \cdot 10^5$	$7,64 \cdot 10^5$
USCR04	$6,32 \cdot 10^5$	$9,24 \cdot 10^5$
MW	$7,32 \cdot 10^5$	
s	$1,23 \cdot 10^5$	

Gruppe 4 (Colgate total®)

Proband	V1	V2
AAOM39	$4,03 \cdot 10^5$	$6,11 \cdot 10^5$
ANUR29	$8,61 \cdot 10^5$	$6,76 \cdot 10^5$
UEAT08	$5,21 \cdot 10^5$	$7,50 \cdot 10^5$
UAWD94	$8,82 \cdot 10^5$	$7,78 \cdot 10^5$
IAIR93	$5,21 \cdot 10^5$	$7,78 \cdot 10^5$
EAEH89	$9,03 \cdot 10^5$	$7,78 \cdot 10^5$
LERZ18	$8,68 \cdot 10^5$	$9,44 \cdot 10^5$
HARR90	$6,94 \cdot 10^5$	$6,81 \cdot 10^5$
SDAR33	$6,39 \cdot 10^5$	$7,85 \cdot 10^5$
UAUS42	$5,56 \cdot 10^5$	$4,79 \cdot 10^5$
MW	$7,05 \cdot 10^5$	
s	$1,54 \cdot 10^5$	

Gruppe 2 (MBE-Kaugummi)

Proband	L_V1	L_V2	R_V1	R_V2
ALAR69	$9,44 \cdot 10^5$	$6,18 \cdot 10^5$	$5,76 \cdot 10^5$	$3,89 \cdot 10^5$
AAAR60	$7,01 \cdot 10^5$	$5,49 \cdot 10^5$	$4,38 \cdot 10^5$	$5,00 \cdot 10^5$
AACR82	$5,08 \cdot 10^5$	$6,18 \cdot 10^5$	$5,00 \cdot 10^5$	$4,58 \cdot 10^5$
ANTR84	$5,76 \cdot 10^5$	$1,03 \cdot 10^6$	$5,63 \cdot 10^5$	$6,46 \cdot 10^5$
VARL28	$7,50 \cdot 10^5$	$6,53 \cdot 10^5$	$4,24 \cdot 10^5$	$5,21 \cdot 10^5$
NNOK71	$8,26 \cdot 10^5$	$1,10 \cdot 10^6$	$6,67 \cdot 10^5$	$9,10 \cdot 10^5$
OAUD63	$5,42 \cdot 10^5$	$6,81 \cdot 10^5$	$6,32 \cdot 10^5$	$6,18 \cdot 10^5$
OKMH91	$6,88 \cdot 10^5$	$5,63 \cdot 10^5$	$6,67 \cdot 10^5$	$6,67 \cdot 10^5$
LNUR19	$7,36 \cdot 10^5$	$7,43 \cdot 10^5$	$6,39 \cdot 10^5$	$5,83 \cdot 10^5$
HAUR01	$6,32 \cdot 10^5$	$6,51 \cdot 10^5$	$5,63 \cdot 10^5$	$6,04 \cdot 10^5$
MW	$7,05 \cdot 10^5$		$578 \cdot 10^5$	
s	$1,60 \cdot 10^5$		$116 \cdot 10^5$	

Gruppe 3 (Kontrollkaugummi)

Proband	L_V1	L_V2	R_V1	R_V2
AAUO80	$5,42 \cdot 10^5$	$8,75 \cdot 10^5$	$5,63 \cdot 10^5$	$7,01 \cdot 10^5$
RAAR17	$6,60 \cdot 10^5$	$5,69 \cdot 10^5$	$1,13 \cdot 10^6$	$6,32 \cdot 10^5$
UAIN87	$8,17 \cdot 10^5$	$8,06 \cdot 10^5$	$5,07 \cdot 10^5$	$4,65 \cdot 10^5$
AAOL98	$6,67 \cdot 10^5$	$7,57 \cdot 10^5$	$6,39 \cdot 10^5$	$4,58 \cdot 10^5$
AAEH45	$8,54 \cdot 10^5$	$1,03 \cdot 10^6$	$5,21 \cdot 10^5$	$8,82 \cdot 10^5$
OAER14	$7,08 \cdot 10^5$	$7,29 \cdot 10^5$	$5,14 \cdot 10^5$	$5,69 \cdot 10^5$
AASR27	$7,43 \cdot 10^5$	$6,46 \cdot 10^5$	$5,97 \cdot 10^5$	$5,14 \cdot 10^5$
AHAR81	$9,38 \cdot 10^5$	$7,01 \cdot 10^5$	$9,24 \cdot 10^5$	$7,46 \cdot 10^5$
RRIE24	$6,94 \cdot 10^5$	$6,52 \cdot 10^5$	$6,74 \cdot 10^5$	$7,22 \cdot 10^5$
OTAR09	$8,65 \cdot 10^5$	$1,06 \cdot 10^6$	$6,39 \cdot 10^5$	$8,33 \cdot 10^5$
MW	$7,66 \cdot 10^5$		$6,61 \cdot 10^5$	
s	$1,40 \cdot 10^5$		$1,73 \cdot 10^5$	

Viabilität

Gruppe 1 (Kontrollzahnpaste)

Proband	V1	V2
IACR43	90,8 %	92,1 %
ASRK70	89,9 %	100 %
AYAN61	88,2 %	100 %
LRRZ54	92,9 %	99,0 %
HETL96	91,5 %	92,1 %
OARZ85	88,3 %	93,6 %
LAHT77	94,6 %	94,6 %
IATR68	88,9 %	92,3 %
IETRO3	95,1 %	98,2 %
USCR04	94,8 %	96,4 %
MW	91,5 %	95,8 %
s	2,58 %	3,13 %

Gruppe 4 (Colgate total®)

Proband	V1	V2
AAOM39	85,3 %	86,3 %
ANUR29	87,9 %	97,3 %
UEAT08	96,2 %	93,1 %
UAWD94	91,4 %	94,1 %
IAIR93	98,7 %	88,2 %
EAEH89	93,5 %	95,2 %
LERZ18	97,7 %	93,8 %
HARR90	96,2 %	95,2 %
SDAR33	93,9 %	94,2 %
UAUS42	98,7 %	100 %
MW	93,9 %	93,7 %
s	4,56 %	3,99 %

Gruppe 2 (MBE-Kaugummi)

	L		R	
	V1	V2	V1	V2
ALAR69	86,6 %	91,8 %	84,7 %	81,7 %
AAAR60	87,8 %	95,2 %	87,5 %	97,3 %
AACR82	92,76 %	93,7 %	88,7 %	91,7 %
ANTR84	95,4 %	95,5 %	92,1 %	94,9 %
VARL28	92,3 %	94,0 %	100 %	100 %
NNOK71	88,8 %	90,8 %	89,7 %	92,9 %
OAUD63	97,5 %	90,8 %	89,7 %	96,7 %
OKMH91	92,5 %	98,8 %	98,0 %	100 %
LNUR19	89,8 %	93,8 %	94,9 %	98,8 %
HAUR01	93,8 %	96,5 %	93,1 %	100 %
MW	91,7 %	94,08 %	91,8 %	95,4 %
s	3,44 %	2,54 %	4,75 %	5,67 %

Gruppe 3 (Kontrollkaugummi)

	L		R	
	V1	V2	V1	V2
AAUO80	79,6 %	81,8 %	87,1 %	87,8 %
RAAR17	91,4 %	95,4 %	88,5 %	91,0 %
UAIN87	98,1 %	88,6 %	98,7 %	91,8 %
AAOL98	86,5 %	94,8 %	92,9 %	100 %
AAEH45	89,1 %	91,9 %	97,4 %	90,7 %
OAER14	93,6 %	92,9 %	100 %	90,1 %
AASR27	92,2 %	93,0 %	96,6 %	98,7 %
AHAR81	93,1 %	96,2 %	90,5 %	92,2 %
RRIE24	92,6 %	92,2 %	97,0 %	96,3 %
OTAR09	95,6 %	100 %	91,1 %	96,8 %
MW	91,2 %	92,7 %	94,0 %	93,5 %
s	5,17 %	4,87 %	4,53 %	4,08 %

Zahnpastaverbrauch

Kontrollzahnpasta		MBE-Kaugummi		Kontrollkaugummi	
IACR43	2,61	ALAR69	4,18	AAUO80	3,34
AYAN61	5,19	AAAR60	3,69	RAAR17	3,80
ASRK70	5,14	AACR82	4,05	UAIN87	4,35
LRRZ54	5,19	ANTR84	9,26	AAOL98	5,34
HETL96	6,40	VARL28	6,86	AAEH45	5,06
OARZ85	3,64	NNOK71	6,64	OAER14	6,16
LAHT77	5,76	OAUD63	3,28	AASR27	3,17
IATR68	3,20	OKMH91	6,91	AHAR81	3,78
IETR03	5,23	LNUR19	6,35	RRIE24	3,10
USCR04	4,84	HAUR01	3,91	OTAR09	4,48
MW	4,72	MW	5,51	MW	4,26
s	1,19	s	1,96	s	1,02
SEM	0,376	SEM	0,619	SEM	0,321

Colgate total®-Gruppe		
	Kontroll- zahnpasta	Colgate total®
AAOM39	2,26	1,36
ANUR29	3,44	1,49
UEAT08	5,24	2,23
UAWD94	5,68	3,80
IAIR93	13,6	5,06
EAEH89	7,75	3,69
LERZ18	5,68	2,26
SDAR33	6,57	2,09
HARR90	1,73	k.A.
UAUS42	3,95	4,03
MW	5,59	2,89
s	3,37	1,29
SEM	1,07	0,407

k.A. = keine Angabe

9.1.2. Bestimmung der photometrischen Katalaseaktivität [MU/l]

Einfluss von PG-LPS auf die Katalaseaktivität [MU/l]

Proband	CON_t ₀	LPS_t ₀	Proband	CON_t ₀	LPS_t ₀
IACR43	0,250	0,129	ALAR69	0,184	0,143
AYAN61	0,150	0,131	AAAR60	0,129	0,126
ASRK70	0,147	0,206	AACR82	0,128	0,128
LRRZ54	0,262	0,296	ANTR84	0,152	0,218
HETL96	0,173	0,129	VARL28	0,125	0,166
OARZ85	0,143	0,138	NNOK71	0,230	0,132
LAHT77	0,132	0,189	OKMH91	0,169	0,249
IATR68	0,140	0,140	LNUR19	0,130	0,132
IETR03	0,134	0,129	OAUD63	0,138	0,138
USCR04	0,447	0,480	HAUR01	0,314	0,575
AAUO80	0,154	0,192	AAOM39	0,147	0,162
RAAR17	0,211	0,131	ANUR29	0,130	0,138
UAIN87	0,159	0,128	UEAT08	0,194	0,190
AAOL98	0,164	0,164	UAWD94	0,137	0,213
AAEH45	0,160	0,159	IAIR93	0,201	0,131
OAER14	0,153	0,211	EAEH89	0,170	0,197
AASR27	0,188	0,243	LERZ18	0,200	0,163
AHAR81	0,158	0,149	HARR90	0,158	0,130
RRIE24	0,175	0,174	SDAR33	0,233	0,240
OTAR09	0,209	0,283	UAUS42	0,130	0,148
	CON_t ₀	LPS_t ₀			
MW	0,178	0,188			
s	0,061	0,092			
SEM	0,010	0,015			

Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf die Katalaseaktivität (CON_t₁/CON_t₀)

Kontrollzahnpaste		MBE-Kaugummi		Kontrollkaugummi		Colgate total®	
IACR43	0,727	ALAR69	0,688	AAUO80	0,913	AAOM39	0,953
AYAN61	1,31	AAAR60	1,05	RAAR17	1,12	ANUR29	1,00
ASRK70	0,887	AACR82	2,00	UAIN87	1,45	UEAT08	0,750
LRRZ54	0,525	ANTR84	0,989	AAOL98	1,05	UAWD94	1,74
HETL96	*	VARL28	1,15	AAEH45	0,831	IAIR93	0,669
OARZ85	2,16	NNOK71	0,570	OAER14	1,53	EAEH89	1,18
LAHT77	0,980	OKMH91	0,779	AASR27	1,05	LERZ18	1,19
IATR68	0,912	LNUR19	2,14	AHAR81	1,98	HARR90	0,829
IETR03	2,08	OAUD63	1,88	RRIE24	0,747	SDAR33	0,969
USCR04	0,480	HAUR01	0,721	OTAR09	0,618	UAUS42	0,991
MW	1,12	MW	1,20	MW	1,03	MW	0,948
s	0,620	s	0,588	s	0,304	s	0,177
SEM	0,207	SEM	0,186	SEM	0,096	SEM	0,059

