

Antibakterielle Wirkung von Honig 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 Gesine Schäfer
geboren am 05.05.1983 in Jena

Gutachter:

1. PD Dr. S. Eick, Bern
2. Prof. Dr. W. Pfister, Jena
3. Prof. Dr. Dr. B. W. Sigusch, Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.02.2012

Abkürzungsverzeichnis

AGEs	Advanced Glycation Endproducts; Verbindungen, die durch die Reaktion von Aminosäuren und reduzierenden Zuckern entstehen (Maillard-Reaktion)
ATCC	American Type Culture Collection
B-Zellen	B-Lymphozyt; Träger der humoralen Immunantwort
DHAP	Dihydroxyaceton Phosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
HPLC	High-performance liquid chromatography/ Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule/ interzelluläres Adhäsionsmolekül
Ig	Immunglobuline; von Plasmazellen gebildete Glykoproteine, die als Antikörper mit Antigenen reagieren
IL	Interleukine; von Leukozyten gebildete Zytokine
in vivo	Prozesse, die im lebendigen Organismus ablaufen
in vitro	Abläufe, die in künstlicher Umgebung bzw. außerhalb lebender Organismen stattfinden
KB-Zellen	Zelllinie, die sich vom humanen Karzinom aus dem Nasopharynx ableitet
KBE	Kolonie bildende Einheiten
MGO	Methylglyoxal
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MM6	MonoMac6/ humane Monozyten-Zelllinie
MMP	Matrixmetallproteasen; Endopeptidasen, die Peptidbindungen spalten
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells; spezifischer Transkriptionsfaktor
PBS	phosphate buffered saline/ Phosphatgepufferte Salzlösung
PGE ₂	Prostaglandin E ₂ ; Gewebehormon, welches in das Entzündungsgeschehen involviert ist
P. gingivalis	<i>Porphyromonas gingivalis</i>

pH-Wert	Maß für die Konzentration an Wasserstoffionen in wässriger Lösung
RANK	Receptor Activator of NF- κ B; Enzym, das an Oberfläche von Osteoklasten exprimiert wird
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand; Protein aus der Familie der Tumornekrosefaktoren, das von Osteoblasten sezerniert wird; ist an Regulation von Knochenaufbau und -abbau beteiligt
ROI	Reaktive oxygene Intermediate
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
TIMP-1	Metallopeptidase Inhibitor 1; natürlicher Inhibitor der MMPs
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α ; Mediator der Entzündungs- und Immunreaktion
Tween 20	Polysorbat-20; Emulgator und Lösungsvermittler
T-Zellen	T-Lymphozyt; weiße Blutzellen, die der Gewebeabwehr dienen
UMF	“Unique Manuka Factor“; standardisierter Labortest, der die antibakterielle Aktivität des Manukahonigs bestimmt
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	4
2.1	Parodontopathien	4
2.1.1	Klassifikation parodontaler Erkrankungen	4
2.1.2	Ätiologie und Pathogenese der Parodontiden	6
2.2	Porphyromonas gingivalis	8
2.3	Therapieansätze zur Behandlung von Parodontitis	14
2.4	Honig	15
2.4.1	Bedeutung der antimikrobiellen Potenz von Honig	15
2.4.2	Antimikrobielle Eigenschaften des Honigs	16
2.4.3	Manukahonig	20
3.	Zielstellung der Arbeit	23
4.	Material und Methoden	24
4.1	Verwendete Materialien	24
4.2	Minimale Hemmkonzentration/MIC	27
4.2.1	Versuchsablauf Screening Honig	27
4.2.2	Versuchsablauf für die Bestimmung der minimalen Hemm- konzentration von Honig, Methylglyoxal und Wasserstoffperoxid mittels Bouillondilution	29
4.3	Biofilm	31
4.3.1	Biofilmbildung	31
4.3.2	Etablierter Biofilm	34

5.	Ergebnisse	35
5.1	Ergebnisse der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) auf <i>Porphyromonas gingivalis</i>	35
5.1.1	Manuka- und Imkerhonig	35
5.1.2	MHK-Ergebnisse für Manuka-, Imkerhonig, Wasserstoffperoxid und Methylglyoxal	36
5.2	Ergebnisse der Biofilmbildung	37
5.2.1	Manuka- und Imkerhonig	37
5.2.2	Wasserstoffperoxid und Methylglyoxal im Biofilm	40
6.	Diskussion	47
7.	Schlussfolgerung	61
8.	Literaturverzeichnis	63
9.	Anhang	70

1. Zusammenfassung

Die Parodontitis ist eine entzündliche, bakteriell verursachte Erkrankung, von der die Mehrheit der erwachsenen Weltbevölkerung betroffen ist. Es kommt zum progredienten Abbau des Zahnhalteapparates und kann bei einem besonders aggressiven Verlauf zum Zahnverlust führen. Das anaerob gram-negative Stäbchen *Porphyromonas gingivalis* gilt als einer der Leitkeime dieser Erkrankung. Es tritt mit großer Häufigkeit bei aggressiver Parodontitis, chronischer Parodontitis, Periimplantitis und rezidivierender Parodontitis auf. Durch die Fähigkeit *P. gingivalis* an den oralen Epithelzellen des Wirtes zu adhären und sich nach erfolgter Therapie schnell zu rekolonisieren, ist eine effiziente keimreduzierende Behandlung parodontaler Erkrankungen indiziert. Neben der mechanischen Therapie, dem Entfernen sub- und supragingival anhaftender Beläge, kommen antiseptische Spüllösungen und bei schweren Parodontiden auch Antibiotika zum Einsatz.

Durch die zunehmende Resistenz vieler Keime gegenüber Antibiotika und deren Nebenwirkungen auf den Magen-Darm-Trakt, ist in den letzten Jahren das Interesse in der Anwendung alternativer phytochemikalischer Substanzen gestiegen. Hierbei stehen antibakteriell wirksame Heilmittel floralen Ursprungs wie essentielle Öle, Miswak, grüne Tee-Extrakte, Ringelblume, Rotwein und Honig zunehmend im Vordergrund. Honig weist antimikrobielle Eigenschaften auf und wird seit Jahrhunderten erfolgreich als antibakterielles Therapeutikum in der Wundbehandlung eingesetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die antibakterielle Wirksamkeit von Honig auf *P. gingivalis* in vitro bestimmt. Hierbei war von besonderem Interesse, ob diese Aktivität auch in einem Milieu wirksam ist, das mit dem dental anhaftenden Biofilm der Mundhöhle vergleichbar ist. Dazu wurden die klinischen Isolate *P. gingivalis* M5-1-2, MaRL und J361-1, die von Patienten mit schwerer chronischer Parodontitis stammten und der internationale Referenzstamm *P. gingivalis* ATCC 33277 verwendet. Zwei Honigsorten, ein einheimischer Imkerhonig und ein neuseeländischer Manukahonig mit einem Aktivitätsfaktor von UMF 25+, wurden auf ihre keimhemmende Aktivität untersucht. Hierbei stellte sich die Frage, ob diese Aktivität von dem Inhibin Wasserstoffperoxid im Imkerhonig und der phytochemikalischen Substanz Methylglyoxal im Manukahonig abzuleiten ist. Mittels HPLC wurde für den Imkerhonig ein Wasserstoffperoxidgehalt von 3,74 µg/g und für

den Manukahonig 1,87 µg/g ermittelt. Der Imkerhonig enthielt 2,0 µg/g Methylglyoxal, der Manukahonig wies eine Konzentration von 982 µg/g auf.

Als Voruntersuchung wurden 19 klinische Patientenisolat und ein Referenzstamm *P. gingivalis* mittels Agar-Dilutionstest auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Manuka- und Imkerhonig getestet. Dabei wurde bereits schon bei einer 10%igen Konzentration beider Honigsorten das Wachstum aller Stämme von *P. gingivalis* signifikant gehemmt. Auch die minimale Hemmkonzentration (MHK) der vier zu untersuchenden Stämme mittels Boullondillution zeigte, dass beide Honigsorten und deren Wirkkomponenten Wasserstoffperoxid und Methylglyoxal keiminhibierende Aktivität aufwiesen. Hier zeigte der Manukahonig schon bei einer 2%igen Lösung, die einer Konzentration von 19,6 µg/ml Methylglyoxal entsprechen (Mavric et al. 2008), eine keimreduzierende Wirkung. Die MHK-Werte für den einheimischen Imkerhonig lagen zwischen 5 und 10%. Für den antimikrobiell wirksamen Bestandteil Wasserstoffperoxid wurden minimale Hemmkonzentrationen von 10 mg/l gegenüber den klinischen Isolaten und 100 mg/l für den Referenzstamm ermittelt. Methylglyoxal hemmte ab einer Konzentration von 5-20 mg/l das Wachstum von *P. gingivalis*.

Um die antibakterielle Wirkung von Honig und seiner Wirkstoffe auf *P. gingivalis* in der Mundhöhle zu bestimmen, wurde ein künstlicher Biofilm mit den zu inkubierenden Keimen hergestellt, dem zusätzlich 1%- und 10%iger Honig sowie anschließend Wasserstoffperoxid und Methylglyoxal in Konzentrationen von 5 bis 100 mg/l zugeführt wurde. Sowohl der Imker- als auch der Manukahonig zeigten bereits nach sechs Stunden einen reduzierenden Effekt auf das Wachstum von *P. gingivalis*. Bei einer 10%igen Konzentration waren beide Honigsorten nach 24 Stunden in der Lage, die Biofilmbildung von *P. gingivalis* signifikant herabzusetzen. Auch die Zahl von *P. gingivalis* im 42 Stunden alten, etablierten Biofilm wurde nach Zugabe von 1% und 10% Imker- und Manukahonig signifikant herabgesetzt. Beim Wasserstoffperoxid war im Biofilm ein Anstieg der KBE zu verzeichnen, im etablierten Biofilm wurde aber eine wachstumshemmende Aktivität ermittelt. Methylglyoxal wies demgegenüber keinen inhibierenden Einfluss auf die Keimzahl von *P. gingivalis* im Biofilm auf.

Honig wirkt signifikant antibakteriell auf *P. gingivalis*, wobei der neuseeländische Manukahonig besondere keiminhibierende Aktivität aufweist. Diese antimikrobielle Eigenschaft ist überwiegend auf die Inhaltsstoffe Wasserstoffperoxid im Imkerhonig

und Methylglyoxal im Manukahonig zurückzuführen. Hohe Konzentrationen von Honig hemmen die Biofilmbildung *P. gingivalis*, ein bereits vorhandener Biofilm von *P. gingivalis* wird durch Honig konzentrationsabhängig zerstört. Somit könnte Honig einen therapeutischen Nutzen in der Behandlung von Parodontiden haben, die mit *P. gingivalis* assoziiert sind.

2. Einleitung

2.1 Parodontopathien

2.1.1 Klassifikation parodontaler Erkrankungen

1999 fand in Illinois der *International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions* statt. Danach wurde basierend auf klinischen, radiographischen, anamnestischen und mikrobiologischen Kriterien eine neue Klassifikation zur Einteilung der destruktiven Parodontalerkrankungen veröffentlicht, die heute noch gültig ist (Armitage 1999). Es werden unterschieden:

- I Gingivale Erkrankungen
- II Chronische Parodontitis
- III Aggressive Parodontitis
- IV Parodontitis als Manifestation einer Systemerkrankung
- V Nekrotisierende Parodontalerkrankungen
- VI Abszesse des Parodonts
- VII Parodontitis im Zusammenhang mit endodontalen Läsionen
- VIII Entwicklungsbedingte oder erworbene Deformationen und Zustände

Die gingivalen Erkrankungen werden in eine dentale plaque-induzierte Gingivitis und nicht-plaque-induzierte Gingivitis unterteilt. Die plaque-induzierte Erkrankung ist gekennzeichnet durch eine Plaqueakkumulation an der Zahnoberfläche und wird von systemischen Faktoren beeinflusst. Auch die Einnahme von Medikamenten sowie eine Fehl- bzw. Mangelernährung können sich negativ auf den Zustand der Gingiva auswirken.

Die nicht-plaque-induzierte Gingivitis wird in gingivale Erkrankungen, die durch spezifische Bakterien und Viren verursacht werden oder durch einen Pilzbefall gekennzeichnet sind, untergliedert. Daneben sind genetische Bedingungen, Manifestationen von systemischen Konditionen, traumatische Läsionen, Fremdkörperreaktionen und nicht anderweitig spezifizierte Faktoren bei dieser Form der Gingivitis bedeutsam.

Die Parodontitis wird definiert als eine entzündliche, durch bakterielle Beläge verursachte Erkrankung aller Anteile des marginalen Parodonts mit fortschreitendem Verlust an Stützgewebe (Hellwig et al. 2003, Kornman 2008). Dazu gehören die Gingiva, das Desmodont, das Wurzelzement und der Alveolarknochen. Bei der Parodontitis kommt es zu einer Entzündung der Gingiva mit apikaler Wanderung des Epithelattachments zur Wurzeloberfläche, begleitet von einem Attachmentverlust des Bindegewebes und Destruktion des Alveolarknochens (Baelum & Lopez 2003). Man unterscheidet eine chronische und eine aggressive Form mit verschiedenen Verlaufs- und Schweregraden.

Ungefähr 90% der Parodontitiden werden der chronischen Parodontitis zugeschrieben (Rateitschak & Wolf 1989). Sie tritt hauptsächlich bei Erwachsenen über dem 30. Lebensjahr auf, aber auch Kinder und Jugendliche sind davon betroffen. Klinische Zeichen sind eine entzündete Gingiva, Attachmentverlust des Bindegewebes, Plaqueanhäufungen, subgingivale Konkremente, parodontale Taschen und horizontaler Knochenabbau. Die chronische Form ist in der Regel langsam fortschreitend mit kurzen Perioden rascher Destruktion des Zahnhalteapparates. In der mikrobiologischen Diagnostik kann eine variable Mikroflora nachgewiesen werden.

Eine weitere Einteilung der chronischen Parodontitis findet in einer lokalisierten und einer generalisierten Form statt.

Die aggressive Parodontitis tritt weniger häufig auf als die chronische Form (Burt et al. 2005). Auf der Zahnoberfläche ist weniger Plaque vorhanden, es kommt zum rapiden Attachmentverlust und zur rasch fortschreitenden Knochendestruktion in vertikaler Richtung. Eine familiäre Häufung wird vielfach beobachtet. Bei der mikrobiologischen Untersuchung sind vorwiegend *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* zu finden. Eine abnormale Phagozytenfunktion und eine erhöhte Produktion von PGE₂ und Il-1 β durch hyperresponsive Makrophagen ist häufig zu beobachten (Armitage 2004).

Die lokalisierte aggressive Parodontitis, bei der überwiegend die ersten Molaren und die Inzisiven des permanenten Gebisses betroffen sind, beginnt meist während der Pubertät. Die generalisierte aggressive Parodontitis betrifft hauptsächlich Patienten unter 30 Jahren, kann aber auch bei älteren Menschen auftreten. Der Krankheitsprozess ist episodisch in der Destruktion von Attachment und

Alveolarknochen ausgeprägt. Dabei sind mindestens drei permanente Zähne betroffen, ausgenommen die ersten Molaren und die Inzisiven.

