

Abschlussbericht zum Projekt

*„Untersuchung der antibakteriellen Eigenschaften des Präparates
Parodont Creme[®]“*

Bearbeiter:

Dr. Nico Stumpp, Marly Dalton

Wissenschaftliche Gesamtleitung:

Prof. Dr. Meike Stiesch

Projektleiter:

Dr. Nico Stumpp

.....

Datum

Unterschrift (Projektleiter)

1 Allgemeine Angaben

Projekttitle

Untersuchung der antibakteriellen Eigenschaften des Präparates Parodont Creme®

Auftraggeberin des Studienvorhabens

seed & speed GmbH

Hindenburgstr. 42

30175 Hannover

Ausführendes Institut/Lehrstuhl

Klinik für Zahnärztliche Prothetik und Biomedizinische Werkstoffkunde

Medizinische Hochschule Hannover

Carl-Neuberg-Str. 1

30625 Hannover

Tel.: 0511/532-4773, Fax: 0511/532-4790

Berichtszeitraum

26.06.2017 – 10.08.2017

2 Arbeits- und Ergebnisbericht

2.1 Einleitung

Die menschliche Mundflora setzt sich aus mehr als 700 verschiedenen Bakterienspezies zusammen und ist damit neben dem Verdauungstrakt das Habitat mit der größten bakteriellen Diversität im menschlichen Körper. In der Mundhöhle bilden die Bakterien komplex strukturierte Biofilmgemeinschaften auf Hart- und Weichgeweben aus, die auch als orale Plaque bezeichnet werden. Diese Biofilme können Auslöser lokaler und systemischer Infektionen im menschlichen Körper sein, die schwerwiegende und z. T. lebensbedrohliche Komplikationen zur Folge haben. Aufgrund besonderer phänotypischer Eigenschaften der Biofilme sowie der speziellen metabolischen Anpassung von in Biofilmen lebenden Bakterien können mit medikamentösen Therapien oftmals nur unzureichende Behandlungserfolge erzielt werden. Ein wesentliches Merkmal der Biofilme ist die sie umgebende Polymermatrix – diese besteht aus Proteinen, DNA und/oder Polysacchariden und wird durch bakterielle Sekretion gebildet. Die Polymerschicht stellt eine wirkungsvolle (Diffusions-) Barriere dar und verhindert eine effektive Immunantwort des Wirts sowie das Eindringen antibakterieller Wirkstoffe in den Biofilm. Eine nachhaltige Schädigung der Gemeinschaft bleibt somit aus. Eine wichtige Präventionsmaßnahme ist die Aufrechterhaltung einer gesunden oralen Mikroflora, welche der Ausbildung pathogener Biofilmgemeinschaften und der Entstehung entzündlicher Prozesse entgegenwirkt. Tägliches Zähneputzen, sowie die Verwendung antibakterieller Pflegeprodukte unterstützen diesen Prozess und sind entscheidend für eine langanhaltende und nachhaltige Mundgesundheit.

Bei dem Präparat Parodont Creme® handelt es sich um ein kosmetisches Pflegeprodukt zur lokalen Anwendung im Mundraum. Die Salbe findet Anwendung als unterstützende therapeutische Maßnahme bei Vorliegen entzündlichen Erkrankungen sowie in der täglichen Mundhygiene. Hauptwirkkomponente der Salbe ist Schwarzkümmelöl. Dieses findet aufgrund einer Vielzahl heilungsfördernder Eigenschaften seit vielen Jahrhunderten Anwendung in der traditionellen orientalischen Heilkunde. Zu den positiven Eigenschaften zählen u.a. eine antibakterielle, antimykotische und entzündungshemmende Wirkung. Einen antibakteriellen Effekt von Schwarzkümmelöl auf verschiedene orale Bakterienspezies wurde in der Literatur bereits beschrieben; die Wirkung der proprietären Parodont Creme®-Formulierung bislang allerdings noch nicht. Ziel der vorliegenden Studie war es, die antimikrobielle Wirkung von Parodont Creme® auf die drei oralen Bakterienspezies *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis* und *Streptococcus sanguinis* zu untersuchen. Diese sind Bestandteil der gesunden nativen Mikroflora, sind aber auch in parodontalpathogenen Biofilmgemeinschaften zu finden.

2.2 Material und Methoden

Prüfpräparate

Die Prüfpräparate wurden entweder in der Originalabpackung (Parodont Creme®) oder als Abfüllungen aus der Produktion (hydrophobes Trägersubstanz ohne Wirkstoff) jeweils vom Hersteller, der Beovita GmbH & Co KG (Berlin), bezogen.