* konnte aufgrund technischer Probleme nicht gemessen werden

9.1.3. Bestimmung der DNA-Schäden mittels Comet Assay

Einfluss von PG-LPS auf das Auftreten von DNA-Strangbrüchen

angegeben in [%] Schweifintensität

Proband	CON_t ₀	LPS_t ₀	Proband	CON_t ₀	LPS_t ₀
IACR43	4,76 %	3,61 %	ALAR69	5,04 %	6,48 %
AYAN61	3,97 %	3,21 5	AAAR60	4,85 %	3,61 %
ASRK70	4,26 %	3,23 %	AACR82	5,77 %	5,24 %
LRRZ54	3,85 %	4,31 %	ANTR84	4,49 %	4,05 %
HETL96	5,90 %	6,55 %	VARL28	3,39 %	3,92 %
OARZ85	6,67 %	7,75 %	NNOK71	4,21 %	6,72 %
LAHT77	4,79 %	3,81 %	OKMH91	6,59 %	5,43 %
IATR68	5,15 %	5,49 %	LNUR19	6,29 %	4,96 %
IETR03	4,00 %	3,65 %	OAUD63	3,40 %	3,74 %
USCR04	5,37 %	4,78 %	HAUR01	5,04 %	3,44 %
AAUO80	6,93 %	5,15 %	AAOM39	7,17 %	8,10 %
RAAR17	5,88 %	5,91 %	ANUR29	6,38 %	4,85 %
UAIN87	3,86 %	3,57 %	UEAT08	2,35 %	3,12 %
AAOL98	4,16 %	4,67 %	UAWD94	3,48 %	4,86 %
AAEH45	4,65 %	4,06 %	IAIR93	5,80 %	5,39 %
OAER14	4,65 %	4,88 %	EAEH89	5,09 %	9,12 %
AASR27	5,91 %	6,51 %	LERZ18	4,00 %	6,56 %
AHAR81	4,44 %	3,70 %	HARR90	5,32 %	5,30 %
RRIE24	4,23 5	5,19 %	SDAR33	4,85 %	5,46 %
OTAR09	4,47 %	4,96 %	UAUS42	8,43 %	8,94 %
	CON_t₀	LPS_t₀			
MW	5,00 %	5,11 %			
s	1,21 %	1,53 %			
SEM	0,191 %	0,242 %			

Einfluss von PG-LPS auf das Auftreten oxidative DNA-Schäden

(Kontrolle = CON_fpg/CON_t₀; LPS = LPS_fpg/LPS_t₀)

Proband	Kontrolle	LPS	Proband	Kontrolle	LPS
IACR43	0,804	0,623	ALAR69	0,826	1,18
AYAN61	1,76	2,09	AAAR60	1,97	1,65
ASRK70	1,30	1,29	AACR82	1,31	1,00
LRRZ54	1,62	1,70	ANTR84	1,50	0,976
HETL96	1,38	1,03	VARL28	1,35	1,44
OARZ85	0,856	0,739	NNOK71	0,925	1,53
LAHT77	1,13	0,850	OKMH91	1,11	0,766
IATR68	1,02	0,993	LNUR19	0,877	0,790
IETRO3	1,30	0,745	OAUD63	1,11	1,28
USCR04	0,820	1,03	HAUR01	1,29	0,803
AAUO80	1,05	1,16	AAOM39	1,35	1,28
RAAR17	0,928	0,956	ANUR29	0,761	0,739
UAIN87	1,25	1,98	UEAT08	1,54	2,13
AAOL98	1,14	1,52	UAWD94	1,26	1,,46
AAEH45	1,41	1,06	IAIR93	0,761	1,12
OAER14	1,07	1,73	EAEH89	0,761	1,68
AASR27	0,935	1,12	LERZ18	0,871	1,20
AHAR81	1,55	0,949	HARR90	1,00	0,827
RRIE24	0,911	1,58	SDAR33	0,987	0,656
OTAR09	1,14	1,09	UAUS42	0,945	1,31
	CON_t₀	LPS_t₀			
MW	1,15	1,20			
s	0,294	0,397			
SEM	0,0417	0,0636			

Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf das Auftreten von DNA-Strangbrüchen (CON_t₁/CON_t₀)

Kontrollzahnpaste		MBE-Kaugummi		Kontrollkaugummi		Colgate total®	
IACR43	1,65	ALAR69	0,802	AAUO80	0,938	AAOM39	0,471
AYAN61	2,05*	AAAR60	1,11	RAAR17	0,538	ANUR29	0,819
ASRK70	1,45	AACR82	0,647	UAIN87	1,49*	UEAT08	1,15
LRRZ54	1,14	ANTR84	2,11*	AAOL98	0,851	UAWD94	1,07
HETL96	0,846	VARL28	1,01	AAEH45	1,04	IAIR93	0,756
OARZ85	0,794	NNOK71	0,454	OAER14	1,18	EAEH89	0,327
LAHT77	1,26	OKMH91	0,840	AASR27	0,541	LERZ18	0,378
IATR68	0,607	LNUR19	0,770	AHAR81	0,929	HARR90	0,400
IETRO3	1,00	OAUD63	1,24	RRIE24	0,531	SDAR33	0,752
USCR04	1,14	HAUR01	1,36	OTAR09	0,680	UAUS42	0,475
MW	1,10	MW	0,914	MW	0,803	MW	0,659
s	0,329	s	0,290	s	0,241	s	0,293
SEM	0,110	SEM	0,097	SEM	0,0804	SEM	0,093

signifikante Ausreißer sind mit * markiert

9.1.4. Bestimmung der Zytokin-/Chemokinausschüttung mittels Luminex-Technologie

Einfluss von PG-LPS auf die Zytokin-/Chemokinausschüttung

IL-1 α

Proband	LPS_t ₀ / CON_t ₀	Proband	LPS_t ₀ / CON_t ₀
AYAN61	1,24	AAAR60	1,93
ASRK70	0,801	AACR82	0,954
LRRZ54	0,867	AANTR84	0,813
IACR43	1,17	ALAR69	1,06
HETL96	1,28	HAUR01	1,54
OARZ85	1,71	VARL28	1,13
LAHT77	1,15	NNOK71	0,724
IATR68	1,26	OAUD63	1,10
IETR03	0,708	OKMH91	1,04
USCR04	1,17	LNUR19	1,00
UAIN87	1,29	AAOM39	0,768
AAOL98	1,14	ANUR29	0,735
AAEH45	0,805	UEAT08	1,53
RAAR17	1,16	UAWD94	1,02
AAUO80	0,879	IAIR93	1,63
OAER14	1,22	EAEH89	1,24
AASR27	1,22	LERZ18	2,52
AHAR81	1,31	HARR90	1,12
RRIE24	1,34	SDAR33	0,870
OTAR09	1,60	UAUS42	1,24
	alle Probanden	Responder	
MW	1,18	1,33	
s	0,359	0,320	
SEM	0,0567	0,0605	

Non-Responder sind grau unterlegt

IL-1β

Proband	LPS_t ₀ / CON_t ₀	Proband	LPS_t ₀ / CON_t ₀
AYAN61	0,872	AAAR60	1,09
ASRK70	1,09	AACR82	1,06
LRRZ54	0,717	AANTR84	0,570
IACR43	1,15	ALAR69	1,80
HETL96	1,10	HAUR01	1,42
OARZ85	0,482	VARL28	1,34
LAHT77	1,62	NNOK71	0,753
IATR68	1,92	OAUD63	1,35
IETR03	0,803	OKMH91	0,938
USCR04	1,04	LNUR19	0,708
UAIN87	0,727	AAOM39	1,10
AAOL98	0,779	ANUR29	0,596
AAEH45	0,792	UEAT08	1,60
RAAR17	0,951	UAWD94	1,17
AAUO80	0,763	IAIR93	1,34
OAER14	1,07	EAEH89	1,08
AASR27	1,07	LERZ18	1,76
AHAR81	0,931	HARR90	1,15
RRIE24	1,36	SDAR33	1,19
OTAR09	1,32	UAUS42	1,07
	alle Probanden	Responder	
MW	1,09	1,29	
s	0,341	0,261	
SEM	0,0540	0,0522	

Non-Responder sind grau unterlegt

IL-8

Proband	LPS_t ₀ / CON_t ₀	Proband	LPS_t ₀ / CON_t ₀
AYAN61	1,12	AAAR60	1,71
ASRK70	0,968	AACR82	1,32
LRRZ54	0,845	AANTR84	0,962
IACR43	1,00	ALAR69	0,808
HETL96	0,819	HAUR01	1,08
OARZ85	0,901	VARL28	1,18
LAHT77	1,21	NNOK71	0,870
IATR68	1,03	OAUD63	0,903
IETR03	0,904	OKMH91	0,837
USCR04	1,13	LNUR19	0,883
UAIN87	0,949	AAOM39	0,780
AAOL98	1,35	ANUR29	0,710
AAEH45	0,788	UEAT08	1,68
RAAR17	1,28	UAWD94	0,827
AAUO80	0,836	IAIR93	1,59
OAER14	1,15	EAEH89	1,07
AASR27	1,25	LERZ18	1,59
AHAR81	1,15	HARR90	0,820
RRIE24	1,24	SDAR33	0,800
OTAR09	1,52	UAUS42	1,19
	alle Probanden	Responder	
MW	1,08	1,28	
s	0,269	0,217	
SEM	0,0426	0,0473	

Non-Responder sind grau unterlegt

MIP-1β

Proband	LPS_t0/ CON_t0	Proband	LPS_t0/ CON_t0
AYAN61	0,857	AAAR60	1,91
ASRK70	0,958	AACR82	1,04
LRRZ54	0,746	AANTR84	1,00
IACR43	1,32	ALAR69	1,73
HETL96	1,16	HAUR01	1,89
OARZ85	0,847	VARL28	1,00
LAHT77	1,24	NNOK71	0,703
IATR68	1,05	OAUD63	1,45
IETR03	1,07	OKMH91	0,820
USCR04	1,07	LNUR19	0,667
UAIN87	1,15	AAOM39	1,13
AAOL98	0,615	ANUR29	0,833
AAEH45	0,945	UEAT08	1,12
RAAR17	1,15	UAWD94	1,30
AAUO80	1,05	IAIR93	1,75
OAER14	1,11	EAEH89	1,31
AASR27	1,13	LERZ18	2,13
AHAR81	1,77	HARR90	0,824
RRIE24	3,40	SDAR33	1,08
OTAR09	1,00	UAUS42	1,07
	alle Probanden	Responder	
MW	1,21	1,39	
s	0,503	0,516	
SEM	0,0795	0,113	

Non-Responder sind grau unterlegt

TNF- α

Proband	LPS_t₀/CON_t₀	Proband	LPS_t₀/CON_t₀
AYAN61	1,07	AAAR60	1,72
ASRK70	0,791	AACR82	1,50
LRRZ54	0,494	AANTR84	0,568
IACR43	0,920	ALAR69	1,60
HETL96	0,667	HAUR01	1,31
OARZ85	0,978	VARL28	1,33
LAHT77	1,82	NNOK71	0,759
IATR68	1,10	OAUD63	1,02
IETR03	0,97	OKMH91	0,411
USCR04	1,13	LNUR19	0,730
UAIN87	0,722	AAOM39	0,955
AAOL98	1,20	ANUR29	0,561
AAEH45	0,501	UEAT08	1,43
RAAR17	1,17	UAWD94	0,991
AAUO80	0,916	IAIR93	3,04
OAER14	1,19	EAEH89	0,972
AASR27	1,23	LERZ18	2,36
AHAR81	0,683	HARR90	0,660
RRIE24	1,18	SDAR33	0,832
OTAR09	1,00	UAUS42	1,18
	alle Probanden	Responder	
MW	1,09	1,45	
s	0,506	0,505	
SEM	0,0800	0,110	

