

Untersuchungen zur antibakteriellen Wirkung von Teebaumöl auf *Porphyromonas gingivalis*

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae
(Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Katharina Funke

Geboren am 10.02.1985 in Gera

Erster Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Pfister, Jena

Zweiter Gutachter: PD Dr. Bernd Sigusch, Jena

Dritter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Hoffmann, Dresden

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.02.2011

Inhaltsverzeichnis

	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG.....	4
2.1	Klassifikation der Parodontitiden	4
2.1.1	Chronische Parodontitis	5
2.2.2	Aggressive Parodontitis.....	5
2.2	Pathogenese der Parodontitiden	7
2.3	Therapie der Parodontitiden	10
2.4	Porphyromonas gingivalis	12
2.5	Zytokine und ihre Bedeutung in der Parodontitis.....	14
2.6	Teebaumöl	16
2.6.1	Antibakterielle Wirkung.....	18
2.6.2	Antimykotische Wirkung	19
2.6.3	Antivirale Wirkung	20
2.6.4	Antiinflammatorische Wirkung.....	20
2.6.5	Toxikologische Aspekte und mögliche Nebenwirkungen.....	21
3.	ZIELSTELLUNG	23
4	MATERIAL UND METHODEN.....	24
4.1	Verwendete Bakterienstämme	24
4.2	Teebaumöl	24
4.3	Versuchsdurchführung der MHK- Bestimmung	24
4.4	Bestimmung der antibakteriellen Wirksamkeit von Teebaumöl im Biofilm.....	26

4.4.1	Versuchsdurchführung mit dem jungen Biofilm	26
4.4.2	Durchführung mit dem etablierten Biofilm.....	27
4.4.	Bestimmung der antibakteriellen Wirksamkeit von Teebaumöl in KB-Zellen und in Fibroblasten	28
4.4.1	Die Zellpassage.....	28
4.4.2	Versuchsdurchführung	29
4.5	Nachweis von Interleukin-6 und Interleukin-8.....	31
4.5.1	Verwendete Lösungen und Zusätze	31
4.5.2	Durchführung des Interleukinnachweises.....	31
5.	ERGEBNISSE.....	34
5.1	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration gegenüber Porphyromonas gingivalis–Stämmen	34
5.2	Antibakterieller Effekt im entstehendem und etabliertem Biofilm durch Teebaumöl	35
5.2.1	Ergebnisse für den sich bildenden Biofilm.....	35
5.2.2	Ergebnisse für den etablierten Biofilm	37
5.3	Antibakterielle Wirksamkeit von Teebaumöl in KB-Zellen und in Fibroblasten.....	38
5.3.1	Wirkung von Teebaumöl in KB-Zellen	38
5.3.2	Wirkung von Teebaumöl in Fibroblasten	40
5.4	Freisetzung von Interleukinen	42
5.4.1	Freisetzung von IL-6 und IL-8 bei KB-Zellen	42
5.4.2	Freisetzung von IL-6 und IL-8 bei Fibroblasten	44

6.	DISKUSSION	47
6.1	Methodendiskussion.....	48
6.2	Wirkung von Teebaumöl auf Bakterien am Beispiel von Porphyromonas gingivalis.....	49
6.3.	Wirkung von Teebaumöl auf den jungen und etablierten Biofilm.....	50
6.4	Wirkung von Teebaumöl auf Fibroblasten und KB-Zellen	51
6.5	Wirkung von Teebaumöl auf die Interleukinausschüttung	52
7.	SCHLUSSFOLGERUNG	56
	LITERATURVERZEICHNIS	57
	ANHANG	66
A	DANKSAGUNG	74
B	LEBENS LAUF	75
C	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	76

Abkürzungsverzeichnis

A. actinomycetemcomitans	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
ATCC	American Type Culture Collection
cfu	Colony forming units, koloniebildende Einheiten
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
ELISA	Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
EMEM	Eagle Minimum Essential Medium
F. nucleatum	Fusobacterium nucleatum
FCS	fötales Kälberserum
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
IgG2	Immunglobulin G2
IL-1, IL-6, IL-8, IL-10	Interleukin 1, 6, 8, 10
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KSCN	Kaliumthiocyanat
LJP	Localized Juvenile Parodontitis
LPS	Lipopolysaccharid
MBK	minimale bakterizide Konzentration
MHK	minimale Hemmkonzentration
MMPs	Matrix-Metall-Proteinase
MRSA-Stämme	Methicillin-resistente-Staphylococcus-aureus-Stämme
Na ₂ HPO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
P. gingivalis	Porphyromonas gingivalis
P. intermedia	Prevotella intermedia
PBS	Phosphate Buffered Saline
PGE-2	Prostaglandin-2
PMN	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
RPP	Rapidly Progressive Parodontitis
T. denticola	Treponema denticola
T. forsythia	Tanarella forsythia
TNF- α	Tumornekrosefaktor- Alpha
Trypsin-EDTA-Lösung	Trypsin-Ethylendiamintetraacetat-Lösung
TTO	Tea tree oil , Teebaumöl

1 Zusammenfassung

Die Parodontitis kommt bei 80% - 90% aller Erwachsenen vor und zählt damit zu den häufigsten Infektionskrankheiten weltweit (Rateitschak und Wolf 2003).

Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*) spielt neben anderen Mikroorganismen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von entzündlichen parodontalen Erkrankungen (Page und Kornman 1997, Travis et al. 1997). Eine weitere Voraussetzung für eine parodontale Infektion ist vor allem eine bestehende Plaque, einem zäh anhaftenden Biofilm, wobei aber die genauen Mechanismen für die Ausbildung des Krankheitsbildes nicht vollständig geklärt sind. Die meisten Bakterien können nur durch die Erzeugung eines Biofilms dauerhaft überleben (Jenkinson und Lamont 2005). Auch die von den Bakterien aus dem Biofilm freigesetzten gebildeten Stoffwechsel- und Zerfallsprodukte spielen eine Schlüsselrolle bei der Krankheitsentstehung, da sie erste Abwehrreaktionen des eigenen Körpers auslösen (Lamont und Jenkinson 1998). Die Zellen des Saumepithels reagieren mit der Sekretion von Entzündungsmediatoren wie Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) oder Matrix-Metall-Proteinase (MMPs). Eine verstärkte Entzündungsreaktion ist die Folge, da die körpereigenen Zellen nach der Diffusion genannter Substanzen zur Freisetzung weiterer Zytokine stimuliert werden (Rateitschak und Wolf 2003).

Zahlreiche Studien haben die antimikrobielle Wirkung von Teebaumöl gegenüber oralen Mikroorganismen gezeigt (Kulik et al. 2000, Carson und Riley 1995).

Bisher existieren jedoch keine Studien, die speziell den Effekt von Teebaumöl bei der Behandlung manifester Parodontopathien untersuchen. Somit war es das Ziel dieser Arbeit, die antibakterielle Wirkung des Öls im Biofilm, in KB-Zellen und in Fibroblasten sowie auf die Interleukinausschüttung zu prüfen.

Die Untersuchungen wurden dabei auf einen Erreger der Parodontitis, *P. gingivalis*, begrenzt.

Die eigenen Untersuchungen bestätigen die antimikrobielle Wirksamkeit des Teebaumöls gegenüber diesem anaeroben Keim. Insgesamt war für alle untersuchten Bakterienstämme ein antibakterieller Effekt festzustellen und somit

bekräftigt die vorliegende Arbeit die Ergebnisse anderer Autoren, die die antimikrobielle Wirksamkeit des Teebaumöls untersucht haben (Kulik et al.2000, Hammer et al. 2003).

Eine große Schwierigkeit besteht bei der Behandlung von Parodontopathien in der Zerstörung des Biofilms. Durch dessen komplexen Aufbau sind die Überlebensbedingungen für die Bakterien verbessert. Der Verlauf der Infektion ist deshalb von dem Weiterbestehen dieser Matrix wesentlich beeinflusst. In dieser Arbeit sollte daher auch die antibakterielle Wirksamkeit des Teebaumöls in einem einfachen und etablierten Biofilm untersucht werden. Die Ergebnisse konnten jedoch keinen signifikanten Einfluss von Teebaumöl im jungen wie auch gefestigten Biofilm zeigen. Lediglich einige stammspezifische Resultate konnten beobachtet werden.

Ein weiterer Untersuchungspunkt der Studie betrachtete den antibakteriellen Effekt des Teebaumöls in KB-Zellen und in Fibroblasten. Dabei war ein genereller wachstumshemmender Effekt des Öls auf die mit Bakterienstämmen infizierten KB-Zellen nach sechs Stunden und auch nach 24 Stunden Inkubationszeit festzustellen. Auch für die Fibroblasten ergab sich eine wachstumshemmende Wirkung durch das Teebaumöl.

Eine Interleukinausschüttung ist ein Zeichen für einen entzündlichen Prozess. Auch Parodontopathien sind demnach von diesen Zytokinausschüttungen begleitet. Der Abschluss der Untersuchungen zielte auf die Wirkweise von Teebaumöl auf die Interleukinausschüttung. Die IL-6-Ausschüttung der mit *P. gingivalis*-Stämmen infizierten KB-Zellen zeigte keine einheitliche Tendenz. Jedoch war ein signifikanter Rückgang an IL-6 für den Referenzstamm *P. gingivalis* ATCC 33277 bei 0,05% und 24h Inkubation sowie für den Patientenstamm *P. gingivalis* J374-1 bei 0,05% und sechs Stunden Inkubation nachzuweisen. Auch die IL-8-Freisetzung an KB-Zellen ergab kein einheitliches Muster. Die 0,01%ige und 0,05%ige Teebaumöllösungen führten zwar in der Mehrzahl der Fälle zu einem Rückgang der IL-8-Produktion. Jedoch waren auch stammspezifische Anstiege der IL-8-Freigabe festzustellen. Die IL-Ausschüttungen der Fibroblasten waren generell gering. Ungeachtet dessen ließ sich aber eine Verminderung der IL-6- und IL-8-Freisetzungen durch Zugabe von Teebaumöl bemerken.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass Teebaumöl in der Zukunft eine mögliche Bedeutung in der Mitbehandlung von Parodontopathien haben könnte.

Die Grundlage der erfolgreichen Behandlung von Parodontopathien bildet die instrumentelle Intervention, um den Biofilm mechanisch zu zerstören und so einen Ausgangspunkt der bakteriellen Besiedlung zu unterbinden. Eventuell kann Teebaumöl eine Neubildung dieser Matrix verhindern.

Ob Teebaumöl als adjuvantes Therapeutikum bei Parodontitisbehandlungen einmal eingesetzt werden kann, muss vor allem in weiteren klinischen Untersuchungen geklärt werden.

2 Einleitung

2.1 Klassifikation der Parodontitiden

In der Vergangenheit haben die Klassifikationen der Parodontitiden schon mehrfach eine Veränderung erfahren. Da die frühere Nomenklatur der American Academy of Periodontology zu stark das Alter bzw. den Krankheitsbeginn für die Zuordnung einer Parodontitisform bewertete, fand 1999 eine grundlegende Umgestaltung der Einteilung der Parodontitiden statt (Armitage 1999).

„Die verschiedenen Arten können in verschiedenen Verlaufsformen und Schweregraden auftreten, die unter anderem durch den Zeitpunkt der Manifestation im Verhältnis zum Alter des Patienten, durch Art und Verteilung des Knochenabbaus und durch die unterschiedlich schnelle Progression gekennzeichnet sind“ (Rateitschak und Wolf 2003).

Grundsätzlich werden eine chronische und eine aggressive Form unterschieden, wobei jeweils zusätzlich generalisierte und lokalisierte Zustände unterschieden werden.

Bei der lokalisierten Form sind weniger als 30% der Messpunkte, bei der generalisierten Form mehr als 30% betroffen. Dabei geht man bei einem Gebiss von 28 Zähnen von insgesamt 168 Messpunkten, jeweils sechs Messpunkten am Zahn, aus.

Aufgrund des Schweregrades können je nach Taschentiefe die Unterteilungen leicht (1-2mm), mittel (3-4mm) und schwer (>5mm) getroffen werden.

Parodontitiden, die im Zusammenhang systemischer Erkrankungen auftreten, und nekrotisierende Krankheitsbilder bilden eine eigene Kategorie in der aktuell gültigen Klassifikation. Letztere sollen in dieser Studie nur erwähnt werden, aber nicht weiterer Diskussion unterliegen.

Klassifikation der Parodontalerkrankungen (Armitage 1999)

Typ I Gingivale Erkrankung

A Plaqueinduzierte gingivale Erkrankungen

B nicht plaqueinduzierte gingivale Erkrankungen (Läsionen)

Typ II Chronische Parodontitis

A Lokalisiert

B Generalisiert

Typ III Aggressive Parodontitis

A Lokalisiert

B Generalisiert

Typ IV Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen

A Assoziiert mit hämatologischen Erkrankungen

B Assoziiert mit genetischen Abberationen

C Assoziiert mit anderen Allgemeinerkrankungen

Typ V Nekrotisierende Parodontalerkrankungen

A Nekrotisierende ulzerative Gingivitis (NUG)

B Nekrotisierende ulzerative Parodontitis (NUP)

2.1.1 Chronische Parodontitis

Die chronische Parodontitis ist mit 85-95% Häufigkeit die am häufigsten auftretende Form der Erkrankung. Sie beginnt meist zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr und entwickelt sich dabei vielfach aus einer bestehenden Gingivitis. Jedoch ist eine bestehende Gingivitis keine unbedingte Voraussetzung für die Entstehung einer Parodontitis. Die Erkrankung ist durch die typischen Haupt- und Begleitsymptome gekennzeichnet, wobei diese Form im höheren Lebensalter nur teilweise zu einem Zahnverlust führen muss. Der Knochen zeigt eine ungleichmäßige, horizontale Destruktion bei einem häufig langsamen chronischen Verlauf. In den aktiven Taschen finden sich die parodontopathogenen Keime *P. gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) und *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*). Eine erbliche Komponente wird bei dieser Form der Parodontitis ausgeschlossen. Die chronische Parodontitis ist durch die instrumentelle Therapie, das sogenannte Scaling und Root planing, sehr gut zu behandeln.

2.2.2 Aggressive Parodontitis

Die lokalisierte Form der aggressiven Parodontitis (früher Localized Juvenile Parodontitis (LJP)) ist eine sehr seltene Erkrankung im bleibenden Gebiss. Die Studien zeigen eine Häufigkeit von 0,1% bei der weißen und >1% bei der schwarzen Bevölkerung (Rateitschak und Wolf 2003). Meist zufällig durch eine Bissflügelaufnahme entdeckt, wird dieser Typus während der Pubertät oder einige

Jahre später diagnostiziert. Mädchen sind häufiger als Jungen betroffen. Im Anfangsstadium ist vor allem ein Befall der Schneidezähne und/oder der ersten Molaren (Typ 1,6) festzustellen. Die Erkrankung verläuft in raschen Schüben, das Zahnfleisch wirkt dabei oft vollkommen gesund, der Knochen aber zeigt typische kraterförmige Defekte. Neben der gewöhnlichen Mischflora finden sich im Gingivafluid spezifische Immunglobuline gegen *A. actinomycetemcomitans*. Es werden dabei Defekte der neutrophilen Granulozyten (PMN) und damit verbunden eine eingeschränkte Chemotaxis und Phagozytose vermutet. Bei rechtzeitiger Diagnose und einer Kombination aus instrumenteller und systemisch-medikamentöser Therapie ist die Prognose für den Patienten relativ gut.

Die generalisierte Form der aggressiven Parodontitis (früher Rapidly Progressive Parodontitis (RPP)) ist mit 5-15% ebenso eine relativ seltene Erkrankung. Sie tritt zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr auf, wobei Frauen häufiger betroffen zu sein scheinen als Männer. Akute Phasen wechseln mit chronischen Stadien und der Schweregrad des Attachmentverlustes zeigt keine einheitliche Verteilung. Dagegen sind viele bis alle Zähne bei diesem Erkrankungstypus betroffen. Die Ursache für die raschen Aktivitätsschübe ist im Vorhandensein spezifischer Mikroorganismen (wie *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* und *T. forsythia*) zu finden. Eine geschlechtsgebunden dominante Vererbung wird in diesem Fall diskutiert. Durch mechanisch-instrumentelle Behandlung und gegebenenfalls begleitende Antibiotikatherapie kann die Mehrzahl dieser aggressiven Parodontitiden aufgehalten werden.

Der Typ IV B, der laut Nomenklatur eine aggressive Form der Parodontitis im Zusammenhang mit systemischen Allgemeinerkrankungen beschreibt, ist eine äußerst seltene Erscheinung. Früher bekannt als präpubertale Parodontitis tritt diese Form unmittelbar nach Durchbruch der Milchzähne auf. Dieser Typ zeigt einen schnellen und meist generalisierten Verlauf. Die spezifische Bakterienflora ist unbekannt. Systemische Erkrankungen, die mit dieser Parodontitis vergesellschaftet auftreten, sind unter anderem Hypophosphatasie, eine erhöhte Anfälligkeit für Mittelohrentzündungen oder Hautinfektionen. Die häufige generalisierte Form zeigt eine schlechte Prognose und ist auch durch eine gezielte Kombinationstherapie nur schlecht aufzuhalten.

2.2 Pathogenese der Parodontitiden

Die Parodontitis ist durch eine Beteiligung aller Anteile des Parodonts gekennzeichnet. Dabei sind neben den typischen Hauptsymptomen, wie Entzündung, echter parodontaler Tasche und Knochenschwund, auch eine Vielzahl möglicher Begleiterscheinungen festzustellen. Eine echte parodontale Tasche ist im Gegensatz zu einer gingivalen- oder Pseudotasche durch Attachmentverlust, Tiefenproliferation des Saumepithels und Umwandlung des Saumepithels in ein Taschenepithel gekennzeichnet. Die Zerstörung des Faserapparates wird zum einen durch die mikrobielle Plaque und andererseits auch durch bakterielle Stoffwechselprodukte vorangetrieben. Zu den eventuellen Begleitsymptomen der Parodontitis gehören unter anderem Schwellung der Gingiva, Fistelbildung, Abzessbildung, Zahnlockerung und im schlimmsten Fall Zahnverlust.

Die Entstehung einer Parodontitis ist ein multifaktorielles Geschehen. Zum einen spielen spezifische Mikroorganismen ohne Zweifel eine entscheidende Rolle für die Ausbildung der Entzündung, andererseits begünstigt das Vorhandensein eines empfänglichen Wirtsorganismus und weiterer Risikofaktoren die Ausbildung der Erkrankung.

Bakterien besitzen die Fähigkeit zur Ausbildung eines Biofilms, der als zäh haftender Oberflächenbelag den Bakterien bessere Überlebenschancen garantiert. Interessanterweise bilden auch Gesunde innerhalb weniger Minuten einen solchen Biofilm aus, der unter anderem an den Zahnhartsubstanzen oder auch Füllungen haftet. Dennoch sind hier die Selbstreinigungskräfte, wie Zunge, Speichel oder Mundhygiene effektiv genug, um ein Gleichgewicht zwischen Wirt und Mikroorganismen wiederherzustellen. Dieses sensible Miteinander ist bei der Parodontitis gestört, das Keimspektrum mit parodontopathogenen Merkmalen ist dem Wirt überlegen und bedingt durch diverse Virulenzfaktoren eine Entzündung und spezifische Immunantworten.

Mit zunehmendem Verlauf der Erkrankung ist eine Veränderung der Plaquezusammensetzung und damit verbunden der Bakterienflora festzustellen. Dabei zeigt sich mit anwachsender Destruktion, unter anderem durch Tiefenzunahme der Taschen, ein Anstieg anaerober Bakterien. Zu den so genannten Leitkeimen der Parodontitis gehören *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T.*

forsythia und Treponema denticola (T. denticola). Die Besonderheit dieser parodontopathogenen Bakterien lässt sich anhand ihrer potenten Virulenzfaktoren erkennen. Erwähnenswert scheint in diesem Zusammenhang, dass diese Keime auch zahlenmäßig höhere Mengen dieser Stoffe im Gegensatz zu Konkurrenzkeimen produzieren. Zu den Virulenzfaktoren der Markerbakterien gehören unter anderem Enzyme, Antigene, Signalstoffe und Toxine.

Um diese krankheitsfördernden Einflüsse zur vollen Wirkung zu bringen, müssen verschiedene Hemmnisse in der bakteriellen Umwelt überwunden werden. Dazu gehören die Etablierung am Wirtsgewebe, der Schutz vor selbstreinigenden Kräften wie Speichel oder Zunge, das sich Behaupten gegenüber Konkurrenten oder Abwehrkräften des Immunsystems und dessen ungeachtet das Vorantreiben der wichtigen Destruktion parodontalen Gewebes. Interessanterweise wechseln bei der Parodontitis aktive und stagnierende Phasen.

Einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung und Progression der Parodontitis haben auch verschiedene Wirtseigenschaften. Dabei spielen neben genetischen Gegebenheiten, möglichen Allgemeinerkrankungen und dem sozialen Umfeld auch persönliche Gewohnheiten eine wichtige Rolle. Demnach kann man speziell für den Menschen genetische und erworbene (Rauchen, Alkohol, Stress) Risikofaktoren unterscheiden.

Genetische Defekte allein führen nicht zu einer klinischen Manifestation der Erkrankung, aber der Wirt wird unter solchen Bedingungen begünstigt, mit zunehmendem Alter eine Parodontitis zu entwickeln. Bekannte genetische Defekte und Varianten sind unter anderem ein erniedrigter IgG2-Spiegel, IL-1-Gen(+)-Polymorphismus oder PMN-Schäden. Antikörper, die gegen die Keime der Erkrankung gebildet werden, gehören zu den so genannten IgG2-Subklassen.

IgG2 bindet an die polysaccharidhaltigen Antigene der Bakterien und hilft so bei der Abwehr. Es konnte festgestellt werden, dass eine hohe IgG2-Serumkonzentration mit einem milderem Verlauf der aggressiven Parodontitis einhergeht, während niedrige Mengen eine höhere Anfälligkeit für die Krankheit vermuten lassen (Harnack et al. 2009).

Durch Mutation eines einzelnen Basenpaares kann eine genetische Veränderung in Form des IL-1-Gen(+)-Polymorphismus vorliegen. Dabei bedingen durch bakterielle

Stoffwechselprodukte aktivierte Monozyten eine vierfach höhere Ausschüttung von IL-1 als normal, was den Verlauf der Parodontitis wesentlich beschleunigen kann. Auch PMN-Defekte stehen im Zusammenhang mit der Ausbildung einer aggressiven Parodontitis, indem verschiedene Abwehrmechanismen wie u.a. Phagozytose und Chemotaxis der Neutrophilen gestört sind. Andere systemische Erkrankungen, die Neutrophilendefekte zeigen und mit Parodontalerkrankungen einhergehen sind z.B. das Down-Syndrom, Diabetes mellitus und Morbus Crohn.

Selbstbestimmte Risikofaktoren, wie z.B. das Rauchen, können die Manifestation einer Parodontitis entscheidend bestimmen. Demnach bestätigen Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen rauchenden Patienten und der Heftigkeit der Entzündung. Dieser Risikofaktor zielt auf verschiedene Angriffspunkte der Abwehr, indem die Neutrophilenaufgaben gestört, die Antikörperbildung geschwächt und zusätzlich die Gingivalfibroblastenfunktion vermindert werden. Auch Rauchen ist mit einer Abnahme des IgG2-Spiegels und den damit beschriebenen Folgen verbunden (Haber 1994, Rateitschak und Wolf 2003).

Einen anderen Faktor in der Pathogenese der Parodontitis kann die Ernährung spielen, indem durch faserarme, klebrige Kost die Plaquebildung gefördert werden kann und dadurch auch für die Mikroorganismen ein ständiges Verpflegungsreservoir geschaffen wird.

Interessanterweise spielen auch das soziale Umfeld, die Erziehung und damit verbunden die erworbene Einstellung zur Gesunderhaltung und Hygiene eine Rolle für die Begünstigung von Erkrankungen des Zahnhalteapparates.

Aktuelle Untersuchungen haben weiterhin einen Zusammenhang zwischen der etablierten Parodontitis und anderen Allgemeinerkrankungen festgestellt.