Bei den Parodontitiden als Manifestation von Systemerkrankungen sind vor allem hämatologische Erkrankungen, genetische Störungen und Stoffwechselerkrankungen von Bedeutung.

2.1.2 Ätiologie und Pathogenese der Parodontiden

Parodontale Erkrankungen sind multifaktorielle, komplexe und polymikrobielle Störungen des parodontalen Gewebes (Fravalo et al. 1996, Page & Kornman 1997), die zu einer Destruktion des Zahnhalteapparates führen.

10-20% der Weltbevölkerung leiden an der Infektionskrankheit Parodontitis. Dabei sind individuelle Unterschiede im Verlauf, den Schweregrad der Erkrankung und der Reaktion des Organismus auf die Behandlung zu beobachten.

Die Zahnfleischtasche gesunder Erwachsener enthält durchschnittlich $2,7 \times 10^{11}$ Bakterien pro Gramm, mit einem Anteil von etwa 75 % Anaerobiern (Gatermann & Loos 1996). Mehr als 700 Bakterienspezies sind in der Mundhöhle angesiedelt (Rylev & Kilian 2008). Zu den parodontalpathogenen Keimen, die in geringer Anzahl auch bei parodontal gesunden Personen zu finden sind, gehören *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus* und *Treponema denticola*. (Burt et al. 2005).

In der Mundhöhle befindet sich beim gesunden Organismus ein Gleichgewicht zwischen der Immunabwehr des Wirtes und den Mikroorganismen, die die Mundhöhle besiedeln, und somit auch eine Balance zwischen gesteuerter Geweberegeneration und -destruktion. Durch eine ineffektive Plaquekontrolle und Hygiene des Patienten sowie exogene Infektionen, die zu einer ansteigenden bakteriellen Belastung führen, ist dieses Gleichgewicht empfindlich gestört. Auch genetische und induzierende Faktoren wie Rauchen, Stress, Stoffwechselstörungen, ernährungsbedingte Schädigungen des Parodonts oder mechanisch bedingte Traumata tragen modifizierend zu diesem Ungleichgewicht bei (Kornman 2008). Erst nachdem die Mikroorganismen einen Schwellenwert überschritten haben, initiieren

sie einen entzündlichen Prozess. Dabei kolonisieren überwiegend gram-negative, anaerobe oder mikroaerophile Bakterien das subgingivale Saumepithel (Page & Kornman 1997).

Nach etwa drei Wochen ungehinderter Plaqueakkumulation entwickelt sich eine Gingivitis, die histopathologisch in drei Phasen untergliedert wird, die aber nicht immer chronologisch verlaufen. Nur bei 10 bis 15 % der Patienten entwickelt sich aus dieser Entzündung eine schwere Parodontitis (Heidemann 2005); dabei wechseln sich Phasen der Stagnation und Exzerbation ab.

Nach einer Phase der fortgeschrittenen Läsion manifestiert sich klinisch die Parodontitis mit Destruktion des Stützgewebes und des Alveolarknochens. Folge dieser entzündlichen Vorgänge sind Zahnlockerungen und schließlich Zahnverlust.

Die Ausbildung einer mikrobiellen Plaque auf der Zahnhartsubstanz ist Voraussetzung für die Entstehung der Parodontitis. Die Bildung dieses Biofilms erfolgt dabei in mehreren Phasen. Nach Reinigung der Zahnoberfläche kommt es auf dieser zum Niederschlag hydrophober Makromoleküle, wie Glykoproteinen des Speichels, Sulkusflüssigkeit, Serum und Schleimhautbestandteilen. Dies führt zur Ausbildung einer Pellikelschicht. Durch spezifische Bindungseigenschaften der Plaque wird die Anhaftung von Mikroorganismen ermöglicht.

Fakultativ anaerobe gram-positive Kokken, Stäbchen und Filamente, die als primäre Kolonisierer bezeichnet werden, haften sich in den ersten 24 Stunden durch extrazelluläre Makromoleküle oder Fimbrien an der Zahnoberfläche an. Durch die Aggregation neuer Mikroorganismen und der Produktion extrazellulärer Polysaccharide kommt es zur Volumenzunahme des Biofilms. Es findet nach etwa zwei bis drei Tagen ein Umbau der Plaque zu einem gereiften Biofilm statt. Dieser Biofilm weist hohe Werte von gram-negativen anaeroben filamentösen Organismen, den sekundären Kolonisierern, auf (Rosan & Lamont 2000). Die Stoffwechselfähigkeit der Mikroorganismen an der Oberfläche erzeugt einen Sauerstoffgradienten, der zu anaeroben Bedingungen innerhalb der Plaque führt. Zunächst lagern sich vermehrt Spirillen an, nach ungefähr 15 Tagen sind vermehrt Spirochäten zu beobachten. Die Formation aus filamentösen Bakterien, die sich um die Kokken angelagert haben, wird als "Maiskolben" bezeichnet. Es kommt zur Produktion bakterieller Toxine sowie zur Bildung hydrolytischer Enzyme, die die Makromoleküle des Wirtes in Polypeptide und Aminosäuren aufspalten.

Im gingivalen Sulkus findet die initiale Auseinandersetzung zwischen Bakterien und Wirtsabwehr statt. Dabei werden im gingivalen Sulkusfluid inflammatorische Zytokine, Eicosanoide, Kinine, Komplementaktivatorprodukte und Matrixmetalloproteinasen als Teil der Wirtsantwort auf die stattfindende Entzündung freigesetzt und tragen so zur Destruktion des Gewebes und zur Ausprägung parodontaler Taschen bei (Page & Kornmann 1997). Zu den Zytokinen gehören Prostaglandin E₂ (PGE₂), Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α), IL-1 alpha (IL-1 α), IL-1 β und andere (Burt et al.). Zytokine werden hierbei von verschiedenen Zelltypen wie Keratinozyten, Fibroblasten, Osteoblasten, dendritische Zellen und endothelialen Zellen exprimiert (Graves 2008).

2.2 Porphyromonas gingivalis

Porphyromonas gingivalis gehört neben *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola* und *Tannerella forsythia* zu den pathogenen Keimen, die stark mit parodontalen Erkrankungen der Mundhöhle assoziiert sind.

P. gingivalis ist ein gram-negatives, obligat anaerob wachsendes Stäbchen der Mundhöhle, welches der Familie der Bacteroidaceae zugeordnet wird (Theuretzbacher 1999, Yilmaz 2008). Der Keim ist schwarz pigmentiert, isomorph und besteht aus kokkoiden Zellen, die eine Größe von 0,8-2,5 x 0,5-1,0 μm erreichen können (Burkhardt 1992). Er weist einen putriden Geruch auf, ist nicht beweglich und bildet keine Sporen aus.

P. gingivalis besitzt einen asaccharolytischen, proteolytischen Stoffwechsel mit Bildung von Essig-, Propion-, Isobutter-, Butter- und Isovaleriansäure (Burkhardt 1992). Zu seiner Energiegewinnung nutzt *P. gingivalis* Peptide und Aminosäuren, die durch die Aktivität wirtseigener Enzyme zur Verfügung gestellt werden, ebenso benötigt er Hämin als Wachstumsfaktor (Marsh & Martin 2003).

Der Keim ist gegenüber Kanamycin resistent und reagiert empfindlich auf Nitroimidazol. Nur etwa fünf Prozent der *P. gingivalis*-Spezies neigt zur β -Laktamasebildung (Theuretzbacher 1999). Hierbei bildet das Bakterium Enzyme, die den β -Laktamring der Antibiotika öffnen und diese damit inaktivieren. Als

Therapeutika werden Metronidazol und Cefalosporine (Cefotetan, Cefoxitin) eingesetzt (Blatz 1999).

P. gingivalis gehört zu der kommensalen Mikroflora der Mundhöhle (Fravalo et al. 1996, Enersen et al. 2008, Yilmaz 2008) und kann bei parodontal Gesunden in geringer Zahl in der supragingivaler Plaque, im gingivalen Sulkus, in parodontalen Zahnfleischtaschen, auf der Zunge, der buccalen Mucosa und im Bereich der Tonsillen nachgewiesen werden (Ximénez-Fyvie et al. 2000, Henderson 2002, Marsh & Martin 2003).

Bei Parodontitiden ist er ein opportunistischer Keim, der als sekundärer Kolonisierer der dentalen Plaque auftritt. Dabei steht *P. gingivalis* häufig im Zusammenhang mit Mischinfektionen. Zu den Keimen *T. forsythia* und *T. denticola* verhält er sich synergistisch und bildet mit ihnen den sogenannten „roten Komplex“, der häufig in parodontalen Taschen, mitunter auch in der supragingivaler Plaque ermittelt wird und eng mit parodontaler Destruktion assoziiert ist (Ximénez-Fyvie et al. 2000).

P. gingivalis ist an der Entwicklung verschiedener Formen der Parodontitis beteiligt, besonders häufig wird er aber bei fortgeschrittenen parodontalen Läsionen der chronischen und aggressiven Parodontitis nachgewiesen (Marsh & Martin 2003). Er taucht vermehrt in den tiefen subgingivalen Abschnitten der parodontalen Taschen bei Parodontitiserkrankten, besonders häufig auch in infizierten Wurzelkanälen, nekrotischen Pulpae und endodontischen Abszessen auf (Inagaki et al. 2003, Gomes et al. 2005).

Durch seine hohe Anpassungs- und Überlebensfähigkeit im parodontalen Gewebe kommt es häufig nach einer Parodontitisbehandlung zu einer Rekolonisierung von *P. gingivalis* (Fujise et al. 2006) und einem fortschreitendem Knochenabbau (Chaves et al. 2000).

P. gingivalis weist eine Vielzahl von Virulenzfaktoren auf, die zum Gewebeabbau im Parodontium beitragen und die mit der Umgehung der Wirtsabwehr in Verbindung gebracht werden. Dazu zählen Fimbrien, Lipopolysaccharide, Kollagenase und Cyteinproteasen (Lamont et al. 1995, Masuda et al. 2006). Durch die Aktivität von Kollagenase, Fibrinolysin, Gingipain, Phospholipase A und alkalischer und saurer Phosphatasen kommt es durch den Keim zur Zerstörung des parodontalen Gewebes.

P. gingivalis ist in der Lage, die Chemotaxis der Wirtszellen zu hemmen und Komplement sowie Immunglobuline zu spalten. Im Saumepithel unterdrückt der Keim die Produktion und Expression von IL-8 und ICAM-1 sowie weiteren Zytokinen.

Spezifische Bindungseigenschaften erlauben *P. gingivalis* die Adhäsion an den Oberflächen der Mundhöhle wie den Zähnen, der oralen Mucosa, anderen oralen Bakterien und Speichelkomponenten (Lin et al. 2006). Dabei besteht ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Bakterien, die den Epithelzellen anhaften und dem Schweregrad der Entzündung (Pathirana et al. 2007).

Die Anhaftung an oralen Epithelzellen, die zuerst besiedelt werden, ermöglicht dem Keim die Invasion und Kolonisierung in die Zellen, um sich dort vor den immunologischen Abwehrmechanismen des Wirtes zu schützen und um sich intrazellulär in einer nährstoffreichen Umgebung zu replizieren (Duncan et al. 1993, Lamont et al. 1995). Durch die Adhäsion werden strukturelle und biochemische Veränderungen in den epithelialen Zellen induziert, die die bakterielle Penetration erleichtern (Lamont et al. 1995). Dadurch findet ein Umbau des epithelialen Aktin-Zytoskeletts statt.

Zu den Adhäsinen gehören zelluläre Komponenten wie Fimbrien, Proteasen, Hämagglutinin und Lipopolysaccharide (Amano 2003, Yilmaz 2008). Für die Pathogenese der parodontalen Erkrankungen sind zwei spezifische Fimbrientypen, die an der Zelloberfläche von *P. gingivalis* lokalisiert sind, von Bedeutung. Man unterscheidet einen Major- Fimbrientyp, der lang und peritrich ist, von einem dünnen, kurzen Minor- Fimbrientyp, bestehend aus einem 67 kDa großen Protein. Eine strukturelle Untereinheit des Majortyps ist das 41 kDa große Protein FimA/ Fimbrillin, das einen wichtigen Virulenzfaktor des Keimes darstellt. Von den sechs Genotypen des Proteins (I, Ib, II, III, IV, V), die sich in der Dichte der Fimbrien und ihrer Nukleotidsequenz unterscheiden, sind FimA Typ II und nachfolgend FimA Typ IV diejenigen mit der größten Fähigkeit zur Adhärenz und Invasion von Epithelzellen (Enersen et al. 2008). FimA Typ II und IV sind als prädominante Genotypen bei chronischen, Typ II auch bei aggressiven Parodontitiden nachzuweisen (Amano 2003, Fujise et al. 2006, Enersen et al. 2008), Typ I, III und V sind hingegen bei parodontal Gesunden die häufigsten Genotypen. Typ II ermöglicht die Anlagerung an den oralen Oberflächen und initiiert die Kolonisierung des Bakteriums. Dabei wird die Produktion proinflammatorischer Zytokine (IL-6) und des

Tumornekrosefaktors α induziert. Der Minor-Fimbrientyp ermöglicht die Koadhäsion mit *Streptococcus gordonii* und ist für die Autoaggregation, der Interaktion zwischen den Bakterienzellen, verantwortlich. Er ermöglicht die Bildung von Mikrokolonien und damit die Reifung des Biofilms (Lin et al. 2006).

Diese spezifische Adhärenz befähigt das Bakterium zur Kolonisierung der parodontalen Tasche und zur Initiierung und Progression einer schweren Parodontitis. Dabei variieren die verschiedenen Stämme *P. gingivalis* in ihrer Fähigkeit zur Anhaftung an oralen Epithelzellen (Duncan et al. 1993, Pathirana et al. 2007).

Neben der Möglichkeit zur Anhaftung und Invasion von gingivalen Epithelzellen besitzt FimA weitere pathogene Eigenschaften wie die Koaggregation mit anderen Bakterienspezies, die Bindung an Bestandteile des Speichels, die Aktivierung von Wirtszellen wie der Epithel- und Endothelzellen, Fibroblasten und Makrophagen sowie der Induktion von inflammatorischen Zytokinen und einer Knochenresorption (Enersen et al. 2008).

Die internalisierten *P. gingivalis* erhöhen die Proliferationsrate der Wirtszellen und hemmen in den gingivalen Epithelzellen die physiologischen Zellvorgänge der Apoptose, um somit ihr intrazelluläres Überleben zu gewährleisten (Yilmaz 2008).

Die verschiedenen Serotypen *P. gingivalis* lassen sich zusätzlich durch ihre verschiedene Kapselpolysaccharide (K-Antigene) unterscheiden (Marsh & Martin 2003). Dierickx et al. wiesen nach, dass in vitro die Stämme ohne Polysaccharidkapsel 10fach stärker als solche mit Kapsel an kultivierten Epithelzellen adhären (2003). Dabei wurde beobachtet, dass die Anzahl der Fimbrien, ebenso wie die Lipopolysaccharide und Membranproteine die Oberflächenhydrophobizität des Keimes beeinflusste. Die Stämme ohne Kapselantigen sind hydrophober, binden dadurch besser und besitzen eine hohe Tendenz zur Autoaggregation, was die Anhaftung im parodontalen Gewebe erleichtert.