Non-Responder sind grau unterlegt

Einfluss der Interventionsphase auf die Zytokin-/Chemokinausschüttung

IL-1 α (CON_{t1}/CON_{t0}) – ausreißerbereingte Werte (Nalimov-Test); angegeben sind die Werte der Gruppe der „Responder“ auf PG-LPS; NR= „Non-Responder“, A = Ausreißer

Kontrollzahnpaste		MBE-Kaugummi		Kontrollkaugummi		Colgate total®	
AYAN61	1,86	AAAR60	A	UAIN87	0,740	AAOM39	NR
ASRK70	NR	AACR82	NR	AAOL98	1,64	ANUR29	NR
LRRZ54	NR	ANTR84	NR	AAEH45	NR	UEAT08	0,760
IACR43	2,12	ALAR69	0,863	RAAR17	0,462	UAWD94	1,03
HETL96	1,25	HAUR01	0,808	AAUO80	NR	IAIR93	0,475
OARZ85	1,74	VARL28	1,03	OAER14	0,922	EAEH89	0,358
LAHT77	0,828	NNOK71	NR	AASR27	1,30	LERZ18	A
IATR68	1,50	OAUD63	1,48	AHAR81	1,18	HARR90	0,681
IETRO3	NR	OKMH91	1,14	RRIE24	0,795	SDAR33	NR
USCR04	1,16	LNUR19	NR	OTAR09	1,00	UAUS42	0,857
MW	1,49	MW	1,06	MW	1,00	MW	0,869
s	0,447	s	0,268	s	0,366	s	0,518
SEM	0,169	SEM	0,120	SEM	0,129	SEM	0,196

IL-1 β (CON_{t1}/CON_{t0}) – ausreißerbereingte Werte (Nalimov-Test); angegeben sind die Werte der Gruppe der „Responder“ auf PG-LPS; NR= „Non-Responder“, A = Ausreißer

Kontrollzahnpaste		MBE-Kaugummi		Kontrollkaugummi		Colgate total	
AYAN61	NR	AAAR60	0,195	UAIN87	NR	AAOM39	0,304
ASRK70	0,495	AACR82	0,904	AAOL98	NR	ANUR29	NR
LRRZ54	NR	ANTR84	NR	AAEH45	NR	UEAT08	0,820
IACR43	0,554	ALAR69	1,64	RAAR17	NR	UAWD94	1,44
HETL96	0,688	HAUR01	0,668	AAUO80	NR	IAIR93	A
OARZ85	NR	VARL28	0,687	OAER14	0,152	EAEH89	0,496
LAHT77	1,55	NNOK71	NR	AASR27	0,492	LERZ18	2,89
IATR68	A	OAUD63	1,07	AHAR81	NR	HARR90	3,04
IETRO3	NR	OKMH91	NR	RRIE24	3,13	SDAR33	1,95
USCR04	0,476	LNUR19	NR	OTAR09	2,84	UAUS42	1,22
MW	0,752	MW	0,860	MW	1,65	MW	1,52
s	0,451	s	0,482	s	1,55	s	1,04
SEM	0,202	SEM	0,197	SEM	0,773	SEM	0,366

IL-8 (CON_{t1}/CON_{t0}) – ausreißerbereingte Werte (Nalimov-Test); angegeben sind die Werte der Gruppe der „Responder“ auf PG-LPS; NR= „Non-Responder“, A = Ausreißer

Kontrollzahnpaste		MBE-Kaugummi		Kontrollkaugummi		Colgate total®	
AYAN61	A	AAAR60	0,805	UAIN87	NR	AAOM39	NR
ASRK70	NR	AACR82	1,21	AAOL98	1,13	ANUR29	NR
LRRZ54	NR	ANTR84	NR	AAEH45	NR	UEAT08	1,86
IACR43	0,853	ALAR69	NR	RAAR17	1,48	UAWD94	NR
HETL96	NR	HAUR01	1,62	AAUO80	NR	IAIR93	1,90
OARZ85	NR	VARL28	0,520	OAER14	0,263	EAEH89	0,317
LAHT77	1,64	NNOK71	NR	AASR27	0,440	LERZ18	1,13
IATR68	1,35	OAUD63	NR	AHAR81	1,93	HARR90	NR
IETR03	NR	OKMH91	NR	RRIE24	3,55	SDAR33	NR
USCR04	0,432	LNUR19	NR	OTAR09	2,80	UAUS42	1,61
MW	1,07	MW	1,04	MW	1,66	MW	1,36
s	0,534	s	0,480	s	1,20	s	0,661
SEM	0,267	SEM	0,240	SEM	0,455	SEM	0,296

MIP-1 β (CON_{t1}/CON_{t0}) – ausreißerbereingte Werte (Nalimov-Test); angegeben sind die Werte der Gruppe der „Responder“ auf PG-LPS; NR= „Non-Responder“, A = Ausreißer

Kontrollzahnpaste		MBE-Kaugummi		Kontrollkaugummi		Colgate total	
AYAN61	NR	AAAR60	0,606	UAIN87	0,196	AAOM39	0,373
ASRK70	NR	AACR82	0,927	AAOL98	NR	ANUR29	NR
LRRZ54	NR	ANTR84	0,924	AAEH45	NR	UEAT08	0,911
IACR43	0,702	ALAR69	1,70	RAAR17	1,02	UAWD94	1,67
HETL96	1,03	HAUR01	1,61	AAUO80	1,04	IAIR93	A
OARZ85	NR	VARL28	0,503	OAER14	0,227	EAEH89	0,466
LAHT77	A	NNOK71	NR	AASR27	0,823	LERZ18	1,02
IATR68	0,936	OAUD63	0,918	AHAR81	2,31	HARR90	NR
IETR03	1,00	OKMH91	NR	RRIE24	A	SDAR33	2,95
USCR04	0,433	LNUR19	NR	OTAR09	A	UAUS42	2,38
MW	0,828	MW	1,036	MW	0,936	MW	1,40
s	0,25	s	0,461	s	0,772	s	0,980
SEM	0,11	SEM	0,174	SEM	0,315	SEM	0,370

TNF- α (CON_t₁/CON_t₀) – ausreißerbereinigte Werte (Nalimov-Test); angegeben sind die Werte der Gruppe der „Responder“ auf PG-LPS; NR= „Non-Responder“, A = Ausreißer

Kontrollzahnpaste		MBE-Kaugummi		Kontrollkaugummi		Colgate total®	
AYAN61	26,9	AAAR60	0,454	UAIN87	NR	AAOM39	NR
ASRK70	NR	AACR82	0,813	AAOL98	4,24	ANUR29	NR
LRRZ54	NR	ANTR84	NR	AAEH45	NR	UEAT08	0,662
IACR43	NR	ALAR69	1,31	RAAR17	1,47	UAWD94	NR
HETL96	NR	HAUR01	1,39	AAUO80	NR	IAIR93	11,63
OARZ85	NR	VARL28	0,372	OAER14	0,092	EAEH89	NR
LAHT77	2,10	NNOK71	NR	AASR27	0,498	LERZ18	1,82
IATR68	1,10	OAUD63	2,12	AHAR81	NR	HARR90	NR
IETRO3	NR	OKMH91	NR	RRIE24	25,4	SDAR33	NR
USCR04	0,321	LNUR19	NR	OTAR09	16,5	UAUS42	2,64
MW	7,61	MW	1,08	MW	8,03	MW	4,19
s	12,89	s	0,665	s	10,48	s	5,03
SEM	6,44	SEM	0,271	SEM	4,28	SEM	2,51

Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf die durch LPS ausgelöste Reaktion

IL-1 α (LPS/CON t1 – LPS/CON t0) - ausreißerbereingte Werte (Nalimov-Test); angegeben sind die Werte der Gruppe der „Responder“ auf PG-LPS; NR= „Non-Responder“, A = Ausreißer

Kontrollzahnpaste		MBE-Kaugummi		Kontrollkaugummi		Colgate total®	
AYAN61	-0,747	AAAR60	-1,19	UAIN87	-0,727	AAOM39	NR
ASRK70	NR	AACR82	NR	AAOL98	A	ANUR29	NR
LRRZ54	NR	ANTR84	NR	AAEH45	NR	UEAT08	-0,840
IACR43	0,278	ALAR69	-0,385	RAAR17	A	UAWD94	0,296
HETL96	A	HAUR01	-0,820	AAUO80	NR	IAIR93	-0,443
OARZ85	-0,848	VARL28	-0,261	OAER14	-0,535	EAEH89	-0,141
LAHT77	-0,411	NNOK71	NR	AASR27	-0,400	LERZ18	-1,46
IATR68	-0,475	OAUD63	-0,121	AHAR81	-0,421	HARR90	0,397
IETR03	NR	OKMH91	0,131	RRIE24	-0,425	SDAR33	NR
USCR04	-0,223	LNUR19	NR	OTAR09	-0,680	UAUS42	0,422
MW	-0,404	MW	-0,442	MW	-0,531	MW	-0,253
s	0,404	s	0,485	s	0,142	s	0,712
SEM	0,165	SEM	0,198	SEM	0,0580	SEM	0,269

IL-1 β (LPS/CON t1 – LPS/CON t0) - ausreißerbereingte Werte (Nalimov-Test); angegeben sind die Werte der Gruppe der „Responder“ auf PG-LPS; NR= „Non-Responder“, A = Ausreißer

Kontrollzahnpaste		MBE-Kaugummi		Kontrollkaugummi		Colgate total®	
AYAN61	NR	AAAR60	0,431	UAIN87	NR	AAOM39	-0,119
ASRK70	-0,253	AACR82	-0,628	AAOL98	NR	ANUR29	NR
LRRZ54	NR	ANTR84	NR	AAEH45	NR	UEAT08	-0,873
IACR43	0,186	ALAR69	-1,25	RAAR17	NR	UAWD94	-0,170
HETL96	A	HAUR01	-0,854	AAUO80	NR	IAIR93	-0,482
OARZ85	NR	VARL28	-0,0616	OAER14	-0,213	EAEH89	-0,251
LAHT77	-0,437	NNOK71	NR	AASR27	-0,184	LERZ18	-0,922
IATR68	-0,704	OAUD63	-0,0168	AHAR81	NR	HARR90	0,021
IETR03	NR	OKMH91	NR	RRIE24	0,087	SDAR33	-0,109
USCR04	0,123	LNUR19	NR	OTAR09	-0,423	UAUS42	-0,303
MW	-0,217	MW	-0,396	MW	-0,183	MW	-0,356
s	0,376	s	0,621	s	0,209	s	0,337
SEM	0,168	SEM	0,253	SEM	0,105	SEM	0,112

IL-8 (LPS/CON t1 – LPS/CON t0) - ausreißerbereinigte Werte (Nalimov-Test); angegeben sind die Werte der Gruppe der „Responder“ auf PG-LPS; NR= „Non-Responder“, A = Ausreißer

Kontrollzahnpaste		MBE-Kaugummi		Kontrollkaugummi		Colgate total®	
AYAN61	-0,490	AAAR60	-0,856	UAIN87	NR	AAOM39	NR
ASRK70	NR	AACR82	-0,744	AAOL98	-0,280	ANUR29	NR
LRRZ54	NR	ANTR84	NR	AAEH45	NR	UEAT08	-0,953
IACR43	0,180	ALAR69	NR	RAAR17	0,279	UAWD94	NR
HETL96	NR	HAUR01	-0,237	AAUO80	NR	IAIR93	-0,558
OARZ85	NR	VARL28	-0,536	OAER14	-0,677	EAEH89	-0,193
LAHT77	-0,378	NNOK71	NR	AASR27	-0,590	LERZ18	-0,783
IATR68	-0,308	OAUD63	NR	AHAR81	0,109	HARR90	NR
IETR03	NR	OKMH91	NR	RRIE24	0,278	SDAR33	NR
USCR04	-0,197	LNUR19	NR	OTAR09	-0,411	UAUS42	0,296
MW	-0,239	MW	-0,593	MW	-0,185	MW	-0,438
s	0,257	s	0,272	s	0,405	s	0,499
SEM	0,115	SEM	0,136	SEM	0,153	SEM	0,223