Die Untersuchungen von Beck et al. (1996) konnten bestätigen, dass das Risiko für eine Herz-Kreislauf-Erkrankung mit den Sondierungstiefen der parodontalen Taschen in Beziehung steht. Jede Infektion gilt als allgemeines Risiko für die Entwicklung einer Herzerkrankung, dabei spielt die Parodontitis insofern eine Rolle, indem durch gramnegative Bakterien eine Einfuhr von Entzündungsmediatoren (IL-6, PGE, TNF- α) in das Gefäßsystem ermöglicht wird.

Auch im Zusammenhang bei Frühgeburten und zu niedrigem Geburtsgewicht wird angenommen, dass die bei chronischen Entzündungen produzierten Entzündungsmediatoren (in diesem Fall vor allem PGE₂) einen entscheidenden Einfluss auf verfrühte Wehentätigkeit und Geburt nehmen (Offenbacher et al. 1996, Lopez 2002).

Obwohl neuere Studien noch nicht eindeutig bestätigen können, dass ein definitiver Zusammenhang zwischen parodontaler Infektion und einem Hirnschlag bestehen, wird zumindest die Möglichkeit einer solchen Beziehung diskutiert (Andersen et al. 1990).

2.3 Therapie der Parodontitiden

Die aktuellen Therapiekonzepte verfolgen heute das Ziel, die Entzündung zu beseitigen und auch die Progression der Erkrankung aufzuhalten.

Da die Pathogenese der Parodontitis durch die spezifischen Bakterien entscheidend bestimmt wird, ist die Beseitigung dieser Keime ein wichtiger Punkt bei der Behandlung. Auf der anderen Seite wird durch Aufgabe oder Änderung selbstbestimmter Risikofaktoren wie Rauchen, Ernährung oder Gesundheitsbewusstsein versucht, den Verlauf der Parodontitis positiv zu beeinflussen, indem diese Triggerfaktoren ausgeschaltet werden. Hier ist die Aufklärung des Patienten von besonderer Wichtigkeit, um ihn über die Entwicklung und Verlauf der Erkrankung zu informieren.

Die Grundlage der Parodontalbehandlung ist zunächst die mechanische Entfernung der supra- und subgingivalen Plaque im Rahmen der Initialtherapie (Petersilka et al. 2002). In dieser Phase ist der Erfolg wiederum von verschiedenen Abhängigkeiten geprägt. Als wesentliche Faktoren sind in diesem Zusammenhang die qualitative Umsetzung der instrumentellen Behandlung, die Einstellung des Patienten zur Mundhygiene, Zusammensetzung des bakteriellen Milieus sowie die Immunabwehr zu nennen. In diesem Zeitraum erfolgt eine umfassende Diagnostik, durch die Art, Schwere und Verlauf der Erkrankung bestimmt werden. Beurteilt wird der Gesamtzustand des Gebisses, eventuelle Zahnlockerungen, die Taschentiefen und bestehende Rezessionen. Röntgenaufnahmen geben einen Überblick über die knöchernen Verhältnisse.

Um den Grad der Entzündung zu bestimmen, werden verschiedene Parodontalindizes angewandt. Beispiele hierfür sind z.B. der Papillenblutungsindex (nach Saxer und Mühlemann), der modifizierte Sulkusblutungsindex (nach Lange) und der Gingivitisindex (nach Silness u. Loe). Andere sinnvolle Techniken für die detaillierte Befunderhebung sind der modifizierte Gingivitisindex (nach Loe) und die von der Originalmethode („Bleeding after pressure“ nach Loe u. Silness) abgewandelte „Bleeding on probing“.

Um eine anhaltende Motivation für den Patienten zu erreichen, können auch der Plaqueindex (nach Silness und Loe) und der modifizierte Approximalindex (nach Lange) angewendet werden.

Nach der Befundaufnahme ist die Beseitigung der Plaque und eventueller iatrogener und lokaler Faktoren (überstehende Füllungsrän­der, Karies, Zahnstein u.a.) die erste Maßnahme. Auch ein gründliches sub- und supragingivales Scaling zur Beseitigung der Ablagerungen sollte schon in dieser Phase der Behandlung erfolgen. Ziel ist es, eine deutliche Reduktion der parodontalen Entzündungszeichen zu erreichen.

Als fortführende Maßnahme ist die Reinigung der Wurzeln, das so genannte „root planing“ bei jeder Parodontitisbehandlung eine unerlässliche Bedingung.

Durch diesen Therapieschritt wird der von den Bakterien gebildete Biofilm mechanisch zerstört, endotoxinhaltige Zementschichten werden abgeschabt und auch der subgingivale Zahnstein wird entfernt. Man kann in Abhängigkeit der Taschentiefe und Morphologie der Zähne (Anzahl der Wurzeln) ein geschlossenes und offenes Verfahren unterscheiden. Als Erfolg dieser Therapie wird die Repara­tion mit Ausbildung eines Saumepithels gewertet

Auch die Qualität und Konsistenz der Nahrung kann für die Behandlung von Bedeutung sein. Insbesondere sollte weiche, faserarme und klebrige Kost vermieden werden.

Bei einem Großteil der behandelten Fälle lässt sich durch diese Standardtherapie eine Verbesserung der klinischen Parameter der Parodontitis innerhalb kurzer Zeit (bis sechs Monate) und darüber hinaus eine Stabilisierung der parodontalen Verhältnisse feststellen. Zusätzlich zu den nicht-chirurgischen Maßnahmen sind bei besonderer Indikation auch chirurgische Verfahren anzuwenden.

Mitunter kann bei schwerer chronischer und aggressiver Parodontitis eine adjuvante systemische Antibiotikagabe notwendig sein.

Die Einbindung des Patienten in ein Recallprogramm mit regelmäßiger Mundhygienemotivation und –instruktion und der Entfernung von supra- und subgingivalen Belägen mittels Scaling/ Root planing verhindert ein erneutes Wachsen der pathogenen subgingivalen Bakterienflora über den das Gleichgewicht störenden Schwellenwert (Rateitschak und Wolf 2003). Bei konsequenter Weiterbehandlung im Nachsorgeprogramm ist bei einer Mehrzahl der Patienten keine weitere Destruktion im Sinne eines fortgeschrittenen Attachmentverlustes festzustellen (Axelsson et al. 1991).

In den meisten Fällen kann bei frühem Behandlungsbeginn und hoher Qualität der Therapie der Parodontitis Einhalt geboten werden. Wichtig für den Erfolg der Behandlung sind die Aufnahme des Patienten in die Nachsorge und enge Kontrolle durch den Zahnarzt. Auch die Einstellung des Patienten, sein erworbenes Gesundheitsbewusstsein und der Umgang mit der Gewissheit, einer strengen Kontrolle zu unterliegen, sind unentbehrlich für den maximalen Behandlungseffekt. Der Patient muss sich bewusst sein, dass das mühsam wiederhergestellte Gleichgewicht zwischen Wirt und bakterieller Flora nicht wieder gestört werden darf.

2.4 Porphyromonas gingivalis

P. gingivalis gehört zu den parodontopathogenen Keimen, die eine Ursache für die Entstehung einer Parodontitis darstellen (Walter et al. 2004).

Um ausreichend destruktiv am Ort der Entzündung wirken zu können, müssen einerseits ausreichende Menge möglicher pathogener Keime (Lamont und Jenkinson 1998), andererseits aber vor allem wirksame Virulenzfaktoren (Cutler et al. 1995) vorhanden sein.

P. gingivalis ist ein anaerob, gramnegatives, unbewegliches Stäbchen, welches bei der aggressiven (Zafiroopoulos et al. 2006) und chronischen Parodontitis (Rateitschak und Wolf 2003) auftritt. Ein Nachweis des Keimes ist auch beim Gesunden (Lamont und Jenkinson 1998) und bei der Gingivitis möglich.

P. gingivalis benötigt verschiedene Virulenzfaktoren, damit er in der parodontalen Tasche überleben kann. Zu Beginn einer Parodontitis besteht zunächst eine Abhängigkeit von den Erstbesiedlern (u.a. *Streptococcus* sp., *Actinomyces*

naeslundii), da es *P. gingivalis* nur möglich ist in Epithel einzudringen, nicht aber Hartschichten zu besiedeln (Deshpande et al. 1998, Lamont und Jenkinson 1998, Rateitschak und Wolf 2003).

Fimbrien und Adhäsine helfen bei der Anhaftung an diese Bakterien und Wirtszellen (Lamont und Jenkinson 1998, Lamont et al. 1994, Njoroge et al. 1997, Nakagawa et al. 2005). Nachdem der Kontakt zu den Epithelzellen hergestellt ist, treibt *P. gingivalis* durch die Freigabe zell- und matrixauflösender Enzyme, z.B. Kollagenasen und Hyaluronidasen, die Gewebeerstörung voran (Rateitschak und Wolf 2003).

So genannte Invasine ermöglichen dem Bakterium den Zutritt in die Gewebezellen (Lamont et al. 1995). Im Verlauf der Erkrankung erhöht sich die Menge an *P. gingivalis* aufgrund des sich verringernenden Sauerstoffgehaltes mit zunehmender Taschentiefe.

Ein Schutzmechanismus vor Phagozytose besteht für *P. gingivalis* durch eine vorhandene Kapsel (Rateitschak und Wolf 2003).

P. gingivalis besitzt als einen weiteren Virulenzfaktor so genannte Gingipaine. Darunter versteht man arginin- und lysinspezifische Cysteinproteasen, mit deren Hilfe sich *P. gingivalis* vor der Phagozytose durch Neutrophile schützt, indem die IL-8-Produktion und damit die Chemotaxis der Leukozyten gehemmt wird (Wilton et al. 1993, Uehara et al. 2008). Gingipaine bedingen weiterhin die Aktivierung von Matrix-Metall-Proteasen (DeCarlo et al. 1997), die für den Gewebeabbau notwendig sind, und die Aktivierung von Osteoklasten, deren Aufgabe im zielgerichteten Ab- und Umbau von Knochengewebe besteht (Watanabe et al. 1996).

Ein anderer wichtiger Virulenzfaktor von *P. gingivalis* ist sein toxisch und antigen wirksames Lipopolysaccharid (LPS). Dieses Endotoxin ist unter anderem beteiligt an der Aktivierung von Zytokinen, wie IL-1, IL-8 und IL-6 in menschlichen Gingivafibroblasten (Rateitschak und Wolf 2003, Watanabe et al. 1996).

Zelltoxische Substanzen wie Butyrat, Acetat, Propionat, Indole und Phenole schädigen zusätzlich den Wirtsorganismus.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass dieses Bakterium durch eine Vielzahl potenter pathogener Eigenschaften in der Lage ist, die Entstehung und Progression der Parodontitis voranzutreiben.

2.5 Zytokine und ihre Bedeutung in der Parodontitis

Zytokine sind hormonähnliche, niedermolekulare Peptide oder Glykopeptide (Rateitschak u. Wolf 2003) und spielen eine wichtige Rolle als natürliche Botenstoffe. Diese Signalstoffe ermöglichen eine Verständigung der Zellen untereinander und bewirken damit unter anderem eine Steuerung der Immunantwort. Man unterscheidet proinflammatorische Zytokine, die das Abwehrsystem auf eine Entzündung aufmerksam machen, von den antiinflammatorischen Zytokinen. Letztere helfen beim Abklingen der Entzündung nach erfolgreicher Immunabwehr (Rateitschak u. Wolf 2003).

Die Zytokinfreisetzung wird durch verschiedene Stimuli, wie z.B. Zerfallsstoffe von Bakterien, aktiviert (Curfs et al. 1997). Bei entzündlichen Vorgängen im Sinne einer Parodontitis sind insbesondere die entzündungsfördernden Zytokine, vor allem IL-1 und TNF- α , vorzufinden (Kesavalu et al. 2002, Rateitschak u. Wolf 2003).

Diese aktivieren weitere Entzündungsmediatoren wie IL-6 oder Matrix-Metall-Proteinasen, die eine wichtige Rolle beim Abbau von Gewebe spielen (Rateitschak u. Wolf 2003).

Dagegen zeigt IL-8 eine große chemotaktische Bedeutung für die Neutrophilenmigration während des Entzündungsprozesses (Harada et al. 1994, Fitzgerald und Kreutzer 2007).

Im Folgenden sollen für ein besseres Verständnis die vielfältigen Auswirkungen von IL-6 und IL-8 genauer beschrieben werden.

IL-6 hat ein Molekulargewicht von 22 bis 29 kDA, dabei ist der Transkriptionsort auf dem kurzen Arm von Chromosom sieben zu finden (Curfs et al. 1997). Humanes IL-6 besteht aus 184 Aminosäuren und besitzt zwei N-glykosylierte Ketten und vier Cysteinreste (Kishimoto 1989).

IL-6 wird von verschiedenen Zellen, so z.B. Monozyten, Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen, B- und T-Zellen, gebildet (Curfs et al. 1997, van Snick 1990).

Da derzeitige Studien einen Anstieg von Makrophagen im Verlauf der parodontalen Erkrankung bestätigen (Gemmell et al. 2001), kann IL-6 somit auch als Indikator für entsprechende Entzündungen angesehen werden.

Interessanterweise wird IL-6 erst durch entsprechende Reize, wie z.B. bakteriellen LPS, IL-1 α oder TNF- α , sezerniert (Kishimoto 1989). Jedoch sei an dieser Stelle noch auf die Arbeit von Curfs et al. (1997) hingewiesen, welche in ihrer Untersuchung gezeigt haben, dass die IL-6-Bildung *in vitro* schneller veranlasst wird als *in vivo*.

IL-6 ist ein multifunktionelles Zytokin und wirkt insbesondere bei entzündlichen Prozessen auf eine Vielzahl von Zellen (Hirano et al. 1990). So konnten erhöhte IL-6-Mengen in der Sulkusflüssigkeit und gereiztem Gewebe von Patienten mit chronischer Parodontitis festgestellt werden (Okada et al. 1997, Wong und Clark 1988). Zudem gilt IL-6 als wichtigster Mediator in der Regulierung der Immunabwehr (Okada et al. 1997).

Heymann et al. (1998) konnten die knochenresorbierende Wirkung von IL-1 β , TNF- α und IL-6 nachweisen. Dabei wird einerseits die Knochensynthese gehemmt und gleichzeitig direkt und indirekt die Resorption durch die Wirkung auf Präosteoklasten gesteigert (Rateitschak und Wolf 2003). Andere wichtige biologische Funktionen von IL-6 sind u.a. die Aktivierung von Hepatozyten zur Synthese von Akute-Phase-Proteinen, die Differenzierung von T-Zellen, sowie die Stimulation der B-Zellproduktion und Antikörperbildung (van Snick 1990, Kishimoto 1989, Okada et al. 1997).

Um seine biologische Wirkung vermitteln zu können, nutzt IL-6 spezifische Rezeptoren. Damit der Zytokinstimulus übermittelt werden kann, sind zwei Rezeptoruntereinheiten notwendig. Für die Bindung von IL-6 an die Zielzelle ist die α -Kette (CD126, IL-6R α) von Bedeutung (Curfs et al. 1997). Die Kette wurde von Yamasaki kloniert und findet aufgrund eines Molekulargewichtes von 80kDA auch die Bezeichnung gp80 (Yamasaki et al. 1988). Für die Signalweiterleitung ist die β -Kette (CD-130) ausschlaggebend (Hibi et al. 1990).

IL-8 gehört zu einer Untergruppe der Interleukine, den so genannten Chemokinen. Man unterscheidet α - und β -Chemokine, die sich in der Aminosäuresequenz unterscheiden. Im Gegensatz zu den β -Chemokinen (-C-C-) findet sich bei den α -Chemokinen (IL-8) eine zusätzliche Aminosäure (-C-X-C-). Der Transkriptionsort für IL-8 findet sich auf dem langen Arm von Chromosom vier. Das Molekulargewicht dieses Zytokins beträgt 8kDA. Verschiedene Zellen, wie Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Epithelzellen und T-Zellen können IL-8 produzieren (Curfs et al.1997). Die von Abwehrzellen gebildete Variante besteht aus 72 Aminosäuren und enthält vier Cysteinreste, die über je zwei Disulfidbrücken verbunden sind (Baggiolini und Clark-Lewis 1992). IL-8 vermittelt seine Effekte über die Bindung und Aktivierung der an ein G-Protein gekoppelten Rezeptoren CXCR-1 und CXCR-2 (Curfs et al. 1997). Für die Aktivierung von IL-8 sind wiederum verschiedene Reizfaktoren, wie LPS, IL-1 oder TNF- α notwendig (Harada et al. 1994). Jedoch haben neuere Studien auch gezeigt, dass unabhängig von einer Entzündung ein bestimmtes IL-8-Level für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen Wirt und Erregern im gesunden Gewebe vorzufinden ist (Huang et al. 2001, Mikolajczyk-Pawliska et al. 1998). Bedeutung erhalten IL-8 bei der Chemotaxis von Neutrophilen an den Ort der Entzündung (Baggiolini und Clark-Lewis 1992, Harada et al. 1994). Die aktivierten Leukozyten binden an die Epithelzellen und setzen verschiedene lysierende Enzyme frei, die am Gewebeumbau beteiligt sind (Owen und Campbell 1999). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang eine Studie, in der nach einer P. gingivalis-Infektion ein Rückgang von IL-8 mit einer starken Zerstörung des umgebenden Gewebes verbunden war (Huang et al. 2001).

2.6 Teebaumöl

In den letzten Jahren ist mehr und mehr ein Trend zu beobachten, der zeigt, dass eine Vielzahl an Menschen die Möglichkeit alternativer Heilmethoden in Betracht ziehen, um Krankheiten zu behandeln. Ein Grund hierfür ist sicherlich in den zunehmenden Antibiotikaresistenzen zu sehen. Aber auch der Wunsch, durch pflanzliche Wirkstoffe eine Verbesserung oder Genesung zu erfahren und Nebenwirkungen durch Medikamente zu verhindern, bestimmt das Denken der Menschen. Dabei beruhen die Erkenntnisse über die heilenden Kräfte der Naturstoffe meist auf einem langen Erfahrungszeitraum. Oft von Naturvölkern über Jahrzehnte genutzt, fanden die Pflanzenstoffe später den Zugang in die jetzige Gesellschaft.

Auch Teebaumöl (TTO) ist ein solches Naturheilmittel, das schon lange von den australischen Bundjalung-Aborigines gekannt und genutzt wurde (Reichling et al. 2003, Soukoulis und Hirsch 2004). In unterschiedlichen Darreichungsformen (als Verband aus Blättern, Paste u.a.) genutzt, fand die Teebaumöl-pflanze bei einer Vielzahl von Erkrankungen ihre Anwendung. Dazu zählen die Behandlung von Wunden, Erkältungen oder Pilzinfektionen.

In der neueren Zeit fanden die Verfahren zunächst bei den Entdeckungsreisen von James Cook erste Aufmerksamkeit. Die Europäer lernten die Verarbeitung und Nutzung der Teebaumölblätter durch die Ureinwohner und brachten die neuen Kenntnisse mit in die Heimat.

Dem Chemiker Dr. A. R. Penfold gelang in den zwanziger Jahren des 20. Jahrhunderts die Herstellung und wissenschaftliche Beschreibung von Teebaumöl (Reichling et al 2003). Dabei wurden erstmalig Untersuchungen zu den Wirkungen von Teebaumöl unternommen.

Später fand das Teebaumöl auch während des zweiten Weltkrieges Anwendung als Antiseptikum, verlor aber in der folgenden Antibiotikaära seine Bedeutung.

Wie eingangs beschrieben, scheint heute verbunden mit der zunehmenden Resistenzproblematik bei Antibiotikagabe und einem neuen ökologischen Bewusstsein ein stärkeres Interesse an der Anwendung von Naturprodukten zu bestehen. Neben Anwendungsgebieten ohne therapeutischen Anspruch (Verwendung als Seifen, Cremes, Shampoos) wurden weitere Wirkgebiete durch Teebaumölprodukte entdeckt. Dabei zeigten verschiedene klinische Studien Teebaumöl als mögliche alternative Wahl zu den Medikamenten der Schulmedizin (Bassett et al. 1990, Tong et al. 1992, Buck et al. 1994).

Heutzutage wird Teebaumöl hauptsächlich durch Wasserdampfdestillation aus den Blättern des australischen Teebaums gewonnen. Da Teebaumöl nach dem „Australischen Standard“ eine bestimmte Zusammensetzung aufweisen muss, können nur drei Stammpflanzen (*Melaleuca alternifolia*, *Melaleuca linariifolia*, *Melaleuca dissitiflora*) zur Ölgewinnung genutzt werden. Die Bestandteile des Teebaumöls sind sehr komplex. Es lassen sich ca. 100 Substanzen feststellen,

wobei heute etwa 60 Komponenten aufgeklärt sind (Carson and Riley 1995, Arweiler et al. 2000).

Der prozentuale Anteil von 1,8-Cineol (<15%) und Terpinen-4-ol (>30%) in kommerziell erhältlichen ätherischen Ölen wird durch den Australischen Standard (AS 2782-1985) vorgeschrieben. Die wissenschaftliche Begründung für diese prozentuale Festlegung ist nicht eindeutig und unterliegt kontroversen Diskussionen (Carson und Riley 1995). Da die aktuellen Studien davon ausgehen, dass der Cineolanteil nur geringe oder keine antimikrobielle Wirkung besitzt, dagegen Terpinen-4-ol den Hauptwirkstoff von Teebaumöl darstellt, könnte damit der Grund für diese Definition gefunden sein. Um seine gesamte Wirkung bewahren zu können, muss das Öl vor Sauerstoff und Licht geschützt werden, da es eine starke Anfälligkeit gegenüber Oxidationsprozessen zeigt (Reichling et al. 2003).

Im Folgenden sollen nun die zahlreichen Wirkungen von Teebaumöl aufgeführt werden, um so einen Ausblick auf mögliche Anwendungsgebiete zu geben.

2.6.1 Antibakterielle Wirkung

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) bzw. der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) sind gebräuchliche Testmethoden zur Feststellung antibakterieller Wirksamkeit (Mann und Markham 1998). Eine Vielzahl von Studien hat gezeigt, dass Teebaumöl über eine hohe antibakterielle Wirkung gegenüber einem weiten Spektrum grampositiver und gramnegativer Bakterien verfügt (Carson und Riley 1993, Carson et al. 1998, Raman et al. 1995, Brady et al. 2006, Hammer et al. 2003, Kulik et al. 2000).

Einige Beispiele für Bakterien an denen die Wirkung von Teebaumöl untersucht wurde, sind u.a. *Escherichia coli*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus pyogenes* oder *P. gingivalis*.

Bemerkenswert in diesem Zusammenhang scheint, dass Teebaumöl eine antibakterielle Wirkung gegen Problemkeime wie MRSA (Methicilin-resistente *Staphylococcus aureus*- Stämme) aufweist. Dabei wurde in entsprechenden Untersuchungen festgestellt, dass die im Teebaumöl enthaltenen Monoterpene wie Terpinen-4-ol, α -terpineol und α -pinene diese Wirkung bedingen (Brady et al. 2006, Raman et al.1995).

Auch Carson und Riley erkannten, dass die antibakterielle Hauptwirkung des Teebaumöls durch die enthaltenen Terpene bedingt wird (Carson und Riley 1995). Andererseits kann der Effekt durch andere Komponenten beeinträchtigt werden. So zeigen die Studien von Cox et al. (2001), dass die nichtoxidierten Terpene die Wirkung von Terpinen-4-ol vermindern.

Neben diesen in vitro Untersuchungen gibt es auch eine klinische Studie, die den Effekt von Teebaumöl bei Akne vulgaris testete. Dabei wurde die Wirkung von Teebaumöl mit dem allgemein gebräuchlichem Aknemittel Benzoylperoxid verglichen. Die Ergebnisse ließen eine Verbesserung der Schädigungen unter beiden Therapien feststellen. Zwar wirkte Benzoylperoxid bei entzündeten Läsionen signifikant besser, aber die Nebenwirkungen waren unter der Anwendung von Teebaumöl verringert (Basset et al. 1990).