Bakterielle Kapseln setzen sich aus extrazellulären, hydrophilen und negativ geladenen säurehaltigen Polysacchariden zusammen. Die Fähigkeit der Adhäsion an Epitheloberflächen ist hierdurch reduziert, jedoch vermindert diese Kapseleigenschaft auch die Wirkung der wirtsspezifischen Phagozytose.

Auch die Proteasen von *P. gingivalis* vermitteln durch die Spaltung von Oberflächenmolekülen an KB-Zellen, einer epithelialen Zelllinie, eine Freilegung der

oberflächigen Bindungsstellen (Pathirana et al. 2007). Dem Keim wird dadurch ermöglicht, an KB-Zellen adhären und internalisiert zu werden (Duncan et al. 1993, Li et al. 2008).

Bei der Anhaftung an die dentale Plaque zeigt *P. gingivalis* eine spezies-spezifische Bindungsaktivität. Die Expression von SspB-ähnlichen Polypeptiden durch *S. sanguinis* ermöglicht *P. gingivalis* eine große Bindungskapazität an Biofilme mit hohem *S. sanguinis*-Vorkommen. Auch die Koadhäsion zu *S. gordonii* wird durch das Oberflächenprotein Ssp-Polypeptid an die Fimbrien und Oberflächenproteine *P. gingivalis* vermittelt (Lamont et al. 1995, Rosan & Lamont 2000). Über Fimbrillin wird der Kontakt an die Oberflächenproteine von *S. oralis*, *A. naeslundii* und *A. viscosus* unterstützt (Amano 2003). Zusätzlich ist *P. gingivalis* befähigt an *F. nucleatum*, *T. forythia*, *T. denticola*, *Veillonella sp.* und *Capnocytophaga sp.* zu adhären (Lamont et al. 1995, Rosan & Lamont 2000).

Zu den wichtigen Virulenzfaktoren *P. gingivalis* gehören die hoch aktiven Gingipaine. Sie sind trypsin-ähnliche Cysteinproteasen, die entweder sezerniert oder membrangebunden vorliegen. Gingipaine spalten entweder arginin-(rgpA, rgpB) oder lysinspezifische (kgp) Peptidbindungen. Durch den Abbau von Wirtsmolekülen wie Immunglobulinen, Komplement, eisen- oder hämbindenden Proteinen und Glykoproteinen führen sie zu einer Dysregulation der Blutgerinnung, einer Fibrinolyse, der Aktivierung der Kallikrein/Kinin-Kaskade, einer Modulierung der Zytokinfreisetzung sowie zu einer Aktivierung der Matrixmetalloproteinasen (Marsh & Martin 2003, Stathopoulou et al. 2009). Zudem werden Wirtsproteine wie Albumin, Kollagen, Laminin, Fibronectin, E-Cadherin, β 1-Integrin und Occludin gespalten (Amano 2003, Inagaki et al. 2003, Yilmaz 2008).

Der Kontakt von gingivalen Epithelzellen mit *P. gingivalis* führt zu einem Anstieg der primären proinflammatorischen Zytokin-Antwort des Wirtes. Dabei wird eine sekundäre Zytokin- und Chemokinantwort reduziert und der Abbau von Zytokinen in den gingivalen Epithelzellen induziert. Während Lys-Gingipain IL-6 und IL-8 abbaut, kommt es durch Arg-Gingipain zur Spaltung von IL-1 β und IL-8 (Stathopoulou et al. 2009). Die Wirtsabwehr wird dadurch empfindlich gestört, indem die vaskulären und zellulären inflammatorischen Infiltrate abnehmen (IL-6) und die Migration von Phagozyten reduziert wird (IL-8), die unter normalen Bedingungen zur bakteriellen Phagozytose führt.

Unter dem Einfluss von *P. gingivalis* werden proteolytisch wirksame Wirtsenzyme stimuliert, die in der Mundhöhle die extrazelluläre Matrix von Bindegewebe und Knochen aufzuspalten vermögen (Fravalo et al. 1996). Dabei kommt den über 14 Matrixmetalloproteinasen (MMP) eine besondere Bedeutung zu. Die MMP stellen eine Familie substratspezifischer Endopeptidasen dar, denen ein ionisiertes Zinkatom im aktiven Zentrum gemeinsam ist (Zhou & Windsor 2006). Die Lipopolysaccharide von *P. gingivalis* regen Makrophagen direkt zur Produktion von Vorstufen der MMPs (Pro-MMP) an. Die Makrophagen sezernieren somit Zytokine und Prostaglandine, die die Fibroblasten und andere Gewebezellen zur MMP-Synthese und -Freisetzung stimulieren. Auch Wachstumsfaktoren und Hormone beteiligen sich indirekt an der Synthese der MMP.

Zu den MMP gehören Gelatinasen (MMP-2, MMP-9), Kollagenasen (MMP-1, MMP-8), Stromelysine (MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-11), Matrilysin u.a. (Fravalo et al. 1996, Rateitschak & Wolf 1989, Zhou & Windsor 2006). Durch Spaltung von Peptidbindungen sind die MMPs in der Lage, verschiedene Strukturen der Extrazellulärmatrix wie Kollagen, Fibronectin oder Laminin abzubauen. An der Destruktion parodontalen Gewebes sind die MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 und MMP-13 beteiligt. Durch eine erhöhte Aktivierung und Freisetzung der MMPs (MMP-1, MMP-3, MMP-14) sowie der Reduktion des Antagonisten TIMP-1 durch *P. gingivalis* wird die Fähigkeit humaner gingivaler Fibroblasten zum Kollagen-Abbau gesteigert (Zhou & Windsor 2006). Im gingivalen Fluid von Parodontitispatienten liegt die Gelatinase MMP-9, die an der Gewebeerstörung beteiligt ist, in erhöhtem Grade vor. Deren Aktivierung wird von *P. gingivalis* reguliert (Fravalo et al. 1996).

Im gesunden Gewebe findet durch das RANK/RANKL- System ein Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und -abbau statt. RANKL („Receptor Activator of NF- κ B Ligand“) ist ein Protein der Familie der Tumornekrosefaktoren, das von Osteoblasten sezerniert wird. Durch die Bindung an den Rezeptor RANK von monozytären Osteoklasten-Vorläuferzellen wird deren Differenzierung zu Osteoklasten angeregt. Die Unterbrechung der Bindung RANK/RANKL durch den Antagonisten Osteoprotegerin wirkt der von RANKL induzierten Osteoklastengnese entgegen. Parodontitispatienten, die mit *P. gingivalis* infiziert sind, weisen im Sulkusfluid und gingivalem Gewebe eine erhöhte RANKL- Expression auf. Somit wird eine erhöhte Knochenresorption hervorgerufen (Taubman et al. 2007). Taubman et al. (2007)

wiesen nach, dass auch B- und T-Zellen des Immunsystems dazu befähigt sind, die Expression von RANKL zu induzieren. In Tierexperimenten zeigte sich, dass *P. gingivalis* durch Aktivierung der Lymphozyten die Osteoklastogenese verstärkt. Zusätzlich wird bei Parodontitiden eine RANKL- unabhängige Osteoklastogenese durch Aktivierung des Zytokins TNF- α ausgelöst.

Lipopolysaccharide sind in der äußeren Membran des Keimes enthalten und wirken bei ihrem Zerfall als Endotoxine schädigend auf Fibroblasten und Leukozyten, initiieren die parodontale Knochenresorption und führen zur Freisetzung von Zytokinen. Durch die Bindung an die Monozytenoberfläche wird die Freisetzung von TNF und IL-1 β induziert.

2.3 Therapieansätze zur Behandlung von Parodontitis

Ziel der Behandlung der parodontalen Erkrankungen ist die Plaquereduktion und die dazu führende Entfernung parodontalpathogener Keime. Durch die Reduktion der mikrobiellen Erreger kann eine Progression der Erkrankung vermieden werden. Sie wird ermöglicht durch Hygienisierungsmaßnahmen, wie die mechanische Zahnreinigung supra- und subgingivaler Beläge (Fujise et al. 2006). Die Beseitigung subgingivaler Konkremeente wird als deep scaling und root planing bezeichnet. Auch eine regelmäßige Instruktion und Remotivation des Patienten zu einer effektiven Mundhygiene spielte eine wichtige Rolle, um eine erneute Exzerbung der Parodontitis zu vermeiden. Weitere Behandlungsmöglichkeiten, die die Therapie der Parodontitis unterstützen, bestehen in parodontalchirurgischen Eingriffen und Anwendung antimikrobiell wirksamer Pharmaka wie Antibiotika, Enzympräparaten sowie antiseptischen Mundspüllösungen (Eickholz 2010). Dabei finden vermehrt alternative Behandlungspräparate floraler Herkunft immer mehr Anerkennung in der Behandlung der Parodontiden (Lauten et al. 2005, Allaker & Douglas 2009).

2.4 Honig

2.4.1 Bedeutung der antimikrobiellen Potenz von Honig

Die heilsamen Eigenschaften von Honig sind schon seit Jahrtausenden bekannt. Er wirkt sowohl antibakteriell als auch fungizid (Molan 1992, Horn & Lüllmann 1992, Snowdon & Cliver 1996, Bogdanov & Blumer 2001, Cooper et al. 2002). Bereits im Altertum wurde er nachweislich bei Kulturvölkern wie den Ägyptern, Assyrern, Chinesen, Griechen und Römern als Arzneimittel zur Wundheilung genutzt (Berger 1916, Zumla & Lulat 1989, Sato & Miyata 2000). In der Volksheilkunde wird Honig traditionell als Wirkstoff bei Erkältungen, Bronchial- und Atemwegserkrankungen oder als Umschlag bei Brandwunden angewendet (Berger 1916, Dany 1991). Auch bei entzündlichen Erkrankungen des Magen- und Darmtraktes, Lepraerkrankungen sowie zur Organkonservierung wird Honig eine heilsame Wirkung zugeschrieben (Zumla & Lulat 1989, Horn & Lüllmann 1992, Sato & Miyata 2000). Das medizinische Heilverfahren, bei dem Bienenprodukte eingesetzt werden, wird als Apitherapie bezeichnet.

Durch die zunehmende Resistenzentstehung vieler Keime ist in den letzten Jahrzehnten das Interesse an traditionellen Naturheilmitteln wieder gewachsen (Zumla & Lulat 1989, Suller & Russell 1999, Sato & Miyata 2000). Durch seine hohe bakterizide und wachstumshemmende Aktivität gegenüber gram-negativer und gram-positiver aerober und anaerober Organismen sowie seiner antiseptischen Eigenschaften ist Honig ein geeignetes Agens im klinischen Alltag (Dold et al. 1939, Efem 1988, Molan 1992, Lusby et al. 2002). Einige Studien belegen eine sensitive Reaktion Antibiotika-resistenter Wundpathogene und Bakterienstämme auf Honig, die aus infizierten Wunden isoliert wurden (Cooper et al. 1999, Cooper et al. 2002, Visavadia et al 2008). An einigen klinischen Einrichtungen und in zahlreichen Studien wird Honig erfolgreich als Ergänzung oder Alternative zur Antibiotikabehandlung bei chronischen Wundinfektionen eingesetzt (Cooper et al. 1999, Molan 2001, Lusby et al. 2005). Dabei werden vorwiegend topisch Verbrennungen, chronische und infizierte Wunden, Dekubitus sowie verschiedene Formen von Geschwüren wie diabetischer Fuß mit Honig therapiert (Blomfield 1973, Bose 1982, Zumla & Lulat 1989, Molan 2001).

Eine klinische Studie untersuchte die Wirkkraft von Honig in Verbänden verschiedener Wundarten, die unter konventionellen Therapiemitteln nicht ausheilten. Dabei zeigte sich eine beschleunigte Wundheilung, Absorption von ödematösen Flüssigkeiten aus der Wundumgebung, Debridement durch chemische oder enzymatische Aktivität, eine Desodorierung der Wunde sowie Förderung der Granulation und Epithelisation (Efem 1988). Dies belegte auch eine Untersuchung von Bergmann et al. (1983), bei der eine beschleunigte Epithelisation und verstärkte Granulation durch eine topische Behandlung offener Wunden bei Mäusen mit kommerziellem Honig beobachtet wurde. Honig ist somit ein effektiver Promotor bei der Wundheilung.

Der neuseeländische Active Manuka Honey®, der aus Australien stammende Medihoney® und rewa rewa honey sind als anerkannte therapeutische Honigsorten auf dem Markt erhältlich (Lusby et al. 2002, 2005).

Honig setzt sich aus über 180 Substanzen zusammen. Dazu zählen vor allem Kohlenhydrate, Wasser, Aminosäuren, Vitamine, Mineralien und verschiedene Enzyme (Dold et al. 1939, Dany 1991, Horn & Lüllmann 1992).

2.4.2 Antimikrobielle Eigenschaften des Honigs

Die antimikrobielle Wirkung des Honigs wird durch eine Vielzahl von Faktoren bestimmt. Darunter zählen sein Säuregehalt, der niedrige pH-Wert, seine hohe Osmolarität und die damit verbundenen hygroscopischen Eigenschaften. Die polyphenolischen Verbindungen, die als Antioxidantien wirksam sind, tragen zu dem entzündungshemmenden Charakter des Honigs bei (Al-Mamary et al. 2002, Gómez et al. 2006).

Dold etablierte 1939 erstmals den Begriff der "Inhibine", der die licht- und temperaturempfindlichen antibakteriellen Substanzen im Honig kennzeichnet. Diese Inhibine weisen einen Aktivitätsverlust bei einem einstündigen Erhitzen auf 56°C oder einer Temperaturerhöhung auf 80°C für zehn Minuten sowie einer stundenlangen Belichtung mit Sonnenlicht auf (Dold et al. 1939). Die Konzentration an Inhibinen steht im direkten Zusammenhang mit der Akkumulation von Wasserstoffperoxid im Honig (White & Subers 1963, White et al. 1963, Molan 1992).

Lange Zeit wurde angenommen, dass die antibakterielle Aktivität des Honigs hauptsächlich durch seinen hohen Zuckergehalt hervorgerufen wird. Honig besteht zu etwa 80% aus Zuckern, wobei die Monosaccharide Glucose (etwa 27 – 36%) und Fructose (33 – 42%), die vom Blütennektar stammen, den größten Anteil ausmachen (Weston & Brockleband 1999, Weston et al. 1999). Daneben sind Maltose als Disaccharid, das Trisaccharid Melezitose, Polysaccharide und andere Kohlenhydrate von Bedeutung (Dany 1991, Horn & Lüllmann 1992, Weston & Brockleband 1999). Der Wassergehalt des Honigs liegt zwischen 15 und 18% (Horn & Lüllmann 1992, Bogdanov & Blumer 2001). Diese Eigenschaften ermöglichen dem Honig als gesättigte Zuckerlösung eine hohe osmotische Wirkung, der einigen Bakterien das Wasser entzieht und ein mikrobielles Wachstum in dieser Umgebung erschwert (White et al. 1963, Bose 1982, Efem 1988). Aber auch bei einer hohen Verdünnung ist eine keimhemmende Wirkung des Honigs nachweisbar. Somit ist die hohe Osmolarität nur teilweise für die antibakterielle Aktivität des Honigs verantwortlich (Cooper et al. 1999). Das belegen auch Untersuchungen, die die antibakterielle Wirkung eines Manuka- und eines Waldhonigs mit einem Kunsthonig auf Methicillin-resistente *S. aureus* Stämme und Vancomycin-empfindliche Enterokokken verglichen (Cooper et al. 2002). Der aus einer Zuckerlösung gewonnene artifizielle Honig wirkte erst bei einer dreifachen Konzentration äquivalent zu den Naturhonigen.