MIP-1β (LPS/CON t1 – LPS/CON t0) - ausreißerbereinigte Werte (Nalimov-Test); angegeben sind die Werte der Gruppe der „Responder“ auf PG-LPS; NR= „Non-Responder“, A = Ausreißer

Kontrollzahnpaste		MBE-Kaugummi		Kontrollkaugummi		Colgate total®	
AYAN61	NR	AAAR60	-0,792	UAIN87	-0,690	AAOM39	-0,0516
ASRK70	NR	AACR82	-0,701	AAOL98	NR	ANUR29	NR
LRRZ54	NR	ANTR84	-0,319	AAEH45	NR	UEAT08	-0,352
IACR43	0,0693	ALAR69	-0,820	RAAR17	0,383	UAWD94	0,0216
HETL96	A	HAUR01	-0,999	AAUO80	0,201	IAIR93	-0,506
OARZ85	NR	VARL28	NR	OAER14	-0,0271	EAEH89	-0,458
LAHT77	-0,282	NNOK71	NR	AASR27	-0,154	LERZ18	NR
IATR68	-0,209	OAUD63	-0,560	AHAR81	-0,318	HARR90	0,157
IETR03	-0,0913	OKMH91	NR	RRIE24	A	SDAR33	-0,130
USCR04	-0,238	LNUR19	NR	OTAR09	NR	UAUS42	0,163
MW	-0,150	MW	-0,699	MW	-0,101	MW	-0,144
s	0,142	s	0,235	s	0,382	s	0,266
SEM	0,0634	SEM	0,0961	SEM	0,156	SEM	0,0939

TNF- α (LPS/CON t1 – LPS/CON t0) - ausreißerbereinigte Werte (Nalimov-Test); angegeben sind die Werte der Gruppe der „Responder“ auf PG-LPS; NR= „Non-Responder“, A = Ausreißer

Kontrollzahnpaste		MBE-Kaugummi		Kontrollkaugummi		Colgate total®	
AYAN61	-0,655	AAAR60	-1,12	UAIN87	NR	AAOM39	NR
ASRK70	NR	AACR82	-1,05	AAOL98	-0,138	ANUR29	NR
LRRZ54	NR	ANTR84	NR	AAEH45	NR	UEAT08	-0,574
IACR43	NR	ALAR69	-1,16	RAAR17	0,326	UAWD94	NR
HETL96	NR	HAUR01	-0,811	AAUO80	NR	IAIR93	-2,08
OARZ85	NR	VARL28	-0,414	OAER14	-0,602	EAEH89	NR
LAHT77	-0,948	NNOK71	NR	AASR27	-0,548	LERZ18	-1,77
IATR68	-0,395	OAUD63	-0,109	AHAR81	NR	HARR90	NR
IETR03	NR	OKMH91	NR	RRIE24	0,408	SDAR33	NR
USCR04	0,210	LNUR19	NR	OTAR09	NR	UAUS42	0,347
MW	-0,447	MW	-0,781	MW	-0,111	MW	-1,02
s	0,493	s	0,431	s	0,473	s	1,12
SEM	0,246	SEM	0,176	SEM	0,211	SEM	0,561

9.1.4. Bestimmung der Genexpression mittels qPCR

Einfluss von LPS auf die Genexpression von Entzündungsmediatoren

IL-1 α

Proband	LPS_t ₀ / CON_t ₀	Proband	LPS_t ₀ / CON_t ₀
USCR04	1,42	VARL28	1,06
IETRO3	1,14	OKMH91	0,988
OARZ85	0,470	OAUD63	0,337
LRRZ54	0,489	NNOK71	0,740
LAHT77	1,71	LNUR19	1,23
IATR68	1,06	HAUR01	1,71
HETL96	1,93	ANTR84	1,12
AYAN61	0,710	ALAR69	0,800
ASRK70	0,676	AACR82	0,577
IACR43	1,22	AAAR60	1,03
UAIN87	3,17	UEAT08	0,927
RAAR17	1,20	UAWD94	0,812
RRIE24	2,66	UAUS42	1,47
AAEH45	1,93	SDAR33	0,712
AAOL98	0,432	LERZ18	0,454
AASR27	0,528	IAIR93	0,877
OTAR09	1,73	HARR90	0,963
AAUO80	1,74	EAEH89	0,974
AHAR81	0,647	ANUR29	10,61
OAER14	1,19	AAOM39I	1,58
	alle Probanden	Responder	
MW	1,14	1,56	
s	0,608	0,554	
SEM	0,0973	0,124	

Non-Responder sind grau hinterlegt

IL-1β

Proband	LPS_t ₀ / CON_t ₀	Proband	LPS_t ₀ / CON_t ₀
USCR04	1,26	VARL28	1,44
OARZ85	0,385	OKMH91	1,62
LRRZ54	0,949	OAUD63	0,886
LAHT77	0,534	NNOK71	0,743
IETR03	1,01	LNUR19	1,20
IATR68	0,793	HAUR01	2,85
IACR43	1,07	ANTR84	1,07
HETL96	1,16	ALAR69	0,856
AYAN61	2,14	AACR82	1,17
ASRK70	1,22	AAAR60	0,919
UAIN87	1,95	UEAT08	0,849
RRIE24	1,16	UAWD94	1,10
RAAR17	1,22	UAUS42	1,15
OTAR09	1,26	SDAR33	0,750
OAER14	3,51	LERZ18	1,32
AHAR81	0,569	IAIR93	0,855
AAUO80	1,71	HARR90	0,851
AASR27	0,874	EAEH89	2,33
AAOL98	1,28	ANUR29	14,34
AAEH45	1,32	AAOM39I	1,52
	alle Probanden	Responder	
MW	1,25	1,52	
s	0,614	0,610	
SEM	0,0983	0,122	

Non-Responder sind grau hinterlegt

IL-8

Proband	LPS_t0/ CON_t0	Proband	LPS_t0/ CON_t0
USCR04	1,40	VARL28	1,03
OARZ85	0,801	OKMH91	1,84
LRRZ54	0,546	OAUD63	1,08
LAHT77	0,888	NNOK71	0,754
IETR03	0,915	LNUR19	0,914
IATR68	0,888	HAUR01	1,02
IACR43	0,963	ANTR84	2,42
HETL96	1,48	ALAR69	1,39
AYAN61	1,48	AACR82	1,48
ASRK70	1,22	AAAR60	1,01
UAIN87	0,921	UEAT08	1,10
RRIE24	0,880	UAWD94	1,29
RAAR17	1,02	UAUS42	1,28
OTAR09	1,02	SDAR33	1,29
OAER14	5,12	LERZ18	0,805
AHAR81	1,32	IAIR93	1,15
AAUO80	1,11	HARR90	1,03
AASR27	1,01	EAEH89	0,893
AAOL98	1,61	ANUR29	1,34
AAEH45	0,964	AAOM39I	1,20
	alle Probanden	Responder	
MW	1,25	1,44	
s	0,710	0,798	
SEM	0,112	0,154	

Non-Responder sind grau hinterlegt

CCR1

Proband	LPS_t ₀ / CON_t ₀	Proband	LPS_t ₀ / CON_t ₀
USCR04	2,71	VARL28	0,441
OARZ85	0,435	OKMH91	0,861
LRRZ54	0,485	OAUD63	0,846
LAHT77	0,579	NNOK71	1,19
IETR03	2,01	LNUR19	1,12
IATR68	0,720	HAUR01	3,19
IACR43	2,80	ANTR84	2,43
HETL96	1,46	ALAR69	0,963
AYAN61	1,49	AACR82	0,426
ASRK70	1,20	AAAR60	0,643
UAIN87	0,934	UEAT08	2,28
RRIE24	0,391	UAWD94	1,48
RAAR17	0,373	UAUS42	0,895
OTAR09	1,41	SDAR33	0,764
OAER14	3,81	LERZ18	1,53
AHAR81	0,893	IAIR93	1,44
AAUO80	0,941	HARR90	0,810
AASR27	0,771	EAEH89	1,19
AAOL98	1,47	ANUR29	0,611
AAEH45	0,935	AAOM39I	0,937
	alle Probanden	Responder	
MW	1,25	1,90	
s	0,810	0,793	
SEM	0,128	0,187	

Non-Responder sind grau hinterlegt

Einfluss der Interventionsphase auf die Genexpression der Entzündungsmediatoren

IL-1 α (CON_{t1}/CON_{t0}) – ausreißerbereinigte Werte (Nalimov-Test); angegeben sind die Werte der Gruppe der „Responder“ auf PG-LPS; NR= „Non-Responder“, A = Ausreißer

Kontrollzahnpaste		MBE-Kaugummi		Kontrollkaugummi		Colgate total®	
USCR04	0,761	VARL28	2,98	UAIN87	3,09	UEAT08	NR
IETR03	0,704	OKMH91	NR	RAAR17	0,870	UAWD94	NR
OARZ85	NR	OAUD63	NR	RRIE24	2,74	UAUS42	1,99
LRRZ54	NR	NNOK71	NR	AAEH45	1,29	SDAR33	NR
LAHT77	0,484	LNUR19	2,22	AAOL98	NR	LERZ18	NR
IATR68	0,745	HAUR01	1,22	AASR27	NR	IAIR93	NR
HETL96	1,67	ANTR84	0,787	OTAR09	2,69	HARR90	NR
AYAN61	NR	ALAR69	NR	AAUO80	0,590	EAEH89	NR
ASRK70	NR	AACR82	NR	AHAR81	NR	ANUR29	1,38
IACR43	1,52	AAAR60	0,840	OAER14	0,833	AAOM39	1,01
MW	0,980	MW	1,61	MW	1,73	MW	1,46
s	0,488	s	0,959	s	1,07	s	0,494
SEM	0,199	SEM	0,429	SEM	0,403	SEM	0,285

IL-1 β (CON_{t1}/CON_{t0}) – ausreißerbereinigte Werte (Nalimov-Test); angegeben sind die Werte der Gruppe der „Responder“ auf PG-LPS; NR= „Non-Responder“, A = Ausreißer

Kontrollzahnpaste		MBE-Kaugummi		Kontrollkaugummi		Colgate total®	
USCR04	0,616	VARL28	2,37	UAIN87	0,965	UEAT08	NR
OARZ85	2,28	OKMH91	4,07	RRIE24	4,07	UAWD94	1,37
LRRZ54	0,823	OAUD63	NR	RAAR17	0,617	UAUS42	1,63
LAHT77	1,27	NNOK71	NR	OTAR09	3,59	SDAR33	NR
IETR03	NR	LNUR19	2,40	OAER14	1,31	LERZ18	0,118
IATR68	0,502	HAUR01	2,66	AHAR81	NR	IAIR93	NR
IACR43	NR	ANTR84	0,577	AAUO80	0,340	HARR90	NR
HETL96	NR	ALAR69	NR	AASR27	NR	EAEH89	2,43
AYAN61	NR	AACR82	0,654	AAOL98	2,02	ANUR29	0,641
ASRK70	NR	AAAR60	NR	AAEH45	2,54	AAOM39	0,254
MW	1,01	MW	2,12	MW	1,93	MW	1,07
s	0,721	s	1,33	s	1,38	s	0,896
SEM	0,323	SEM	0,541	SEM	0,487	SEM	0,366

IL-8 (CON_{t1}/CON_{t0}) – ausreißerbereinigte Werte (Nalimov-Test); angegeben sind die Werte der Gruppe der „Responder“ auf PG-LPS; NR= „Non-Responder“, A = Ausreißer