Bakterienstämme und Kultivierungsbedingungen

Die verwendeten Bakterienkulturen wurden von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) käuflich erworben. Eine Liste der verwendeten Stämme ist in Tabelle 1 aufgeführt. Die Vorkulturen wurden statisch bei 37°C in Brain Heart Infusion Medium (BHI; Oxoid, Wesel, Deutschland) oder auf mit 5% Schafsblut supplementiertem Columbia Blood Agar (CB; Oxoid, Wesel, Deutschland) unter anaeroben Bedingungen angezogen. Alle Kultivierungen erfolgten in einer Anaerobierwerkbank mit Fremdbegasung (DonWhitley, Concept 400; 10% H₂, 10% CO₂, 80% N₂). Die typische Kultivierungsdauer, sowohl in flüssigen Medien als auch auf Festmedien, lag bei 18 – 24 h.

Tabelle 1 Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

Spezies	Stamm
<i>Streptococcus sanguinis</i>	DSM 20556
<i>Streptococcus oralis</i>	DSM 20627
<i>Streptococcus gordonii</i>	DSM 20568

Antibakterielle Testung - Agardiffusionstest

Für die antibakterielle Testung wurden standardisierte Bakteriensuspensionen erzeugt. Dazu wurden einzelne Bakterienkolonien von den Platten (Vorkultur) abgenommen und in 10 ml steriler 0,9% NaCl Lösung bis zum Erreichen einer Trübung von McFarland 0,5 (Remel™, Thermofisher, Waltham, USA) resuspendiert. Ein steriles Wattestäbchen wurde mit der Bakteriensuspension getränkt und die Bakterien durch Ausstreichen auf einer CB Agarplatten ausgebracht. In der Plattenmitte sowie am Rand wurde mittels einer 7 mm Stanze der Agar entfernt. Die entstandenen Vertiefungen wurden mit ca. 120 µl Parodont Creme® (Plattenmitte) bzw. 120 µl Trägersubstanz ohne Wirkstoff (Rand) befüllt. Die Platten wurden 5 d unter anaeroben Bedingungen kultiviert; nach 1 d und 5 d erfolgte jeweils eine Fotodokumentation. Die Untersuchungen erfolgten als Dreifachbestimmung mit 3 biologischen

Replikaten. Die Hemmhofdurchmesser wurden mittels der Analysesoftware ImageJ (v1.37c) computergestützt bestimmt. Dazu wurde ein kreisförmiges Objekt über das Hemmhofareal gelegt und aus dem Flächeninhalt der mittlere Hemmhofdurchmesser errechnet. Die Berechnung statistischer Signifikanzen (Signifikanzniveau $p \leq 0,05$) erfolgte mittels t-Test (2-seitig, unabhängige Stichproben) unter Verwendung der statistischen Analysesoftware SPSS (v24; IBM, Armonk, USA). Varianzhomogenität (Levene-Test) sowie Normalverteilung (Shapiro-Wilk Test) waren in allen Fällen gegeben und vor Durchführung des t-Tests überprüft worden.