Teebaumöl greift überwiegend in die Stoffwechselforgänge der Keime ein und kann so antibakteriell wirken. Die Untersuchung von Gustafson et al. beschrieb die Autolyse von Zellen in *Escherichia coli*, die Koagulation von Zytoplasma und die Bildung extrazellulärer Blasen als mögliche Wirkmechanismen (Gustafson et al. 1998). Als weitere antimikrobielle Wirkmechanismen gelten die Störung des Ionentransportes, die Zellwandzerstörung sowie die Behinderung der Permeabilitätsbarriere oder der Zellatmung (Cox et al. 2000, Cox 2001).

2.6.2 Antimykotische Wirkung

Teebaumöl zeigt auch antimykotische Effekte mit breitem Wirkspektrum, so z.B. gegenüber *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* oder *Aspergillus niger* (Hammer et al. 2003).

In der Studie von Oliva et al. (2003) wurde die Wirkung von gängigen Pilzmedikamenten und Teebaumöl verglichen. Dabei wirkte Teebaumöl sogar stärker als Amphotericin oder 5-Fluorocytosin. Der Effekt war hierbei nicht nur durch Terpinen-4-ol sondern auch den Cineolanteil bedingt. Bedauerlicherweise waren auch Hautirritationen Folge der Cineolwirkung.

Klinische Studien untersuchten den Effekt von Teebaumöl zum einen auf Fußpilz und zum anderen auf Nagelpilz. Jedoch zeigten die Untersuchungen von Tong et al. (1992) keinen statistisch gesicherten Effekt von Teebaumöl auf Fußpilzinfektionen in

vivo. Bei der Nagelpilzstudie waren dagegen die klinischen Symptome ganz oder teilweise abgeklungen (Buck et al. 1994).

2.6.3 Antivirale Wirkung

Die Wirkung des Teebaumöls auf Viren wurde in einer Arbeit von Bishop (1995) untersucht. Dabei präparierte man Pflanzen mit einer Teebaumöllösung bevor in einem nächsten Schritt eine Infektion der Pflanzen mit dem Tabak-Mosaik-Virus erfolgte. Der Befall der Pflanzen nach Virusgabe war unter der Wirkung des Teebaumöls verringert.

Eine andere Studie zeigte die direkte Wirkung des Teebaumöls auf Herpes simplex-Viren Typ I und Typ II, indem eine signifikante Verringerung der Virustiter festgestellt werden konnte. Interessanterweise konnte in dieser Studie auch ein möglicher Wirkmechanismus des Teebaumöls erkannt werden. Das Öl bedingt unter Umständen einen direkten Effekt auf die Herpesviren während der Adsorption, nicht aber während der Penetration in die Zellen (Schnitzler et al. 2001).

Aufgrund dieser Untersuchungen könnte eine mögliche Alternative in der Behandlung von Herpeserkrankungen gefunden sein.

2.6.4 Antiinflammatorische Wirkung

Verschiedene Bestandteile von Teebaumöl sind für ihre antientzündlichen Eigenschaften bekannt. Dazu gehören u.a. Terpinen-4-ol und α -terpineol, die auch in vivo diese Effekte zeigen (Hart et al. 2000).

Die gleiche Untersuchung von Hart et al. (2000) zeigte, dass eine Ausschüttung LPS induzierter Entzündungsmediatoren, wie IL-1 β , TNF- α und IL-10 unter Teebaumöleinfluss signifikant zurückging. Dabei wurden mittels der Gaschromatographie Terpinen-4-ol, α -terpineol und 1,8-Cineol als Wirkkomponenten festgestellt. Einzeln angewandt konnte nur Terpinen-4-ol die Ausschüttung der Entzündungsmediatoren IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-10 und PGE2 an LPS aktivierten Monozyten verringern (Hart et al. 2000).

Auch die Studie von Brand et al. (2001) konnte den antiinflammatorischen Effekt der wasserlöslichen Bestandteile von Teebaumöl untermauern. Terpinen-4-ol, α -terpineol und 1,8-Cineol unterdrücken demnach die Bildung von Superoxiden durch Monzyten, wobei kein Effekt auf Neutrophile nachgewiesen werden konnte.

2.6.5 Toxikologische Aspekte und mögliche Nebenwirkungen

Neben zahlreichen Befürwortern des Gebrauchs von Teebaumöl gibt es auch vereinzelte Gegenstimmen, die trotz des vorangegangenen gezeigten weiten Wirkspektrums Zweifel bezüglich der unbedenklichen Anwendbarkeit des Naturproduktes anmelden.

Als ein Kritikpunkt wird angeführt, dass der Großteil der Untersuchungen zu den Wirkungen des Öls *in vitro* durchgeführt wurde und dementsprechend die Verwendung am Menschen noch nicht uneingeschränkt möglich ist. Möglicherweise sind zur Erzielung identischer Ergebnisse *in vivo* höhere Konzentrationen an Teebaumöl nötig. Auch die klinischen Studien lassen noch keinen endgültigen Schluss auf den therapeutischen Nutzen zu, da viele Ergebnisse allein auf Patientenbefragungen beruhen (Reichling et al. 2003).

Eine weitere Arbeit zeigt außerdem, dass bei der Anwendung von Teebaumöl in zu niedrigen Konzentrationen die Bildung von Resistenzen gegen Antibiotika bei Bakterien gefördert werden kann (McMahon et al. 2007). Die Untersucher kommen zu dem Schluss, dass eine Anwendung mit zu stark verdünntem Teebaumöl Bakterien nicht abtötet, sondern vielmehr deren Abwehrmechanismen aktiviert, in Folge dessen sich die beschriebenen Resistenzen der Erreger ausbilden. Die Autoren empfehlen daher, Teebaumöl nicht unter einer Konzentration von 4-5% anzuwenden. Dann sei gewährleistet, dass die Bakterien durch die Inhaltsstoffe abgetötet werden und der Bildung resistenter Keime nicht Vorschub geleistet wird (McMahon et al. 2007).

Andere Studien zeigen weiterhin einen allergisierenden Effekt von Teebaumöl, der unter anderem zu Hautirritationen und einer Kontaktdermatitis führen kann. Jedoch sind sich die Forscher dabei über die verursachenden Komponenten des Teebaumöls uneinig. Apted (1991) spricht 1,8-Cineol den allergisierenden Effekt zu, während Reichling (2003) vorzugsweise δ -Limonen, Aromadendren und α -Terpinen als mögliche Ursachen aufführt.

Vereinzelt wurden auch toxikologische Zwischenfälle unter Einsatz von Teebaumöl festgestellt. Zu den typischen Symptomen, die nach der Aufnahme von

unverdünntem Teebaumöl bei Kindern auftraten, gehörten Durchfall, Übelkeit, Verwirrheitszustände und Koordinationsprobleme, die aber innerhalb weniger Stunden bis Tage abklagen (Reichling 2003).

3. Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit sollte die antimikrobielle Wirkung von Teebaumöl (*Melaleuca alternifolia*) auf *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*) untersucht werden.

Dabei sollte der Effekt von Teebaumöl zunächst in Form der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) gegenüber 21 *P. gingivalis*- Stämmen ermittelt werden.

Ferner sollte die antibakterielle Wirksamkeit von Teebaumöl im jungen und im etablierten Biofilm getestet werden. Dazu sollte synthetischer Speichel mit vier verschiedenen *P. gingivalis*-Stämmen infiziert und das Öl in unterschiedlichen Konzentrationen (0,001%, 0,01%, 0,1%) zugegeben werden. Anschließend sollten die Proben für sechs bzw. 24 Stunden inkubiert und die kolonienbildenden Einheiten (cfu) bestimmt werden.

Schließlich sollte auch die antibakterielle Wirkung in KB-Zellen und Fibroblasten geprüft werden. Folglich sollten auch hier die Zellen mit den vier *P. gingivalis*-Stämmen infiziert und die Zugabe von verschiedenen Teebaumölkonzentrationen (0,01%, 0,05%, 0,1%) erfolgen. Später sollte eine Inkubation für sechs bzw. 24 Stunden stattfinden. Nach diesen Zeitintervallen sollten die Versuchswerte wie Keimzahlen (freie und adhärente Bakterien) und die ausgeschütteten Interleukinmengen (IL-6 und IL-8) ermittelt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Verwendete Bakterienstämme

Für die Untersuchung wurden 21 verschiedene *P. gingivalis*-Stämme verwendet. Dabei wurden die folgenden klinischen Isolate in die Studie einbezogen: *P. gingivalis* D9-3-3, *P. gingivalis* MaRL, *P. gingivalis* 358-1, *P. gingivalis* J439-1, *P. gingivalis* H17, *P. gingivalis* M5-1-2, *P. gingivalis* PL23, *P. gingivalis* PL55, *P. gingivalis* PL103, *P. gingivalis* PL139, *P. gingivalis* D2-4-3, *P. gingivalis* J378-1, *P. gingivalis* PL110, *P. gingivalis* J358-1, *P. gingivalis* PL126, *P. gingivalis* J430-1, *P. gingivalis* J361-1, *P. gingivalis* PL62, *P. gingivalis* J374-1. Weiterhin wurden folgende Referenzstämme verwendet: *P. gingivalis* W83 und *P. gingivalis* ATCC 33277.

Alle genannten Stämme fanden in der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration ihre Anwendung. Für die restlichen Untersuchungen kamen stets die folgenden vier Stämme in Gebrauch: *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. gingivalis* M5-1-2, *P. gingivalis* J374-1, *P. gingivalis* MaRL.

4.2 Teebaumöl

Für alle Versuche wurde Teebaumöl (TTO) der polnischen Firma Avicenna verwendet. Dieses Öl entspricht dem australischem Standard (AS 2782- 1985). Dieser schreibt den prozentualen Anteil von 1,8-Cineol und Terpinen-4-ol im ätherischen Öl vor. Dabei wird verlangt, dass in kommerziell erhältlichen Produkten der Anteil von 1,8-Cineol die 15% nicht und Terpinen-4-ol mindestens 30% erreichen sollte. Die genaue Zusammensetzung ist im Anhang aufgeführt.

4.3 Versuchsdurchführung der MHK- Bestimmung

Es erfolgte zunächst die Anfertigung der Wilkens-Chalgren-Platten, die mit verschiedenen Konzentrationen Teebaumöl (Avicenna, Polen) versetzt wurden.

Zu Beginn wurden die verschiedenen Verdünnungsreihen des Öls angefertigt (*Tabelle 1*). Im Anschluss wurde der Agar unter Wärmezufuhr geschmolzen und in Portionen à 18 ml eingeteilt. Zu diesen Portionen wurden dann jeweils 2 ml Schafblut und 5 ml der entsprechenden Teebaumöllösung hinzugegeben. Somit standen pro Konzentration vier Platten zur Verfügung.

Tab.1 Pipettierschema der Platten zur Bestimmung der MHK

TTO-Konzentration (%)	TTO (µl)	PBS (µl)	Tween 20 (µl)	Agar (ml)
Kontrolle (0)	0	200	20	18
0,005	1	199	20	18
0,01	2	198	20	18
0,05	10	190	20	18
0,1	20	180	20	18
0,5	100	100	20	18
1	200	0	20	18

Die verwendeten anaeroben Bakterienstämme wurden auf Schaedler-Agar bei 37°C in einem luftdicht verschließbaren Behälter mit Anaerobiersystem (Oxoid, Basingstoke, UK) kultiviert. Die Kulturen befanden sich demnach in einer frühen Wachstumsphase.

Nach der 24-stündigen Inkubation unter anaeroben Bedingungen wurden die jeweiligen Bakterienkolonien mit einem sterilen Wattetupfer von der Agarplatte abgenommen und mit physiologischer NaCl-Lösung in Suspension gebracht. 1 ml jeder Aufschwemmung wurde in ein Well eines sterilen Kunststoffträgers pipettiert.

Mittels Multipointinokulator wurden die Suspensionen danach gleichmäßig auf die mit unterschiedlichen Konzentrationen des Teebaumöls versetzten Wilgrens-Chalgren-Agar-Platten aufgebracht. Anschließend erfolgte die Inkubation der Platten für eine Woche bei 37°C in anaerober Atmosphäre.

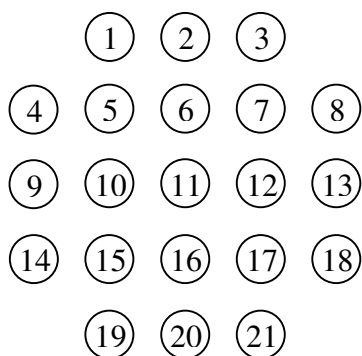


Abb.1 Pipettierschema der Suspension

Im Anschluss an die Inkubation erfolgte die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration. Dazu wurde kontrolliert, bei welcher Teebaumölkonzentration ein Wachstum der Bakterienkultur stattgefunden hatte oder nicht. Entsprechend konnte so die Zuordnung getroffen werden, ab welcher Konzentration eine Wachstumshemmung festzustellen war, die der minimalen Hemmkonzentration des jeweiligen Stammes entsprach.

4.4 Bestimmung der antibakteriellen Wirksamkeit von Teebaumöl im Biofilm

Die verwendeten anaeroben Bakterienstämme wurden auf Schaedleragar bei 37°C in einem luftdicht verschließbaren Behälter mit Anaerobiersystem (Oxoid, Basingstoke, UK) kultiviert.

Es erfolgte die Herstellung von Teebaumöllösungen, die die unterschiedlichen Endkonzentrationen von 0,001%; 0,01% und 0,1% zeigten. Die Zusammensetzung zeigt *Tabelle 2*.

Tab.2 Teebaumöl-Lösungen für die Biofilmbildung

Endkonzentrationen im Versuch bei Zusatz von 100µl/1ml	Verdünntes Medium 9,9ml PBS + 100µl Tween 20	Teebaumöl verdünnt :180 µl TTO + 20µl Tween 20+ 1600µl PBS
Kontrolle	1ml	
0,001%	999µl	1µl
0,01%	990µl	10µl
0,1%	900µl	100µl

Zusätzlich kam synthetischer Speichel nach ISO 10993 unter der Zugabe von 1% Albumin (1g/100ml) zum Einsatz. Dieser Speichel setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen: 0,7g NaCl, 0,26g Na₂HPO₄, 0,33g KSCN, 0,2g KH₂PO₄, 1,5g NaHCO₃ und 1,2g KCl.

4.4.1 Versuchsdurchführung mit dem jungen Biofilm

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Bakterienstämme in 10 ml Schaedlerbouillon, die mit 1 ml Schafblut versetzt war, eingimpft. Die entstandenen Suspensionen wurden dann für einen Tag in einem luftdicht verschlossenen Gefäß mit einem Anaerobiersystem (Oxoid, Basingstoke, UK) inkubiert.

Am Versuchstag wurde je 1 ml synthetischer Speichel in ein Well von zwei sterilen 24-Well-Platten zugegeben. Die Platten wurden eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Danach wurden die Überstände vorsichtig abpipettiert. Es folgte die Zugabe von 0,9 ml Bakterienvorkultur und 100 µl Teebaumöl-Lösung in jedes Well nach einem festgelegtem Schema (*Abb.2*).

<u>Reihe 1</u>	<u>Reihe 2</u>	<u>Reihe 3</u>	<u>Reihe 4</u>	<u>Reihe 5</u>	
①	②	③	④	⑤	Kontrolle
⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	0,001%
⑪	⑫	⑬	⑭	⑮	0,01%
⑯	⑰	⑱	⑲	⑳	0,1%

Reihe 1: Zellreihe
 Reihe 2: P.g. ATCC 33277
 Reihe 3: P.g. M5-1-2
 Reihe 4: P.g. J374-1
 Reihe 5: P.g. MaRL

Abb.2 Pipettierschema der Bakterienvorkultur und der TTO-Lösung

Die beiden 24-Well-Platten wurden anschließend für sechs bzw. 24 Stunden bei 37°C mittels Anaerobiersystem (Oxoid, Basingstoke, UK) inkubiert.

Im Anschluss erfolgte die Entnahme der Proben für die weitere Verarbeitung. Dazu wurde der Überstand vorsichtig entnommen. 200 µl NaCl-Lösung wurden in jedes Well pipettiert und der Biofilm mechanisch durch Abkratzen gelöst. Danach wurden die 200 µl NaCl-Lösung in den 24-Well-Platten mit der Pipette gut durchmengt. 10 µl der Suspension wurden entnommen und in 990 µl NaCl-Lösung gegeben, um eine Verdünnung von 1 : 100 zu erhalten. 100 µl dieser Verdünnung wurden anschließend auf eine Schaedler-Agarplatte gespatelt. Die beimpften Agarplatten wurden anaerob in einem luftdichten Behälter bei 37°C für sieben Tage inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Ermittlung der kolonienbildenden Einheiten.

4.4.2 Durchführung mit dem etablierten Biofilm

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden zunächst verschiedene Bakterienbouillons angesetzt. Dazu wurde eine Suspension aus 1 ml lysiertem Schafblut, 10 ml

Schaedlerbouillon und dem jeweiligen Bakterienstamm gefertigt. Diese wurde anschließend 24 Stunden anaerob inkubiert.

Am folgenden Tag wurden je 1 ml synthetischer Speichel pro Well auf zwei sterile 24-Well-Platten mittels Pipette aufgebracht und die Platten anschließend eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Danach wurden die Überstände vorsichtig entnommen und 1 ml Bakterienvorkultur in jedes Well nach einem festgelegtem Pipettierschema eingebracht (*Vgl. Abb.2*).

Die beiden 24-Well-Platten wurden anschließend für 42 Stunden bei 37°C mittels Anaerobiersystem (Oxoid, Basingstoke, UK) inkubiert.

Dann wurde vorsichtig das Medium abgesaugt. Nun folgte die Zugabe von 900 µl Kulturmedium vermischt mit 100 µl Teebaumöl-Lösung (*Tabelle 2*) pro Well und eine anschließende Inkubation von sechs bzw. 24 Stunden. Danach wurde der Überstand vorsichtig entfernt und jeweils 200 µl NaCl-Lösung in jedes Well pipettiert, um dann den Biofilm mechanisch zu lösen. Wiederum wurden die 200 µl NaCl-Lösung in den 24-Well-Platten gut mit der Pipette durchmengt.

In zuvor nummerierte 1,5ml- Eppendorfröhrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurden 990 µl Natriumchlorit gegeben. Anschließend fand die Pipettierung von 10 µl der Biofilmsuspension in die vorbereiteten Röhrchen statt.

100 µl dieser Verdünnung wurden anschließend auf Schaedleragar-Platten gespatelt. Die beimpften Agarplatten wurden anaerob in einem luftdichten Behälter bei 37°C für sieben Tage inkubiert und dann die Zahl der kolonienbildenden Einheiten ermittelt.

4.4. Bestimmung der antibakteriellen Wirksamkeit von Teebaumöl in KB-Zellen und in Fibroblasten

4.4.1 Die Zellpassage

Für diesen Versuch kamen zwei verschiedene Zellarten zur Anwendung. Zum einen wurden Epithelzellen (KB-Zellen), zum anderen humane Fibroblasten der Gingiva benutzt.

Als Ausgangsbasis dienten zwei mit einem dichten Zellrasen bewachsene 250 ml Gewebekulturflaschen (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland). Die KB-Zellen wurden mit einem Nährmedium EMEM (BioWhittaker, Verviers, Belgien) unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FCS von Gibco BRL, Paisley, UK) kultiviert.

Die Anzucht der Fibroblasten erfolgte mit DMEM (Gibco BRL, Paisley, UK) und mit Zusatz von 10% Kälberserum.

Für die eigentlichen Versuche fand die Passage der Zellen auf 24-Well-Zellkulturplatten (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland) statt. Dafür wurde unter der Laminarbox das alte Medium angesaugt und die an der Flasche haftenden Zellen mit phosphate buffered saline (PBS) gespült. Um die Zellen zu lösen, erfolgte dann die Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung (5%) in den Flascheninhalt.

Dann wurde die Flasche für fünf Minuten zurück in den Inkubator gestellt. Danach waren die Zellen als weißlicher Schleier sichtbar.

Die KB-Zellen wurden nun mit 2 ml EMEM mit 10% FCS, die Fibroblasten mit 2 ml DMEM mit 10% FCS vermischt, danach erfolgte die Zugabe in ein Gewebekulturröhrchen (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland).

Anschließend folgte die Zentrifugation der Zellen für vier Minuten bei 1.400U/min, wodurch die Zellen nun wieder als weißer Bodenbelag sichtbar wurden. Nun wurde der Überstand verworfen und die Zellen wurden mit 2 ml des jeweiligen Mediums abgesaugt und in ein Becherglas gegeben, welches mit 28 ml Nährmedium gefüllt war. Die Suspension wurde gemischt und nachfolgend je 500 µl pro Well pipettiert. Die Platten wurden mit 5%CO₂ bei 37 °C 24 Stunden inkubiert.

In dieser Zeit konnten die Zellen in der Suspension absinken und einen Monolayer auf dem Plattenboden bilden.

4.4.2 Versuchsdurchführung

Die Zellpassage erfolgte 48 Stunden vor dem eigentlichen Versuchsbeginn.

Am Vortag des Experiments wurden die Bakterienstämme auf Schaedler-Agarplatten überimpft. Nach Inkubation wurden die Bakterienkolonien mit einem sterilen Wattetupfer von der Agarplatte abgenommen und Medium 199 (Gibco BRL, Paisley, UK) zugegeben. Die Bakteriendichte wurde photometrisch auf eine OD_{640nm} = 0,1 eingestellt.

Anschließend wurden jeweils 1 ml Bakteriensuspension und 8 ml EMEM bzw. DMEM gemischt.

Das Zellkulturmedium wurde von den 24-Well-Platten abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Danach folgte die Zugabe von 900 µl Bakterien-Zellkulturmedium-Gemisch und 100 µl der verschiedenen Konzentrationen der Teebaumöl-Lösungen (*Tabelle 3*) nach einem festgelegten Pipettierschema (*Abb.3*).

Im Anschluss wurden die Zellkulturplatten mit 5% CO₂ bei 37°C für sechs bzw. 24 Stunden inkubiert.

Anschließend wurden 900 µl abpipettiert, in 1,5 ml Röhrchen gegeben und zehn Minuten bei 14.000 U/min zentrifugiert. Danach wurden 500 µl Überstand entnommen und für die spätere Interleukinbestimmung bei -20°C sofort eingefroren.

Tab.3 Teebaumöl- Lösungen für die Fibroblasten und KB-Zellen

Endkonzentration im Versuch bei Zusatz von 100µl/1ml	Verdünntes Medium: 9,9ml PBS + 100µl Tween 20	PBS: 20µl Tween 20 + 1880µl PBS	Teebaumöl verdünnt: 180 µl TTO + 20µl Tween 20 + 1600µl PBS
Kontrolle	900µl	100µl	
0,01%	900µl	90µl	10µl
0,05%	900µl	50µl	50µl
0,1%	900µl		100µl

<u>Reihe 1</u>	<u>Reihe 2</u>	<u>Reihe 3</u>	<u>Reihe 4</u>	<u>Reihe 5</u>	
①	②	③	④	⑤	Kontrolle
⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	0,01%
⑪	⑫	⑬	⑭	⑮	0,05%
⑯	⑰	⑱	⑲	⑳	0,1%

Reihe 1: Zellreihe
 Reihe 2: P.g. ATCC 33277
 Reihe 3: P.g. M5-1-2
 Reihe 4: P.g. J374-1
 Reihe 5: P.g. MaRL

Abb.3 Pipettierschema der Bakterienvorkulturen

Für die Bestimmung der planktonisch vorkommenden Bakterien wurden 10 µl pro Well entnommen und auf Schaedler-Agarplatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte für sieben Tage mit luftdichtem Behälter unter Anaerobiersystem (Oxoid, Basingstoke, UK) bei 37°C.

Nach dieser Inkubationszeit war die Zahl der koloniebildenden Einheiten zu ermitteln.