Kontrollzahnpaste		MBE-Kaugummi		Kontrollkaugummi		Colgate total®	
USCR04	1,36	VARL28	2,22	UAIN87	NR	UEAT08	1,19
OARZ85	NR	OKMH91	A	RRIE24	NR	UAWD94	0,448
LRRZ54	NR	OAUD63	0,902	RAAR17	1,38	UAUS42	1,46
LAHT77	NR	NNOK71	NR	OTAR09	1,78	SDAR33	1,64
IETR03	NR	LNUR19	NR	OAER14	A	LERZ18	NR
IATR68	NR	HAUR01	2,71	AHAR81	1,65	IAIR93	A
IACR43	NR	ANTR84	2,75	AAUO80	0,286	HARR90	1,38
HETL96	1,44	ALAR69	1,67	AASR27	0,154	EAEH89	NR
AYAN61	2,41	AACR82	2,42	AAOL98	1,20	ANUR29	1,25
ASRK70	0,664	AAAR60	1,09	AAEH45	NR	AAOM39	1,06
MW	1,47	MW	1,97	MW	1,07	MW	1,202
s	0,718	s	0,756	s	0,694	s	0,383
SEM	0,359	SEM	0,286	SEM	0,283	SEM	0,145

CCR1 (CON_{t1}/CON_{t0}) – ausreißerbereinigte Werte (Nalimov-Test); angegeben sind die Werte der Gruppe der „Responder“ auf PG-LPS; NR= „Non-Responder“, A = Ausreißer

Kontrollzahnpaste		MBE-Kaugummi		Kontrollkaugummi		Colgate total®	
USCR04	2,62	VARL28	NR	UAIN87	NR	UEAT08	1,77
OARZ85	NR	OKMH91	NR	RRIE24	NR	UAWD94	1,99
LRRZ54	NR	OAUD63	NR	RAAR17	NR	UAUS42	NR
LAHT77	NR	NNOK71	0,937	OTAR09	0,563	SDAR33	NR
IETR03	1,96	LNUR19	1,84	OAER14	2,43	LERZ18	0,201
IATR68	NR	HAUR01	2,23	AHAR81	NR	IAIR93	A
IACR43	0,708	ANTR84	1,78	AAUO80	NR	HARR90	NR
HETL96	1,64	ALAR69	NR	AASR27	NR	EAEH89	2,76
AYAN61	1,33	AACR82	NR	AAOL98	1,03	ANUR29	NR
ASRK70	0,910	AAAR60	NR	AAEH45	NR	AAOM39	NR
MW	1,53	MW	1,70	MW	1,34	MW	1,68
s	0,706	s	0,544	s	0,97	s	1,07
SEM	0,288	SEM	0,272	SEM	0,562	SEM	0,537

Einfluss der zweiwöchigen Interventionsphase auf die durch LPS ausgelöste Reaktion

IL-1 α (LPS/CON t1 – LPS/CON t0) - ausreißerbereingte Werte (Nalimov-Test); angegeben sind die Werte der Gruppe der „Responder“ auf PG-LPS; NR= „Non-Responder“, A = Ausreißer

Kontrollzahnpaste		MBE-Kaugummi		Kontrollkaugummi		Colgate total®	
USCR0404	-0,514	VARL28	-0,381	UAIN87	-1,04	UEAT08	NR
IETR03	-0,437	OKMH91	NR	RAAR17	-0,368	UAWD94	NR
OARZ85	NR	OAUD63	NR	RRIE24	A	UAUS4242	-0,493
LRRZ54	NR	NNOK71	NR	AAEH45	-0,614	SDAR33	NR
LAHT77	A	LNUR19	-0,298	AAOL98	NR	LERZ18	NR
IATR68	0,0331	HAUR0101	-0,741	AASR27	NR	IAIR93	NR
HETL96	-1,02	ANTR84	-0,216	OTAR0909	-0,989	HARR90	NR
AYAN61	NR	ALAR69	NR	AAUO80	-0,862	EAEH89	NR
ASRK70	NR	AACR82	NR	AHAR81	NR	ANUR29	A
IACR43	-0,58	AAAR60	-0,556	OAER14	-0,591	AAOM39	-0,481
MW	-0,504	MW	-0,438	MW	-0,744	MW	-0,487
s	0,375	s	0,211	s	0,262	s	0,009
SEM	0,168	SEM	0,0942	SEM	0,107	SEM	0,006

IL-1 β (LPS/CON t1 – LPS/CON t0) - ausreißerbereingte Werte (Nalimov-Test); angegeben sind die Werte der Gruppe der „Responder“ auf PG-LPS; NR= „Non-Responder“, A = Ausreißer

Kontrollzahnpaste		MBE-Kaugummi		Kontrollkaugummi		Colgate total®	
USCR04	-0,281	VARL28	-0,372	UAIN87	-0,509	UEAT08	NR
OARZ85	NR	OKMH91	-0,699	RRIE24	-0,190	UAWD94	0,187
LRRZ54	NR	OAUD63	NR	RAAR17	A	UAUS42	-0,122
LAHT77	NR	NNOK71	NR	OTAR09	-0,408	SDAR33	NR
IETR03	-0,025	LNUR19	-0,424	OAER14	A	LERZ18	1,54
IATR68	NR	HAUR01	A	AHAR81	NR	IAIR93	NR
IACR43	0,198	ANTR84	-0,157	AAUO80	-1,14	HARR90	NR
HETL96	-0,445	ALAR69	NR	AASR27	NR	EAEH89	-1,66
AYAN61	-0,788	AACR82	0,0658	AAOL98	-0,242	ANUR29	A
ASRK70	0,158	AAAR60	NR	AAEH45	-0,265	AAOM39	1,95
MW	-0,197	MW	-0,317	MW	-0,458	MW	0,378
s	0,382	s	0,288	s	0,352	s	1,44
SEM	0,156	SEM	0,129	SEM	0,144	SEM	0,642

IL-8 (LPS/CON t1 – LPS/CON t0) - ausreißerbereinigte Werte (Nalimov-Test); angegeben sind die Werte der Gruppe der „Responder“ auf PG-LPS; NR= „Non-Responder“, A = Ausreißer

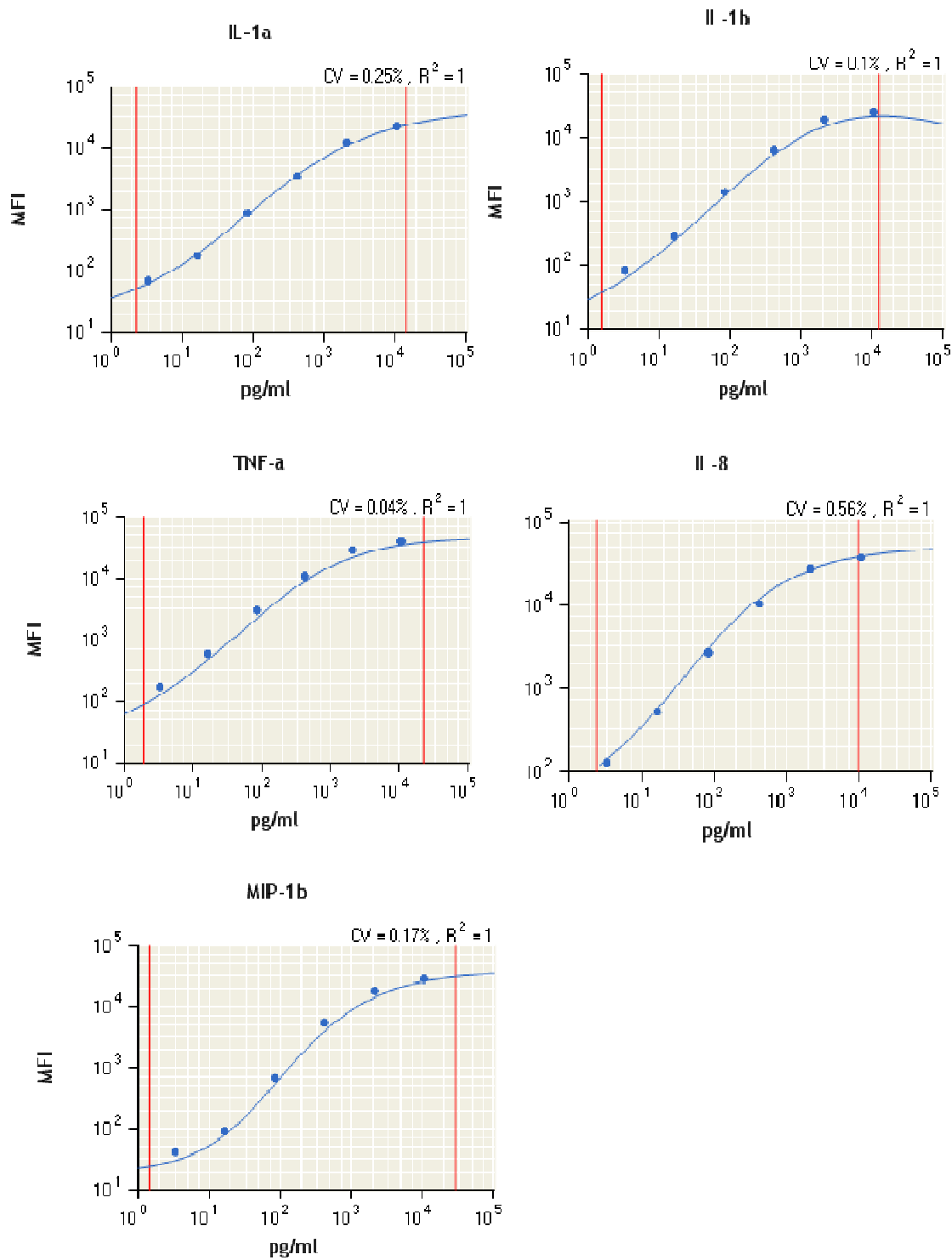
Kontrollzahnpaste		MBE-Kaugummi		Kontrollkaugummi		Colgate total®	
USCR04	-0,554	VARL28	-0,444	UAIN87	NR	UEAT08	0,0844
OARZ85	NR	OKMH91	-1,17	RRIE24	NR	UAWD94	1,00
LRRZ54	NR	OAUD63	-0,240	RAAR17	0,003	UAUS42	-0,292
LAHT77	NR	NNOK71	NR	OTAR09	-0,181	SDAR33	-0,172
IETR03	NR	LNUR19	NR	OAER14	A	LERZ18	NR
IATR68	NR	HAUR01	-0,273	AHAR81	-0,795	IAIR93	1,99
IACR43	NR	ANTR84	-1,58	AAUO80	0,004	HARR90	1,54
HETL96	-0,701	ALAR69	-0,318	AASR27	A	EAEH89	NR
AYAN61	-0,230	AACR82	-1,08	AAOL98	-0,563	ANUR29	-0,586
ASRK70	0,0527	AAAR60	0,229	AAEH45	NR	AAOM39	-0,0858
MW	-0,358	MW	-0,610	MW	-0,308	MW	0,435
s	0,337	s	0,603	s	0,356	s	0,949
SEM	0,169	SEM	0,213	SEM	0,159	SEM	0,335

CCR1 (LPS/CON t1 – LPS/CON t0) - ausreißerbereinigte Werte (Nalimov-Test); angegeben sind die Werte der Gruppe der „Responder“ auf PG-LPS; NR= „Non-Responder“, A = Ausreißer

Kontrollzahnpaste		MBE-Kaugummi		Kontrollkaugummi		Colgate total®	
USCR04	-2,14	VARL28	NR	UAIN87	NR	UEAT08	-1,15
OARZ85	NR	OKMH91	NR	RRIE24	NR	UAWD94	-0,638
LRRZ54	NR	OAUD63	NR	RAAR17	NR	UAUS42	NR
LAHT77	NR	NNOK71	0,234	OTAR09	-0,402	SDAR33	NR
IETR03	-0,517	LNUR19	0,251	OAER14	-2,83	LERZ18	-0,258
IATR68	NR	HAUR01	-1,40	AHAR81	NR	IAIR93	-0,809
IACR43	0,0729	ANTR84	-1,27	AAUO80	NR	HARR90	NR
HETL96	-1,02	ALAR69	NR	AASR27	NR	EAEH89	-0,444
AYAN61	-0,860	AACR82	NR	AAOL98	-0,438	ANUR29	NR
ASRK70	0,520	AAAR60	NR	AAEH45	NR	AAOM39	NR
MW	-0,657	MW	-0,548	MW	-1,22	MW	-0,660
s	0,928	s	0,915	s	1,39	s	0,344
SEM	0,379	SEM	0,457	SEM	0,803	SEM	0,154