Der pH-Wert des Honigs liegt bei 4,5 bis 3,2 mit einem Durchschnitt von 3,9 (Molan 1992, Sato & Miyata 2000, Bogdanov & Blumer 2001, Lusby et al. 2002, Snow et al. 2004). In diesem sauren Milieu sind die meisten pathogenen Keime in ihrem Wachstum gehemmt. Bestimmte Sorten wie Kastanien- oder Honigtau-honig weisen aber auch noch bei einem erhöhten pH-Wert von 5 bis 6 antibakterielle Wirkung auf (Dany 1991, Bogdanov & Blumer 2001).

In der Speicheldrüse der Honigbiene ist das licht- und hitzeempfindliche Enzym Glucoseoxidase enthalten. Im unreifen Honig setzt es Glucose und Wasser zu Gluconlacton um, welches spontan oder enzymatisch zu Gluconsäure hydrolysiert wird und somit Wasserstoffperoxid freisetzt (White et al. 1963, White & Subers 1963, Horn & Lüllmann 1992, Bogdanov & Blumer 2001). In den meisten Honigsorten wird die antibakterielle Aktivität durch seinen Gehalt an Wasserstoffperoxid bestimmt (White et al. 1963, White & Subers 1963, Molan 1992). Dieses besitzt eine signifikante bakterizide und bakteriostatische Wirkung (Molan 1992). 1 mmol/l

Wasserstoffperoxid in gelöstem Honig bzw. 5 – 100 µg Wasserstoffperoxid ist pro Gramm Honig zu ermitteln, dabei schwankt die Konzentration zwischen den verschiedenen Honigsorten bedeutend (White et al. 1963, 1963, Molan 1992, Molan 2001). Minimale Konzentrationen von Wasserstoffperoxid, die das bakterielle Wachstum hemmen, liegen zwischen 0,12 bis 5,9 mmol/l (Molan 1992,1).

Nach Reifung des Honigs und der daraus resultierenden Abnahme seines Wassergehalts, wird die Produktion von Wasserstoffperoxid weitestgehend eingestellt; Glucoseoxidase befindet sich dann im inaktiven Zustand. Auch kommt es bei langer Lagerung sowie durch Licht- und Hitzeeinflüsse zu einem Wirkungsverlust der enzymatischen Aktivität. Erst bei einer Verdünnung des Honigs wird die Produktion des Peroxids wieder angeregt (White et al. 1963, Bogdanov et al. 1987). Damit zählt Wasserstoffperoxid zu einem der Hauptwirkstoffe in gelöstem Honig (Molan & Russell 1988, Molan 1992).

Das Enzym Katalase gehört zu der Gruppe der Peroxidasen und gelangt durch Pollen und Nektar von verschiedenen Pflanzen in den Honig (Molan 1992, Horn & Lüllmann 1992). Es zerlegt Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff (White et al. 1963, Bogdanov & Blumer 2001). Katalase ist auch im humanen Plasma enthalten, baut aber nur in hohen Konzentrationen Wasserstoffperoxid ab. Bei physiologischen Werten ist sie nur gering aktiv (Molan 1992). Honige, die einen hohen Gehalt an Wasserstoffperoxid aufweisen, besitzen nur einen geringen Anteil an Katalase.

Die antibakterielle Aktivität korreliert jedoch nicht vollständig mit der Akkumulation von Wasserstoffperoxid im Honig (White et al. 1963). Bei der Untersuchung verschiedener Honigarten wurde festgestellt, dass bei speziellen Sorten unter Zugabe von Katalase, bei einer Temperaturerhöhung auf 100°C für 15 Minuten sowie bei lang anhaltender Lagerung über sechs Monate bei 2 – 8°C die antimikrobielle Wirkung des Honigs weder geschwächt noch verloren ging (Nzeako & Hamdi 2000). Dies belegt, dass ein Wirkstoff mit antibakterieller Aktivität zusätzlich im Honig enthalten sein muss, der nicht peroxidalen Ursprungs ist (Molan 1992). Auch andere Untersuchungen zeigten, dass sich die antibakterielle Wirkung nicht-peroxidaler Inhibine bei einer Temperaturerhöhung von 70°C für 15 Minuten nur wenig verminderte. Auch war bei diesen Wirkstoffen eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Lichteinflüssen und 15-monatiger Lagerung im Vergleich zu Honigen mit

hohem Peroxidgehalt festzustellen (Bogdanov & Blumer 2001). Somit weisen einige Honigsorten zusätzliche phytochemische antibakterielle Substanzen auf (Molan 2001), in anderen Honigen überwiegt hingegen der Anteil an Wasserstoffperoxid als Hauptwirkstoff.

Der nicht-peroxidale antibakterielle Bestandteil im Honig wurde in den letzten Jahrzehnten intensiv erforscht. Er leitet sich aus pflanzlichen Komponenten und Substanzen, die während der Honigverarbeitung durch Bienen hinzugegeben werden, ab (Molan & Russell 1988, Bogdanov & Blumer 2001). Das belegt eine Studie von Bogdanov & Blumer (2001), die die antibakterielle Aktivität eines Honigs, der durch die Fütterung von Bienen mit raffiniertem Zucker entstand, mit einem Waldhonig verglich. Die Inhibine des Zuckerfütterungshonigs waren nur unerheblich geringer als die des Waldhonigs.

Zu den nicht-peroxidalen Inhibinen werden phenolische Verbindungen wie aromatische Säuren und Flavonoide, teilweise auch das antibakteriell wirksame Enzym Lysozym, flüchtige Verbindungen sowie Aromakomponenten gezählt (Molan 1992, Horn & Lüllmann 1992, Bogdanov & Blumer 2001).

Dem hohen Säureanteil des Honigs wird dabei die größte antibakterielle Aktivität zugeschrieben (Bogdanov 1997, Bogdanov & Blumer 2001). Diese Verbindungen sind meist pflanzlichen Ursprungs, stammen aber auch aus den Speicheldrüsen der Bienen oder leiten sich aus enzymatischen Einwirkungen auf bestimmte Zuckerverbindungen ab (Dany 1991, Herold & Leibold 1991).

Zu den phenolischen Säuren des Honigs gehören Ferulic, Mandelic, Vanillic, Ellagic, Gallic, Homogentisic und P-Coumaric. Die häufigsten Flavonoide sind Apigenin, Kaempferol, Naringenin, Pinocembrin, Pinobanksin, Chrysin, Quercetin, Hesperetin und Myricetin. Je nach Honigsorte und deren floraler und geographischer Herkunft weicht die Zusammensetzung dieser antioxidativer Verbindungen und deren antibakterieller Aktivität ab (Bogdanov 1997, Weston et al. 2000, Al-Mamary et al. 2002, Gómez-Caravaca et al. 2006, Pulcini et al. 2006).

Nicht alle Honigsorten besitzen denselben Grad an antibakterieller Aktivität. Die Wirkung hängt dabei von der Konzentration seiner spezifischen Wirkstoffe, seiner saisonalen Ernte sowie seiner floralen Herkunft ab und variiert je nach Honigsorte (Molan & Russell 1988, Molan 1992, Postmes et al. 1993, Sato & Miyata 2000, Bogdanov & Blumer 2001). Dabei ist der Wirkungsgrad der antibakteriellen Aktivität

gegenüber verschiedenen Bakterienarten nicht konstant (Dold et al. 1937, Molan 1992). Auch zeigt sich eine Variation in der Hitzeempfindlichkeit der Inhibine bei Honigen verschiedenen pflanzlichen Ursprungs (Molan & Russell 1988, Nzeako & Hamdi 2000).

2.4.3 Manukahonig

Manuka stammt vom Baum des neuseeländischen *Leptospermum scoparium* und gehört zur Familie der Myrtengewächse (Weston et al. 2000). Durch seine signifikant hohe antibakterielle Wirkung in vitro und in vivo ist der Manukahonig in den letzten Jahrzehnten zum Schwerpunkt vieler Forschungsarbeiten geworden, in denen er unter anderem erfolgreich als antibakteriell wirksames Agens bei infektiösen Wundbehandlungen eingesetzt wurde (Lusby et al. 2002, 2005, Visavadia et al. 2008). Besondere Aktivität zeigt Manuka gegenüber *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* und *Streptococcus pyogenes* (Russell et al. 1990, Molan 1992, Cooper et al. 1999, Weston et al. 1999, Cooper et al. 2002, Snow et al. 2004, Adams et al. 2008, Mavric et al. 2008).

Seine hohe antibakterielle Wirksamkeit bleibt auch noch nach Erwärmen des Manukahonigs auf 95°C bestehen und weist nach einer Behandlung mit Katalase unveränderte antibakterielle Aktivität auf (Molan & Russell 1988, Weston et al. 1999, Snow & Manley-Harris 2004).

Manukahonig zählt zu den Honigsorten mit hohem Grad an nicht-peroxidaler antibakterieller Aktivität (Molan & Russel 1988, Russel et al. 1990, Cooper et al. 1999, Weston et al. 1999, Snow & Manley-Harris 2004). Im Gegensatz zu den meisten Honigsorten, deren antibakterielle Eigenschaften vom Gehalt an Wasserstoffperoxid bestimmt werden, sind im Manukahonig phytochemischen Verbindungen enthalten, die seine hohe antibakterielle Aktivität verantworten (Molan 1992). 90% der antibakteriellen Wirkung beruht auf dem Anteil der Derivate aromatischer Säuren (Molan 1992, Bogdanov 1997, Bogdanov & Blumer 2001). Spezifisch für Manukahonig sind Gallussäure und Abscisinsäure (Yao et al. 2003). Russell et al. (1990) extrahierten durch verschiedene chromatographische und

massenspektrometrische Verfahren Wirkstoffe des Manukahonigs mit antibakterieller Aktivität gegenüber *S. aureus*. Eine signifikante antibakterielle Wirkkraft wurde für die aromatische Säuren 4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoesäure (Syringasäure) und 3,4,5-Trimethoxybenzoesäure sowie im geringeren Maße auch für 4-Hydroxy-3,5-dimethoxymethylbenzoat (Methylsyringasäure) nachgewiesen. Methylsyringasäure macht etwa 70% der phenolischen Verbindungen im Manukahonig aus (Weston et al. 2000). Die phenolischen Verbindungen sind hauptsächlich floraler Herkunft, aber auch Pollen, Propolis und Wachs sind verantwortlich für den Gehalt an den antibakteriell wirksamen aromatischen Säuren des Manukahonigs (Russel et al. 1990, Weston et al. 2000).

Weston et al. (1999) bestätigten in ihren Untersuchungen die antibakteriellen Eigenschaften der aromatischen Säuren des Manukahonigs, stellten aber einen vergleichbaren Gehalt dieser Säuren in anderen europäischen Honigsorten fest. Die phenolischen Verbindungen tragen daher zur antibakteriellen Aktivität von Manukahonig bei, sind aber nur in geringem Maße für die beobachtete hohe non-peroxidale antibakterielle Aktivität des Honigs verantwortlich.

Manukahonig weist zudem einen hohen Gehalt an Flavonoiden auf. Mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC-Technik) wurden die Flavonoide Pinobanksin, Pinocembrin, Galangin, Quercetin, Isorhamnetin, Chrysin, Luteolin detektiert (Weston et al. 2000, Yao et al. 2003).

Mavric et al. (2008) wiesen erstmals das hoch reaktive α -Oxoaldehyd Methylglyoxal (Nemet et al. 2006) als die dominante antibakterielle, nicht-peroxidhaltige Wirkkomponente im Manukahonig nach. Ihre Analysen zeigten, dass die antibakterielle Aktivität des Honigs unmittelbar auf den Methylglyoxal-Gehalt zurückzuführen ist. Das bestätigten auch Untersuchungen von Adams et al. (2008). Der Gehalt an Methylglyoxal liegt dabei in deutlich höherem Maße vor, als in den herkömmlichen Honigsorten. Er beträgt zwischen 38 und 761 mg/kg (Mavric et al. 2008) bzw. 38 bis 828 mg/kg (Adams et al. 2008). Andere Analysen ergaben einen Methylglyoxal-Wert von 0,4 – 5,4 mg/kg in verschiedenen kommerziellen Honigsorten mit einem Mittelwert von 2,4 mg/kg (Weigel et al. 2004).

Methylglyoxal ist ein Abbauprodukt von Glucose; unter Hitzebehandlung und langer Lagerung bleibt diese Verbindung beständig.

Auch die anderen 1,2-Dicarbonylverbindungen 3-Deoxyglucosulose und Glyoxal zeigten im geringeren Maße als Methylglyoxal eine antibakterielle Aktivität gegenüber den untersuchten Keimen *E. coli* und *S. aureus* (Mavric et al. 2008).

Nicht jede Sorte des Manukahonigs verfügt in gleichem Maße über diese Eigenschaft, sondern ist in seiner antibakteriellen Aktivität von der geographischen und floralen Herkunft abhängig (Molan & Russell 1988, Weston et al. 2000).

3. Zielstellung der Arbeit

Parodontitis ist eine chronische Entzündung des Zahnhalteapparates, die maßgeblich von der bakteriellen Besiedelung der Zahnoberfläche bestimmt wird und bei einem aggressiven Verlauf zum Verlust der Zähne führen kann. Eine effiziente Keimreduktion ist daher Ziel der Behandlung parodontaler Erkrankungen. Als besonders mit Parodontitis assoziiert gilt *P. gingivalis*. Die Persistenz dieses Keims innerhalb der parodontalen Tasche ist häufig für den Misserfolg der Therapie verantwortlich.

In zahlreichen Studien wurden bereits die antimikrobiellen Eigenschaften von Honig auf verschiedene pathogene Keime beschrieben. Für die keiminhibierende Aktivität des Honigs in der Mundhöhle sind dagegen nur wenige Studien bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Wirksamkeit von Honig und seiner Wirkkomponenten auf *P. gingivalis* untersucht werden.

In diesem Kontext stellten sich folgende Fragen:

1. Weist Honig antibakterielle Eigenschaften gegenüber *P. gingivalis* auf?
2. Unterscheiden sich die beiden Honigsorten Manuka- und Imkerhonig in ihrer antimikrobiellen Aktivität?
3. Ist eine mögliche antimikrobielle Aktivität auf die Bestandteile Wasserstoffperoxid und Methylglyoxal zurückzuführen?
4. Ist diese Aktivität der untersuchten Wirkungsstoffe konzentrationsabhängig?
5. Kann eine antibakterielle Aktivität des Honigs und seiner Wirkkomponenten in einem Biofilm nachgewiesen werden?
6. Könnte somit Honig ein wirksames adjuvantes Therapeutikum in der Behandlung der Parodontitis darstellen?