4.5 Nachweis von Interleukin-6 und Interleukin-8

Für den Nachweis von Interleukinen wurden Capture–ELISA-Tests verwendet. Hierbei werden antigenspezifische Antikörper an den Träger gebunden. Zunächst werden die antigentragenden Proben hinzugegeben und darauf folgend ein Detection- Antikörper, der mit einem Enzym markiert ist. Die Aufgabe des Enzyms besteht darin, das farblose Substrat in ein farbiges Produkt umzusetzen, wobei der Farbumschlag als Extinktion in einem Mehrkanalspektrometer erfasst werden kann. Für die quantitative Messung wurde die Extinktion der Proben mit einer Standardkurve verglichen. Diese Standardkurve wurde durch eine Verdünnungsreihe mit bekannter Antigenkonzentration erreicht. Als Rückschluss auf die Interleukinkonzentration diente die Stärke an Extinktion, sprich die Menge an Substratumsetzung.

4.5.1 Verwendete Lösungen und Zusätze

Für die Interleukinbestimmung wurden spezifische Testkits (CytoSets™, BioSource, Ratingen, Deutschland) verwendet. Für die Ausführung mussten zunächst verschiedene Puffer und Lösungen angesetzt werden (*Tabelle 4*).

Tab.4 Puffer und Lösungen für die Interleukinbestimmung

Coatingpuffer	PBS
Blockingpuffer	PBS+ 40g Rinderserumalbumin (Fraktion V) pro Liter
Standardpuffer	PBS+ 5g Rinderserumalbumin (Fraktion V)+ 1ml TBS Tween 20 pro Liter
Waschlösung	9g NaCl+ 1ml TBS Tween 20 pro Liter, pH 7,4
Stopplösung	0,5 M H ₂ SO ₄
Substrat	TMB

4.5.2 Durchführung des Interleukinnachweises

Bei der Realisierung des Versuches wurden 96-Well-Mikrotiterplatten (Immuno Modules, Nunc A/S Roskilde, Dänemark) und die angeführten Testkits benutzt.

In der Vorbereitung erfolgte ein einmaliges Waschen der Platten mit PBS, anschließend fand die Beschichtung mit dem Coating-Antikörper statt. Die Antikörperlösung wurde im Verhältnis 1 : 1000 mit PBS verdünnt und 100 µl pro Well

aufgetragen. Die Platten erhielten eine Abdeckung mit selbstklebender Folie und wurden dann für 12 bis 18 Stunden bei 2 bis 8 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Nach dieser Zeit wurde der Überstand entfernt und dann 300 µl Blockingpuffer pro Well pipettiert. Nachdem die Platten wieder mit Folie beklebt waren, begann eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach anschließender Entfernung der Blockinglösung wurden die Mikrotiterplatten dreimal mit je 400 µl Waschlösung pro Well gewaschen.

Nun wurden die Proben und der Standard aufgetragen. Um den Standard im richtigen Konzentrationsverhältnis zu erhalten, musste eine ausreichende Verdünnung mit destilliertem Wasser erfolgen, bis eine Ausgangskonzentration von 10.000 pg/ml vorlag. In einer Verdünnungsreihe wurden mit dem Standardpuffer weitere Konzentrationen von 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,675 pg/ml und eine Nullkontrolle angefertigt und schließlich von diesen Lösungen jeweils 100 µl pro Well pipettiert. Ebenso fand die Zugabe von 100 µl der zu untersuchenden Proben auf die Platten statt.

Im direkten Anschluss wurden 50 µl des Detection-Antikörpers aufgebracht, der im Verhältnis 1 : 250 mit dem Standardpuffer verdünnt worden war. Die Beklebung der Platten erfolgte erneut, dann begann die Inkubation bei Raumtemperatur für zwei Stunden auf dem Laborrüttler.

Nach Ablauf der Zeit schloss sich ein weiterer Waschvorgang mit dreimal 400 µl pro Well an.

Nun wurde das mit Standardpuffer 1 : 4000 verdünnte Konjugat aufgetragen, die Platten erneut abgeklebt und bei Raumtemperatur eine halbe Stunde inkubiert.

Erneut folgte die Spülung der Platten dreimal mit der Waschlösung. Nun wurde 100 µl Tetramethylbenzidin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) pro Well zugegeben. Ohne die Mikrotiterplatten abzukleben, folgte nun die halbstündige Inkubation bei dunkler Umgebung. Während dieser Zeit wandelte sich das farblose Substrat in ein blaues Produkt. Durch Zugabe von 50 µl 0,5 M H₂SO₄ pro Well wurde die Reaktion gestoppt, die blaue Färbung wechselte zu gelb. Innerhalb von 30 Minuten fand nun die Auswertung mit Hilfe des Mehrkanalspektrometers ELISA-Reader (Spectra Rainbow, TECAN, Crailsheim, Deutschland) statt. Hierbei kamen ein Messfilter von 450 nm und ein Referenzfilter von 650 nm zur Verwendung. Mit der dazugehörigen Software wurde die optische Dichte des Standards auf die Konzentration des Standards logarithmisch aufgetragen und eine Standardgerade berechnet. Anhand

dieser Standardgerade konnte nun jede Probenkonzentration ermittelt werden (Rönnebeck 2006).

Die Versuchsergebnisse wurden einer statistischen Prüfung mittels t-Test nach Student unterzogen.

5. Ergebnisse

5.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration gegenüber *Porphyromonas gingivalis*-Stämmen

Bei der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration der 21 einbezogenen *P. gingivalis*-Isolaten wuchsen alle Stämme auf den Kontrollplatten. Bei einer Konzentration von 0,005% Teebaumöl wurde das Wachstum von fünf Stämmen (*P. gingivalis* PL 55; *P. gingivalis* PL 103; *P. gingivalis* J 378; *P. gingivalis* J 358-1 und *P. gingivalis* PL 126) gehemmt. Bei einer Konzentration von 0,05% Teebaumöl war bei insgesamt 18 Stämmen und ab einer Konzentration von 0,5% war bei allen 21 Stämmen kein Wachstum mehr feststellbar (Abb.4). Für den weiteren Versuchsablauf wurden von den 21 *P. gingivalis*-Stämmen vier ausgewählt. Diese waren im Einzelnen die Stämme *P. gingivalis* MaRL (MHK: 0,01%), *P. gingivalis* J374-1 (MHK: 0,01%), *P. gingivalis* M5-1-2 (MHK: 0,05%) und *P. gingivalis* ATCC 33277 (MHK: 0,5%).

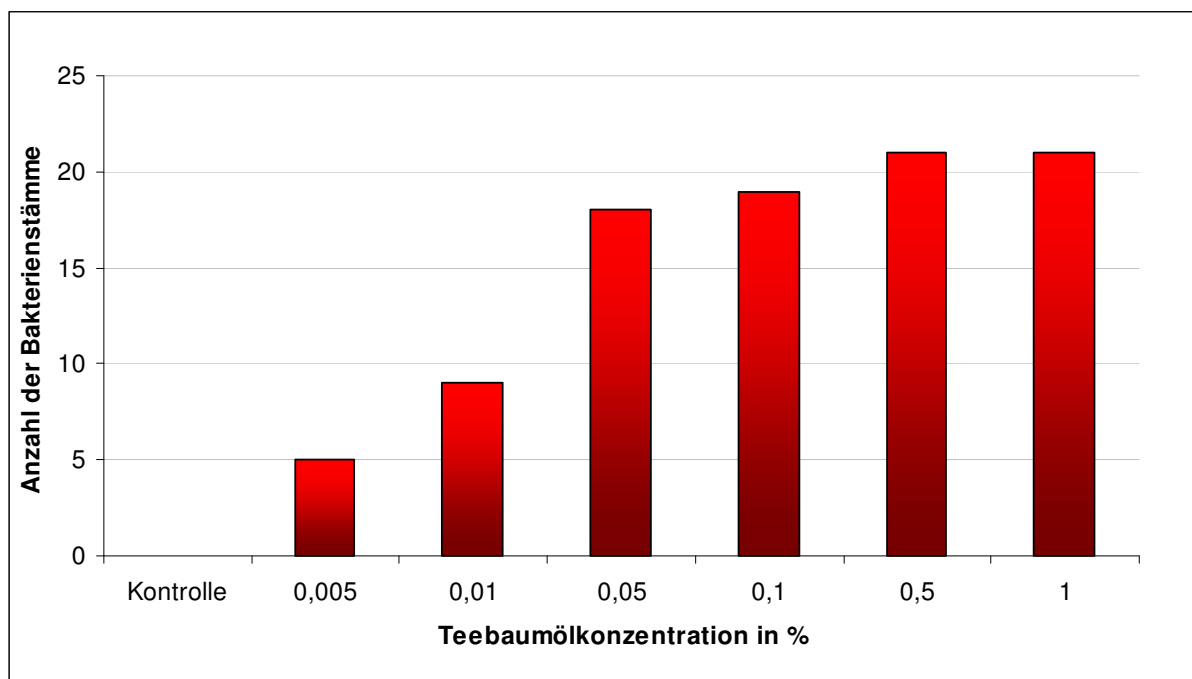


Abbildung 4
Kumulative minimale Hemmkonzentration (MHK) gegenüber *P. gingivalis*-Stämmen bei verschiedenen Teebaumölkonzentrationen

5.2 Antibakterieller Effekt im entstehenden und etablierten Biofilm durch Teebaumöl

Der antibakterielle Effekt von Teebaumöl wurde auf vier ausgewählte *P. gingivalis*-Stämme im sich bildenden und schon etablierten Biofilm untersucht. Die Analyse erfolgte nach sechs und 24 Stunden.

Die angegebenen Werte ergaben sich als der Mittelwert der beiden Messungen der Doppelbestimmungsversuche.

5.2.1 Ergebnisse für den sich bildenden Biofilm

Teebaumöl zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die in einem sich bildenden Biofilm geprüften *P. gingivalis*-Stämme (Abb.5). Jedoch waren stammspezifische Effekte zu verzeichnen (Abb.6).

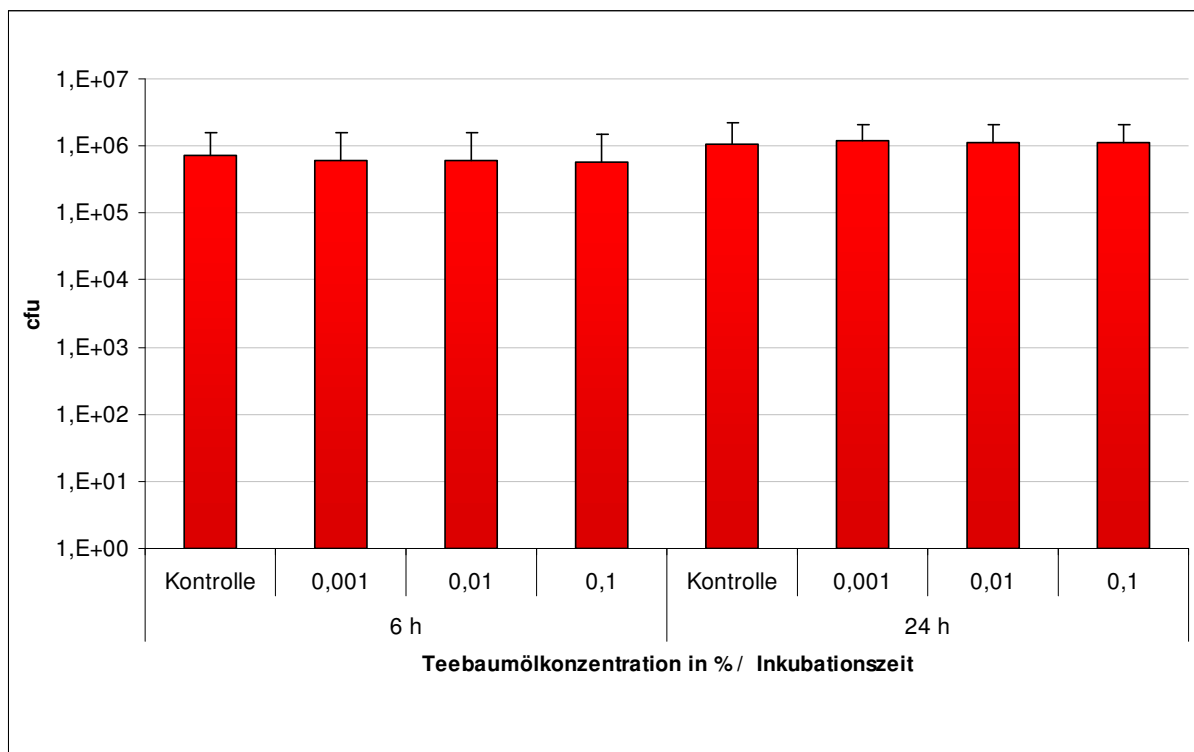


Abbildung 5
Durchschnitt der koloniebildenden Einheiten (cfu) aller vier Bakterienstämme im jungen Biofilm

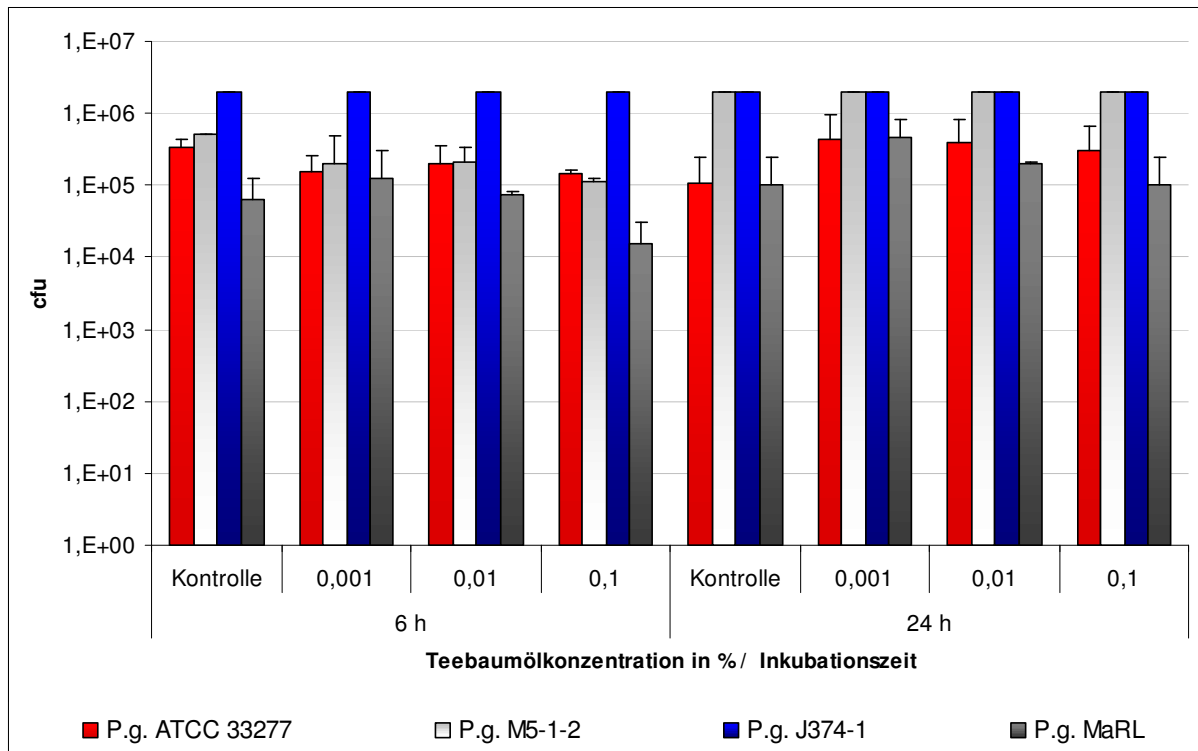


Abbildung 6

Koloniebildende Einheiten (cfu) je *P. gingivalis*-Stamm im sich bildenden Biofilm bei verschiedenen Teebaumölkonzentrationen und Inkubationszeiten

Für den *P. gingivalis*-Stamm ATCC 33277 war eine generelle Abnahme der koloniebildenden Einheiten mit zunehmender Teebaumölkonzentration nach sechs Stunden Inkubationszeit festzustellen. So zeigte sich ein Rückgang um 57% bei 0,1%iger Teebaumöllösung.

Nach 24 Stunden Inkubationszeit zeigte sich im Gegensatz dazu ein Anstieg aller Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle.

Der *P. gingivalis*-Stamm M5-1-2 verzeichnete einen Rückgang der Bakterienkolonien um maximal 78% bei einer 0,1%igen Konzentration des Teebaumöls und sechs Stunden Inkubationszeit.

Kein Einfluss des Teebaumöls ließ sich für *P. gingivalis* J374-1 jeweils nach sechs und 24 Stunden Inkubationszeit festzustellen.

Für den *P. gingivalis*-Stamm MaRL war zunächst ein Anstieg der koloniebildenden Einheiten nach sechs Stunden Inkubationszeit und einer 0,001%igen Teebaumölkonzentration festzustellen. Für die 0,1%ige Konzentration zeigte sich eine

Abnahme um 76% an Bakterienkolonien. Nach 24 Stunden Inkubation war ein Anstieg der Bakterienkolonien bei 0,001% und 0,01% Teebaumölkonzentration festzustellen.

5.2.2 Ergebnisse für den etablierten Biofilm

Bei der Untersuchung der Wirkung von Teebaumöl auf die vier *P. gingivalis*-Stämme in einem etablierten Biofilm wurden ebenfalls keine signifikanten Wirkungen festgestellt (Abb.7). Für die einzelnen Stämme ließen sich charakteristische Ergebnisse registrieren (Abb.8).

Der Stamm *P. gingivalis* ATCC 33277 wurde nach sechs und 24 Stunden Inkubationszeit nicht durch Teebaumöl beeinflusst. *P. gingivalis* M5-1-2 zeigte einen Anstieg an koloniebildenden Einheiten mit zunehmender Teebaumölkonzentration nach sechs Stunden Inkubationszeit. Für die 0,01%ige Konzentration war ein Anstieg um 51% und für 0,01% um 36% an Bakterienkolonien festzustellen.

Keine eindeutigen Effekte ließen sich für *P. gingivalis* J374-1 und *P. gingivalis* MaRL nach sechs und 24 Stunden Inkubationszeit erfassen.

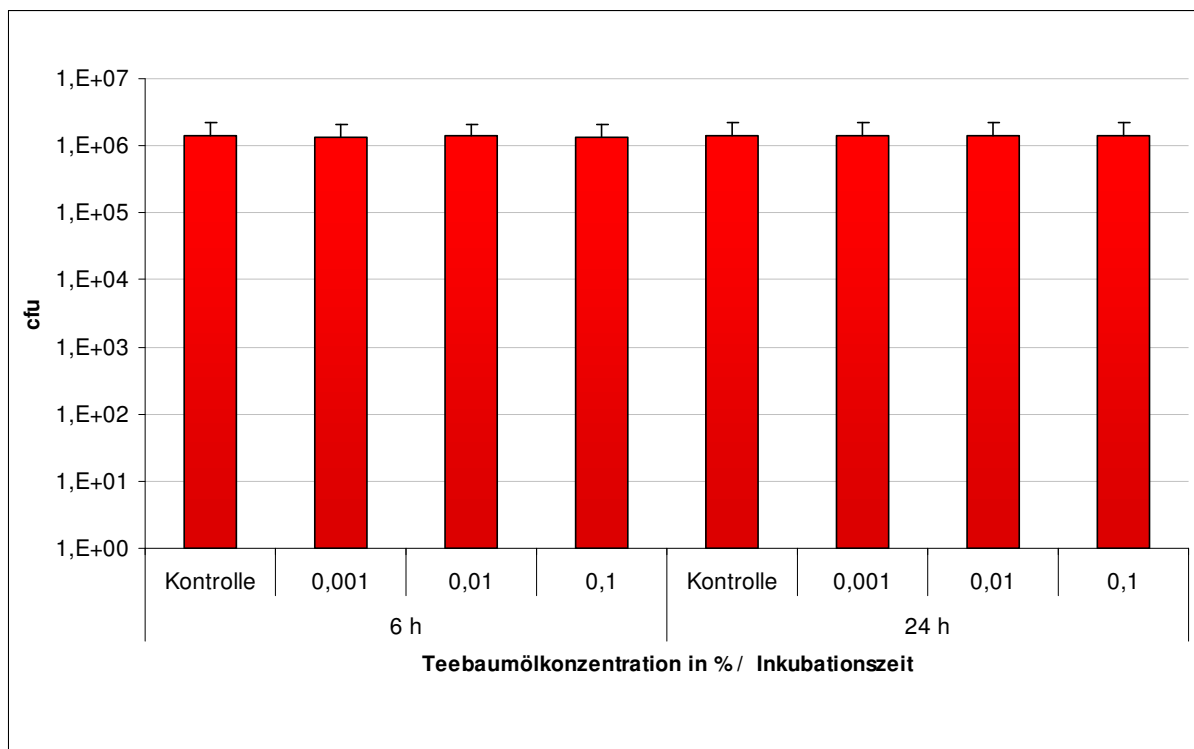


Abbildung 7
Durchschnitt der koloniebildenden Einheiten (cfu) aller vier Bakterienstämme im etablierten Biofilm

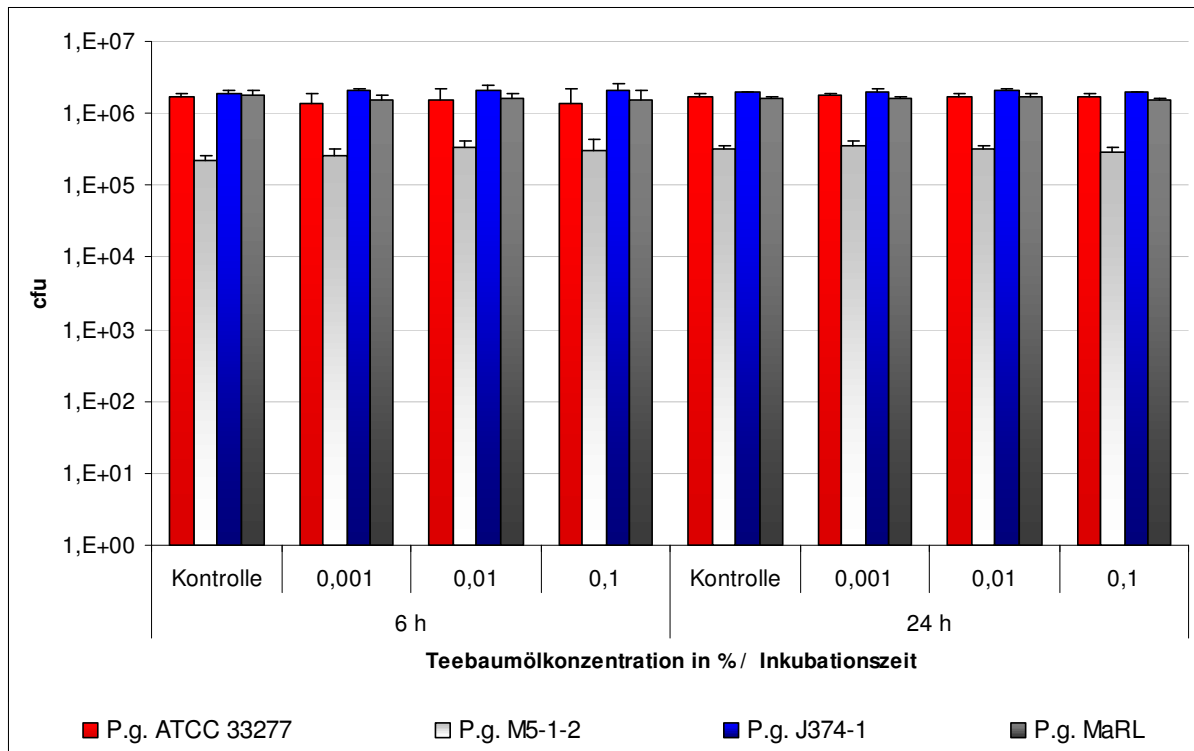


Abbildung 8
Koloniebildende Einheiten (cfu) je P. gingivalis–Stamm im etablierten Biofilm unter verschiedenen Teebaumölkonzentrationen und Inkubationszeiten

5.3 Antibakterielle Wirksamkeit von Teebaumöl in KB-Zellen und in Fibroblasten

Nach der Untersuchung der Wirksamkeit von Teebaumöl auf verschiedene P. gingivalis–Stämme in unterschiedlichen Biofilmen soll im folgenden Abschnitt die antibakterielle Wirkung auf die Bakterienstämme in Verbindung mit KB-Zellen und Fibroblasten erörtert werden. Für die KB–Zellen wurden adhärente (einschließlich invasiver) sowie die planktonisch vorkommenden Bakterienzahlen bestimmt. Dagegen wurde für die Fibroblasten nur die Anzahl an planktonischen Bakterien erfasst. Die Analyse erfolgte ebenfalls nach einer Zeit von sechs und 24 Stunden. Die angegebenen Werte ergaben sich als der Mittelwert der beiden Messungen der Doppelbestimmungsversuche.