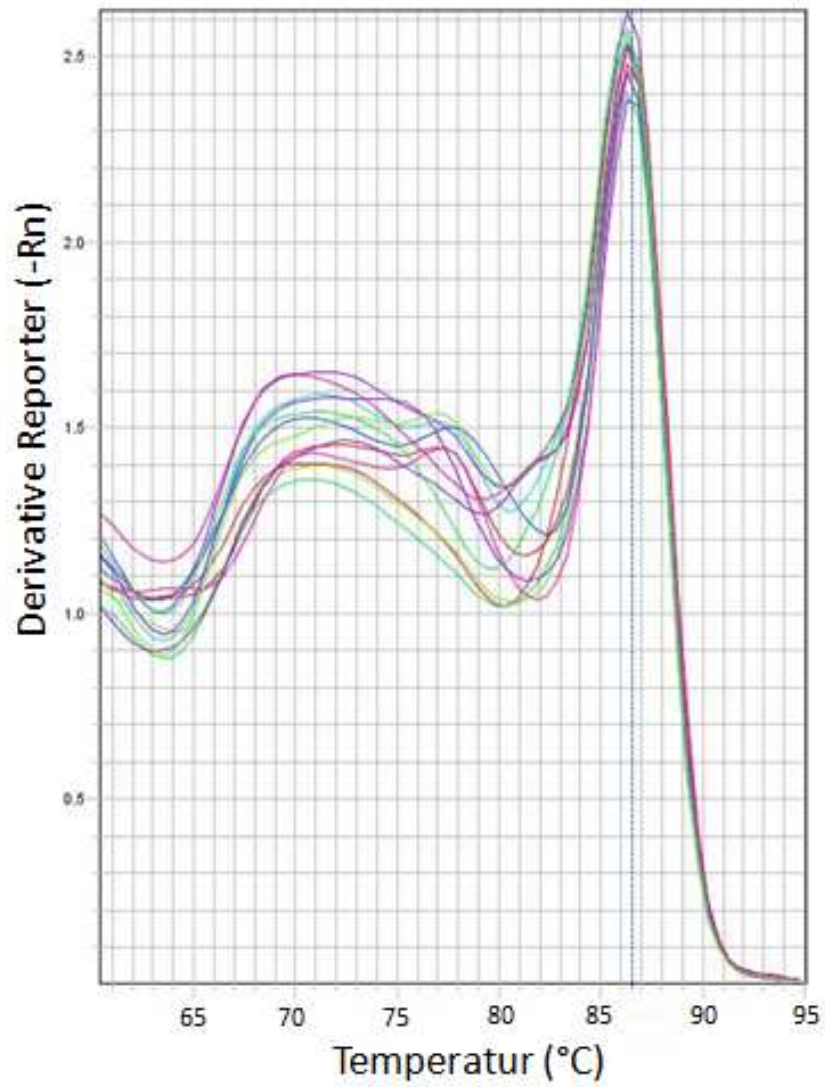
9.2. Graphen und Kurven

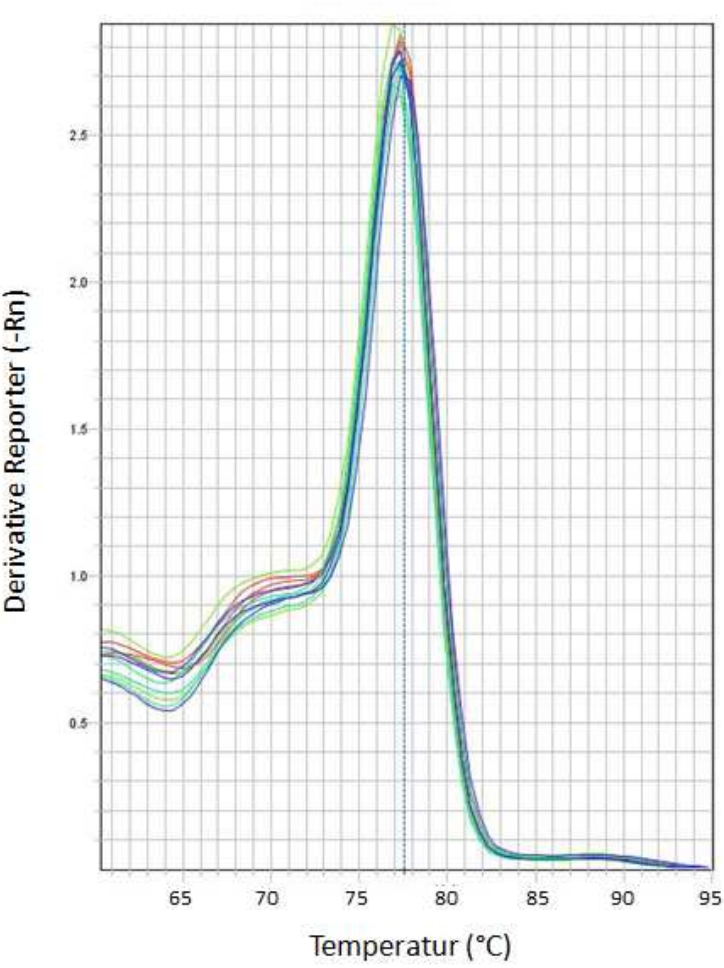
Standardkurven bei der Messung der Zytokin-Ausschüttung mittels Luminex-Technologie



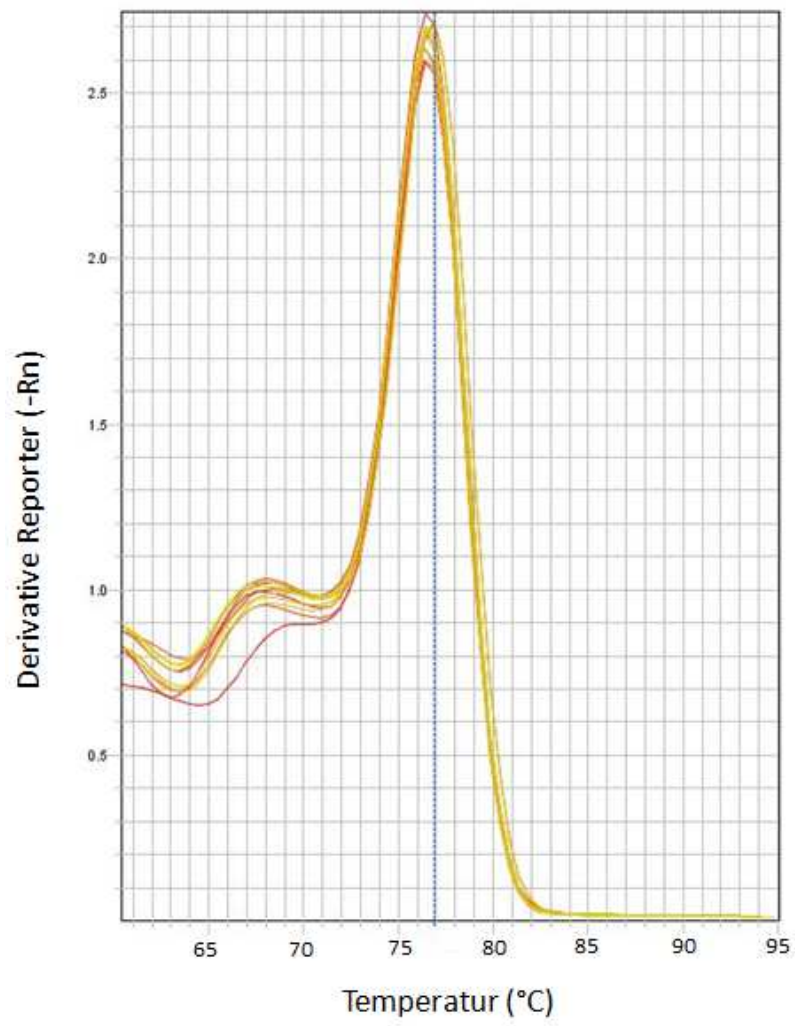
Schmelzkurven der PCR-Produkte:

β -Aktin

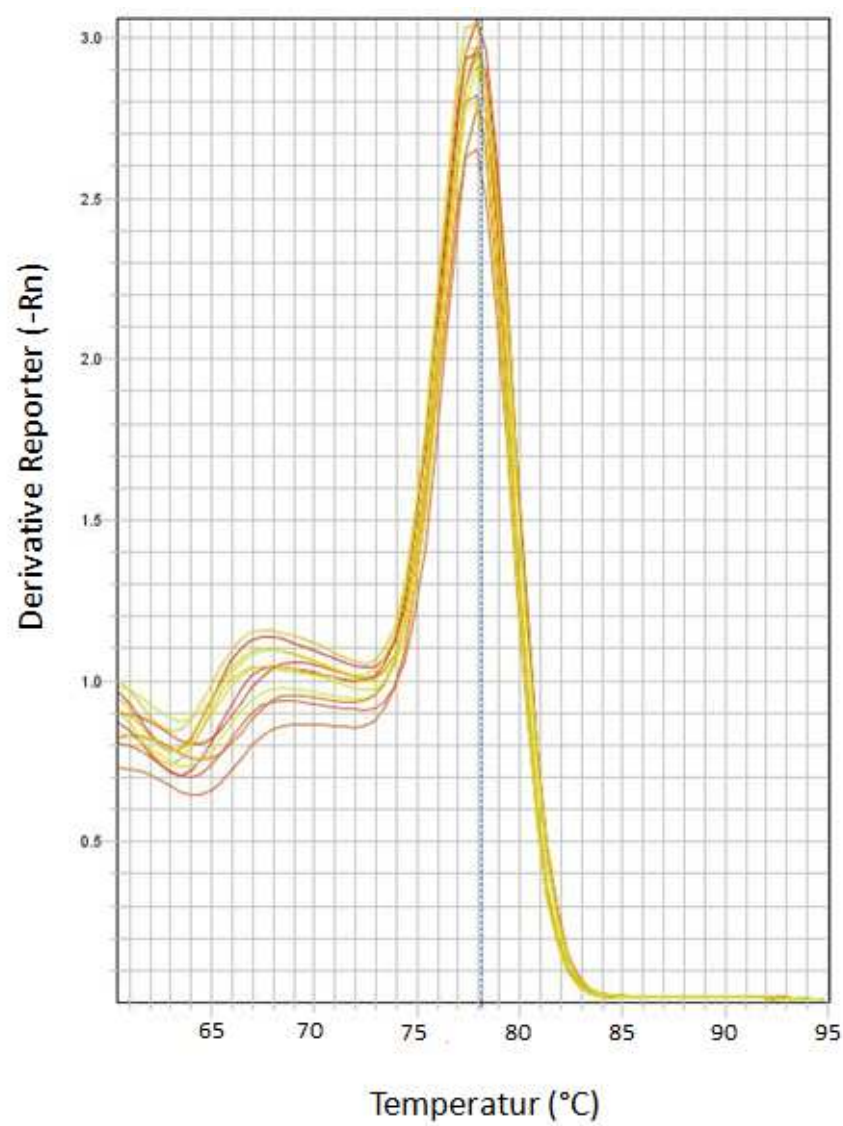




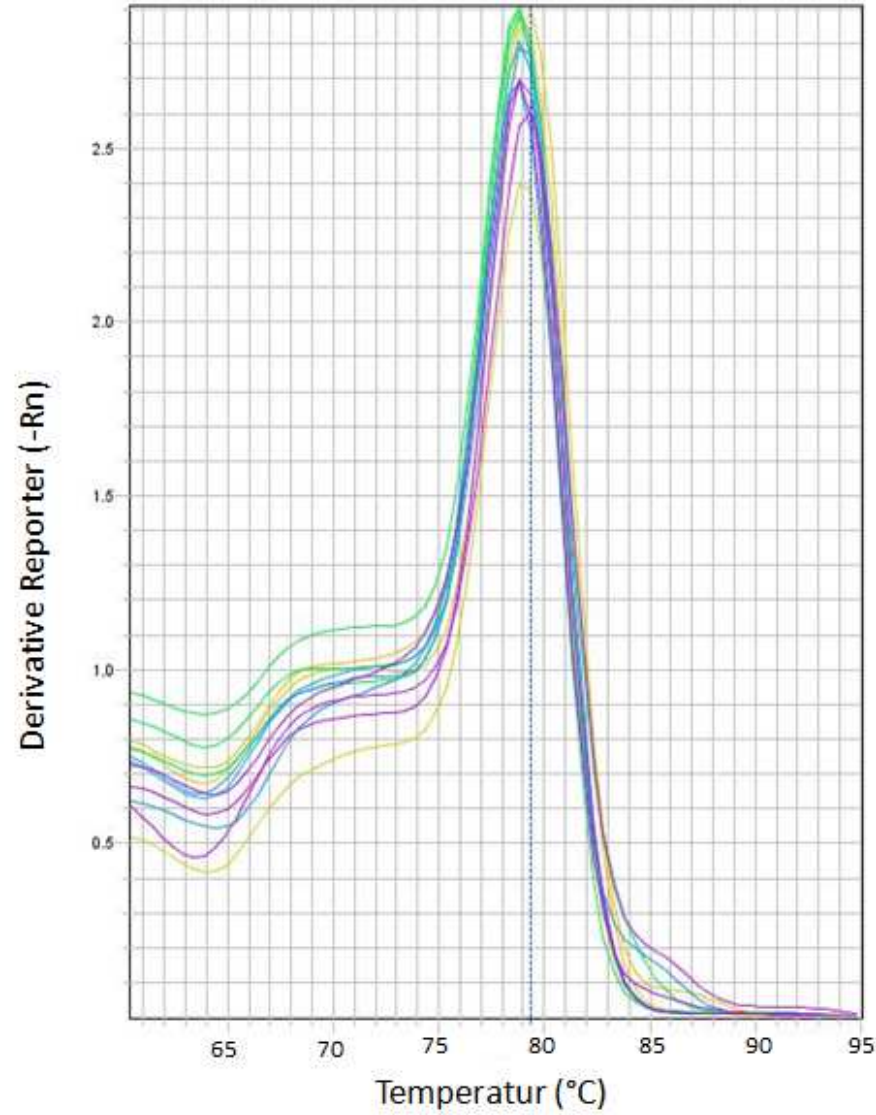
IL-1 α



IL-1 β



CCR1



Probanden/-innen-Information und Einwilligungserklärung

zur Teilnahme an der Studie

Humane Interventionsstudie: Bestimmung der anti-inflammatorischen und anti-oxidativen Marker nach Kauen eines mit 0,1 % Magnolienrindenextrakts-angereicherten Kaugummis

Sehr geehrte Probandin, sehr geehrter Proband,
wir möchten Sie einladen, an der oben genannten Studie teilzunehmen. Die Aufklärung darüber erfolgt durch unsere Mitarbeiter/-innen.

Ihre Teilnahme an dieser Studie erfolgt freiwillig. Sie können jederzeit ohne Angabe von Gründen aus der Studie ausscheiden. Die Ablehnung der Teilnahme oder ein vorzeitiges Ausscheiden aus dieser Studie hat keine nachteiligen Folgen.

Studien wie diese sind unabdingbar, um neue Forschungsergebnisse zu gewinnen und zu validieren. Die wichtigste Voraussetzung für die Durchführung einer Studie ist, dass Sie schriftlich Ihr Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie erklären. Bitte lesen Sie dazu den folgenden Text als Ergänzung zum Informationsgespräch sorgfältig durch und zögern Sie nicht, Fragen zu stellen.

Unterschreiben Sie die Einwilligungserklärung bitte ausschließlich

- wenn Sie den Ablauf und die Art der Studie vollständig verstanden haben,
- wenn Sie bereit sind, der Teilnahme zuzustimmen und
- wenn Sie sich über Ihre Rechte als Proband/-in an dieser Studie im Klaren sind.

Zu dieser Studie, sowie zur Probanden/-innen-Information und Einwilligungserklärung, wurde von der zuständigen Ethikkommission eine befürwortende Stellungnahme abgegeben.

1 Zahnfleischentzündungen und Parodontitis

Zahnfleischentzündungen und Parodontitis zählen zu den Zahnerkrankungen, bei denen Infektionen und Entzündungen unter anderem das Zahnfleisch und damit das Stützgewebe der Zähne zerstören. Eine Zahnfleischentzündung ist eine Langzeitfolge von Plaqueablagerungen auf den Zähnen. Diese Plaques bestehen aus Speiseresten, Schleim und Bakterien. Die Bakterien und die Giftstoffe, die diese produzieren, können das Zahnfleisch angreifen wodurch es sich entzündet, anschwillt und empfindlich wird. Besonders anfällig sind Stellen des Zahnfleisches, die verletzt wurden. Zu den Symptomen von Zahnfleischentzündungen zählen Zahnfleischbluten, rot oder rot-violette Verfärbungen des Zahnfleisches, sensitives und geschwollenes Zahnfleisch.

Bleiben Zahnfleischentzündungen unbehandelt droht eine Parodontitis. Dies bedeutet, dass die Entzündungen und Infektionen vom Zahnfleisch auf die Knochen und Sehnen übergreifen. Der Verlust der Stabilität des Zahns, der dadurch entsteht, kann zur Folge haben, dass der Zahn sich lockert und sogar ausfällt. Bei einer Parodontitis lagern sich die Plaques im Zahnzwischenraum am Übergang zwischen Zahn und Zahnfleisch ab und durch die hervorgerufene Entzündung und der damit verbundenen Abwehrreaktion des Körpers entsteht eine Tasche zwischen diesen, in der sich wiederum Plaque ansammeln kann. Während das Zahnfleisch über der Tasche anschwillt können im Inneren weitere Entzündungen das Gewebe und den Zahnknochen zerstören. Die zusätzlichen Symptome im Vergleich zur Zahnfleischentzündung sind Mundgeruch, lockere Zähne und Zahnverlust.

Ziel einer Behandlung beider Krankheitsbilder ist die Reduzierung von Entzündungen. Die Zähne müssen gründlich gereinigt werden und die tägliche Mundhygiene muss eingehalten werden. Sie können Zahnfleischentzündungen vorbeugen indem Sie die tägliche Mundhygiene gründlich durchführen und dabei mit Zahnbürste, speziellen Zahnstochern, Zahnseide, Mundwässern oder anderen Hilfsmitteln ihre Zähne pflegen. Dabei erfreuen sich Zahnpflegekaugummi immer größerer Beliebtheit, vor allem weil Sie auch unterwegs nach einem kleinen Snack leicht anwendbar sind. Das Ziel solcher Kaugummi ist es, den Säuregehalt im Speichel zu neutralisieren und damit den Bakterien die Nahrung zu entziehen. Zahnpflegekaugummi dienen vorwiegend der Kariesprophylaxe. Um Zahnfleischentzündungen mit Kaugummi vorzubeugen, wäre es von Nöten, diese mit anti-bakteriell wirksamen oder entzündungshemmenden Substanzen anzureichern.

2 Pflanzenextrakte

Pflanzenextrakte sind aus Kräutern oder (Heil-)Pflanzen durch Extraktion und Trocknung gewonnene Pulver, die die Wirkstoffe der jeweiligen Pflanzen enthalten. Der Vorteil von Extrakten ist ihre längere Haltbarkeit und das geringere Volumen im Vergleich mit den Originalpflanzen, was auch die Transportkosten senkt. Pflanzenextrakte finden Anwendungen im Bereich der Medizin und in der Kosmetikindustrie. Sie werden entweder als Kapseln direkt oder als Zusätze zu Cremes, Zahnpasten, Shampoos, etc. in den Handel gebracht.

3 Vorstudien zur Bestimmung von Entzündungsmarkern in Zahnfleischzellen

In einer Studie an kultivierten Zahnfleischzellen konnte durch unsere Mitarbeiter gezeigt werden, dass Pflanzenextrakte Entzündungsmarker, wie die entzündungsfördernden Marker IL-6 und IL-8 reduzieren können. Verschiedene Extrakte wurden auf ihre Fähigkeit getestet, Entzündungsreaktionen der Zellen vorzubeugen, wenn diese einem bakteriellen Giftstoff ausgesetzt wurden. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen der Extrakte auf ihre Wirksamkeit untersucht. Gleichzeitig wurde überprüft, ob die Extrakte eine schädigende Wirkung auf die Zellen hatten. Keiner der getesteten Extrakte zeigte in keiner der getesteten Konzentrationen eine zellschädigende Wirkung. Einer der getesteten Extrakte soll nun im Rahmen dieser Studie weiter untersucht werden.

In einem Vorversuch wurde einer unserer Mitarbeiterinnen das Zahnfleisch abgebürstet und die so gewonnenen Zahnfleischzellen dann in der Zellkultur mit einem bakteriellen Toxin für 6 und 24 h behandelt. Im Zellkulturüberstand konnten anschließend Entzündungsmarker gemessen werden und die Zellen wurden auf oxidativen Stress untersucht. Oxidativer Stress ist ein Überbegriff, der die Schädigung der Zellen durch sogenannte oxidative Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies (ROS, „freie Radikale“) bezeichnet. Die Folgen von oxidativem Stress

sind vielfältig und führen unter anderem zu Verlust der Zellfunktion, Mutationen und Zelltod. Die Zellen haben Abwehrmechanismen, wie z.B. die anti-oxidativ wirksamen Enzyme Katalase und Superoxiddismutase. In dieser Vorstudie konnte gezeigt werden, dass durch das Kaugummikauen der oxidative Stress und auch die Interleukinfreisetzung gesenkt werden können.

Die Mitarbeiterin, der die Zellen entnommen wurden beschrieb das Gefühl nach der Entnahme der Zellen als vergleichbar mit einem intensiven Zähneputzen. Wenige Stunden nach der Zellentnahme war nichts mehr spürbar am Zahnfleisch.

4 Der Zweck der Studie

Mit Hilfe dieser Studie sollen folgende Fragen geklärt werden:

- ✓ Hat ein Kaugummi, der mit einem Pflanzenextrakt angereichert wurde, eine entzündungshemmende Wirkung im Vergleich zu einem Kaugummi ohne Pflanzenextrakt bzw. im Vergleich zu einer regulären Zahnpasta und einer speziellen anti-bakteriellen Zahnpasta?
- ✓ Kann der Pflanzenextrakt in dem Kaugummi vor oxidativem Stress in Zahnfleischzellen schützen bzw. diesen verringern?

5 Wie läuft die Studie ab?

Als Proband oder Probandin werden Sie zunächst über die Studie von unseren Mitarbeitern aufgeklärt. Vor Beginn der Studie müssen die Probandinnen einen Schwangerschaftstest durchführen. Anschließend werden Sie zufällig einer von vier Studiengruppen zugeteilt. Dabei besteht eine 25 %ige Chance der Zuordnung eines Probanden/einer Probandin für jede der unten aufgeführten Gruppen. Der Proband/die Probandin wird unabhängig vom Zeitpunkt der Rekrutierung zufällig einer der vier Gruppen zugeordnet.

Gruppe 1: Kontrollgruppe – erhält eine reguläre Zahnpasta ohne anti-bakterielle oder Pflanzenextraktzusätze

Gruppe 2: Kontrollkaugummigruppe – erhält 140 Kaugummis, die nicht mit Pflanzenextrakt angereichert wurden und eine reguläre Zahnpasta

Gruppe 3: Kaugummigruppe – erhält 140 Kaugummis, die mit Pflanzenextrakt angereichert wurden und eine reguläre Zahnpasta

Gruppe 4: Positivkontrollgruppe – erhält eine anti-bakterielle Zahnpasta (Colgate total)

Zuerst werden die Probanden zu einem Termin mit einer Zahnärztin gebeten, wobei mit verschiedenen Tests (Bestimmung des Plaqueindexes, Blutungsindexes, der Bakterienarten und des Parodontitisstatus') die Mundgesundheit und eine evtl. vorliegende Kiefergelenksproblematik ermittelt werden soll.