Antibakterielle Testung – Biofilme

Für die Testung wurden aus einer Filtermembran (0,22 μm , GPW P04700; Merck Millipore, Billerica, USA) Probekörper mit einem Durchmesser von 12 mm ausgestanzt, autoklaviert und für min. 24 h in PBS inkubiert. Zur Erzeugung eines initialen Biofilms auf den Membranoberflächen, wurden die Probekörper in 12 Well-Platten (Cellstar; Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) für 18 h in einer Bakteriensuspension anaerob inkubiert. Die Herstellung der Suspension erfolgte aus eine ÜN-Kultur, die gewaschen (PBS), verdünnt (PBS) und auf einen Trübungswert von McFarland 0,5 (Remel™, Thermofisher, Waltham, USA) eingestellt wurde. Im Anschluss wurden die Membranen entnommen und nicht anhaftende Bakterien durch Spülen mit PBS entfernt. Für die Testung wurden jeweils 50 μl Testsubstanz punktförmig in die Kavitäten einer 12 Well-Platte appliziert (Abb. 1A). Im Anschluss wurden die Filtermembranen auf der Probensubstanz platziert, wobei die mit Biofilm bewachsene Seite nach oben zeigte (Abb. 1B). Durch Andrücken der Probekörper wurde für eine gleichmäßige Verteilung der Salbe auf der Unterseite gesorgt; die poröse Struktur der Membran erlaubte eine freie Diffusion der Wirkstoffe in den Biofilm (auf der Membranoberseite). Die Membranen wurden für jeweils 18 h in 2 ml Todd-Hewitt Broth (Oxoid, Wesel, Deutschland) inkubiert, welches mit 0,5% Saccharose supplementiert worden war und anschließend mit PBS gespült. Die Membranen wurde in eine neue 12 Well-Platte überführt und mit 2 ml 0,001%-iger Resazurin Lösung für 45 min inkubiert. Bei der Substanz Resazurin handelte es sich um einen Indikatorfarbstoff, welcher von den Bakterien metabolisch zu Resorufin abgebaut werden kann. Der Abbau zu Resorufin erfolgt nur durch vitale, d. h. metabolisch aktive Zellen. Der entstandene Fluoreszenzfarbstoff Resorufin wurde mittels eines Fluoreszenz-Lesegeräts quantitativ detektiert (Tecan Infinite 200 pro, Anregung: 530 nm, Emission: 600 nm). Es wurden Parodont Creme®, die Trägersubstanz, sowie eine unbehandelte Membran untersucht; jeweils 3 technische Replikate. Als zusätzliche Kontrollen wurden Parodont Creme®, Trägersubstanz sowie die Plastikoberfläche der Multiwell-Platten mit Resazurin Lösung in Abwesenheit von Bakterien untersucht. Zur Analyse statistischer Signifikanzen wurde der ANOVA-Test (einfaktorielle Varianzanalyse, Signifikanzniveau $p \leq 0,05$) durchgeführt; Varianzhomogenität (Levene-Test) sowie Normalverteilung (Shapiro-Wilk Test) waren im Vorfeld überprüft worden.

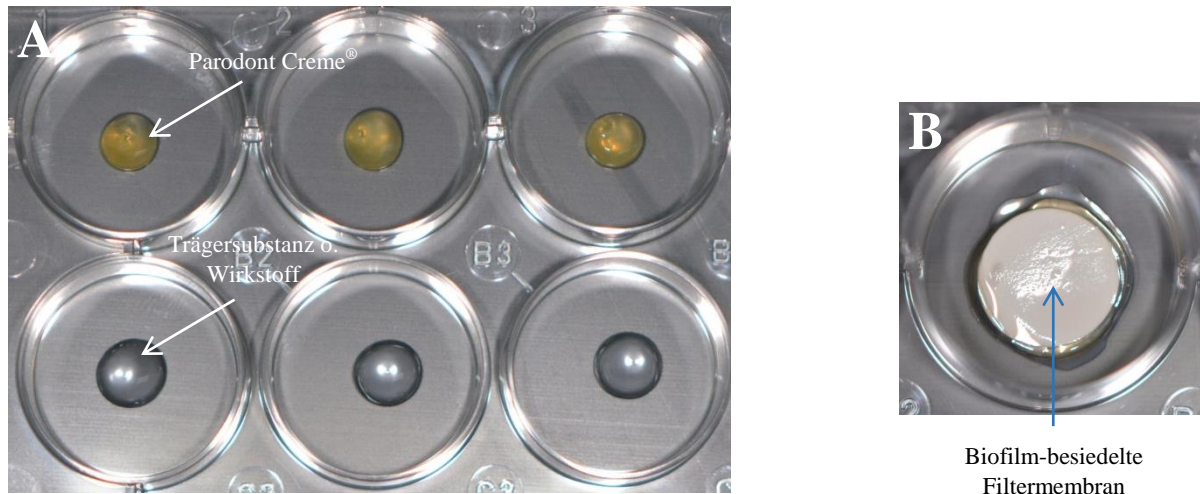


Abb. 1A/B

A zeigt einen Ausschnitt einer 12 Well-Platten; am Boden der Wells wurden jeweils 50 µl Parodont Creme® (obere Reihe) bzw. 50 µl des Trägermaterials ohne Wirkstoff (untere Reihe) appliziert; **B** zeigt eine bakteriell bewachsene Filtermembran, die auf dem Boden des Wells (direkt auf der Salbenportion) platziert worden war, leichter Anpressdruck mit einer sterilen Pinzette sorgte für eine gleichmäßige Verteilung des Präparats auf der Unterseite der Membran.