5.3.1 Wirkung von Teebaumöl in KB-Zellen

Bei der Bestimmung der planktonisch vorkommenden Bakterien (KBE) in Verbindung mit KB-Zellen ließ sich in der Regel eine wachstumshemmende Wirkung von Teebaumöl feststellen ($p < 0,05$). In *Abbildung 9* sind die Zahlen der KBE der einzelnen Bakterienstämme dargestellt. Für die Bakterienstämme P. gingivalis ATCC

33277 und *P. gingivalis* J374-1 konnte ein Rückgang der koloniebildenden Einheiten im Vergleich zur Kontrollkultur zwischen 50% und der völligen Wachstumshemmung festgestellt werden. Dabei war mit Ausnahme des Stammes ATCC 33277 bei 0,1% Lösung und 24 h Inkubationszeit ein Zusammenhang zwischen Höhe der Teebaumölkonzentration und Rückgang der Anzahl der planktonischen Bakterien zu erkennen.

Für den *P. gingivalis*-Stamm M5-1-2 ließ sich für Konzentrationen größer als 0,01% eine deutliche Wachstumshemmung bei einer Inkubationszeit von sechs Stunden feststellen. Diese betrug bei einer Konzentration des Teebaumöls von 0,05% mehr als 99%.

Der Stamm *P. gingivalis* MaRL wurde durch 0,01%iges Teebaumöl nicht beeinflusst. In den weiteren Versuchen kam es hingegen zu keinem Keimwachstum mehr. Die Ergebnisse der adhärennten Bakterienkolonien sind in *Abbildung 10* aufgeführt. In der Regel war ein durchschnittlicher Rückgang der koloniebildenden Einheiten in Abhängigkeit der Teebaumölkonzentrationen festzustellen.

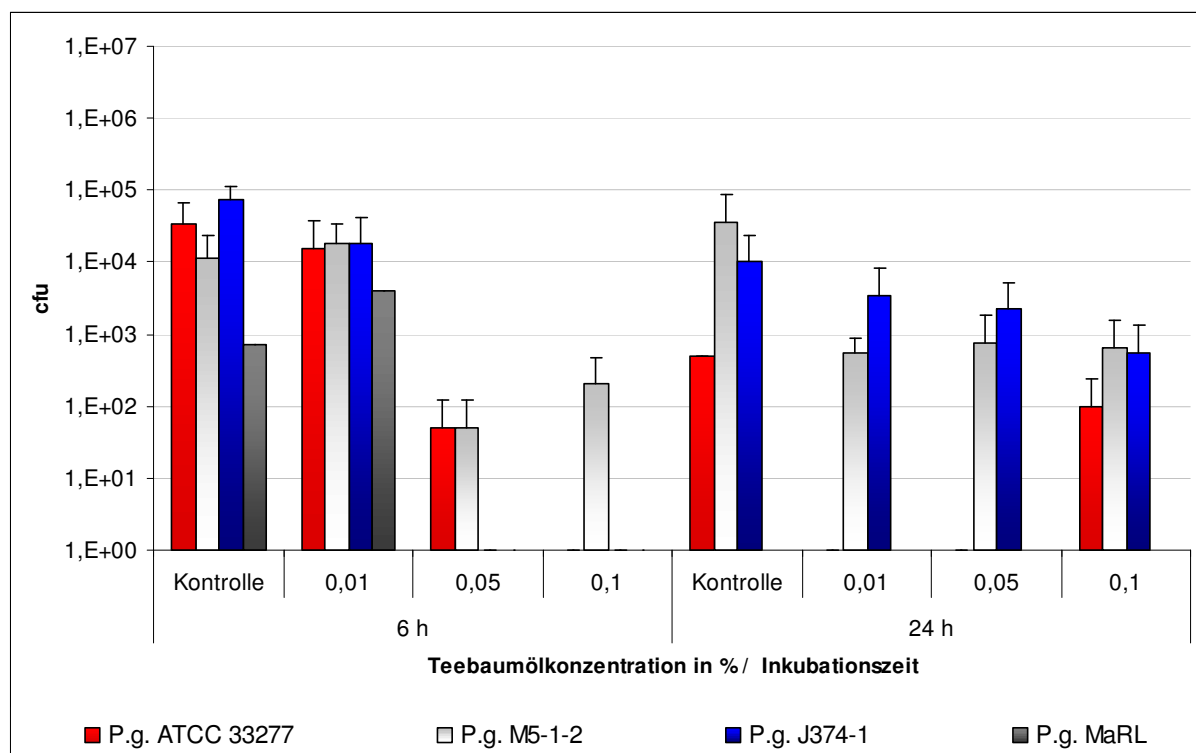


Abbildung 9
Anzahl der planktonisch vorkommenden Bakterien bei KB-Zellen mit unterschiedlichen Teebaumölkonzentrationen und Inkubationszeiten

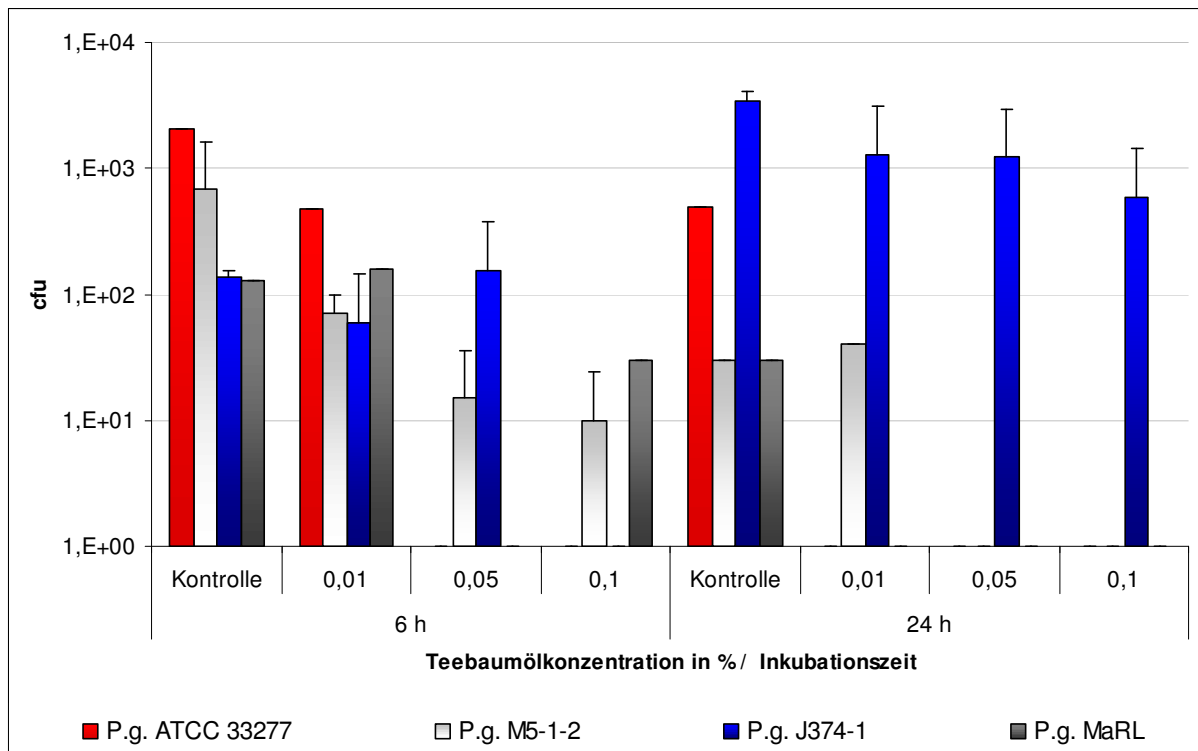


Abbildung 10
Anzahl der adhärennten Bakterien bei KB-Zellen mit verschiedenen Teebaumölkonzentrationen und Inkubationszeiten

Dennoch zeigten sich wiederum stammspezifische Unterschiede. So war bei den P. gingivalis–Stämmen J374-1 und MaRL ein Anstieg des Wachstums nach sechs Stunden Inkubationszeit im Vergleich zur Kontrolle um 15% bzw. 23% bei Konzentrationen von 0,05% bzw. 0,01% zu beobachten. Für den Stamm M5-1-2 wurde nach 24 Stunden Inkubationszeit ebenfalls bei einer Konzentration von 0,01% ein Anstieg der Koloniezahlen im Vergleich zur Kontrolle um 33% festgestellt.

Für die 0,1%ige Konzentration des Teebaumöls konnte bei allen Stämmen und Inkubationszeiten eine nahezu völlige Wachstumshemmung ermittelt werden. Die Anzahl der ermittelten koloniebildenden Einheiten war zwischen 77% und 100% geringer als die der entsprechenden Kontrollen.

5.3.2 Wirkung von Teebaumöl in Fibroblasten

Ähnlich dem Ergebnis des vorangegangenen Abschnittes ließ sich auch für die freien Bakterienkolonien in Verbindung mit Fibroblasten eine wachstumshemmende Wirkung von Teebaumöl feststellen ($p < 0,05$).

Nach sechs Stunden Inkubationszeit war eine Abnahme der Anzahl der Bakterienkolonien ab einer Teebaumölkonzentration von 0,05% für alle Stämme festzustellen. Bei einer Konzentration von 0,01% war hingegen nur für den Stamm MaRL ein Rückgang der Anzahl der Kolonien um 49% zu beobachten. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden war für die P. gingivalis–Stämme ATCC 33277 und MaRL eine nahezu völlige Wachstumshemmung für alle Teebaumölkonzentrationen zu verzeichnen. Für den Stamm P. gingivalis J374-1 war ein Abfall der Anzahl der Bakterienkolonien mit zunehmender Höhe der Konzentration sichtbar.

Die Ergebnisse für den P. gingivalis–Stamm M5-1-2 schienen hingegen keinen eindeutigen Hinweis auf die Wirkung von Teebaumöl zuzulassen. Bei Konzentrationen von 0,01% und 0,05% war in den Versuchen ein durchschnittlicher Anstieg im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen. Im Gegensatz dazu war ab einer Konzentration von 0,1% das Wachstum der Kolonien völlig gehemmt (Abb. 11).

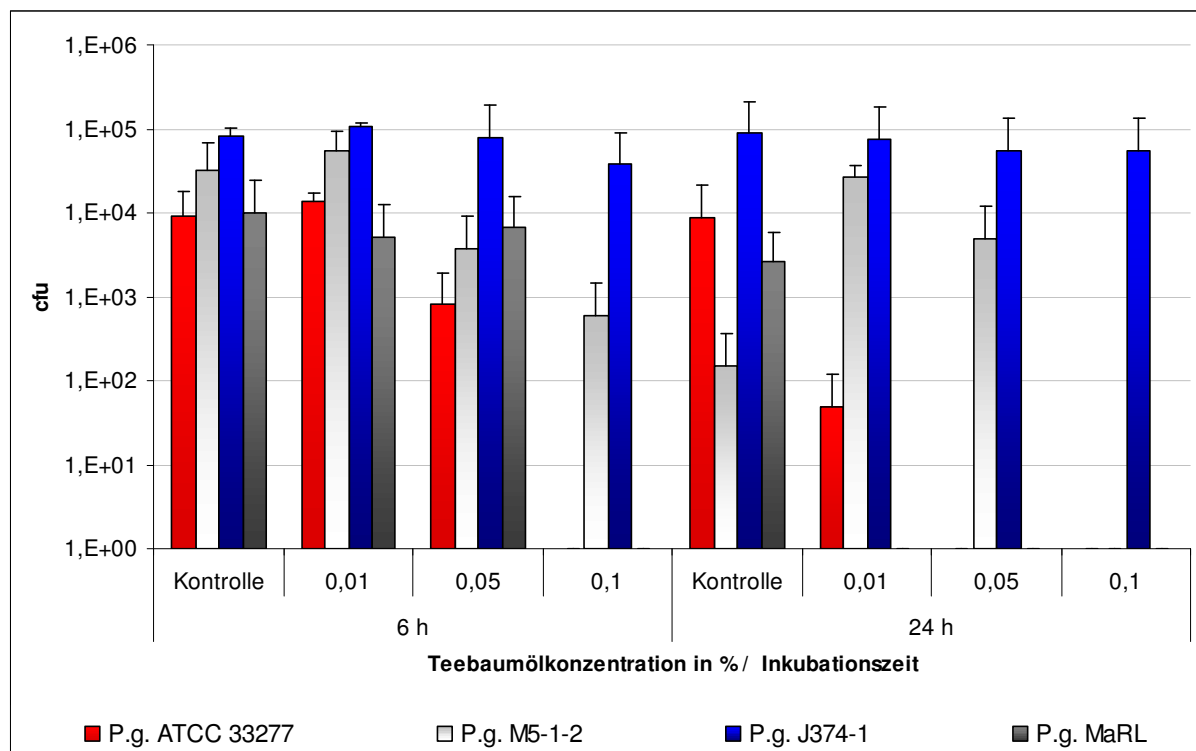


Abbildung 11
Anzahl der planktonischen Bakterien bei Fibroblasten mit verschiedenen Teebaumölkonzentrationen und Inkubationszeiten

5.4 Freisetzung von Interleukinen

In diesem Abschnitt soll der Einfluss von Teebaumöl auf die Ausschüttung von IL-6 und IL-8 bei KB-Zellen und Fibroblasten nach verschiedenen Inkubationszeiten dargestellt werden.

5.4.1 Freisetzung von IL-6 und IL-8 bei KB-Zellen

Zunächst wurden für die KB-Zellen, die nicht mit den *P. gingivalis*-Stämmen infiziert wurden, die Auswirkungen auf die IL-6-Spiegel bei verschiedenen Teebaumölkonzentrationen untersucht. Dabei ließ sich bei der 0,05%igen und 0,1%igen Konzentration eine Reduktion der IL-6-Freisetzung nach 24h Inkubationszeit feststellen ($p \leq 0,05$). Die ermittelte Interleukinfreisetzung der Kontrolle in Höhe von 20,39 pg/ml verringerte sich auf 6,25 pg/ml bzw. 8,79 pg/ml (Abb. 12).

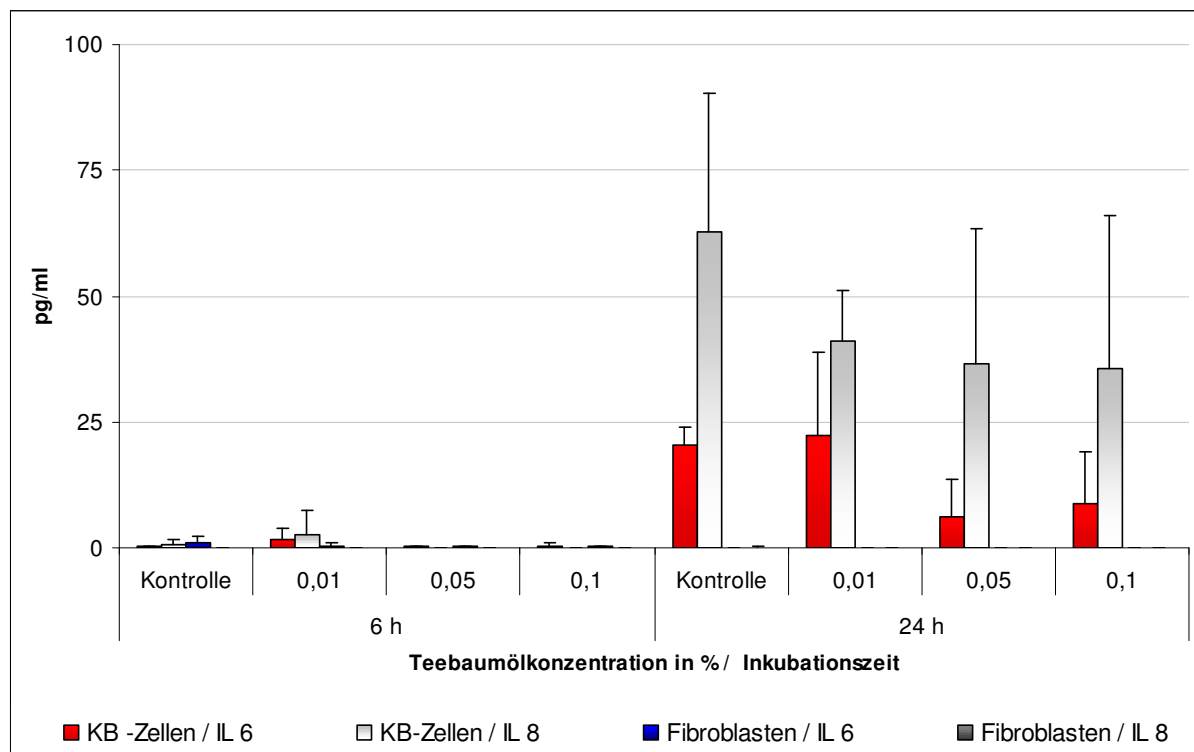


Abbildung 12

Interleukinfreisetzung bei nicht infizierten KB-Zellen und Fibroblasten bei unterschiedlichen Teebaumölkonzentrationen und Inkubationszeiten

Weiterhin wurden der Einfluss von Teebaumöl auf die IL-6-Ausschüttung der mit *P. gingivalis*-Stämmen infizierten KB-Zellen untersucht. Hierbei konnte jedoch keine einheitliche Tendenz festgestellt werden. Ein signifikanter Rückgang an IL-6 konnte für *P. gingivalis* ATCC 33277 bei 0,05% und 24h Inkubation sowie für *P. gingivalis* J374-1 bei 0,05% und sechs Stunden Inkubation nachgewiesen werden ($p \leq 0,05$).

Bei den restlichen Messwerten ließ sich der durchschnittlich stärkste Rückgang an IL-6-Freisetzung für die 0,05%ige Lösung bei allen Stämmen und Inkubationszeiten verzeichnen. Andererseits war gleichzeitig ein Anstieg der Ausschüttung für *P. gingivalis* MaRL von 8,33 pg/ml in der Kontrolle auf 16,2 pg/ml bei 0,05% Konzentration und 24h Inkubation zu bemerken (Abb. 13).

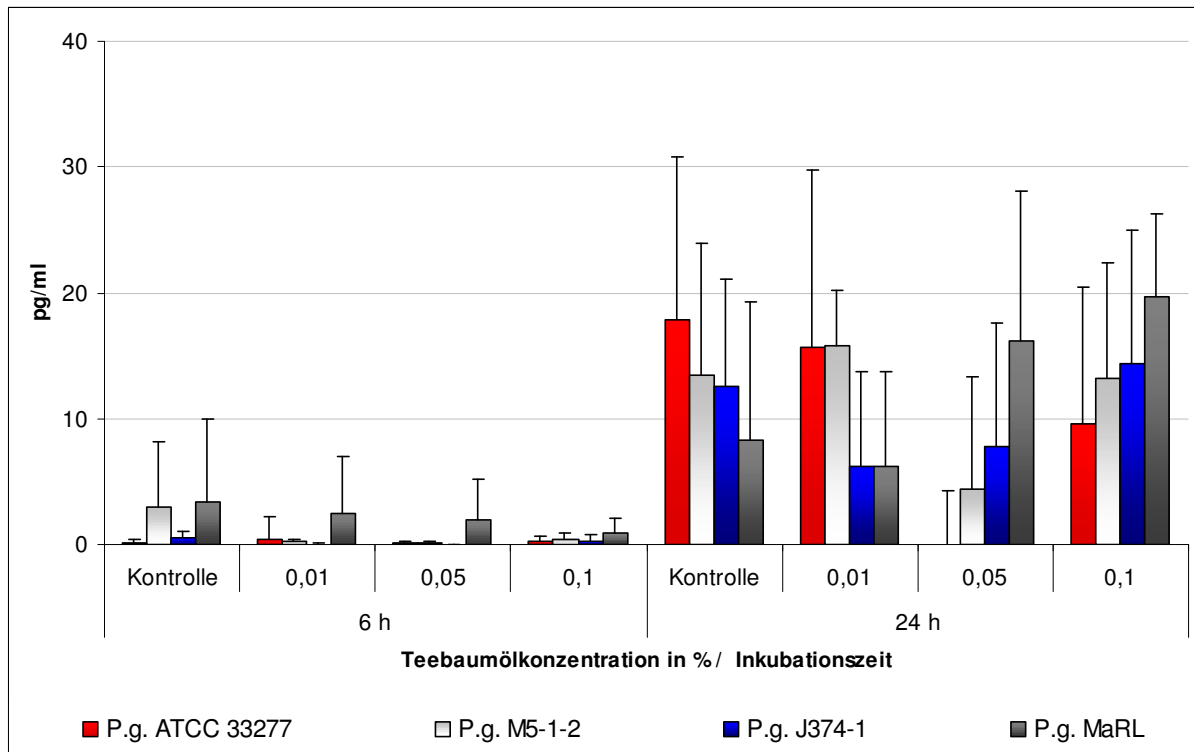


Abbildung 13

IL-6-Freisetzung bei KB-Zellen bei unterschiedlichen Teebaumölkonzentrationen und Inkubationszeiten

Für die nicht infizierten KB-Zellen wurde für alle Teebaumöllösungen ein Rückgang der IL-8-Freisetzung festgestellt. Für die 0,05% und 0,1% Konzentration und sechs Stunden Inkubationszeit konnte ein signifikanter Rückgang von 0,73pg/ml auf 0pg/ml gemessen werden.

Wiederum wurde die Wirkung verschiedener Teebaumöllösungen auf infizierte KB-Zellen und die IL-8-Ausschüttung untersucht. Es ergab sich jedoch für die IL-8-Freisetzung kein einheitliches Muster. Die 0,01%ige und 0,05%ige Teebaumöllösungen führten zwar in der Mehrzahl der Fälle zu einem durchschnittlichen Rückgang der IL-8-Produktion. Jedoch war beispielsweise bei *P.*

gingivalis MaRL ein geringer Anstieg von 37,47pg/ml auf 39,65pg/ml für die 0,05%ige Lösung zu verzeichnen (Abb. 14).