4. Material und Methoden

4.1 Verwendete Materialien

Honig

In Voruntersuchungen wurde eine Auswahl an Honigen auf ihre Sterilität untersucht. Da einige Proben Verunreinigungen enthielten, erfolgte in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena eine Bestrahlung mit Gammastrahlung von 1 kGy in 50 min zur Abtötung vorhandener Mikroorganismen.

Bei dem im Anschluss verwendeten deutschen Imkerhonig und dem neuseeländischen Manukahonig wurden in den Analysen mittels Ausstrich auf Schaedleragar und Schaedlerboullion keine verunreinigenden Keime nachgewiesen und somit auf eine Bestrahlung verzichtet.

Für die Untersuchungen zur antibakteriellen Aktivität wurden zwei verschiedene Honigsorten verwendet. Der hellgelbe einheimische Imkerhonig, der in einer privaten Imkerei in Jena erzeugt wurde, enthielt hauptsächlich Erträge aus Raps- und Obstblüten. Der braune aus Neuseeland stammende Honig Manuka Health wies den Faktor UMF 25+ active auf. Dieser "Unique Manuka Factor" (UMF®-Wert) ist ein kommerziell genutzter Parameter in einem standardisierten Labortest, der die antibakterielle Aktivität des Manukahonigs festlegt. Dabei wird der phytochemische antibakteriell wirksame Bestandteil des Honigs mit einer Konzentration Phenol verglichen, welche dieselbe antibakterielle Aktivität gegenüber *S. aureus* aufweist (Molan 2001). Ein Honig mit der UMF®-Bewertung von 25+ ist damit äquivalent zur antiseptischen Potenz einer 25%igen Phenollösung.

Die zu untersuchenden Honigsorten wurden im Dunklen bei Zimmertemperatur gelagert.

Da beide Honigsorten eine hoch visköse Konsistenz aufwiesen, mussten sie vor Versuchsbeginn in einem Wasserbad in Lösung gebracht werden. Hierbei wurde der Honig bei 40°C für 15 Minuten erwärmt. In anderen Untersuchungen wurden ab 56°C erste Wirkungsverluste dokumentiert (Dold et al. 1937). Um die Löslichkeit des

Honigs zu steigern, wurde allen Medien in den Experimenten, die Honig enthielten, Tween 20 zugeführt.

Methylglyoxal ($\text{CH}_3\text{-CO-CH=O}$ oder $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$)

Die Methylglyoxal-Lösung wurde von der Firma Sigma-Aldrich, Steinheim® gekauft.

Am Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Dresden wurden beide Honigsorten auf ihren Methylglyoxalgehalt untersucht. Die Bestimmung erfolgte mittels einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) und UV-Detektion nach Vorsäulenderivatisierung mit ortho-Phenylendiamin. Dabei wies der Imkerhonig einen Wert von 2 mg Methylglyoxal pro kg Honig und der Manukahonig Werte von 982 mg/kg auf.

Wasserstoffperoxid

Eine 3%ige Wasserstoffperoxidlösung aus der Apotheke der Schiller-Universität Jena wurde bei den Untersuchungen verwendet.

Die Bestimmung des Gehaltes an Wasserstoffperoxid in den Honigsorten erfolgte mittels einer Kaliumpermanganat-Maßlösung. Kaliumpermanganat reagiert mit Wasserstoffperoxid in schwefelsaurer Lösung zu Sauerstoff, Mangan(II)-sulfat, Kaliumsulfat und Wasser. Es wurde eine Vergleichslösung mit 20 µl 0,03%igen Wasserstoffperoxid und 80 ml entmineralisiertem Wasser vorbereitet. Parallel wurde jeweils eine Lösung mit 10 g Manuka- und Imkerhonig mit 90 ml Wasser hergestellt. Zu jeder Konzentration wurde 30 ml konzentrierte Schwefelsäure dazugegeben. Mittels Titration einer Kaliumpermanganat-Lösung wurde durch Farbumschlag der Gehalt an Wasserstoffperoxid bestimmt. Dabei entspricht 1 ml Kaliumpermanganatlösung 1,701 mg Wasserstoffperoxid.

Die ermittelten Werte ergaben für den Imkerhonig ein Gehalt von 3,74 mg/l Wasserstoffperoxid und für den Manukahonig 1,87 mg/l H_2O_2 . Diese entsprechen den Richtwerten aus der Literatur (Mavric et al. 2008). In den Analysen von Mavric et al. (2008) wies ein Großteil der zu untersuchten Honigsorten einen Wasserstoffperoxidgehalt von 1 bis 3 mg/kg auf.

Synthetischer Speichel

Zur Bildung eines künstlich erzeugten Biofilms kam synthetischer Speichel nach ISO 10993 zum Einsatz. Dabei enthielt 1 l synthetischer Speichel:

0,7 g	NaCl
0,26 g	Na ₂ HPO ₄
0,33 g	KSCN
0,2 g	KH ₂ PO ₄
1,5 g	NaHCO ₃
1,2 g	KCl00
4 g	Mucin II (Sigma)
1000 ml	destilliertes H ₂ O

Nach Filtration durch Filterpapier erfolgte ein kurzes Erhitzen im Autoklaven. Anschließend wurde 1% Albumin auf 10 ml Speichel zugesetzt.

Bakterienstämme

In Voruntersuchung wurden 20 verschiedene Stämme *P. gingivalis* getestet, die subgingivalen Plaquentnahmen chronisch erkrankter Parodontitispatienten abstammten:

<i>P. gingivalis</i> 40/2	<i>P. gingivalis</i> J 426-1
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	<i>P. gingivalis</i> J 430-1
<i>P. gingivalis</i> D 2-4-3	<i>P. gingivalis</i> J 435-1
<i>P. gingivalis</i> D 5-2-2	<i>P. gingivalis</i> 439-1s
<i>P. gingivalis</i> J 358-1	<i>P. gingivalis</i> M5-1-2
<i>P. gingivalis</i> J361-1	<i>P. gingivalis</i> Magda RI
<i>P. gingivalis</i> J 362-1	<i>P. gingivalis</i> PI 55
<i>P. gingivalis</i> J 374-1	<i>P. gingivalis</i> PI 110
<i>P. gingivalis</i> J 378-1	<i>P. gingivalis</i> PI 126
<i>P. gingivalis</i> J 424-1	<i>P. gingivalis</i> W83

In den anschließenden Versuchen wurde folgender Bakterienreferenzstamm verwendet (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland):

- *P. gingivalis* ATCC 33277

Zusätzlich wurde in den Untersuchungen mit drei klinischen Isolaten gearbeitet:

- *P. gingivalis* M5-1-2

- *P. gingivalis* MaRL

- *P. gingivalis* J361-1

Die drei klinischen Isolate wurden in subgingivalen Plaqueproben, die Patienten mit schwerer chronischer Parodontitis entnommen wurden, identifiziert. Dabei wurden zwei Papierspitzen für 20 Sekunden in die jeweilige parodontale Tasche eingeführt und anschließend mit 2 ml PBS für 30 Sekunden vermischt und bis zu 10^{-5} gelöst. 0,1 ml der Proben wurden auf Schaedler-Blutagar plattiert. Die Platten wurden anaerob bei 37°C für 7 Tage inkubiert und anschließend die Zahl der Kolonie bildenden Einheiten mittels 16S rDNA Sequenz-Analyse bestimmt. Der Anteil an der kultivierbaren Flora *P. gingivalis* betrug dabei über 10%. Diese Kulturen wurden zusammen mit dem Referenzstamm in einem Tiefkühlsystem konserviert. Für die folgenden Untersuchungen wurden den Keimen Proben entnommen und Subkulturen in anaerober Atmosphäre inkubiert.

4.2 Minimale Hemmkonzentration/MIC

4.2.1 Versuchsablauf Screening Honig

Vor Versuchsbeginn wurden die 20 verschiedenen Stämme von *P. gingivalis* (Referenzstämme und klinische Isolate) auf Schaedleragarplatten überimpft und unter anaeroben Bedingungen bei 37°C inkubiert, um deren Wachstum zu analysieren. Anschließend wurden drei klinischen Isolate für den weiteren Versuchsablauf bestimmt und ausgewählt.

Für den Agar-Dilutionstest wurde Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) in sterile Glaskolben gegeben, der Imker- und Manukahonig wurde auf 40°C erwärmt und

jeweils in definierten Mengen zugegeben (Tabelle 1). Anschließend wurde 500 ml Wilkinson-Chalgren-Agar im Wasserbad auf 56°C erhitzt, 8% Schafblut hinzugegeben und gemeinsam mit der Suspension in Petrischalen gegossen. Nach wenigen Minuten erstarrte das so vorbereitete Medium in den Schalen.

Die Bakterienkulturen wurden mittels sterilem Wattetupfer in physiologische Kochsalzlösung überführt und in Wells einer sterilen Platte mit 21 Vertiefungen pipettiert. Anschließend wurde die Suspension unter Zuhilfenahme eines Multipointinoculators auf die vorbereiteten Agarplatten transferiert und für 48 Stunden bei 37°C unter anaeroben Bedingungen inkubiert.

Danach erfolgte das Ablesen der Ergebnisse. Als minimale Hemmkonzentration wurde die niedrigste Konzentration des Honigs bestimmt, bei der kein Wachstum des Stammes auftrat.

Um statistisch relevante Werte zu erhalten, wurde die Untersuchung der minimalen Hemmkonzentration dreimal durchgeführt.

Tabelle 1:

Pipettierschema zur Herstellung der Agarplatten für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Konzentration (%)	PBS (µl)	Honig (µl)	Agar (ml)
Kontrolle	4000	0	36
0,1	3960	20	36
0,2	3920	40	36
0,5	3800	100	36
1	3600	200	36
2	3200	400	36
5	2000	1000	36
10	0	2000	36

4.2.2 Versuchsablauf für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Honig, Methylglyoxal und Wasserstoffperoxid mittels Bouillondilution

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die vier Keime *P. gingivalis* ATCC 33277, M5-1-2, MaRL und J361-1 auf Schaedleragarplatten über Nacht überimpft.

Von 30 ml Wilkinson-Chalgren-Bouillon, 2,4 ml lysiertem Schafblut und 60 μl Vitamin K wurden je 185 μl dieser Lösung zu gleichen Teilen mit 10 μl Keimsuspension auf Wells einer 96er Wellplatte verteilt (Abb. 1).

Dazu wurden Verdünnungsreihen verschiedener Konzentrationen (1% – 10% (w/v)) von beiden Honigsorten, Methylglyoxal- und Wasserstoffperoxidlösung (0,1 - 100 $\mu\text{g/ml}$) hergestellt (Tabellen 2 – 4) und je 50 μl dieser Konzentrationen zu den Wells zugegeben. Zusätzlich wurde eine vergleichende Kontrolllösung den Wells hinzugefügt. Nachdem die Suspension über Nacht inkubiert wurde, wurden 10 μl davon auf Schaedler-Agarplatten übertragen und bei 37°C anaerob bebrütet.

Das Ablesen der Platten erfolgte nach 5 bis 8 Tagen. Dabei wurde der MHK-Wert ermittelt, bei dem als letzte in der Reihe weder durch Trübung, Farbveränderung oder durch Kolonien angezeigtes bakterielles Wachstum sichtbar war.

Der Versuchsablauf wurde zur Kontrolle der Ergebnisse ein zweites Mal durchgeführt.

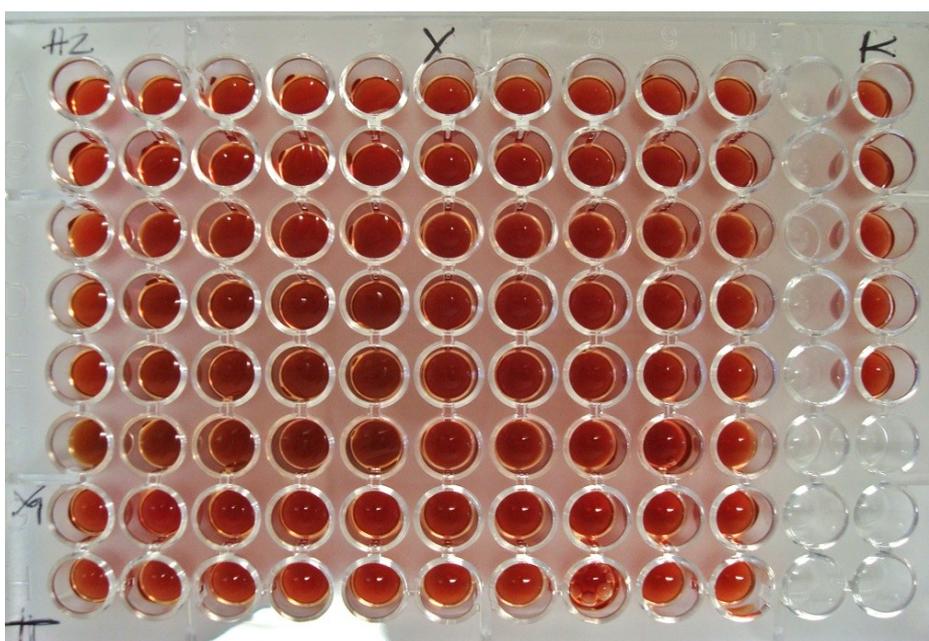


Abb. 1: Mikrotiterplatten mit Suspensionen

Tabelle 2:

Pipettierschema Manuka- und Imkerhonig

Verdünnung A: 1:10 µl mit PBS (100 + 900)

Konzentration Honig (mg/l)	Honig (µl)	PBS (µl)	Bouillon (µl)
Kontrolle	0	20	170
0,1	2 (A)	18	170
0,2	4 (A)	16	170
0,5	10 (A)	10	170
1	20 (A)	0	170
2	40 (A)	16	170
5	100 (A)	10	170
10	200 (A)	0	170

Tabelle 3:

Pipettierschema 3%ige Lösung Wasserstoffperoxid (entspricht 30 mg/l)

Verdünnung A: 1 : 10 µl mit PBS (100 + 900)

B: 1 : 100 µl mit PBS (10 + 990)

C: 1 : 1000 µl mit PBS (100 von Lösung B + 900)

Konzentration H ₂ O ₂ (mg/l bzw. kg)	H ₂ O ₂ (µl)	PBS (µl)	Bouillon (µl)
Kontrolle	0	20	170
0,1	0,7 (C)	19,3	170
0,2	1,4 (C)	18,6	170
0,5	3,5 (C)	16,5	170
1	7 (C)	13	170
2	14 (C)	6	170
5	3,5 (B)	16,5	170
10	7 (B)	13	170
20	14 (B)	6	170
50	3,5 (A)	16,5	170
100	7 (A)	13	170

Tabelle 4:

Pipettierschema 40%ige Lösung Methylgloxal (entspricht 1,17 g/ml)

Verdünnung A: 1 : 100 µl mit PBS (10 + 990)

B: 1 : 1 000 µl mit PBS (100 von Verdünnung A + 900)

C: 1 : 10 000 µl mit PBS (100 von Verdünnung B + 900)

Konzentration H₂O₂ (mg/l bzw. kg)	H₂O₂ (µl)	PBS (µl)	Bouillon (µl)
Kontrolle	0	20	170
0,1	1,2 (C)	18,8	170
0,2	2,35 (C)	17,65	170
0,5	5,9 (C)	14,1	170
1	11,8 (C)	8,2	170
2	2,35 (B)	17,65	170
5	5,9 (B)	14,1	170
10	11,8 (B)	8,2	170
20	2,35 (A)	17,65	170
50	5,9 (A)	14,1	170
100	11,8 (A)	8,2	170

4.3 Biofilm

Um die Wirksamkeit der Honigsorten und ihrer Inhaltsstoffe auf die pathogenen Keime der Mundhöhle bei Parodontitispatienten zu untersuchen, wurde ein künstlicher Biofilm, der dem oralen vergleichbar ist, erzeugt. Dazu wurde ein synthetischer Speichel hergestellt, der nach einer Stunde Inkubation bei 37°C bereits eine Pellikelschicht aufwies.