2.3 Ergebnisse und Diskussion

Eine antibakterielle Wirkung von Parodont Creme® auf die untersuchten Bakterienspezies war unter *In vitro*-Bedingungen gegeben. Der Effekt auf die verschiedenen Bakterienspezies war jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt: *Streptococcus sanguinis* > *Streptococcus gordonii* > *Streptococcus oralis* (antibakterielle Wirkung in absteigender Reihenfolge; Messgröße: Hemmhofdurchmesser). Eine Wirkung des Präparats auf gereifte Biofilme konnte im Versuch nicht nachgewiesen werden. Hier zeigte sich bei allen Spezies keine wesentliche Beeinträchtigung des bakteriellen Metabolismus, so dass unter den genannten Versuchsbedingungen von keiner Anti-Biofilm Wirkung auszugehen ist. Im Folgenden sind die Ergebnisse für die einzelnen Bakterienspezies detailliert aufgeschlüsselt:

Streptococcus sanguinis

Die antibakterielle Wirkung zeigte sich bei *S. sanguinis* am stärksten ausgeprägt. Die mittleren Hemmhofdurchmesser nach 1 d und 5 d waren identisch (1 d = 6,86 cm ± 0,37 cm; 5 d = 6,86 cm ± 0,30 cm; Abb. 2 A). Analog zeigten die Versuche mit Trägersubstanz ohne Wirkstoff keine Hemmung des bakteriellen Wachstums (Abb. 2B) und bestätigten, dass der antibakterielle Effekt auf das Schwarzkümmelöl zurückzuführen war. Eine Wirkung auf gereifte Biofilme des Bakteriums zeigte sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht, d.h. es wurde bei allen Proben wesentliche metabolischer Aktivität gemessen, unabhängig von der Behandlungsart. Die Untersuchungen zeigten keine signifikanten Unterschiede bei den Fluoreszenzintensitäten der Kontrollen und der Wirkstoff-behandelten Proben ($p > 0,05$, Abb. 3A/B). Eine Umwandlung von Resazurin in Resorufin durch in der Salbenformulierung enthaltene Inhaltsstoffe erfolgte nicht (Abb. 3B, (4), (8)).

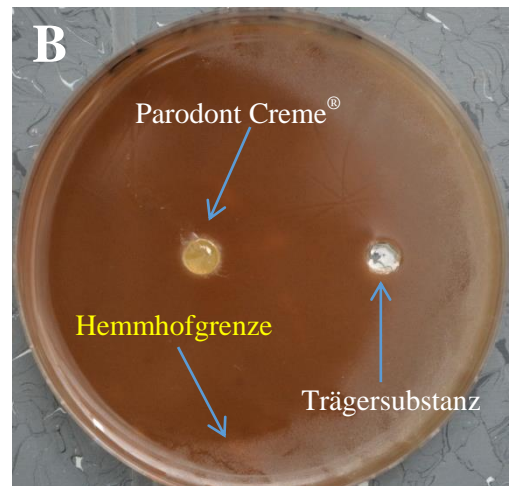
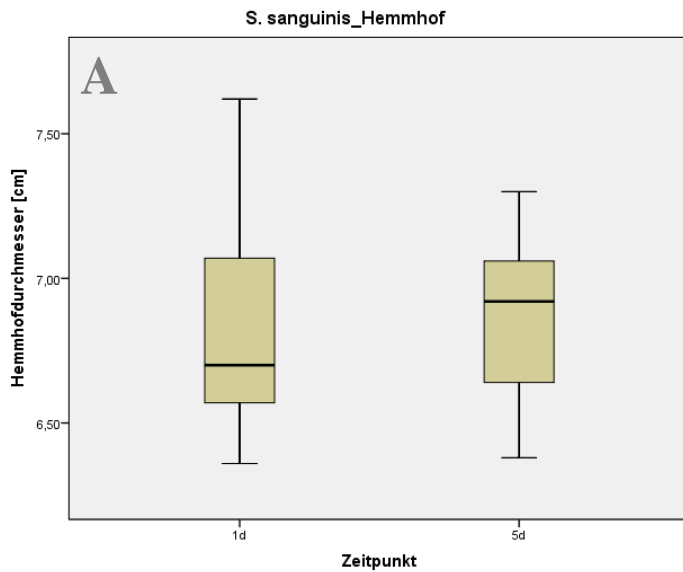


Abb. 2A/B

A zeigt ein Boxplot Diagramm der Hemmhofdurchmesser nach 1 d (links) und 5 d (rechts); **B** zeigt eine Agarplatte nach 24 h Bebrütung mit *S. sanguinis*, Vertiefung links mit Parodont Creme[®] und deutlicher Hemmhofbildung, Vertiefung rechts mit Trägersubstanz ohne Wirkstoff und ohne echte Hemmhofbildung – die Trägersubstanz befindet sich z.T. im Bereich des Parodont Creme[®] induzierten Hemmhofs.