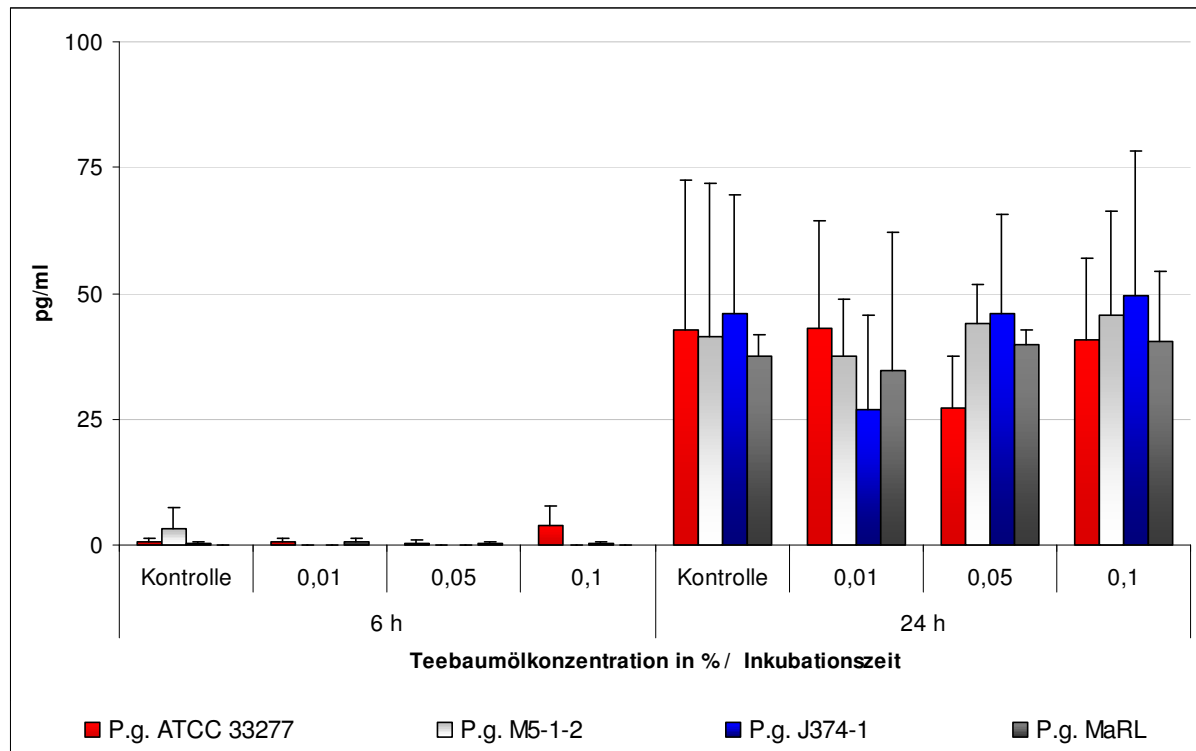


Abbildung 14

IL- 8-Freisetzung bei KB-Zellen bei unterschiedlichen Teebaumölkonzentrationen und Inkubationszeiten

5.4.2 Freisetzung von IL-6 und IL-8 bei Fibroblasten

Analog der Untersuchung bei KB-Zellen soll im folgenden Abschnitt die Interleukinfreisetzung bei Fibroblasten bewertet werden. Es zeigten sich auch hier ähnliche Ergebnisse wie bei den im vorangegangenen Abschnitt dargestellten Resultaten.

Bei den nicht infizierten Zellen verringerte sich die IL-6-Freisetzung mit zunehmender Konzentration an Teebaumöl nach sechs Stunden Inkubationszeit. Es war beispielsweise ein Rückgang von 0,87 pg/ml in der Kontrolle auf 0,21 pg/ml bei 0,1% festzustellen. Dagegen ließen sich nach 24h Inkubationszeit keine IL-6-Freisetzungen in den Versuchsreihen beobachten. Grundsätzlich bleibt zu bemerken, dass generell nur eine geringe IL-Freisetzung festgestellt werden konnte.

Für die durch Bakterienstämme infizierte Zellen waren zum Teil andere Ergebnisse zu verzeichnen. So war die Abnahme der IL-6-Ausschüttung in der 0,05% Konzentration und ein Anstieg der Werte bei 0,1% bei allen Keimen zu erkennen.

Tatsächlich ließ sich keine einheitliche Tendenz für die unterschiedlichen Keime ableiten (Abb. 15).

Nach 24h Inkubationszeit war für keinen Stamm eine Interleukinausschüttung nachzuweisen.

Auch bei den Fibroblasten wurde die IL-8-Ausschüttung bewertet. Dabei fiel zunächst die fehlende IL-8-Freisetzung nach sechs Stunden Inkubationszeit in allen Versuchsreihen auf. Nach 24h Inkubationszeit ließen sich keine IL-8-Freisetzungen bei allen drei Teebaumölkonzentrationen im Vergleich zu 0,13pg/ml bei der Kontrolle für die nicht infizierten Zellen feststellen. Aber auch die mit Bakterien infizierten Fibroblasten zeigten eine generelle Abnahme der IL-8-Freisetzung bei 0,05%. Bei 0,01%iger und 0,1%iger Konzentration fand sich bei *P. gingivalis* MaRL mit gleicher IL-8-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle eine Ausnahme. Die restlichen Stämme zeigten auch bei diesen Konzentrationen eine deutliche Verringerung der Interleukinausschüttung wiederum im Kontrollvergleich (Abb. 16).

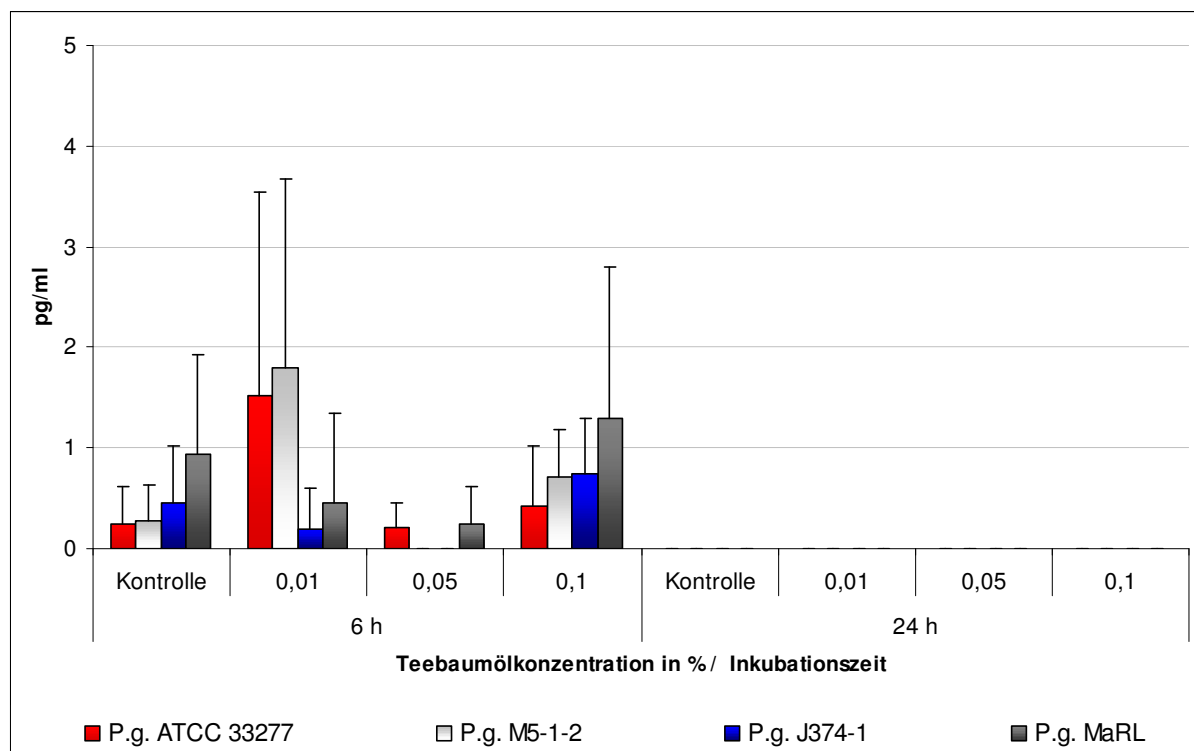


Abbildung 15
IL-6-Freisetzung bei Fibroblasten bei unterschiedlichen Teebaumölkonzentrationen und Inkubationszeiten

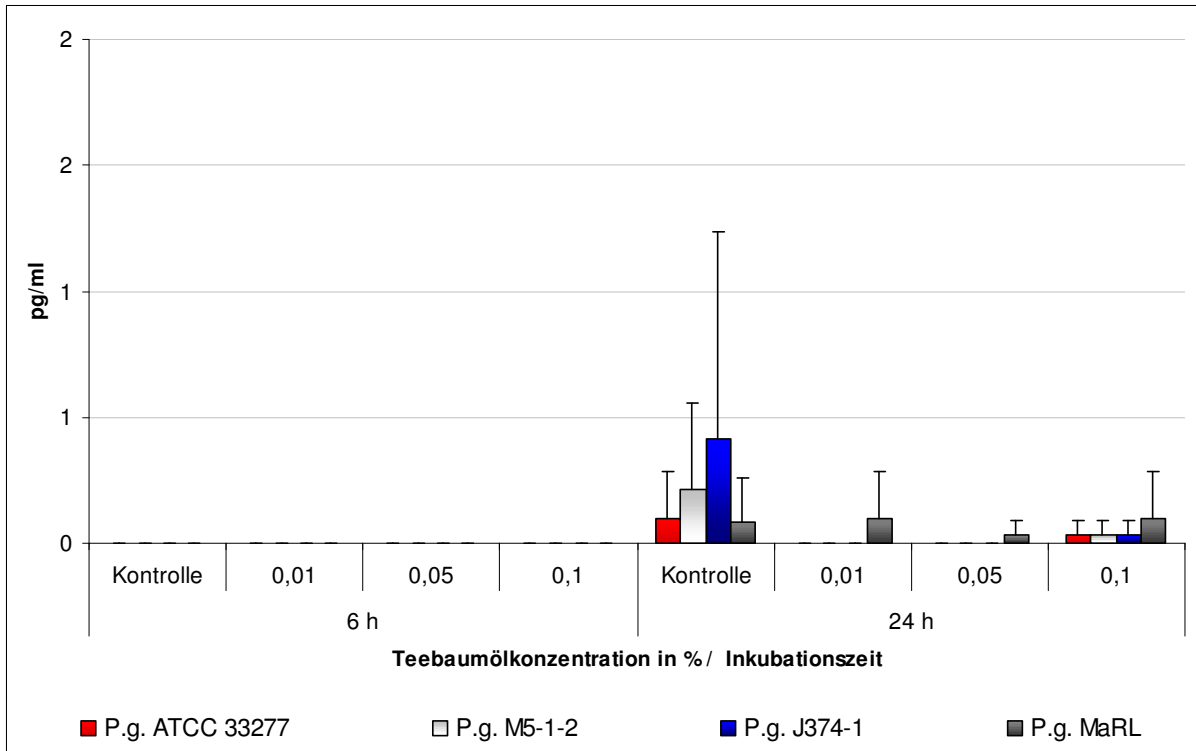


Abbildung 16
 IL-8-Freisetzung bei Fibroblasten bei unterschiedlichen Teebaumölkonzentrationen und Inkubationszeiten

6. Diskussion

Die Pathogenese der Parodontitiden ist ein komplizierter Prozess, der sich durch viele unterschiedliche Vorgänge entwickelt. Dazu gehört die Besiedlung der Mundhöhle, insbesondere des subgingivalen Bereiches mit parodontopathogenen Keimen (Lamont und Jenkinson 2001). Zu diesen Bakterien gehört u.a. *P. gingivalis*, eine gramnegative anaerobe Spezies, die durch eine Vielzahl von Virulenzfaktoren an der Destruktion des parodontalen Gewebes beteiligt ist (Travis et al. 1997, Delima und van Dyke 2003). Auch Plaqueakkumulation und die Entstehung eines Ungleichgewichtes zwischen Wirtsabwehr und Besiedlern bestimmen die Entwicklung der Parodontopathien.

Über die Wirkung des Teebaumöls gibt es verschiedene Untersuchungen. Die antimikrobielle Wirksamkeit von Teebaumöl nach australischem Standard wurde in einer Vielzahl von Studien demonstriert (Groppo et al. 2002, Hammer et al. 1999, Carson and Riley 1995). Dabei zeigte sich, dass besonders der Hauptbestandteil Terpinen-4-ol das Wachstum vieler Mikroorganismen unterdrückt (Carson et al. 1995). Kulik et al. (2000) wiesen diese Effekte auch für *P. gingivalis* nach.

Teebaumöl besitzt auch eine antiinflammatorische Wirkung. So wurde durch Hart et al. (2000) gezeigt, dass schon Mengen von 0,008% Teebaumöl die Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren hemmen.

Die vorliegende in vitro Studie sollte die antimikrobielle Wirkung von Teebaumöl auf *P. gingivalis*-Stämme testen. Zudem war es das Ziel neue Erkenntnisse über die Wirkung des Öls auf den sich bildenden und etablierten Biofilm und den wenig untersuchten Effekt auf KB-Zellen und Fibroblasten zu gewinnen. Auch die Interleukinfreisetzung unter Teebaumöleinfluss nach Infektion mit *P. gingivalis* ist unzureichend bekannt und war deshalb Bestandteil der Untersuchungen.

6.1 Methodendiskussion

Für die Untersuchungen wurden KB-Zellen und Fibroblasten eingesetzt, um die Mundschleimhaut zu simulieren. Dabei stammten die KB-Zellen aus der Epithelzelllinie ATCC CCL 17. 1991 wiesen Meyer et al. erstmals nach, dass *A. actinomycetemcomitans* in der Lage ist, in Epithelzellen einzudringen. Da KB-Zellen vergleichbare Versuchsbedingungen und reproduzierbare Ergebnisse gewähren, wurden sie auch in anderen Studien genutzt (Duncan et al. 1993, Yumoto et al. 1999). Weitere Untersuchungen bewiesen auch die Adhärenz von *P. gingivalis* an KB-Zellen (Duncan et al. 1993, Eick et al. 2002) und die Internalisierung des Bakteriums (Lamont et al. 1992). Für die experimentelle Darstellung tieferer Gewebeschichten wurden in vorliegender Studie humane Gingivafibroblasten verwendet.

Die Komplexität des Parodonts konnte durch die Versuche mit Monolayern nicht dargestellt werden, jedoch konnten Interaktionen von Bakterien und Zellen getestet werden.

In nachfolgenden Studien könnten zur besseren Darstellung der oralen Verhältnisse auch Multilayer- Schichten eingeführt werden (Dongari- Bagtzoglou und Kashleva 2006).

Als Nachteil kann zudem gewertet werden, dass KB-Zellen genetisch veränderte Zellen sind. Sandros et al. konnte zeigen, dass KB-Zellen eine geringere Rezeptordichte verglichen mit Zellen des Taschenepithels besitzen. Dementsprechend könnte ein verändertes Adhäsionsverhalten der ausgewählten Bakterienspezies teilweise vorliegen (Sandros et al. 1994).

Mit *P. gingivalis* infizierte Fibroblasten setzen vermehrt Interleukin frei (Steffen et al. 2000, Imatani et al. 2001). Es fanden sich vergleichbare Ergebnisse bei Primärkulturen aus dem Taschenepithel und KB- Zellen nach deren Infektion durch *P. gingivalis* und *Escherichia coli* (Sandros et al. 2000).

Die folgenden *P. gingivalis*-Stämme wurden für die Untersuchungen ausgewählt: *P. gingivalis* MaRL, *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. gingivalis* M5-1-2 und *P. gingivalis* J 374-1. *P. gingivalis* 33277 als Typ-Stamm wurde schon in zahlreichen anderen Studien untersucht (Eick et al. 2002, Eick et al. 2004, Lamont et al. 1995, Weinberg

et al. 1997). Dabei wurde u.a. die Invasion der Epithelzellen durch Virulenzfaktoren oder der Einfluss von *P. gingivalis* auf KB-Zellen getestet.

6.2 Wirkung von Teebaumöl auf Bakterien am Beispiel von *Porphyromonas gingivalis*

Die Ergebnisse der in vitro Studie zeigten eine generelle wachstumshemmende Wirkung auf alle untersuchten Bakterienstämme. Die Werte für die minimale Hemmkonzentration lagen für die Teebaumöllösung zwischen 0,005% und 0,5%. Diese Resultate stimmen mit den Untersuchungen von Takarada et al. (2004) und Kulik et al. (2000) überein.

Teebaumöl wurde schon früh als Antiseptikum angewendet (Hili et al. 1997). Die antimikrobielle Wirkung auf verschiedene Mikroorganismen wurde in zahlreichen Studien aufgezeigt (Carson und Riley 1993, Shapiro et al. 1994, Carson und Riley 1995, Hammer et al. 2003, Raman et al. 1995, Groppo et al. 2002).

Die Wirkungsweise des Teebaumöls wird durch die enthaltenen lipophilen Bestandteile erklärt. So bewirken vor allem die Terpene (v.a. Terpinen-4-ol) eine Schädigung der Zellorganellen und des Stoffwechsels (Carson und Riley 1995), indem sie die Fähigkeit nutzen, Lipidstrukturen zu zerstören und zu penetrieren (Takahashi et al. 1996). Somit kann die Zellwand nicht mehr als Permeabilitätsbarriere dienen (Cox et al. 2000, Gustafson et al. 1998). Cox et al. konnten in ihren Studien die verschiedenen Mechanismen aufzeigen, die den antibakteriellen Effekt auf die Mikroorganismen erklären. So bedingt Teebaumöl eine Zytoplasmakoagulation und die Autolyse von Zellen. Auch intrazelluläre K^+ - Wanderungen nach Penetration der bakteriellen Zellwand wurden festgestellt (Cox et al. 1998/2001).

Es scheint bedeutsam, dass die Verwendung des Teebaumöls in ausreichenden bakteriziden Mengen stattfindet. Gegebenenfalls besteht sonst die Gefahr, dass durch unzureichende Konzentrationen an Teebaumöl Antibiotikaresistenzen ermöglicht werden (McMahon et al. 2007). Außerdem kann die Zusammensetzung des Teebaumöls variieren, was dann Einfluss auf die antibakterielle Aktivität gegenüber den Mikroorganismen haben kann (Carson und Riley 1995, May et al. 2000).

Ein großer Nachteil in den Untersuchungen mit Teebaumöl besteht in der großen Lipophilie des Naturproduktes. Durch die schlechte Wasserlöslichkeit muss das Öl erst durch Anwendung von Detergenzien (u.a. Tween 20) gelöst werden. Durch Zufügen dieser Hilfsstoffe kann die Wirksamkeit des Teebaumöls gegenüber oralen Mikroorganismen beeinträchtigt sein (Carson & Riley 1995, May et al. 2000).

Die Studie von Cox et al. (2001) zeigt, dass auch Interaktionen zwischen den natürlichen Komponenten von Teebaumöl denkbar sind. Die enthaltenen nicht oxidierten Monoterpene (z.B. γ -terpinen, p -cymene) verringern die Wasserlöslichkeit von Terpinen-4-ol und vermindern somit die antimikrobielle Effizienz.

Die eigenen Untersuchungen bestätigen die antimikrobielle Wirksamkeit von Teebaumöl (nach australischem Standard) gegenüber anaeroben Mikroorganismen.

6.3. Wirkung von Teebaumöl auf den jungen und etablierten Biofilm

Die Fähigkeit parodontopathogener Keime zur Ausbildung von Biofilmen ist ein bedeutsamer Schritt in der Pathogenese der Parodontitis (Ellen et al. 2007).

Brady et al. untersuchten die Wirksamkeit von Teebaumöl auf verschiedene Keime im Biofilm. Dabei resultierte ein stärkerer Effekt auf die pathogenen Keime der Durchgangsflora, während bei den Bakterien der Standortflora eine geringere Beeinflussung festzustellen war (Brady et al. 2006).

Die eigenen Untersuchungen ergaben sowohl für den jungen als auch den etablierten Biofilm keinen signifikanten Einfluss von Teebaumöl auf das Wachstum von *P. gingivalis* im Vergleich zu einer Kontrollgruppe.

Andere Studien prüften den Effekt unterschiedlicher Öle auf den Biofilmaufbau. So konnten Nostro et al. feststellen, dass ätherische Öle den Biofilm beeinflussen und dadurch destabilisieren (Nostro et al. 2004). Daneben konnten Niu et al. (2004) die möglichen Wirkmechanismen der Öle aufzeigen. Dazu gehören die Beeinflussung der Hydrophobizität der Membranoberfläche der Bakterien, die Zerstörung von Membranbestandteilen oder die Behinderung der Peptidoglykansynthese. Auch die Untersuchungen von Nuryastuti et al. (2009) bestätigen die antimikrobielle Wirkung von Öl bedingt durch Auflösung bestehenden Biofilms und Abtöten der Bakterien.

In einer weiteren Arbeit von Nostro et al. werden die vorangegangenen Aussagen unterstützt, zusätzlich finden sich Hinweise über eine stärkere Biofilmbeeinflussung und Hemmung des Bakterienwachstums mit zunehmender Konzentration an Teebaumöl (Nostro et al. 2007).

Im Gegensatz dazu scheint der antimikrobielle Effekt von ätherischen Ölen geringer, wenn Biofilme zusammen mit planktonischen Zellen untersucht werden (Saginur et al. 2006). Die Studie von Brown und Gilbert bestätigt die Überlegenheit der Biofilme im Vergleich zu den freien Kolonien (Brown und Gilbert 1993). Auch andere Untersuchungen berichten von einer verminderten antimikrobiellen Wirkung gegenüber dem Biofilm, bedingt durch eine verringerte Durchlässigkeit des Wirkstoffes (Olson et al. 2002).

Jedoch konnten Karpanen et al. (2008) in ihren Studien zumindest die verstärkte antimikrobielle Wirkung von Chlorhexidindigluconat durch die Kombination mit Teebaumöl im Biofilm zeigen. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch Hendry et al. (2009) und Nuryastuti et al. (2009).

Ein Grund für die fehlende Beobachtung einer Wirkung von Teebaumöl auf den Biofilm in den eigenen Untersuchungen könnte in der verwendeten Konzentration der Lösung liegen. In den Studien von Karpanen et al. (2008) und Nostro et al. (2007) wurde für den komplexen Biofilm gezeigt, dass zur Erzielung eines wachstumshemmenden Effektes hohe Konzentrationen an Teebaumöl bzw. anderen ätherischen Ölen notwendig sind. Diesbezüglich wäre eine zusätzliche Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration der im Biofilm verwendeten Bakterienstämme für nachfolgende Forschungen notwendig.

6.4 Wirkung von Teebaumöl auf Fibroblasten und KB-Zellen

In den eigenen Studien war eine wachstumshemmende Wirkung von Teebaumöl auf die planktonisch und adhärenen Bakterien in Verbindung mit KB-Zellen festzustellen. Ähnliche Ergebnisse ließen sich auch für die freien Bakterienkolonien in Verbindung mit Fibroblasten feststellen.

Die Möglichkeiten von *P. gingivalis*, mit KB-Zellen und Fibroblasten zu interagieren, sind gut untersucht. In einigen Studien wurden die Mechanismen der Invasion von menschlichen Epithelzellen analysiert (Duncan et al. 1993, Weinberg et al. 1997, Lamont et al. 1995). Eine andere Untersuchung vermutet, dass erst unter Anwesenheit von Calcium eine Invasion der Epithelzellen erfolgen kann (Izutsu et al. 1996). Virulenzfaktoren, wie extrazelluläre proteolytische Enzyme, toxische Metabolite oder Fimbrien verursachen die Zerstörung von parodontalen Gewebe und die Kolonisation im Wirt (Lamont et al. 1995, Lamont et al. 1992, Xie et al. 1997).

Söderberg et al. (1996) untersuchten die Toxizität von Teebaumöl auf epitheliale Zellen und Fibroblasten. Dabei zeigte sich ein Anstieg der Toxizität mit zunehmender Konzentration und Anwendungsdauer. Jedoch waren für eine Einwirkungszeit unter einer Stunde keine zytotoxischen Effekte festzustellen. Als mögliche Ursache für die tödliche Zellwirkung werden Interaktionen an der Zellmembran diskutiert.

Im Gegensatz dazu wurden toxische Wirkungen durch reines Terpinen-4-ol und Teebaumöl auf Fibroblasten ausgeschlossen (Loughlin et al. 2008).

Der wachstumshemmende Effekt von Teebaumöl in den eigenen Untersuchungen scheint durch die oben genannten Wirkungen des Teebaumöls auf die *P. gingivalis*-Stämme erreicht worden zu sein. Durch den Einfluss auf die Membraneigenschaften, die Störung der Aufgabe der Zellwand als Permeabilitätsbarriere und damit der Verlust der osmotischen Kontrolle können die verminderten koloniebildenden Einheiten nach Teebaumölgabe erklärt werden (Cox et al. 2000, Gustafson 1998).

Die Wirkungen auf die KB-Zellen und Fibroblasten waren nicht Bestandteil der Untersuchungen, könnten aber in weiterführenden Studien einbezogen werden.

6.5 Wirkung von Teebaumöl auf die Interleukinausschüttung

Bakterien, darunter *P. gingivalis*, induzieren in Epithelzellen und Fibroblasten eine Freisetzung von Zytokinen (Sandros et al. 2000). Diese Zytokinsekretion wird u.a. durch unterschiedliche Anheftungsmechanismen der Bakterien stimuliert (Duncan et al. 1993).