4.3.1 Biofilmbildung

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die vier *P. gingivalis*-Stämme auf Schaedleragarplatten überimpft und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Eine Vorkultur aus 800 µl lysiertem Schafblut, 1 µl Kanamycin und je 10 ml Schaedlerbouillon mit

den Kulturen wurde am nächsten Tag angefertigt und über Nacht bei 37°C anaerob bebrütet. Kanamycin ist ein Aminoglycosid-Antibiotikum und wird für Selektionsmedien eingesetzt, um bakterielles Wachstum anderer Keime zu verhindern.

Pro Well wurden 250 µl synthetischer Speichel auf zwei 24er Wellplatten mit einem Durchmesser von 11 mm/ Well pipettiert. Diese wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt. Suspensionen mit 1%igen und 10%igen Imker- und Manukahonig bzw. den jeweiligen Konzentrationen für Wasserstoffperoxid und Methylglyoxal (5 – 100 µg/ml (Tab. 5 – 7)) sowie eine Kontrolllösung (PBS) wurden vorbereitet. Davon wurde jeweils 100 µl zusammen mit je 900 µl Bakterienvorkultur auf jedes Well gegeben.

Nach Inkubation von 6 Stunden bzw. 24 Stunden unter anaeroben Bedingungen wurde der Überstand entfernt und zweimal mit PBS gewaschen, um die nicht adhärenen Bakterien zu entfernen. Nach Zugabe von 1 ml PBS und Lösen des Biofilms sowie Mischen der Suspension wurden 10 µl davon in Ependorfgefäße pipettiert und mit 990 µl PBS verdünnt. 50 µl der Lösung wurden in Rörchen einer Ultraschallbestrahlung von 160 W für eine Minute ausgesetzt, auf Schaedleragarplatten ausplattiert und 5 bis 8 Tage inkubiert. Dieser Versuch wurde zweimal durchgeführt.

Das darauffolgende Auszählen der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) erfolgte mit dem computergesteuerten aCOLyte -System.

Tabelle 5:

Pipettierschema Imker- und Manukahonig

Endkonzentration bei Zusatz von 100 µl / 1 ml	PBS	Honig
Kontrolle	1 ml	0
1 %	900 µl	100 µl
10 %	-	1 ml

Tabelle 6:

Pipettierschema des 3%igen Wasserstoffperoxids

A: Verdünnung 1:10 μl mit PBS entspricht 3000 $\mu\text{g/ml}$

B: Verdünnung 1:100 μl mit PBS entspricht 300 $\mu\text{g/ml}$

Endkonzentration bei Zusatz von 100 μl / 1 ml	PBS	H ₂ O ₂
Kontrolle	1 ml	0
5 $\mu\text{g/ml}$	983 μl	17 μl (B)
20 $\mu\text{g/ml}$	933 μl	67 μl (B)
100 $\mu\text{g/ml}$	967 μl	33 μl (A)

Tabelle 7:

Pipettierschema 40%ige Lösung Methylglyoxal

A: Verdünnung 1:100 μl mit PBS entspricht 11 700 $\mu\text{g/ml}$

B: Verdünnung 1:1000 μl mit PBS entspricht 1700 $\mu\text{g/ml}$ (1:10 aus Verdünnung A)

C: Verdünnung 1:10 000 μl mit PBS entspricht 170 $\mu\text{g/ml}$ (1:100 aus Verdünnung A)

Endkonzentration bei Zusatz von 100 μl / 1 ml	PBS	Methylglyoxal
Kontrolle	1 ml	0
5 $\mu\text{g/ml}$	971 μl	29 μl (C)
20 $\mu\text{g/ml}$	988 μl	12 μl (B)
100 $\mu\text{g/ml}$	970 μl	58 μl (B)

4.3.2 Etablierter Biofilm

Bei der Bildung eines etablierten Biofilms wurden ebenfalls die vier *P. gingivalis*-Stämme auf Schaedlerplatten überimpft und eine Vorkultur hergestellt, die anaerob bei 37°C über Nacht inkubiert wurde.

Auf 24er Well-Platten wurden jeweils 250 µl synthetischer Speichel pro Well zugegeben und für eine Stunde bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurde der Überstand entfernt und mit PBS gewaschen. 1 ml der Bakteriensuspension wurde je Well zugegeben und 42 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt, 900 µl Schaedlerbouillon mit 8% Schafblut und 100 µl Honiglösung (bzw. Methylglyoxal bzw. Wasserstoffperoxid (Tab. 5 – 7)) auf die Wells pipettiert. Eine Kontrolllösung mit 100 µl PBS wurde zusätzlich hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden bzw. 18 Stunden wurde mittels Pipette das Medium abgesaugt und zweimal mit PBS vorsichtig gewaschen. Der Biofilm wurde anschließend in 1 ml PBS gelöst und 10 µl davon mit 990 µl PBS verdünnt. Jeweils 50 µl Mediums wurden auf Schaedlerplatten ausplattiert und für 5 bis 8 Tage inkubiert. Der Versuchsablauf wurde ein drittes Mal wiederholt.

Das Ermitteln der KBE-Werte erfolgte wieder mit dem aCOLyte -System.

Die statistische Auswertung wurde mittels t-Test durchgeführt. Eine statistische Aussagekraft wurde bei $p < 0,05$ bestimmt.

5. Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) auf *Porphyromonas gingivalis*

5.1.1 Manuka- und Imkerhonig

Als Voruntersuchung wurden zwanzig verschiedene Bakterienstämme von *P. gingivalis* mittels Agar-Dilutionstest auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Manuka- und Imkerhonig getestet. Bei einer 10%igen Konzentration beider Honigsorten wurde das Wachstum aller Stämme von *P. gingivalis* signifikant gehemmt. Dabei zeigte der Imkerhonig bereits bei 0,1% bakteriostatische Aktivität, der Manukahonig erst bei 0,5%.

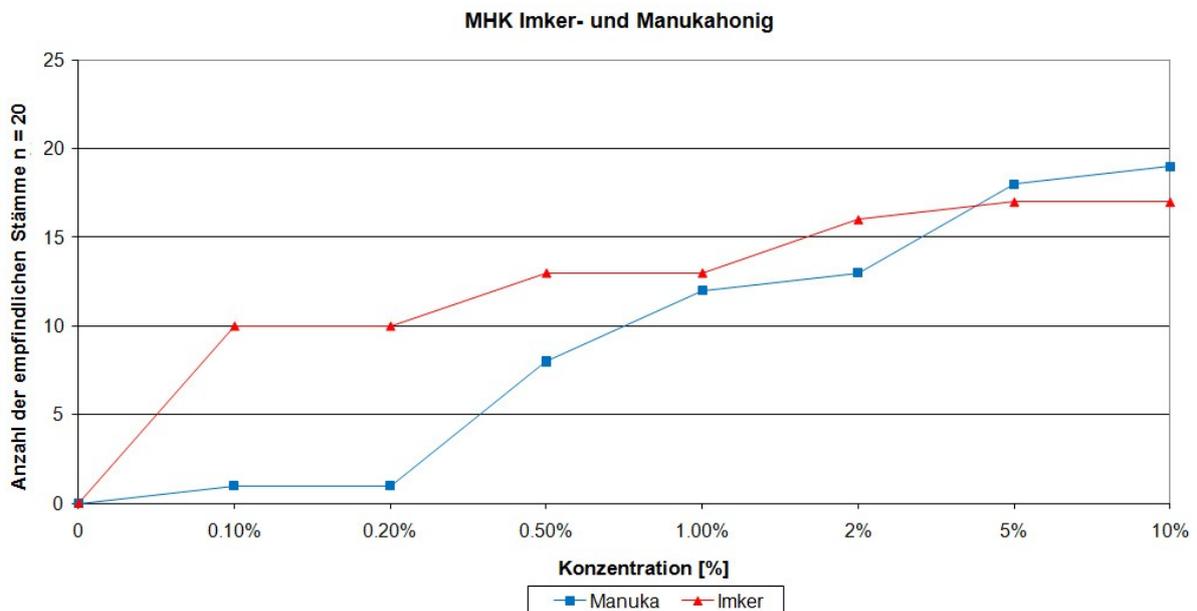


Abb.2: Minimale Hemmkonzentration von Imker- und Manukahonig auf 20 verschiedene Stämme *P. gingivalis*

5.1.2 MHK-Ergebnisse für Manuka-, Imkerhonig, Wasserstoffperoxid und Methylglyoxal

Die Untersuchung der antibakteriellen Eigenschaften des Honigs und seiner Wirkkomponenten auf den Referenzstamm *P. gingivalis* ATCC 33277 und drei Isolaten aus subgingivalen Plaqueproben, die Patienten mit schwerer chronischer Parodontitis entnommen wurden, wurde mittels Bouillondilution durchgeführt.

Die minimale Hemmkonzentration des Manukahonigs auf das bakterielle Wachstum von *P. gingivalis* betrug bei allen vier zu untersuchenden Stämmen konstant 2% (Tab. 8). Die Werte für den deutschen Imkerhonig variierten zwischen 5% und 10%.

Die MHK-Werte für den antibakteriellen Wirkstoff des Honigs Wasserstoffperoxid betrugen 10 µg/ml gegenüber den drei klinischen Isolaten und 100 µg/ml für den Referenzstamm ATCC 33277.

Der Hauptwirkstoff des Manukahonigs Methylglyoxal hemmte das bakterielle Wachstum ab einer Konzentration von 5 bis 20 µg/ml, wobei er besonders bei den klinischen Isolaten *P. gingivalis* M5-1-2 und MaRL eine hohe Aktivität zeigte.

Unter Berücksichtigung der MHK-Werte beider Honigsorten gegenüber der Stämme *P. gingivalis* entspricht bei einem 2%igen Manukahonig der Gehalt an Wasserstoffperoxid 0,038 µg/ml und für Methylglyoxal 19,6 µg/ml. Die Konzentration von Wasserstoffperoxid entspricht im 5%igen Imkerhonig 0,174 µg/ml bzw. 0,374 µg/ml im 10%igen, der Gehalt an Methylglyoxal liegt bei 0,1 µg/ml im 5%igen, 0,2 µg/ml im 10%igen Imkerhonig vor.

Tabelle 8:

MHK- Werte des Manuka- und Imkerhonigs, Methylglyoxal und Wasserstoffperoxid auf die vier zu untersuchenden Bakterienstämme von *P. gingivalis*

Bakterienstämme	Manuka (%)	Imkerhonig (%)	Methylglyoxal (µg/ml)	H2O2 (µg/ml)
ATCC 33277	2	5	10	100
M5-1-2	2	5	5	10
J361-1	2	10	20	10
MaRL	2	5	5	10

5.2 Ergebnisse der Biofilmbildung

5.2.1 Manuka- und Imkerhonig

Um die antibakterielle Wirkung von Honig auf *P. gingivalis* in der Mundhöhle zu untersuchen, wurde ein künstlicher Biofilm mit den zu inkubierenden Keimen hergestellt, dem zusätzlich Honig in verschiedenen Konzentrationen zugeführt wurde. Sowohl der Imker- als auch der Manukahonig zeigten bereits nach sechs Stunden einen reduzierenden Effekt auf das Wachstum von *P. gingivalis* (Abb.3). Bei einer 10%igen Konzentration waren beide Honigsorten nach 24 Stunden in der Lage, die Biofilmbildung von *P. gingivalis* signifikant herabzusetzen.

Bei dem Versuch zeigte sich, dass das Wachstum der Stämme *P. gingivalis* verschieden inhibiert wurde (Abb.5). Der Referenzstamm ATCC 33277 erreichte Koloniezahlen über 3000 mit nur geringfügigen Abweichungen zwischen Kontroll- und Honiglösung, wohingegen die Zahl der Patientenisolate deutlich unter diesem Wert war. Bei dem Keim J361-1 lagen die Werte der Koloniezahlen zwischen 1800 für die Kontrolllösung ohne Honigzusatz und 1000 mit Honig, bei M5-1-2 zwischen 2300 und 1500, bei MaRL waren die Keimzahlen erhöht zwischen 2700 und 2000.

Zwischen der bakteriostatischen Wirkung des neuseeländischen Manuka- und des deutschen Imkerhonigs konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

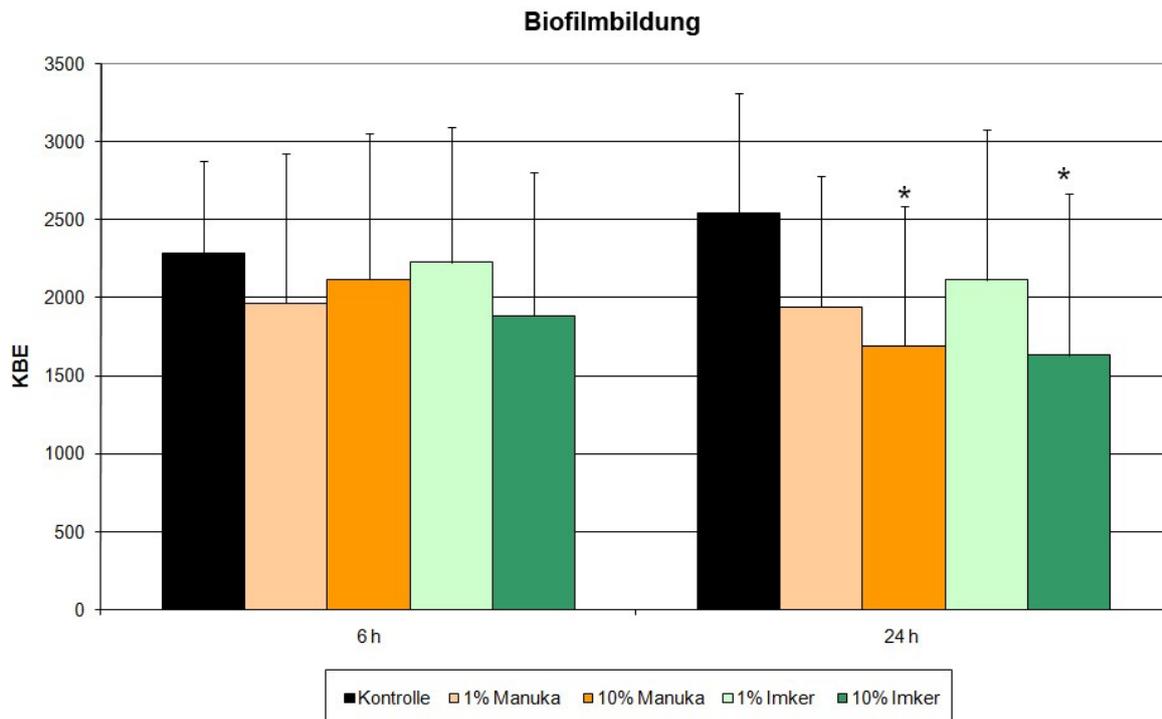


Abb.3:

Wirkung von 1%iger und 10%iger Manuka- und Imkerhoniglösung auf *P. gingivalis* im sich bildenden Biofilm nach 6 und 24 Stunden

* p < 0,05

Für die Untersuchung des Honigs auf *P. gingivalis* in einem etablierten Biofilm, der bei Parodontiden Voraussetzung für die Adhärenz pathogener Mikroorganismen ist, wurde eine synthetische Speichelsuspension hergestellt und der daraufhin entstandene Biofilm mit *P. gingivalis* für 42 Stunden inkubiert.