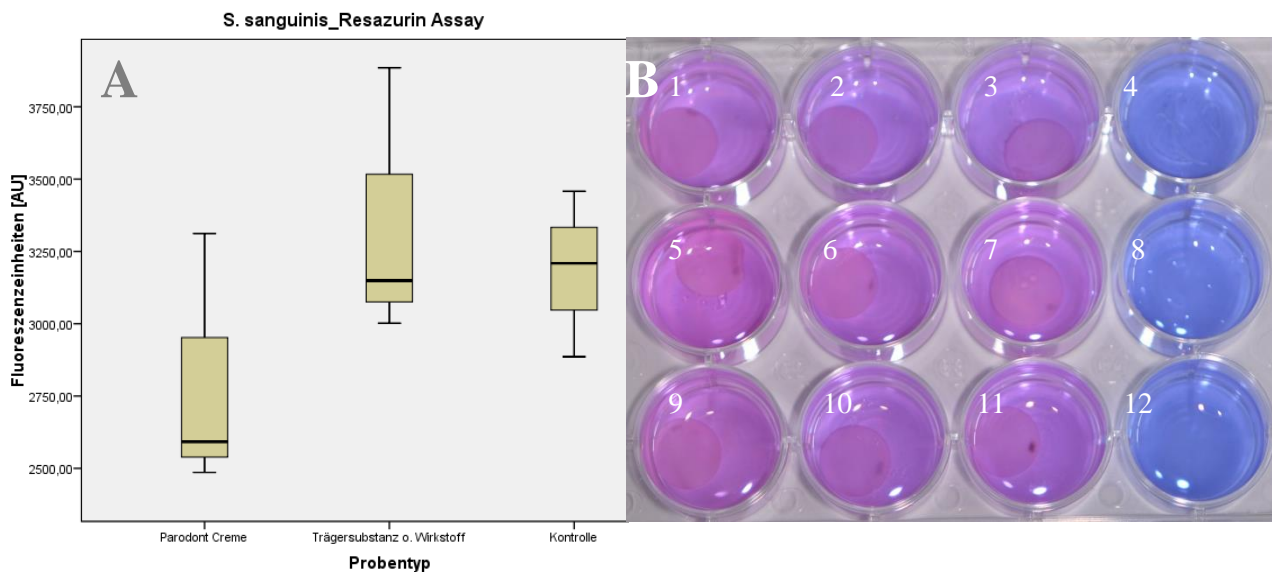


Abb. 3A/B

A zeigt Boxplot Diagramm der Fluoreszenzintensitäten nach Inkubation bewachsener Membranen (*S. sanguinis*) mit Parodont Creme[®] (links), Trägersubstanz (Mitte) und ohne Zusatzstoffe (rechts) in Resazurin Lösung, starke Fluoreszenz ist gleichzusetzen mit hoher metabolischer Aktivität und kennzeichnet vitale Bakterien/Biofilme; **B** zeigt eine Mikrotiterplatte mit bewachsenen Filtermembranen nach der Behandlung mit Resazurin Lösung; blau = keine/wenig Umsetzung von Resazurin, violett = Umsetzung von Resazurin in Resorufin; (1-3) bewachsenen Membran inkubiert mit Parodont Creme[®], (4) Parodont Creme[®] ohne Bakterien, (5-7) bewachsenen Membran inkubiert mit Trägersubstanz o. Wirkstoff, (8) Trägersubstanz ohne Bakterien, (9-11) bewachsenen Membran o. Wirkstoff (Kontrolle), (12) Resazurin Lösung ohne Bakterien.

Streptococcus oralis

Für das Bakterium *S. oralis* lag der mittlere Hemmhofdurchmesser nach 1 d bei 2,86 cm (\pm 0,25 cm), nach 5 d bei 2,78 cm (\pm 0,25 cm); eine antibakterielle Wirkung auf das Bakterium war somit gegeben. Die Unterschiede in der Hemmhofgröße an Tag 1 und Tag 5 waren statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$; Abb. 4A/B). Analog wurde mit dem Trägergel ohne Wirkstoff keine Hemmhofbildung beobachtet. Eine Wirkung gegen gereifte Biofilme des Bakteriums *S. oralis* im Resazurin Assay konnte nicht nachgewiesen werden; die Unterschiede zwischen den Gruppen (Präparat/Trägergel/Kontrolle) waren statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$, Abb. 5A/B).