IL-6 und IL-8 spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Parodontitiden (Kjeldsen et al. 1993, Wilson et al. 1996). Dabei bedingen diese

Entzündungsmediatoren, welche im parodontalen Gewebe im Verlauf der Erkrankung gefunden werden, die Aktivierung von verschiedenen Mechanismen, wie z.B. die Aktivierung von Osteoklasten (Kjeldsen et al. 1993).

IL-1, IL-6 und TNF- α sind sowohl in die lokale als auch systemische Immunantwort eingebunden (van Snick 1990), während IL-8 große Bedeutung bei der lokalen Verteidigung zukommt, indem es die Neutrophilenmigration bedingt (Baggiolini et al. 1992). Erhöhte IL-8-Werte scheinen eine Rolle bei der Wanderung von Neutrophilen zwischen Submucosa und sulkulären Raum zu spielen (Tonetti et al. 1998).

In unserer Studie ließen sich keine einheitlichen Ergebnisse für die Wirkung von Teebaumöl auf die Interleukinfreisetzung aus KB-Zellen und Fibroblasten feststellen.

Auch in nicht infizierten KB-Zellen wurden in den Untersuchungen IL-6 und IL-8 Ausschüttungen festgestellt. Diese Ergebnisse decken sich mit den Studien von Huang et al. (2001) und Mikolajczyk-Pawliska et al. (1998), welche einen ständigen IL-8-Spiegel im Gleichgewicht zwischen Wirtsorganismus und Erregern feststellten. Für die nicht infizierten KB-Zellen ergaben die Untersuchungen teilweise signifikante Reduktionen der IL-6- und IL-8-Ausschüttung nach Zugabe von Teebaumöl. Es ist zu vermuten, dass die Interleukinausschüttung in nicht mit *P. gingivalis* infizierten Zellen mit der Immunantwort aufgrund der genetischen Veränderungen der KB-Zellen zu erklären ist.

Im Gegensatz dazu konnte bei den infizierten Zellen keine einheitliche Tendenz beobachtet werden. Es waren hier neben stammspezifischen signifikanten Verminderungen der IL-6-Freisetzungen auch stammspezifische Erhöhungen der IL-6-Freigaben festzustellen. Gleiche Resultate ergaben sich für die Ausschüttung an IL-8.

Die IL-6-Freisetzungen aus den Fibroblasten war generell sehr gering. Je höher die Konzentration des Teebaumöls war, desto stärker war auch der Rückgang an IL-6-Mengen bei den nicht infizierten Zellen. Zudem war für die nicht infizierten Zellen keine IL-8-Ausschüttung festzustellen. Ähnliche Ergebnisse waren für die infizierten Zellen zu ermitteln. Es ließ sich sowohl ein Rückgang an IL-6-Freisetzung nach sechs Stunden Inkubationszeit bemerken, als auch eine fehlende Ausschüttung nach

24 Stunden. Generell war eine verminderte IL-8- Menge in den Untersuchungen zu erkennen.

Zur Wirkung von Teebaumöl bei Epithelzellen existieren in der aktuellen Literatur keine relevanten Untersuchungen. Jedoch wurden die Auswirkungen einer Infektion mit verschiedenen Bakterienarten erforscht.

Es konnte gezeigt werden, dass *P. gingivalis* die Fähigkeit besitzt, eine Zytokinfreisetzung nach Penetration der Epithelzelle zu initiieren (Lamont et al. 1995). Die von *P. gingivalis* produzierten Proteasen gelten als starke Virulenzfaktoren (Travis et al. 2000). So bedingen Arginin-spezifische Proteasen in menschlichen Epithelzellen eine starke IL-6-Freisetzung (Lourbakos et al. 2001). Im Gegensatz dazu stehen die Untersuchungen von Chen et al. (1997). Diese haben erkennen lassen, dass nach der Invasion von *P. gingivalis* in epitheliale Zellen die IL-8-Konzentration herabgesetzt war. Das kommt daher, weil *P. gingivalis* auf mRNA-Ebene die IL-6 und IL-8-Expression stimuliert, aber auf Proteinebene werden diese Interleukine durch die Proteasen von *P. gingivalis* wiederum abgebaut. Damit kann für das Bakterium eine verzögerte Wirtsabwehr durch das Immunsystem und damit ein größerer Schaden im umgebenden Gewebe erreicht werden (Darveau et al. 1998, Huang et al. 2007, Madianos et al. 1997). Durch Störung der Neutrophilenaktivierung bei verminderten IL-8-Werten ist ein wichtiger Schritt in der Abwehr der Infektion geschwächt (Huang et al. 2007, Madianos et al. 1997, Miyasaki 1991). Auch andere Studien belegen die Reduktion der IL-8-Freisetzung nach Infektion mit *P. gingivalis* (Darveau et al. 1998, Mikolajczyk-Pawlinska 1998, Zhang et al. 1999, Calkins et al. 1998, Fletcher et al. 1997/1998, Kuramitsu 1998).

In Anbetracht dieser Erkenntnisse scheint die Ableitung der entzündungshemmenden Wirkung von Teebaumöl bei infizierten Zellen anhand der Reduktion der Interleukinausschüttung hinterfragt werden zu müssen. Gegebenfalls sind andere Indikatoren zur Ermittlung der Wirksamkeit von Teebaumöl zu finden.

Andere Untersuchungen beschreiben die IL-8-Freisetzung als ein späteres Vorkommnis bei Interaktionen von Bakterien und Epithelzellen (Eckmann et al. 1993, Jung et al. 1995). Yumoto et al. (1999) fanden heraus, dass die IL-6 und IL-8-Ausschüttungen nach Infektion mit *Eikenella corrodens* nach längerer Wirkdauer

wesentlich höher waren, als im Vergleich zu den nicht infizierten Kulturen. Gegebenfalls müsste hier die Wirkung von Teebaumöl nach einer Inkubationszeit von mehr als 24 Stunden untersucht werden, um die Auswirkungen auf Epithelzellen im Detail zu erforschen. Dieser Erkenntnis entspricht auch die Studie von Curfs et al. 1997, welche eine beschleunigte IL-6-Ausschüttung in vitro feststellen konnten. Damit scheint die Wirksamkeit von Teebaumöl in vivo verzögert einzusetzen. Entsprechende Behandlungen mit Teebaumöl sollten daher vermutlich einer längeren Einwirkdauer unterliegen und zum Schutz vor der Spülwirkung des Speichels beispielsweise als entsprechendes Gel verabreicht werden.

7. Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit bestätigt die antimikrobielle Wirksamkeit von Teebaumöl gegenüber dem parodontopathogenen Keim *P. gingivalis*. Teebaumöl ist in der Lage das Wachstum dieses Keimes zu hemmen, wobei mit zunehmender Konzentration der Teebaumöllösungen ein breiteres Wirkspektrum auf *P. gingivalis*-Stämme erreicht werden konnte.

Die antibakterielle Wirksamkeit des Teebaumöls im jungen und etablierten Biofilm konnte nicht eindeutig festgestellt werden. Zwar konnten verschiedene stammspezifische Einflüsse gezeigt werden, die als antibakterielle Beeinflussung des Biofilms durch Teebaumöl gedeutet werden könnten. Dennoch besteht die Notwendigkeit weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen, um den möglichen antibakteriellen Einfluss des Teebaumöls zu bestätigen.

Die antibakterielle Wirkung des Teebaumöls auf *P. gingivalis* bestätigt sich im Zusammenwirken mit KB-Zellen und Fibroblasten. Die Ergebnisse zeigten eine wachstumshemmende Wirkung unter Teebaumöleinfluss bei sechs und 24 Stunden Inkubationszeit.

Die mögliche Beeinflussung der Interleukinfreisetzung durch Teebaumöl lässt keine eindeutigen Schlussfolgerungen zu. Wiederum konnten stammspezifische Resultate für die IL-6 und IL-8-Freisetzungen festgestellt werden, aber auch hier sind fortführende Untersuchungen notwendig.

Zusammenfassend wird deutlich, dass die Wirkungsweise des Teebaumöls in weiteren wissenschaftlichen Studien untersucht werden muss. Möglicherweise ist Teebaumöl dann eine mögliche Alternative bei der Mitbehandlung von Parodontitis. Auch eine positive Beeinflussung des Mundmilieus durch die Anwendung von Teebaumöl als Zahnpasta oder Mundspülung wäre nach der Durchführung weiterer klinischer Studien denkbar.

Literaturverzeichnis

- [1] Andersen WC, Horton HL. 1990. Parietal lobe abscess after routine periodontal recall therapy. Report of a case. *J Periodontol* 61: 243-247.
- [2] Apted JH. 1991. Contact dermatitis associated with the use of tea tree oil. *Australian J of Dermatology* 32: 177.
- [3] Armitage GC. 1999. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol* 4: 1-6.
- [4] Arweiler NB, Donos N, Netuschil L, Reich E. 2000. Clinical and antibacterial effect of tea tree oil – a pilot study. *Clin Oral Invest* 4: 70-73.
- [5] Axelsson P, Lindhe J, Nyström B. 1991. On the prevention of caries and periodontal disease. Results of a 15-year longitudinal study in adults. *J Clin Periodontol* Vol. 18, Issue 3: 182-189.
- [6] Baggiolini M, Clark- Lewis I. 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Vol.* 307 (Nr. 1): 97-101.
- [7] Bassett IB, Pannowitz DL, Barnetson RS. 1990. A comparative study of tea tree oil versus benzoylperoxide in the treatment of acne. *Med J of Australia* 153: 455-458.
- [8] Beck J, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S. 1996. Periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol* 67: 1123-1137.
- [9] Bishop CD. 1995. Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. *J of Essential Oil Res* (7): 641-644.
- [10] Brady A, Loughlin R, Gilpin D, Kearney P, Tunney M. 2006. In vitro activity of tea tree oil against clinical skin isolates of methicillin-resistant and –sensitive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci growing planktonically and as biofilms. *J of Medical Microbiology* 55: 1375-1380.
- [11] Brand C, Ferrante A, Prager RH, Riley TV, Carson CF, Finlay-Jones JJ, Hart PH. 2001. The water-soluble components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) suppress the production of superoxide by human monocytes, but not neutrophils, activated in vitro. *Inflamm. res.* 50: 213-219.
- [12] Brown MR W und Gilbert P. 1993. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *J Appl Bacteriol* 74: 875-975.
- [13] Buck DS, Nidorf DM, Addino JG. 1994. Comparison of two topical preparations for the treatment of onychomycosis: *Melaleuca alternifolia* and Clotrimazol. *J of Family Practice* 38: 601-605.

- [14] Calkins C, Platt K, Potempa J, Travis J. 1998. Inactivation of TFN- alpha by proteinases (gingipains) from the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*: implications of immune evasion. *J. Biol. Chem.* 273: 6611-6614.
- [15] Carson CF and Riley TV. 1993. Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Letters in Applied Microbiology* 16: 49-55.
- [16] Carson CF and Riley TV. 1995. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J of Applied Bacteriology* 78: 264-269.
- [17] Carson CF, Riley TV, Cookson BD. 1998. Efficacy and safety of tea tree oil as a topical antimicrobial agent. *J of Hospital Infection* 40: 175-178.
- [18] Chen CC, Chang KL, Huang JF, Tsai CC. 1997. Correlation of interleukin-1-beta, interleukin-6, and periodontitis. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 13: 609-617.
- [19] Cox SD, Gustafson JE, Mann CM, Markham JL, Liew YC, Hartland RP, Bell HC, Warmington JR, Wyllie SG. 1998. Tea tree oil causes K⁺- leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 26: 355-358.
- [20] Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J of Appl Microbiology* 88: 170-175.
- [21] Cox SD, Mann CM, Markham JL, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. 2001. Determining the Antimicrobial Actions of Tea Tree Oil. *Molecules* 6: 87-91.
- [22] Cox SD, Mann CM, Markham JL. 2001. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J of Applied Microbiology* 91: 492-497.
- [23] Curfs J, Meis J, Hoogkamp- Korstanje J. 1997. A Primer on Cytokines: Sources, Receptors, Effects, and Inducers. *Clinical Microbiol Reviews*. Vol.10. Nr. 4: 742-780.
- [24] Cutler CW, Kalmar JR, Genco CA. 1995. Pathogenic strategies of the oral anaerobe, *Porphyromonas gingivalis*. *Trends in Microbiology* Vol. 3 (Issue2): 45-51.
- [25] Darveau RP, Belton CM, Reife RA, Lamont RJ. 1998. Local Chemokine Paralysis, a novel Pathogenic Mechanism for *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity*: 1660-1665.
- [26] DeCarlo AA, JR, Winsor LJ, Bodden MK, Harber GJ, Birkedal-Hansen B, Birkedal-Hansen H. 1997. Activation and Novel Processing of Matrix-Metalloproteinases by a Thiol-proteinase from the Oral Anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res* 76: 1260-1270.
- [27] Delima AJ, Van Dyke TE. 2003. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. *Periodontology* 2000: Vol.31: 55-76.

- [28] Deshpande RG, Khan M, Genco CA. 1998. Invasion Strategies of the Oral Pathogen *Porphyromonas gingivalis*: Implications for Cardiovascular Disease. *Invasion and Metastasis*: Vol. 18 (No.2): 57-69.
- [29] Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H. 2006. Development of a novel- three-dimensional in vitro model of oral *Candida* infection. *Microbial pathogenesis* Vol.40, No. 6: 271-278.
- [30] Duncan MJ, Nakao S, Skobe Z, Xie H. 1993. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with Epithelial Cells. *Infection and Immunity*: 2260-2265.
- [31] Eckmann L, Jung HC, Scurer- Maly, Panja A, Morzycka- Wroblewska E, Kagnoff MF. 1993. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin-8. *Gastroenterology* 105: 1689-1697.
- [32] Eick S, Rödel J, Einax JW, Pfister W. 2002. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with KB-cells: comparison of different clinical isolates. *Oral Microbiology Immunology* 17: 201-208.
- [33] Eick S, Seltmann T, Pfister W. 2004. Efficacy of antibiotics to strains of periodontopathogenic bacteria within a single species biofilm- an in vitro study. *J Clin Periodontol* 31: 376-383.
- [34] Ellen RP, Lepine G, Nghiem PM. 2007. In vitro models that support adhesion specificity in biofilms of oral bacteria. *Advances in Dental Research* 11: 33-42.
- [35] Fitzgerald JE, Kreutzer DL. 2007. Localization of interleukin-8 in human gingival tissues. *Oral Microbiology and Immunology* Vol.10 Issue 5: 297-303.
- [36] Fletcher J, Nair S, Poole S, Henderson B, Wilson M. 1998. Cytokine degradation by biofilms of *Porphyromonas gingivalis*. *Curr. Microbiol.* 36: 216-219.
- [37] Fletcher J, Reddi K, Poole S, Nair S, Henderson B, Tabona P, Wilson M. 1997. Interactions between periodontopathogenic bacteria and cytokines. *J. Periodontal Res.* 32: 200-205.
- [38] Gemmell E, Carter CL, Seymour GJ. 2001. Chemokines in human periodontal disease tissues. *Clin Exp Immunol*, Vol. 125: 134-141.
- [39] Groppo FC, Ramacciato RP, Simões RP, Flório FM, Sartoratto A. 2002. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. *Int Dental J* 52: 433-437.
- [40] Gustafson JE, Liew YC, Chew S, Markham J, Bell HC, Wyllie SG, Warmington JR. 1998. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 26: 194-198.
- [41] Haber J. 1994. Smoking is a major risk factor for periodontitis. *Curr Opin Periodontol.* 12-8.

- [42] Hammer KA, Carson CF, Riley TV. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. . J of Applied Microbiology 86: 985-990.
- [43] Hammer KA, Carson CF, Riley TV. 1999. Influence of organic matter, cations and surfactants on the antimicrobial activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) in vitro. J of Applied Microbiology 86: 446-452.
- [44] Hammer KA, Carson CF, Riley TV. 2003. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. J of Applied Microbiology 95: 853-860.
- [45] Hammer KA, Dry L, Johnson M, Michalak EM, Carson CF, Riley TV. 2003. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro. Oral Microbiology Immunology 18: 389-392.
- [46] Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. 1994. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. J of Leukocyte Biol Vol. 56: 559-564.
- [47] Harnack L, Gonzalés J, Meyle J. 2009. Parodontitis bei IgG2-Subklassenmangel- ein Fallbericht. Parodontologie No.2:167-181.
- [48] Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. 2000. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. Inflamm res. 49: 619-626.
- [49] Hendry ER, Worthington T, Conway BR, Lambert PA. 2009. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. J of Antimicrobial Chemotherapy 1-7.
- [50] Heymann D, Guicheux J, Gouin F, Passuti N, Daculsi G. 1998. Cytokines, Growth Factors and Osteoclasts. Cytokine Vol.10, No. 3: 155-168.
- [51] Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. 1990. Molecular Cloning and Expression of an IL-6 Signal Transducer, Gp 130. Cell 63: 1149-1157.
- [52] Hili P, Evans CS, Veness RG. 1997. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulfoxide on the activity of cinnamon oil. Lett in App Microbiol 24: 269-275.
- [53] Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. 1990. Biological and clinical aspects of interleukin-6. Immunology Today Vol.11, No. 12: 443-449.
- [54] Huang G TJ, Kinder- Haake S, Kim JW, Park NH. 2007. Differential expression of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 by human epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis* infection. Oral Microbiol. Immunol. 13: 301-309.
- [55] Huang G, Kim D, Lee J, Kuramitsu HK, Kinder Haake S. 2001. Interleukin-8 and Intercellular Adhesion Molecule 1 Regulation in Oral Epithelial Cells by Selected

Periodontal Bacteria: Multiple Effects of *Porphyromonas gingivalis* via Antagonistic Mechanisms. *Infection and Immunity* Vol.69: 1364-1372.

- [56] Imatani T, Kato T, Okuda K. 2001. Production of inflammatory cytokines by human gingival fibroblasts stimulated by cell-surface preparations of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 16: 65-72.
- [57] Izutsu KT, Belton CM, Chan A, Fatherazi S, Kanter JP, Park Y, Lamont RJ. 1996. Involvement of calcium in interactions between gingival epithelial cells and *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiology Letters* 144: 145-150.
- [58] Jenkinson HF, Lamont RJ. 2005. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends in Microbiology*: Vol. 13: No.12: 589-595.
- [59] Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka- Wroblewska E, Kagnoff MF. 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin. Invest.* 95: 55-65.
- [60] Karpanen TJ, Worthington T, Hendry ER, Conway BR, Lambert PA. 2008. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. *J of Antimicrobial Chemotherapy*: 1-6.
- [61] Kesavalu L, Chandrasekar B, Ebersole JL. 2002. In vivo induction of proinflammatory cytokines in mouse tissue by *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol* (17): 177-180.
- [62] Kishimoto T. 1989. The biology of interleukin-6. *blood journal* 74: 1-10.
- [63] Kjeldsen M, Holmstrup P, Bendtzen K. 1993. Marginal periodontitis and cytokines: a review of literature. *J Periodontol* 64: 1013-1022.
- [64] Kulik E, Lenkeit K, Meyer J. 2000. Antimikrobielle Wirkung von Teebaumöl (*Melaleuca alternifolia*) auf orale Mikroorganismen. *Acta Med Dent Helv* 5: 125-130.
- [65] Kuramitsu HK. 1998. Proteases of *Porphyromonas gingivalis*: what don't they do? *Oral Microbiol. Immunol.* 13: 263-270.
- [66] Lamont R, Oda D, Persson E, Persson G. 1992. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with gingival epithelial cells maintained in culture. *Oral Microbiol Immunol* 7: 364-367.
- [67] Lamont RJ and Jenkinson HF. 2001. Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol and Immunology* Vol. 15, Issue 6: 341-349.
- [68] Lamont RJ, Chan A, Belton CM, Izutsu KT, Vasel D, Weinberg A. 1995. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect. Immun.* 63: 3878-3885.

- [69] Lamont RJ, Hiaso GW, Gil S. 1994. Identification of a molecule of *Porphyromonas gingivalis* that binds to *Streptococci gordonii*. *Microb Pathog* 17: 355-360.
- [70] Lamont RJ, Jenkinson HF. 1998. Life Below the Gum Line: Pathogenic Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: 1244-1263.
- [71] Lopez NJ, Smith PC, Gutierrez J. 2002. Higher risk of preterm birth and low birth weight in woman with periodontal disease. *J Dent Res.* (81): 58-63.
- [72] Loughlin R, Gilmore BF, McCarron PA, Tunney MM. 2008. Comparison of the cidal activity of tea tree oil and terpinen-4-ol against clinical bacterial skin isolates and human fibroblast cells. *Lett in Appl Microbiol* 46 (14): 428-433.
- [73] Lourbakos A, Potempa J, Travis J, D'Andrea MR, Andrade- Gordon P, Santulli R, Mackie EJ, Pike RN. 2001. Arginine-Specific Protease from *Porphyromonas gingivalis* Activates Protease-Activated Receptors on Human Oral Epithelial Cells and Induces α 6 Secretion. *Infection and Immunity*: 5121-5130.
- [74] Madianos PN, Papapanou PN, Sandros J. 1997. *Porphyromonas gingivalis* Infection of Oral Epithelium Inhibits Neutrophil Transepithelial Migration. *Infection and Immunity*: 3983-3990.
- [75] Mann CM und Markham JL. 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J of Applied Microbiology* 84: 538-544.
- [76] May J; Chan CH, King A, Williams L, French GL. 2000. Time-kill studies of tea tree oil on clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 45: 639-643.
- [77] McMahon M, Blair I, Moore J, McDowell D. 2007. Habituation to sub-lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) is associated with reduced susceptibility to antibiotics in human pathogens. *J of Antimicrobial Chemotherapy*: 59-125.
- [78] Meyer D, Screenivasan P, Fives-Taylor P. 1991. Evidence for invasion of a human oral cell line by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* 59: 2719- 2726.
- [79] Mikolajczyk-Pawliska J, Travis J, Potempa J. 1998. Modulation of interleukin-8 activity by gingipains from *Porphyromonas gingivalis*: implications for pathogenicity of periodontal disease. *FEBS Lett.* 440: 282-286.
- [80] Miyasaki KT. 1991. The neutrophil mechanisms of controlling periodontal bacteria. *J Periodontol* (62): 761-774.
- [81] Nakagawa I, Amano A, Inaba H, Kawai S, Hamada S. 2005. Inhibitory effects of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae on interactions between extracellular matrix proteins and cellular integrins. *Microbes and Infection*: 157-163.
- [82] Niu C, Gilbert ES. 2004. Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *App and environmental Microbiol.*: 6951-6956.

- [83] Njoroge T, Genco RJ, Sojar HT, Hamada N, Genco CA. 1997. A Role for Fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* Invasion of Oral Epithelial Cells. *Infection and Immunity*: 1980-1984.
- [84] Nostro A, Blanco A, Cannatelli MA, Enea V, Flamini G, Morelli I, Sudano Roccaro A, Alonzo V. 2004. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol Lett.* 230: 191-195.
- [85] Nostro A, Roccaro Sudano A, Bisignano G, Marino A, Cannatelli MA, Pizzimenti FC, Cioni PL, Procopio F, Blanco AR. 2007. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J of Medical Microbiol.* 56: 519-523.
- [86] Nuryastuti T, van der Mei HC, Busscher HJ, Irvati S, Aman AT, Krom BP. 2009. Effect of Cinnamon oil on *icaA* expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *App and Environmental Microbiology*: 6850-6855.
- [87] Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, McKaig R, Beck J. 1996. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol* 67: 1103-1113.
- [88] Okada N, Kobayashi M, Mugikawa K, Okamatsu Y, Hanazawa S, Kitano S, Hasegava K. 1997. Interleukin-6 production in human fibroblasts derived from periodontal tissues is differentially regulated by cytokines and a glucocorticoid. *J of Periodontal Res.* (32): 559-569.
- [89] Oliva B, Piccirilli E, Ceddia T, Pontieri E, Aureli P, Ferrini AM. 2003. Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. *Letters in Applied Microbiology* 37: 185-187.
- [90] Olson ME, Ceri H, Morck DW et al. 2002. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res* 66: 86-92.
- [91] Owen CA, Campbell EJ. 1999. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J of Leukocyte Biology* Vol.65:137-150.
- [92] Page RC, Kornman KS. 1997. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology* 2000: Vol. 14: 9-11.
- [93] Petersilka GJ, Ehmke B, Flemmig TF. 2002. Antimicrobial effects of mechanical debridement. *Periodontol* 2000 (28): 56-71.
- [94] Raman A, Weir U, Bloomfield SF. 1995. Antimicrobial effects of tea tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis* and *Propionibacterium acnes*. *Letters in Applied Microbiology* 21: 242-245.
- [95] Rateitschak KH, Wolf HF. 2003. *Farbatlant der Zahnmedizin Parodontologie*. 3. Auflage.
- [96] Reichling J, Iten F, Saller R. 2003. Australisches Teebaumöl (*Melaleuca aetheroleum*). *phytotherapie*. Phyto.astral.ch.