Die Zahl von *P. gingivalis* im etablierten, 42 Stunden alten Biofilm wurde nach Zugabe von 1% und 10% Imker- und Manukahonig signifikant reduziert (Abb.4).

Die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) sanken nach sechs Stunden von 1500 auf bis zu 800. Nach 24 Stunden wurde dagegen ein Wachstumsanstieg und erhöhte Keimzahlen von 2500 bei der Kontrolllösung verzeichnet. Auch die beiden Honigsorten wiesen erhöhte Keimzahlen auf, die jedoch deutlich unter denen der Kontrolllösung lagen. Die KBE vom Imker- und Manukahonig lagen zwischen 1700 bei der 1%igen Lösung bis zu 1000 bei der 10%igen Honiglösung. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede in der Wirksamkeit der beiden Honigsorten Manuka und deutschem Imkerhonig beobachtet werden.

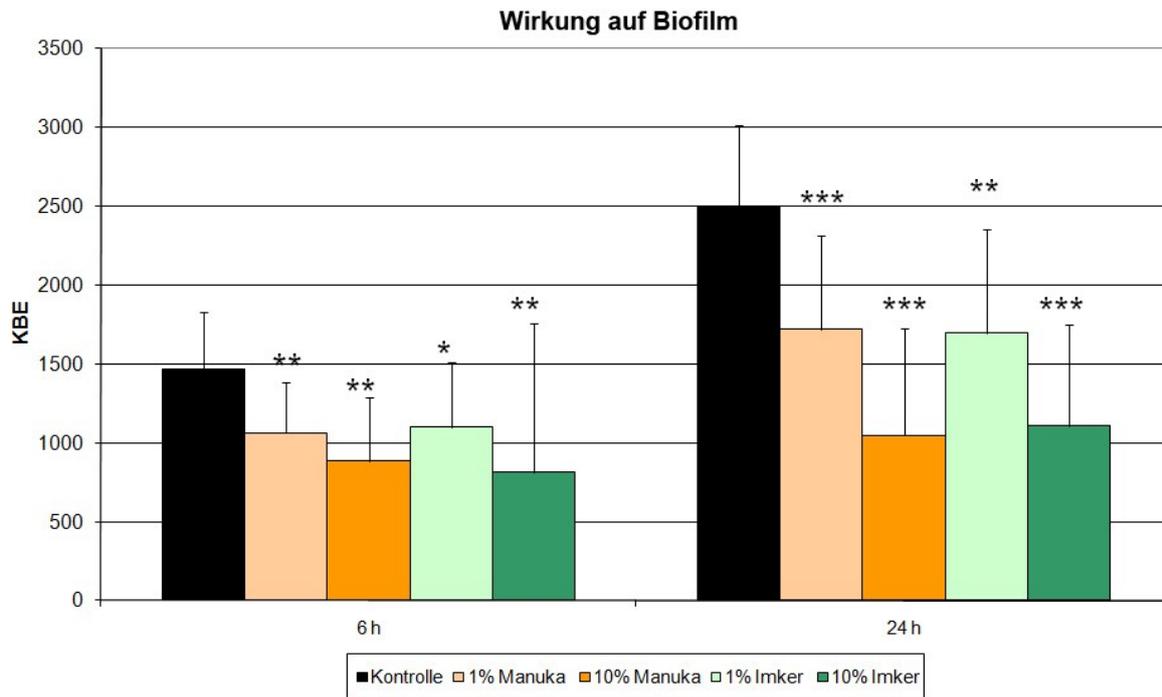


Abb.4:

Wirkung von 1%iger und 10%iger Manuka- und Imkerhoniglösung auf *P. gingivalis* im etablierten Biofilm nach 6 und 24 Stunden

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

Zwischen den einzelnen Stämmen wurden hingegen signifikante Abweichungen festgestellt (Abb.5). So zeigten sich bei dem Patientenisolat J361 Koloniezahlen von über 1500 bei der Kontrolle und eine Wachstumsinhibition bis auf 500 bei der 10%igen Manukalösung, bei MaRL reduzierten sich die KBE von 2200 auf 800, bei dem Referenzstamm ATCC 33277 sanken die Werte von 1600 auf bis zu 1000 und bei dem Stamm M5-1-2 lagen die Kolonie bildenden Einheiten bei über 2000 für die Kontrolllösung und bis zu 1000 für die Honiglösung.

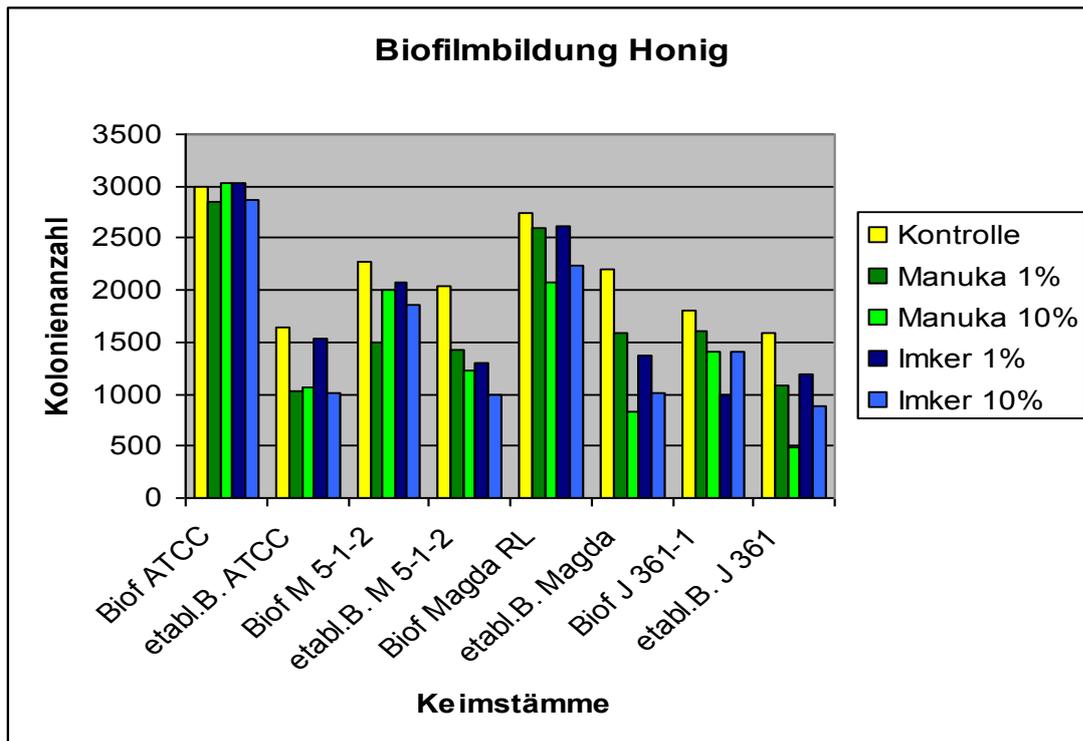


Abb.5:

Koloniezahlen der *P. gingivalis* Stämme im sich bildenden (Biof.) und vorhandenen (etabl. B.) Biofilm bei Zugabe einer 1%igen und 10%igen Lösung Manuka- und Imkerhonigs

5.2.2 Wasserstoffperoxid und Methylglyoxal im Biofilm

Bei der Ermittlung der Eigenschaften von Methylglyoxal auf einen sich bildenden Biofilm wurde diese Wirkkomponente des Honigs in den Konzentrationen von je 5, 20 und 100 µg/ml einem synthetisch erzeugten Speichel mit inkubierten *P. gingivalis* Stämmen zugegeben. Dabei wies Methylglyoxal keinen inhibierenden Einfluss auf die Keimzahl von *P. gingivalis* im Biofilm auf (Abb.6).

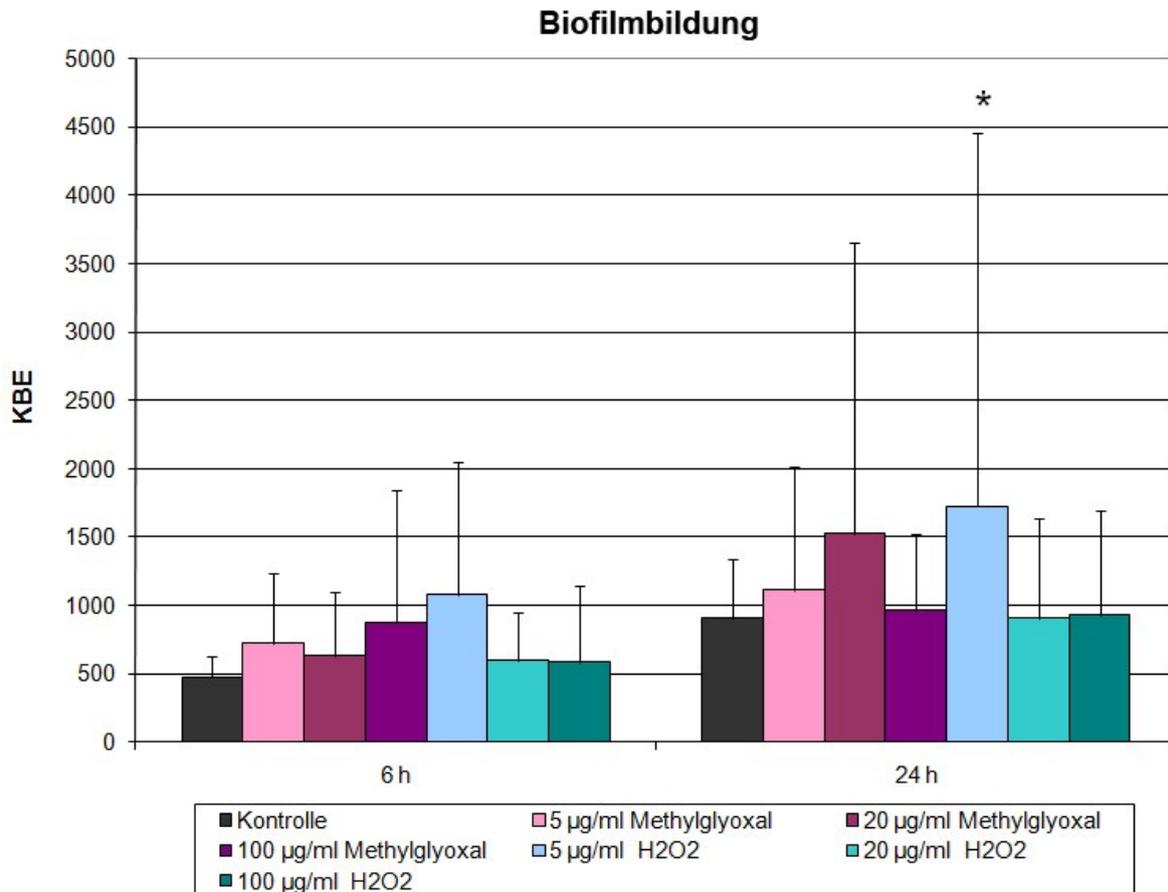


Abb.6:

Wirkung von Methylglyoxal und Wasserstoffperoxid auf sich bildenden Biofilm aller vier Stämme nach 6 Stunden und 24 Stunden

* $p < 0,05$

Zwischen den einzelnen Stämmen konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden (Abb.7). Bei dem Referenzstamm ATCC 33277 wurde eine deutliche Erhöhung der Keimzahlen beobachtet. Nach sechs Stunden zeigte sich bei 100 µg/ml und nach 24 Stunden bei 20 µg/ml ein ausgeprägter Wachstumsimpuls. Auch das klinische Patientenisolat M5-1-2 wies nach sechs und 24 Stunden erhöhte Keimzahlen auf. MaRL zeigte nach sechs Stunden keine signifikanten Unterschiede in den Kolonie bildenden Einheiten, nach 24 Stunden wurden jedoch bei den verschiedenen Konzentrationen geringe keimhemmende Effekte verzeichnet. Bei dem Isolat J361-1 zeigte Methylglyoxal nach sechs Stunden erhöhte Koloniezahlen, nach 24 Stunden hingegen wurde ein reduzierender Effekt bei 5-20 µg/ml beobachtet, bei 100 µg/ml erhöhten sich allerdings wieder die Keimzahlen auf die Ausgangswerte.