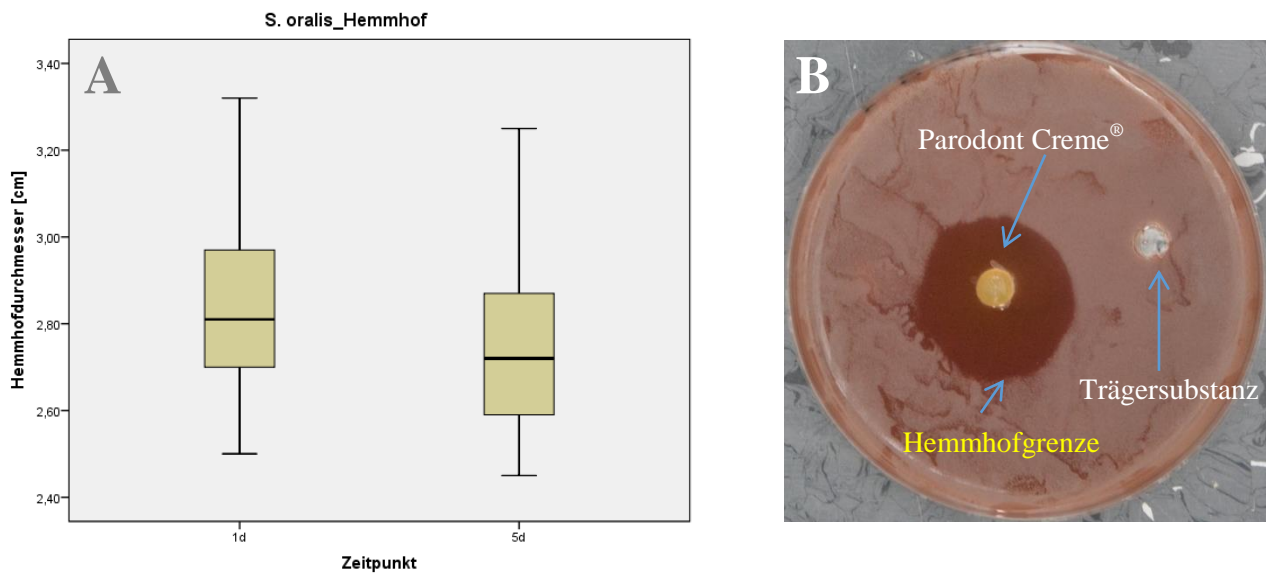


Abb. 4A/B

A zeigt ein Boxplot Diagramm der Hemmhofdurchmesser nach 1 d (links) und 5 d (rechts); **B** zeigt eine Agarplatte nach 24 h Bebrütung mit *S. oralis*, Vertiefung links mit Parodont Creme® und deutlicher Hemmhofbildung, Vertiefung rechts mit Trägersubstanz ohne Wirkstoff und ohne Hemmhofbildung.