- [97] Rönnebeck, Marcus. 2006. Einfluss von Serum auf die Freisetzung von Interleukinen nach Infektion von Fibroblasten und Epithelzellen mit parodontopathogenen Keimen.
- [98] Saginur R, StDenis M, Ferris W, Shawn DA, Chan F, Lee C, Ramotar K. 2006. Multiple combination bactericidal testing of staphylococcal biofilms from implant-associated infections. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*: 50: 55-61.
- [99] Sandros J, Karlsson C, Lappin DF, Madianos PN, Kinane DF, Papapanou PN. 2000. Cytokine Responses of Oral Epithelial Cells to Porphyromonas gingivalis Infection. *J Dent Res*: 79:1808-1814.
- [100] Sandros J, Papapanou P, Nanmark U, Dahlen G. 1994. Porphyromonas gingivalis invades human pocket epithelium in vitro. *J Periodont Res*. 29: 62-69.
- [101] Schnitzler P, Schön K, Reichling J. 2001. Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture. *Pharmazie* 56: 343-347.
- [102] Shapiro S, Meier A, Guggenheim B. 1994. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 9: 202-208.
- [103] Söderberg T, Johansson A, Gref R. 1996. Toxic effects of some conifer resin acids and tea tree oil on human epithelial and fibroblast cells. *Toxicology* 107: 99-109.
- [104] Soukoulis S, Hirsch R. 2004. The effects of a tea tree oil-containing gel on plaque and chronic gingivitis. *Australian Dental Journal* 49:(2):78-83.
- [105] Steffen MJ, Holt SC, Ebersole JL. 2000. Porphyromonas gingivalis induction of mediator and cytokine secretion by human gingival fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol* 15: 172-180.
- [106] Takahashi K, Hasaka M, Hanabusa Y et al. 1996. Dispersion of stratum corneum in aqueous mixed solutions of surfactant and terpene- the effect of mixtures of N,N- dimethyldodecylamine and α -terpineol. *Colloids & Surfaces A- Physicochemical & Engineering Aspects* 109: 273-282.
- [107] Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. 2004. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiology Immunology* 19: 61-64.
- [108] Tonetti MS, Imboden MA, Lang NP. 1998. Neutrophil migration into the gingival sulcus is associated with transepithelial gradients of interleukin-8 and ICAM-1. *J. Periodontol*. 69: 1139-1147.
- [109] Tong MM, Altmann PM, Barnetson RS. 1992. Tea tree oil in the treatment of Tinea pedis. *Australian J of Dermatol*. 33: 145-149.
- [110] Travis J, Banbula A, Potempa J. 2000. The role of bacterial and host proteinases in periodontal disease. *Adv. Exp. Med. Biol*. 477: 455-465.

- [111] Travis J, Pike R, Imamura T, Potempa J. 1997. Porphyromonas gingivalis proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. J Periodont Res. 32: 120-125.
- [112] Uehara A, Naito M, Imamura T, Potempa J, Travis J, Nakayama K, Takada H. 2008. Dual regulation of Interleukin-8 production in human oral epithelial cells upon stimulation with gingipains from Porphyromonas gingivalis. J of Medical Microbiology (57): 500-507.
- [113] Van Snick J. 1990. Interleukin-6: an overview. Ann Rev Immunol 8: 253-278.
- [114] Walter CW, Zahlten J, Schmeck B, Schaudinn C, Hippenstiel S, Frisch E, Hocke AC, Pischon N, Kuramitsu HK, Bernimoulin JP, Suttorp N, Krüll M. 2004. Porphyromonas gingivalis Strain- Dependent Activation of Human Endothelial Cells. Infection and Immunity: 5910-5918.
- [115] Watanabe A, Takeshita A, Kitano S, Hanazawa S. 1996. CD14-Mediated Signal Pathway of Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide in Human Gingival Fibroblasts. Infection and Immunity: 4488-4494.
- [116] Weinberg A, Belton CM, Park Y, Lamont RJ. 1997. Role of Fimbriae in Porphyromonas gingivalis Invasion of Gingival Epithelial Cells. Infection and Immunity: 313-316.
- [117] Wilson M, Reddi K, Henderson B. 1996. Cytokine- inducing components of periodontopathogenic bacteria. J Periodontal Res. 31: 393-407.
- [118] Wilton J, Hurst TJ, Scott EE. 1993. Inhibition of polymorphonuclear leucocyte phagocytosis by Porphyromonas gingivalis culture products in patients with adult periodontitis. Arch Oral Biol 38: 285-289.
- [119] Wong GG, Clark SC. 1988. Multiple actions of interleukin 6 within a cytokine network. Immunology Today Vol.9, No.5:137-139.
- [120] Xie H, Cai S, Lamont RJ. 1997. Environmental Regulation of Fimbrial Gene Expression in Porphyromonas gingivalis. Infection and Immunity: 2265-2271.
- [121] Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, Taniguchi T, Hirano T, Kishimoto T. 1988. Cloning and Expression of the human IL-6 (BSF-2/IFN- Beta 2) Receptor. Science 241: 825-828.
- [122] Yumoto H, Nakae H, Fujinaka K, Ebisu S, Matsuo T. 1999. Interleukin-6 (IL-6) and IL-8 are induced in human oral epithelial cells in responses to exposure to periodontopathic Eikenella corrodens. Infection and Immunity 1999: Vol. 67, No. 1: 384-394.
- [123] Zafiroopoulos GG, Weiss O, Willershausen B, Beaumont C, Froberg U, Kasaj A. 2006. The Use of Microbiological Diagnostic in the Treatment of Aggressive Periodontitis. Georg Thieme Verlag Stuttgart * New York. ZWR 34-38.
- [124] Zhang J, Dong H, Kashket S, Duncan MJ. 1999. IL-8 degradation by Porphyromonas gingivalis proteases. Microb. Pathog. 26: 275-280.

Anhang

Tab. 5 Chromatographisches Profil des benutzten Teebaumöls

α - Pinene	1,0-6,0%
Sabinene	<3,5%
α - Terpinene	5,0-13,0%
Limonene	0,5-4,0%
Cineole	<15,0%
γ – Terpinene	10,0-28,0%
para-Cymene	0,5-12,0%
Terpinolene	1,5-5,0%
Terpinen-4-ol	mind. 30,0%
Aromadendrene	<7,0%
α - Terpeneol	1,5-8,0%

Quelle: Produktspezifikation der Firma Avicenna (Polen), Produktcode 1034

Tab. 6 Anzahl der im Wachstum gehemmten *P. gingivalis*-Stämme (kumulativ)

Teebaumölkonzentration in %	Anzahl gehemmter <i>P. gingivalis</i> Stämme
Kontrolle	0
0,005	5
0,01	9
0,05	18
0,1	19
0,5	21
1,0	21

Tab. 7 Minimale Hemmkonzentrationen der vier *P. gingivalis*-Stämme, die für die Versuche mit Biofilmen, KB-Zellen und Fibroblasten eingesetzt wurden

Teebaumölkonzentration in %	MHK der benutzten Versuchstämmen
Kontrolle	
0,005	
0,01	P.g. MaRL, P.g. J374-1
0,05	P.g. M5-1-2
0,1	
0,5	P.g. ATCC 33277
1,0	

Tab. 8 Antibakterielle Wirksamkeit von Teebaumöl im jungen Biofilm : KBE von den vier verwendeten *P. gingivalis*-Stämmen

	Werte in Mio.	P.g. ATCC 33277		P.g. M5-1-2		P.g. J374-1		P.g. MaRL	
		1. Mesung	2. Mesung	1. Mesung	2. Mesung	1. Mesung	2. Mesung	1. Mesung	2. Mesung
6 h	Kontrolle	0,2840	0,4060	0,5000	0,5200	2,0000	2,0000	0,0200	0,1086
	0,001	0,0840	0,2240	0,4000	0,0000	2,0000	2,0000	0,0014	0,2540
	0,01	0,0840	0,3100	0,3000	0,1188	2,0000	2,0000	0,0800	0,0676
	0,1	0,1400	0,1562	0,1000	0,1198	2,0000	2,0000	0,0040	0,0264
24 h	Kontrolle	0,0024	0,2080	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	0,0042	0,2000
	0,001	0,8000	0,0600	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	0,7000	0,2000
	0,01	0,6800	0,0878	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	0,2100	0,2000
	0,1	0,5600	0,0552	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	0,0020	0,2000

Tab. 9 Antibakterielle Wirksamkeit von Teebaumöl im etablierten Biofilm : KBE von den vier verwendeten P. gingivalis-Stämmen

		P.g. ATCC 33277		P.g. M5-1-2		P.g. J374-1		P.g. MaRL	
Werte in Mio.		1. Mes- sung	2. Mes- sung	1. Mes- sung	2. Mes- sung	1. Mes- sung	2. Mes- sung	1. Mes- sung	2. Mes- sung
6 h	Kontrolle	1,6000	1,8000	0,2000	0,2500	2,0000	1,8000	1,6000	2,0000
	0,001	1,0000	1,7000	0,3000	0,2300	2,2000	2,0000	1,4000	1,7000
	0,01	1,0000	2,0000	0,4000	0,2800	2,3000	1,9000	1,4400	1,8000
	0,1	0,8000	2,0000	0,4000	0,2100	2,4000	1,8000	1,2000	1,9000
24 h	Kontrolle	1,6000	1,8000	0,3000	0,3400	2,0000	2,0000	1,7000	1,6000
	0,001	1,7000	1,8500	0,4000	0,3100	1,8000	2,1000	1,6000	1,7000
	0,01	1,5000	1,8400	0,3000	0,3400	2,0000	2,1500	1,5500	1,8000
	0,1	1,6000	1,8400	0,2600	0,3200	2,0000	2,0000	1,5000	1,6000

Tab. 10 Antibakterielle Wirksamkeit von Teebaumöl in KB-Zellen (planktonisch vorkommende Zellen): KBE von den vier verwendeten P. gingivalis-Stämmen

		P.g. ATCC 33277		P.g. M5-1-2		P.g. J374-1		P.g. MaRL	
Werte in Tsd.		1. Mes- sung	2. Mes- sung	1. Mes- sung	2. Mes- sung	1. Mes- sung	2. Mes- sung	1. Mes- sung	2. Mes- sung
6 h	Kontrolle	58,400	10,200	20,300	2,800	47,400	103,000	0,700	k.W.
	0,01	30,600	0,000	28,900	6,600	0,600	35,200	4,100	k.W.
	0,05	0,100	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	k.W.
	0,1	0,000	0,000	0,400	0,000	0,000	0,000	0,000	k.W.
24 h	Kontrolle	0,500	0,500	70,300	0,900	1,000	19,900	k.W.	k.W.
	0,01	0,000	0,000	0,800	0,300	0,000	7,000	k.W.	k.W.
	0,05	0,000	0,000	0,000	1,500	0,000	4,400	k.W.	k.W.
	0,1	0,000	0,200	0,000	1,300	0,000	1,100	k.W.	k.W.

*) k.W. = kein Wachstum

Tab 11. Antibakterielle Wirksamkeit von Teebaumöl in KB-Zellen (Werte der adhärenen Bakterien): KBE von den vier verwendeten P. gingivalis-Stämmen

		P.g. ATCC 33277		P.g. M5-1-2		P.g. J374-1		P.g. MaRL	
		1. Mes- sung	2. Mes- sung	1. Mes- sung	2. Mes- sung	1. Mes- sung	2. Mes- sung	1. Mes- sung	2. Mes- sung
6 h	Kontrolle	2.030	k.W.	1.330	30	150	120	130	k.W.
	0,01	480	k.W.	50	90	-	120	160	k.W.
	0,05	-	k.W.	-	30	-	310	-	k.W.
	0,1	-	k.W.	-	20	-	-	30	k.W.
24 h	Kontrolle	500	k.W.	30	k.W.	3.900	2.950	30	k.W.
	0,01	-	k.W.	40	k.W.	-	2.580	-	k.W.
	0,05	-	k.W.	-	k.W.	-	2.460	-	k.W.
	0,1	-	k.W.	-	k.W.	-	1.190	-	k.W.

*) k.W. = kein Wachstum

Tab. 12 Versuchswerte für die antibakterielle Wirksamkeit von Teebaumöl in Fibroblasten (planktonisch vorkommende Bakterien): KBE von den vier verwendeten P. gingivalis-Stämmen

		P.g. ATCC 33277		P.g. M5-1-2		P.g. J374-1		P.g. MaRL	
Werte in Tsd.		1. Mes- sung	2. Mes- sung	1. Mes- sung	2. Mes- sung	1. Mes- sung	2. Mes- sung	1. Mes- sung	2. Mes- sung
6 h	Kontrolle	15,600	2,900	58,300	4,600	96,800	68,700	19,900	0,400
	0,01	11,500	15,900	83,300	26,000	99,400	114,000	0,000	10,400
	0,05	1,600	0,000	7,600	0,000	158,100	0,600	13,200	0,000
	0,1	0,000	0,000	1,200	0,000	74,400	0,400	0,000	0,000
24 h	Kontrolle	17,600	0,200	0,000	0,300	171,600	4,600	5,000	0,300
	0,01	0,000	0,100	34,100	18,600	151,700	0,600	0,000	0,000
	0,05	0,000	0,000	10,000	0,000	111,100	0,100	0,000	0,000
	0,1	0,000	0,000	0,000	0,000	110,900	0,000	0,000	0,000

Tab. 13: IL6-Freisetzung aus nicht infizierten sowie mit *P. gingivalis* infizierten KB-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration des Teebaumöls nach sechs und 24 Stunden Inkubation

		6 h				24 h			
		Kontrolle	0,01	0,05	0,1	Kontrolle	0,01	0,05	0,1
KB-Zellen ohne P.g.	1. Messung	0,19	0,07	0,53	0,07	17,84	22,93	14,62	14,62
	2. Messung	0,35	0,07	0,00	0,00	22,93	10,40	0,00	0,00
	3. Messung	0,35	1,44	0,07	1,19	-	10,40	10,40	0,00
	4. Messung	-	5,03	0,35	0,07	-	45,32	0,00	20,55
P.g. ATCC 33277	1. Messung	0,53	0,19	0,19	0,53	17,84	14,62	0,00	0,00
	2. Messung	0,00	0,53	0,00	0,19	22,93	10,40	0,00	20,55
	3. Messung	0,00	0,00	0,19	0,00	0,00	10,40	0,00	0,00
	4. Messung	-	0,73	0,07	0,19	30,61	27,06	0,00	17,84
P.g. M5-1-2	1. Messung	0,53	0,19	0,19	0,07	10,40	17,84	0,00	14,62
	2. Messung	0,53	0,53	0,19	1,19	22,93	20,55	0,00	20,55
	3. Messung	0,07	0,07	0,07	0,00	0,00	14,62	0,00	0,00
	4. Messung	10,68	0,00	0,19	0,19	20,55	10,40	17,84	17,84
P.g. J374-1	1. Messung	0,35	0,07	0,00	0,19	0,00	14,62	0,00	14,62
	2. Messung	1,19	0,00	0,00	0,00	14,62	0,00	0,00	17,84
	3. Messung	0,07	0,07	0,07	0,07	17,84	10,40	10,40	0,00
	4. Messung	0,35	0,07	0,00	0,95	17,84	0,00	20,55	25,08
P.g. MaRL	1. Messung	0,35	0,35	0,00	0,19	0,00	10,40	14,62	10,40
	2. Messung	13,17	9,26	6,62	2,59	10,40	0,00	0,00	20,55
	3. Messung	0,19	0,07	1,19	0,19	22,93	14,62	25,08	22,93
	4. Messung	0,00	0,00	0,07	0,53	0,00	0,00	25,08	25,08

Tab. 14: IL8-Freisetzung aus nicht infizierten sowie mit *P. gingivalis* infizierten KB-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration des Teebaumöls nach sechs und 24 Stunden Inkubation

		6 h				24 h			
		Kontrolle	0,01	0,05	0,1	Kontrolle	0,01	0,05	0,1
KB-Zellen ohne P.g.	1. Messung	0,71	0,00	0,00	0,00	67,57	33,11	15,04	0,00
	2. Messung	0,00	0,00	0,00	0,00	87,40	37,60	75,46	28,11
	3. Messung	1,47	0,00	0,00	0,00	33,11	-	22,31	41,71
	4. Messung	-	9,84	0,00	0,00	-	52,54	33,11	72,90
P.g. ATCC 33277	1. Messung	1,47	1,47	0,00	1,47	52,54	33,11	-	55,79
	2. Messung	0,00	0,71	0,00	0,00	80,40	28,11	33,11	52,54
	3. Messung	0,00	0,00	0,00	8,97	22,31	k.W.	15,04	33,11
	4. Messung	-	0,00	1,47	4,72	15,04	67,57	33,11	22,31
P.g. M5-1-2	1. Messung	0,00	0,00	0,00	0,00	45,53	37,60	-	72,90
	2. Messung	0,00	0,00	0,00	0,00	82,78	22,31	37,60	41,71
	3. Messung	3,89	-	-	-	22,31	49,13	41,71	45,53
	4. Messung	8,97	0,00	0,00	0,00	15,04	41,71	52,54	22,31
P.g. J374-1	1. Messung	0,00	0,00	0,00	0,71	41,71	0,00	-	87,40
	2. Messung	0,71	0,00	0,00	0,00	80,40	41,71	28,11	55,79
	3. Messung	0,00	0,00	0,00	0,00	28,11	28,11	41,71	33,11
	4. Messung	0,71	0,00	0,00	0,00	33,11	37,60	67,57	22,31
P.g. MaRL	1. Messung	0,00	1,47	0,00	0,00	37,60	37,60	-	52,54
	2. Messung	0,00	0,00	0,00	0,00	41,71	67,57	37,60	52,54
	3. Messung	0,00	-	-	-	-	0,00	41,71	28,11
	4. Messung	0,00	0,00	0,71	0,00	33,11	33,11	-	28,11

Tab. 15: IL6-Freisetzung aus nicht infizierten sowie mit *P. gingivalis* infizierten Fibroblasten in Abhängigkeit von der Konzentration des Teebaumöls nach sechs und 24 Stunden Inkubation

		6 h				24 h			
		Kontrolle	0,01	0,05	0,1	Kontrolle	0,01	0,05	0,1
KB-Zellen ohne P.g.	1. Messung	0,14	0,14	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2. Messung	0,14	1,26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3. Messung	3,04	0,43	0,43	0,43	-	0,00	0,00	0,00
	4. Messung	0,14	0,00	0,14	0,43	0,00	0,00	0,00	0,00
P.g. ATCC 32277	1. Messung	0,00	0,00	0,43	0,43	0,00	0,00	0,00	0,00
	2. Messung	0,14	0,81	0,00	0,00	-	0,00	0,00	0,00
	3. Messung	0,81	0,81	0,43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4. Messung	0,00	4,51	0,00	1,26	0,00	0,00	0,00	0,00
P.g. M5-1-2	1. Messung	0,14	0,00	0,00	0,43	0,00	0,00	0,00	0,00
	2. Messung	0,14	0,43	0,00	-	-	0,00	0,00	0,00
	3. Messung	0,81	3,75	0,00	0,43	0,00	0,00	0,00	0,00
	4. Messung	0,00	3,04	0,00	1,26	0,00	0,00	0,00	0,00
P.g. J374-1	1. Messung	0,14	0,00	0,00	1,26	0,00	0,00	0,00	0,00
	2. Messung	1,26	0,00	0,00	-	-	0,00	0,00	0,00
	3. Messung	0,43	0,81	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00
	4. Messung	0,00	0,00	0,00	0,81	0,00	0,00	0,00	0,00
P.g. MaRL	1. Messung	1,79	0,00	0,00	3,04	0,00	0,00	0,00	0,00
	2. Messung	1,79	0,00	0,00	-	-	0,00	0,00	0,00
	3. Messung	0,14	1,79	0,81	0,43	0,00	0,00	0,00	0,00
	4. Messung	0,00	0,00	0,14	0,43	0,00	0,00	0,00	0,00

Tab. 16: IL8-Freisetzung aus nicht infizierten sowie mit *P. gingivalis* infizierten Fibroblasten in Abhängigkeit von der Konzentration des Teebaumöls nach sechs und 24 Stunden Inkubation

		6 h				24 h			
		Kontrolle	0,01	0,05	0,1	Kontrolle	0,01	0,05	0,1
KB-Zellen ohne P.g.	1. Messung	0,00	0,00	0,00	-	0,00	0,00	0,00	0,00
	2. Messung	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00
	3. Messung	-	-	-	0,00	0,38	0,00	0,00	0,00
	4. Messung	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P.g. ATCC 33277	1. Messung	-	-	-	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12
	2. Messung	0,00	-	0,00	0,00	0,38	0,00	0,00	0,00
	3. Messung	0,00	-	0,00	-	0,00	0,00	0,00	0,00
	4. Messung	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P.g. M5-1-2	1. Messung	-	-	-	-	0,00	0,00	0,00	0,12
	2. Messung	-	0,00	0,00	-	0,73	0,00	0,00	0,00
	3. Messung	-	-	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00
	4. Messung	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P.g. J374-1	1. Messung	-	0,00	-	-	0,00	0,00	0,00	0,12
	2. Messung	-	0,00	0,00	0,00	1,65	0,00	0,00	0,00
	3. Messung	0,00	-	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4. Messung	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P.g. MaRL	1. Messung	0,00	0,00	-	0,00	0,00	0,38	0,12	0,38
	2. Messung	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35	0,00	0,00	0,00
	3. Messung	-	-	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4. Messung	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

A Danksagung

Mein großer Dank gilt an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. med. habil. Wolfgang Pfister, der trotz seiner vielfachen und starken Beanspruchung im Mikrobiologischen Institut die Zeit gefunden hat, mir tatkräftig unter die Arme zu greifen. Durch seine angenehme Art und die freundliche Betreuung meiner Arbeit konnte ich die Dissertation beenden.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau PD Dr. med. habil. Sigrun Eick, die mich ebenso in der Durchführung meiner Versuche unterstützte.

Ein besonderer Dank ist auch Claudia Ranke auszusprechen, die mich in den Vorbereitungen und Durchführungen der einzelnen Untersuchungen gezielt unterstützte und so manchen Versuchstag durch Ihre nette Persönlichkeit erleichterte.

Ein weiterer herzlicher Dank gilt meinen Eltern, die mich während der gesamten Zeit immer wieder ermutigten und unterstützten. Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Freund Andreas, der mir immer wieder mit Rat und Tat zur Seite stand.

B Lebenslauf

Name: Katharina Funke
Anschrift: Schellingstraße 13
07548 Gera
Geburtstag: 10.02.1985
Geburtsort: Gera
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Schulbildung: 1990-94 Besuch der 4. Grundschule Gera
1994-2003 Besuch des Osterlandgymnasiums Gera (mit
Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife)
Studium: 2003-2009 Studium der Zahnmedizin an der FSU Jena
Approbation im Januar 2009
(Promotionszeit: 2006-2010)
Assistenzzeit: ab 02.03.2009 Assistenz Zahnärztin in Bamberg bei Dr.
med. dent. T. Pfützner
ab 01.06.2010 Assistenz Zahnärztin in Gera bei Dr. med.
B. Funke

Gera, den 01.06.2010

Katharina Funke

C Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- § mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- § ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- § mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben: Prof. Dr. med. habil. Wolfgang Pfister, PD Dr. med. habil. Sigrun Eick,
- § die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- § Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen
- § ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Gera, den 01.06.2010

Katharina Funke, Verfasser