Bei einem weiteren Besuch wird das Zahnfleisch des Probanden/der Probandin nun mit einer sterilen Bürste abgebürstet. Die Zellen, die an der Bürste heften bleiben, dienen zur Bestimmung des Grundlevels an Entzündungsmarkern und oxidativem Stress.

Der Proband/die Probandin erhält Anweisung zur Verwendung der Zahnpasta und der Kaugummis von den Mitarbeitern der Studie. Mit der Zahnpasta sollen sich die Probanden wie gewohnt, 2-3-mal täglich gründlich die Zähne putzen. Die Proband/innen der Kaugummigruppen werden instruiert, täglich fünfmal zwei Kaugummis zu kauen. Nach 14 Tagen kommen die Proband/innen zu einem zweiten Besuch an unser Institut. Es werden erneut Zahnfleischzellen mit einer sterilen Bürste aus dem Mund entnommen. Diese Zellen dienen zur Analyse der Entzündungsmarker und des oxidativen Stresses zu Studienende. Zum Test der Kurzzeitwirkung werden einigen Proband/innen noch einmal zwei Kaugummis verabreicht. Nach dem Kauen dieses werden erneut Zellen aus dem Mund des Probanden/ der Probandin entnommen. Nach Beendigung der zwei Wochen werden die ProbandInnen ein zweites Mal zahnärztlich untersucht.

Die entnommenen Zellen werden in Kulturmedium aufgenommen und in einem Inkubator mit und ohne Toxin für 6 Stunden behandelt. Danach wird der Zellkulturüberstand für die Analysen der Entzündungsmarker eingesetzt oder bis zur jeweiligen Analyse eingefroren.

Die Zellen werden direkt nach der Inkubation auf die Anwesenheit von ROS und DNA-Schäden untersucht. Außerdem wird die Aktivität der anti-oxidativ wirksamen Enzyme bestimmt.

6 Worin liegt der Nutzen einer Teilnahme an der Studie?

Durch diese Studie erhalten Sie die Möglichkeit, Ihr Risiko an Zahnfleiscentzündungen und Parodontitis zu erkranken, besser einzuschätzen und gegebenenfalls Veränderungen in Ihrem täglichen Ritual zur Zahnpflege vorzunehmen.

Des Weiteren bietet Ihnen diese Studie, neue Möglichkeiten zur Zahnpflege kennenzulernen und die auf dem Markt befindlichen Produkte besser verstehen zu lernen. Ein Zahnarzt wird Sie im Rahmen der Studie untersuchen und Sie über geeignete Methoden zur Zahnpflege aufklären können.

Sie haben nach Abschluss der Studie die Möglichkeit die Ergebnisse Ihres Tests zu erhalten.

Über Ihren persönlichen Nutzen hinaus bietet diese Studie einen wichtigen Erkenntnisgewinn hinsichtlich der möglichen positiven Wirkung von Pflanzenextrakten als Zusätze zu Kaugummis zur Vorbeugung von Zahnfleiscentzündungen und **Parodontitis**.

7 Risiken, Beschwerden und Begleiterscheinungen

Es werden mit einer sterilen Bürste Zellen aus dem Mund der Probanden entnommen. Dieser Vorgang kann sich wie ein leichtes Kratzen mit einer Zahnbürste anfüllen. Das Gefühl kann nach der Entnahme noch für etwa eine Stunde anhalten. Das Zahnfleisch regeneriert sich schnell und die Probanden werden durch die Zellentnahme keine weiteren Beschwerden haben.

Das Putzen der Zähne mit einer Zahnpasta mit oder ohne Zusatz von anti-bakteriellen Wirkstoffen stellt kein Risiko für die Proband/innen dar und sollte Teil der täglichen Routine der Zahnpflege sein. Das Kauen von zehn Kaugummis pro Tag über einen Zeitraum von 14 Tagen ist als unbedenklich einzustufen und liegt beispielsweise unter den Empfehlungen bei der Rauchentwöhnung mit Nikotinkaugummis (8 bis 12 Kaugummis pro Tag).

Es wurde bei der Zurich Versicherungs-AG, Schwarzenbergplatz 15, A-1010 Wien, eine Personenschadenversicherung abgeschlossen mit der sich die Prüfer für den Fall versichern, dass die Probanden durch die geplante Studie einen gesundheitlichen Schaden erleiden. Die Versicherungsdauer erstreckt sich vom 05. Februar 2012 bis zum 01. März 2013, jeweils 0Uhr.

Die Polizze hat die Nummer 07247587-9. Schadenshotline: **050 1255 1255**.

8 In welcher Weise werden die im Rahmen dieser Studie gesammelten Daten verwendet?

Nur der Prüfer und deren Mitarbeiter/-innen werden Zugang zu den vertraulichen Daten haben, in denen Sie namentlich genannt werden. Diese Personen unterliegen der Schweigepflicht.

Zur Analyse der Daten, die statistische Auswertung sowie eventuelle Veröffentlichung der Untersuchungsergebnisse werden Ihre persönlichen Daten verschlüsselt. In die Decodierungsliste hat nur die Prüfungsleitung Einsicht. Sie werden also bei der Weitergabe der Daten niemals namentlich erwähnt.

9 Entstehen für die ProbandInnen Kosten? Gibt es einen Kostenersatz oder eine Vergütung?

Für die Probanden/Probandinnen dieser Studie entstehen keine zusätzlichen Kosten. Sie erhalten bei Abschluss der Studie (bei dem zweiten Besuch, 14 Tage nach dem ersten Besuch) 100 € Aufwandsentschädigung. Zudem werden die Studienzahnpasta und die Studienkaugummis kostenlos zur Verfügung gestellt.

10 Haben Sie weitere Fragen?

Für weitere Fragen im Zusammenhang mit dieser Studie stehen Ihnen die Mitarbeiter der Studie und die Projektleitung gern zur Verfügung. Auch Fragen, die Ihre Rechte als Proband/-in an dieser Studie betreffen, werden Ihnen gerne beantwortet.

Projektleitung:	Univ.-Prof. Dr. Veronika Somoza
Telefon:	01 4277 70601
E-Mail:	veronika.somoza@univie.ac.at

Projektbetreuung:	Joel Michael Walker, PhD
E-Mail:	joel.michael.walker@univie.ac.at

	Dr. Jessica Walker
Telefon:	01 4277 70611
E-Mail:	jessica.walker@univie.ac.at

11 Einwilligungserklärung

Name des Probanden bzw. der Probandin:

.....
(in Druckbuchstaben)

Geb.Datum: Code:.....

Ich erkläre mich bereit, an der Humanen Interventionsstudie: „Bestimmung der anti-inflammatorischen und anti-oxidativen Marker nach Kauen eines mit 0,1 % Magnolienrindenextrakts-angereicherten Kaugummis“ teilzunehmen.

Ich bin von Herrn/Frau ausführlich und verständlich über mögliche Risiken, sowie über Art und Bedeutung der Studie und sich für mich daraus ergebenden Anforderungen aufgeklärt worden. Ich habe darüber hinaus den Text dieser ProbandInnen-Information und Einwilligungserklärung, die insgesamt 6 Seiten umfasst gelesen. Aufgetretene Fragen wurden mir von den Mitarbeiter/-innen der Studie verständlich und genügend beantwortet. Ich hatte ausreichend Zeit, mich zu entscheiden.

Ich habe zurzeit keine weiteren Fragen mehr.

Ich werde den Anordnungen, die für die Durchführung der Studie erforderlich sind, Folge leisten, behalte mir jedoch das Recht vor, meine freiwillige Mitwirkung jederzeit zu beenden.

Ich bin zugleich damit einverstanden, dass meine im Rahmen dieser Studie ermittelten Daten aufgezeichnet werden. Um die Richtigkeit der Datenaufzeichnung zu überprüfen, dürfen Beauftragte des Auftraggebers und der zuständigen Behörden beim Prüfungsleiter Einblick in meine personenbezogenen Studienergebnisse nehmen.

Beim Umgang mit den Daten werden die Bestimmungen des Datenschutzgesetzes beachtet.

Eine Kopie dieser ProbandInnen-Information und Einwilligungserklärung habe ich erhalten. Das Original verbleibt bei der Studienleitung.

.....
(Datum und Unterschrift der Probandin bzw. des Probanden)

.....
(Datum, Name und Unterschrift des Studienbetreuers)

Zahnärztlicher Prüfbogen

Name:

Datum:

Zahnarzt:

Medizinische Universität Wien
Bernhard Gottlieb Universitätsklinik
Parodontologie und Prophylaxe

Leitungsasse. Dr.
1090 Vienna
Austria

Plaqueindex

- ☐ < 20: optimale Mundhygiene
- ☐ 20 - 39: gute Mundhygiene
- ☐ 40 - 69: mäßige Mundhygiene
- ☐ 70 - 100: unzureichende Mundhygiene

Parodontaler Screening Index

- ☐ 0: keine Entzündungen vorhanden
- ☐ 1: leichte Gingivitis
- ☐ 2: mittlere bis schwere Gingivitis
- ☐ 3: leichte Parodontitis
- ☐ 4: schwere Parodontitis

Kiefergelenkproblematik

- ☐ keine Kiefergelenkproblematik
- ☐ leichte Kiefergelenkproblematik
- ☐ schwere Kiefergelenkproblematik

Blutungsindex

- ☐ 0: keine Blutung
- ☐ 1: ein Blutungspunkt
- ☐ 2: mehrere Blutungspunkte, schmaler Blutungsband
- ☐ 3: Blut im interdentalen Driaseck
- ☐ 4: massive Blutung

Kommentare:

Bakterien

- ☐ Porphyromonas gingivalis
- ☐ Actinobacillus actinomycetemcomitans
- ☐ Streptococcus constellatus
- ☐ Streptococcus intermedius-anginosus
- ☐ Campylobacter rectus
- ☐ Fusobacterium nucleatum
- ☐ Staphylococcus aureus
- ☐ Candida species
- ☐ andere:
- ☐ andere:
- ☐ andere:
- ☐ andere:

Datum:

Unterschrift des
Zahnarztes:

Cons. form sign.		Volunteer ID	
Date of birth		Gender of birth ☐ male ☐ female	
Smoker	☐ yes ☐ no		
Medications	☐ yes ☐ no	Which?	
Pregnant/breast feeding	☐ yes ☐ no		
Addiction to alcohol	☐ yes ☐ no		
Addiction to drugs	☐ yes ☐ no		
General health	☐ good ☐ medium ☐ bad		
Last sickness	☐ last week ☐ last month ☐ two or more months ago		
☐ Dentist approval			
Date 1st visit		Time 1st visit	
Date 2nd visit		Time 2nd visit	
Date 3rd visit		Time 3rd visit	
Test group	☐ 1) Control tooth paste ☐ 2) Control gum ☐ 3) Test gum ☐ 4) Positive control tooth paste		
Quality control: Groups 1) and 4) weight of tooth paste tube, Groups 2) and 3) number of chewing gums handed out and packaging brought back			
Day 1			
Day 7			
Day 14			

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Julia Maria Imböck
geboren am	11.02.1989
geboren in	Wels, Oberösterreich
Staatsbürgerschaft	Österreich

Bildungsweg:

seit 04/2013	Bearbeitung der Masterarbeit; Forschungstätigkeit an der Universität Wien am Institut für Ernährungsphysiologie und Physiologische Chemie
seit 10/2010	Master Ernährungswissenschaften Masterzweig: Lebensmittelqualität und Lebensmittelsicherheit
2010	Abschluss Bakkalaureatsstudium Ernährungswissenschaften
seit 2007	Studium „Ernährungswissenschaften“ an der Universität Wien
2007-2011	Studium „Psychologie“ an der Universität Wien
1999-2007	Gymnasium Brucknerstraße, Wels; Abschluss mit Matura

Berufliche Erfahrung:

Praktika:

07/2011-09/2011	Firma Prolactal mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln, Laborantin
08/2010-09/2010	Klinikum Wels - Grieskirchen Abteilung Ernährungsberatung; Diabetikerschulung