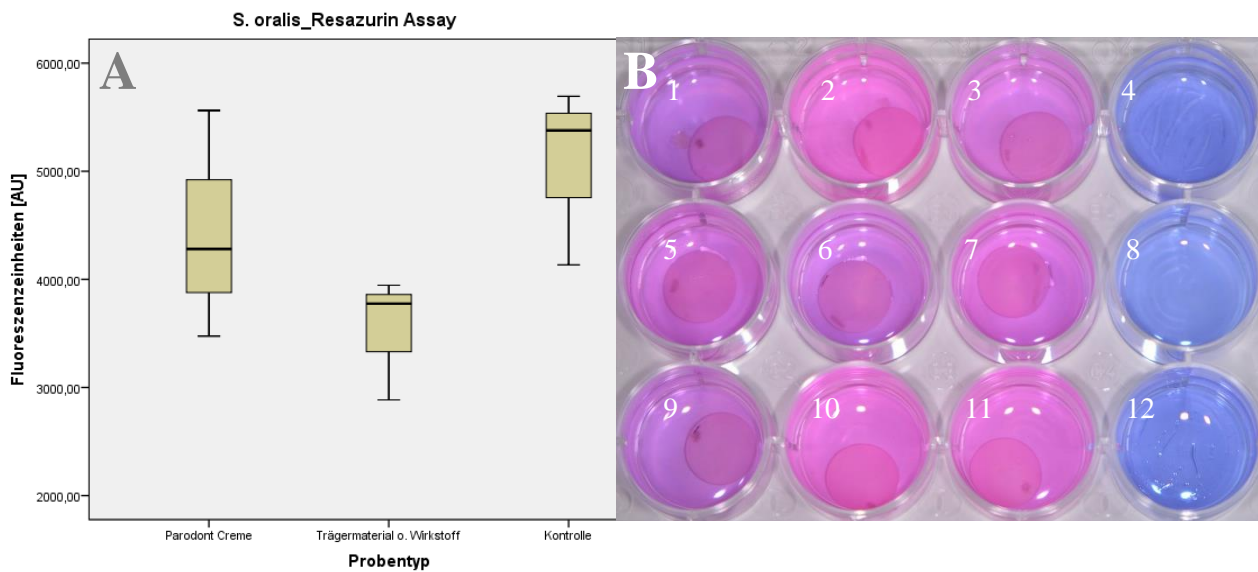


Abb. 5A/B

A zeigt Boxplot Diagramm der Fluoreszenzintensität nach Inkubation bewachsener Membranen (*S. oralis*) mit Parodont Creme® (links), Trägersubstanz (Mitte) und ohne Zusatzstoffe (rechts) in Resazurin Lösung, starke Fluoreszenz ist gleichzusetzen mit hoher metabolischer Aktivität und kennzeichnet vitale Bakterien/Biofilme; **B** zeigt eine Mikrotiterplatte mit bewachsenen Filtermembranen nach der Behandlung mit Resazurin Lösung; blau = keine/wenig Umsetzung von Resazurin, violett = Umsetzung von Resazurin in Resorufin; (1-3) bewachsenen Membran inkubiert mit Parodont Creme®, (4) Parodont Creme® ohne Bakterien, (5-7) bewachsenen Membran inkubiert mit Trägersubstanz o. Wirkstoff, (8) Trägersubstanz ohne Bakterien, (9-11) bewachsenen Membran o. Wirkstoff, (12) Resazurin Lösung ohne Bakterien.

Streptococcus gordonii

Der mittlere Hemmhofdurchmesser betrug bei den Versuchen mit *S. gordonii* an Tag 1 nach Plattierung 3,33 cm (\pm 0,18 cm). An Tag 5 wurde ein Rückgang auf 3,08 cm (\pm 0,17 cm) verzeichnet. Diese Verringerung des Hemmhofdurchmesser war statistisch signifikant ($p=$ 0,011), und belegte eine Abnahme der antibakteriellen Wirkung im zeitlichen Verlauf (Abb. 6A/B). Da das Produkt täglich appliziert werden kann, ist der Wirkungsverlust im praktischen Gebrauch aber wahrscheinlich nicht relevant. Eine Wirkung auf Biofilme des oralen Primärbesiedlers *S. gordonii* konnte nicht nachgewiesen werden. Die Unterschiede zwischen den drei Gruppen (Präparat/Trägergel/Kontrolle) waren statistisch nicht signifikant (Abb. 7A/B).

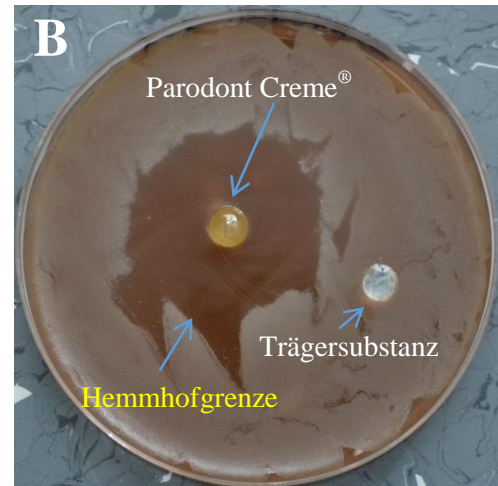
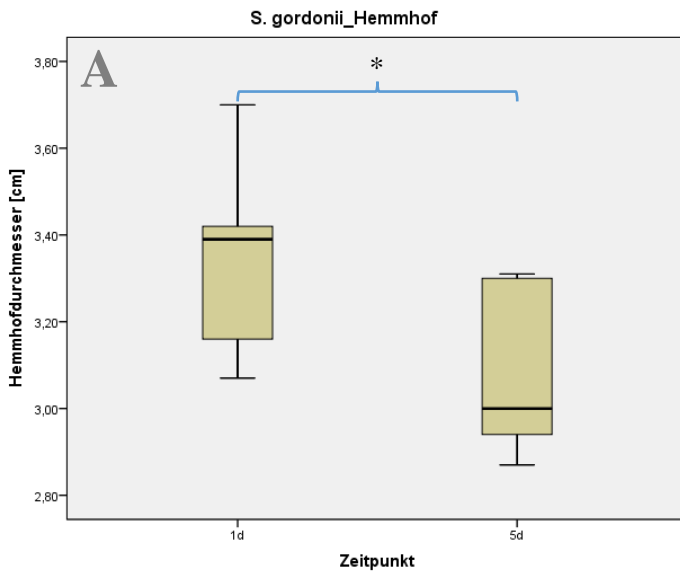


Abb. 6A/B

A zeigt ein Boxplot Diagramm der Hemmhofdurchmesser nach 1 d (links) und 5 d (rechts), Kennzeichnung statistisch signifikanter Ereignisse mit (*); **B** zeigt eine Agarplatte nach 24 h Bebrütung mit *S. gordonii*, Vertiefung links mit Parodont Creme® und deutlicher Hemmhofbildung, Vertiefung rechts mit Trägersubstanz ohne Wirkstoff und ohne Hemmhofbildung.

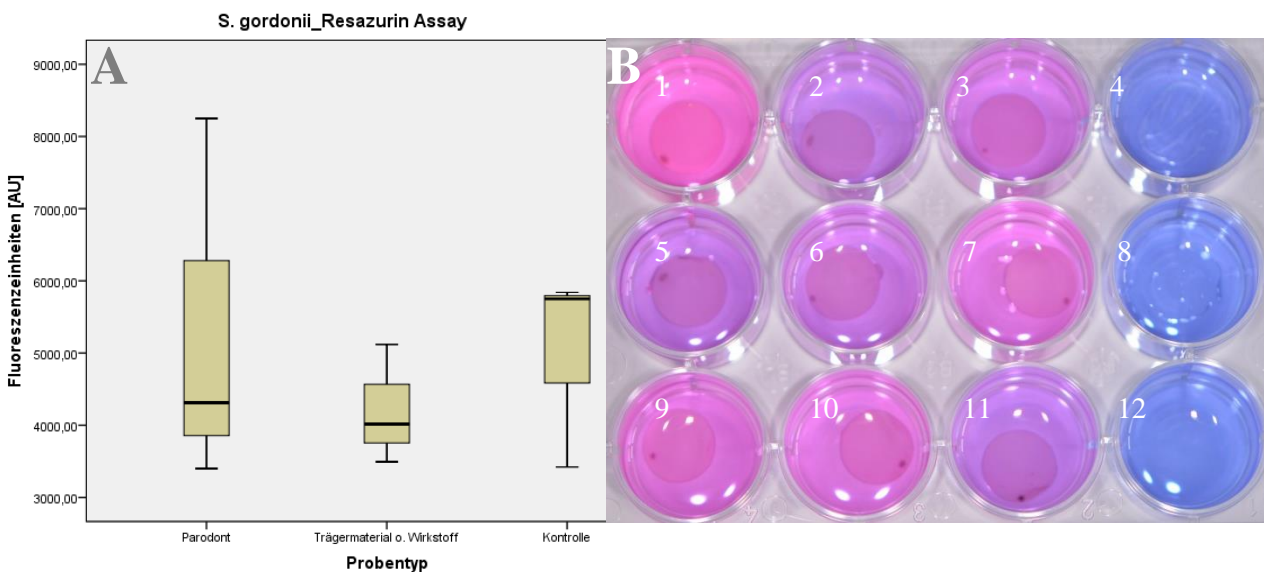


Abb. 7 A/B

A zeigt Boxplot Diagramm der Fluoreszenzintensität nach Inkubation Biofilm-bewachsener Membranen (*S. gordonii*) mit Parodont Creme® (links), Trägersubstanz (Mitte) und ohne Zusatzstoffe (rechts) in Resazurin Lösung, starke Fluoreszenz ist gleichzusetzen mit hoher metabolischer Aktivität und kennzeichnet vitale Bakterien/Biofilme; **B** zeigt eine Mikrotiterplatte mit bewachsenen Filtermembranen nach der Behandlung mit Resazurin Lösung; blau = keine/wenig Umsetzung von Resazurin, violett = Umsetzung von Resazurin in Resorufin; (1-3) bewachsenen Membran inkubiert mit Parodont Creme®, (4) Parodont Creme® ohne Bakterien, (5-7) bewachsenen Membran inkubiert mit Trägersubstanz o. Wirkstoff, (8) Trägersubstanz ohne Bakterien, (9-11) bewachsenen Membran o. Wirkstoff, (12) Resazurin Lösung ohne Bakterien.

3 Zusammenfassung

Eine antibakterielle Wirkung des Präparats Parodont Creme® auf die Bakterienspezies *S. gordonii*, *S. sanguinis* und *S. oralis* war unter den aufgeführten Versuchsbedingungen *in vitro* gegeben. Eine Wirkung gegen gereifte Biofilme derselben Spezies zeigte sich bei den Experimenten hingegen nicht.