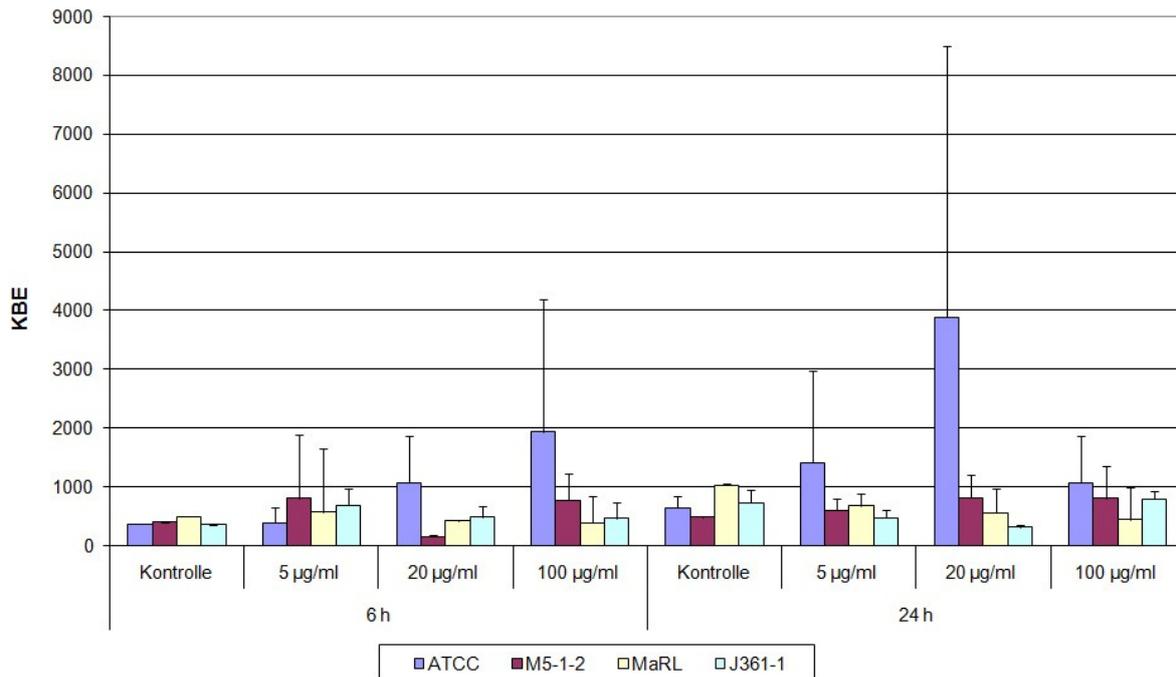


Abb.7:

Wirkung von Methylglyoxal auf sich bildenden Biofilm aller vier Stämme nach 6 Stunden und 24 Stunden

Der antimikrobiell wirksame Inhaltsstoff des Honigs Wasserstoffperoxid wurde ebenso in den Konzentrationen 5, 20 und 100 µg/ml auf einen sich bildenden Biofilm aller vier *P. gingivalis* Stämme untersucht.

Auch diese Verbindung zeigte keinen reduzierenden Effekt auf das Wachstum der vier Keime (Abb.6). Bei einer Konzentration von 5 µg/ml konnte ein deutlicher Anstieg der Keimzahlen verzeichnet werden, wohingegen Konzentrationen von 20 µg/ml und 100 µg/ml wieder auf die Ausgangszahlen der Kontrolllösung zurückfielen.

Zwischen den einzelnen Stämmen zeigten sich einzelne Abweichungen (Abb.8). Der Kontrollwert des Referenzstamms ATCC 33277 lag unter 500. Bei einer Konzentration von 5 µg/ml wies der Keim ein Maximum von über 2000 Kolonie bildenden Einheiten nach sechs Stunden auf, nach 24 Stunden lag der Wert sogar bei 5000. Die Konzentrationen von 20 µg/ml und 100 µg/ml zeigten demgegenüber keine signifikanten Abweichungen vom Kontrollwert. Bei dem Stamm M5-1-2 sanken die KBE leicht ab einer Konzentration von 20 µg/ml und 100 µg/ml nach sechs Stunden, stiegen aber nach 24 Stunden deutlich wieder an. Für MaRL wurden nach

sechs Stunden erhöhte Keimzahlen verzeichnet, die nach 24 Stunden bei allen Konzentrationen deutlich unter den Kontrollwert sanken. Auch J361-1 zeigte nach sechs Stunden einen Wachstumsanstieg, der nach 24 Stunden unter das Niveau der Kontrolllösung sank.

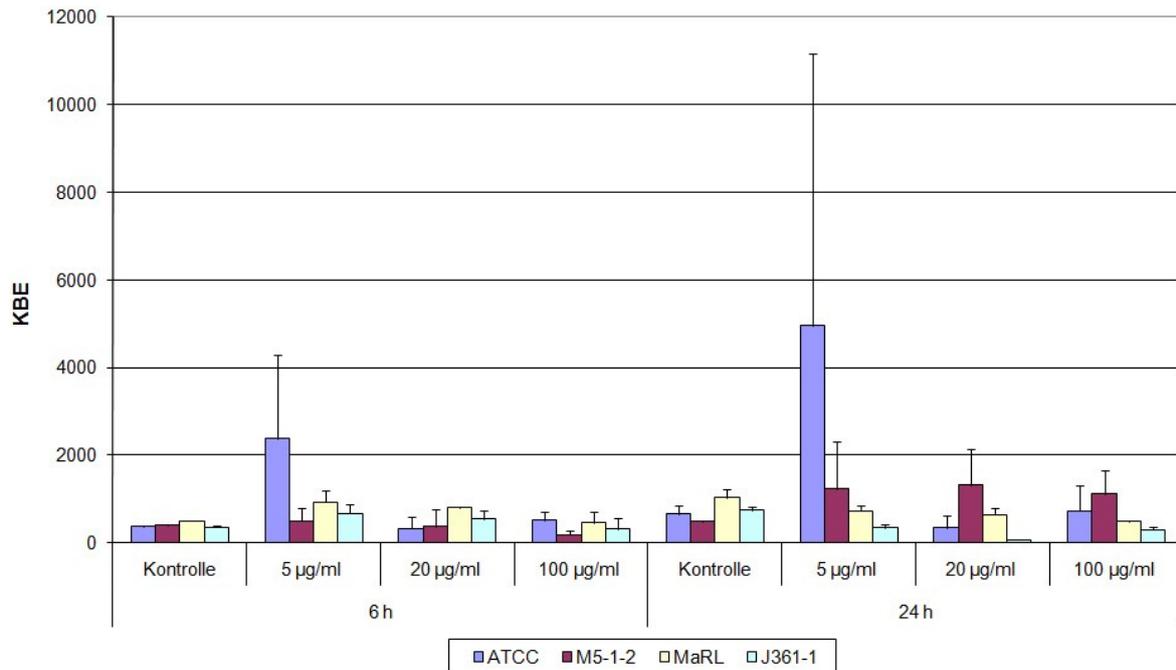


Abb.8:

Wirkung von Wasserstoffperoxid auf sich bildenden Biofilm aller vier zu untersuchenden Stämme nach 6 Stunden und 24 Stunden.

Die Wirkung der beiden antimikrobiellen Substanzen Methylglyoxal und Wasserstoffperoxid wurde zusätzlich bei einem 42 Stunden alten, bereits etablierten Biofilm untersucht.

Methylglyoxal zeigte dabei einen geringen wachstumsreduzierenden Effekt auf *P. gingivalis*, der je nach Konzentration des Wirkstoffes und abhängig von den einzelnen Stämmen erheblich schwankte (Abb.10).

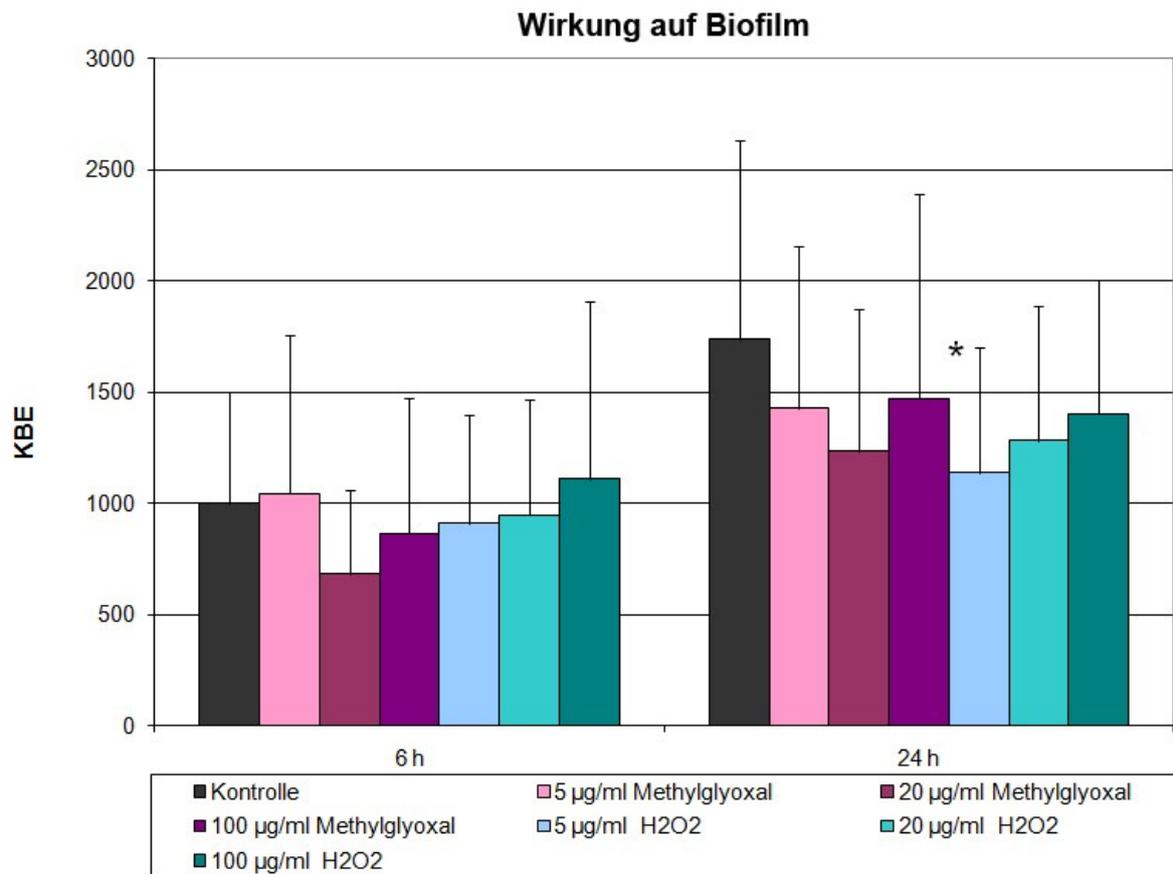


Abb.9:

Wirkung von Methylglyoxal und Wasserstoffperoxid auf vorhandenen Biofilm aller vier Stämme nach 6 Stunden und 24 Stunden

* $p < 0,05$

Mit Ausnahme von MaRL konnte bei allen Stämmen ab einer Konzentration von 100 µg/ml ein Anstieg der Kolonie bildenden Einheiten beobachtet werden (Abb. 10). 5 µg/ml Methylglyoxal erhöhten die Zahl von *P. gingivalis* nach 6 Stunden im etablierten Biofilm (Abb. 9). Ab Konzentrationen von 20 µg/ml Methylglyoxal wurde nach 6 Stunden nur bei den Stämmen MaRL und M5-1-2 ein reduzierender Effekt auf das Wachstum der Stämme festgestellt, beim letzteren stiegen die Kolonie bildenden Zahlen bei 100 µg/ml erneut an. Die anderen Stämme verzeichneten dagegen einen stärkeren Wachstumsanstieg. Eine keimreduzierende Wirkung wurde nach 24 Stunden bei Konzentrationen von 5 und 20 µg/ml bei den Stämmen MaRL und J361-1 beobachtet. Bei 100 µg/ml Methylglyoxal stiegen die Zahl von *P. gingivalis* J361-1 erneut wieder an. Der Referenzstamm ATCC zeigte bei allen Konzentrationen eine bedeutende Zunahme an Kolonie bildenden Einheiten.

Methylglyoxal besitzt somit keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum von *P. gingivalis* im vorhandenen Biofilm.

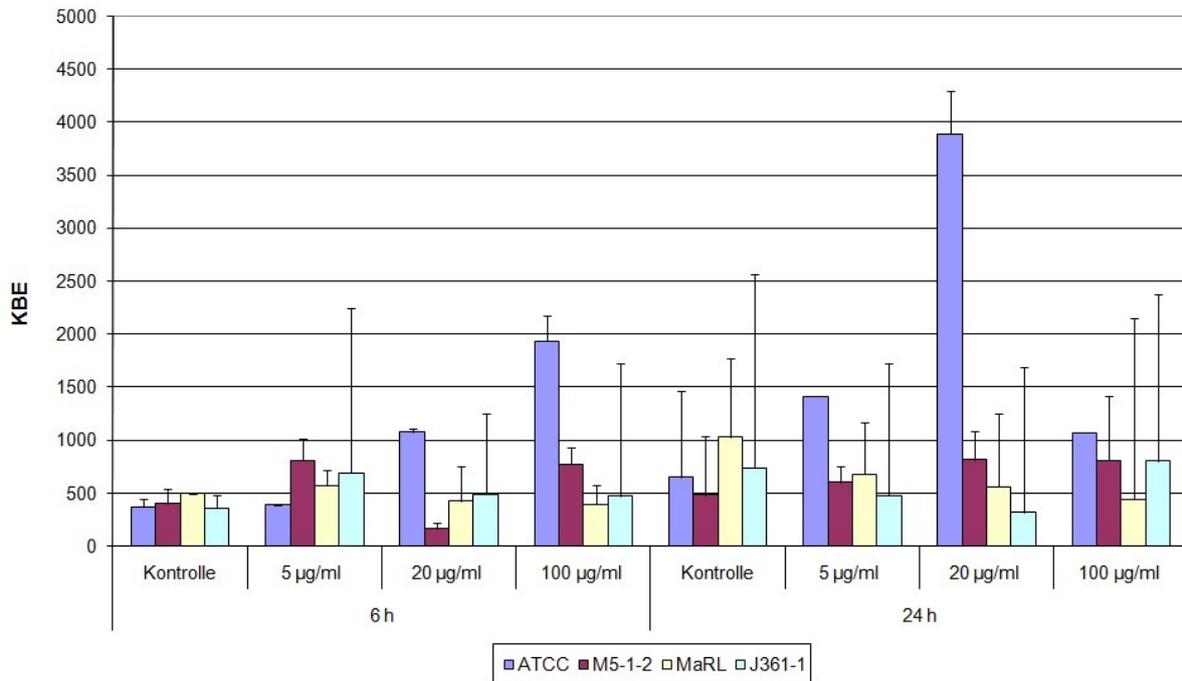


Abb.10:

Wirkung von Methylglyoxal auf vorhandenen Biofilm aller vier Stämme nach 6 Stunden und 24 Stunden

Wasserstoffperoxid zeigte nach sechs Stunden im etablierten Biofilm bei Konzentrationen ab 20 µg/ml einen reduzierenden Effekt auf das Wachstum von *P. gingivalis* und nach 24 Stunden ab 5 µg/ml eine signifikante Verminderung der KBE (Abb. 9).

Nach sechs Stunden erhöhte 5 µg/ml Wasserstoffperoxid die Zahl von *P. gingivalis* im etablierten Biofilm bei allen Patientenisolaten (Abb. 11). Bei 100 µg/ml wies der Wirkstoff hingegen einen reduzierenden Effekt auf das Wachstum der Stämme ATCC, M5-1-2 und MaRL auf, wohingegen bei J361-1 ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen war. Nach 24 Stunden zeigte sich bei der Konzentration von 5 µg/ml bei ATCC, MaRL und J361-1 eine deutliche wachstumshemmende Eigenschaft von Wasserstoffperoxid. Die Kolonie bildenden Einheiten stiegen bei erhöhter Konzentration des Wirkstoffes wieder leicht an, lagen aber noch deutlich unterhalb

des Kontrollwertes. M5-1-2 zeigte keine signifikanten Veränderungen in seinem Wachstum.

Wasserstoffperoxid wirkt somit nachweislich bakteriostatisch auf *P. gingivalis* im etablierten Biofilm.

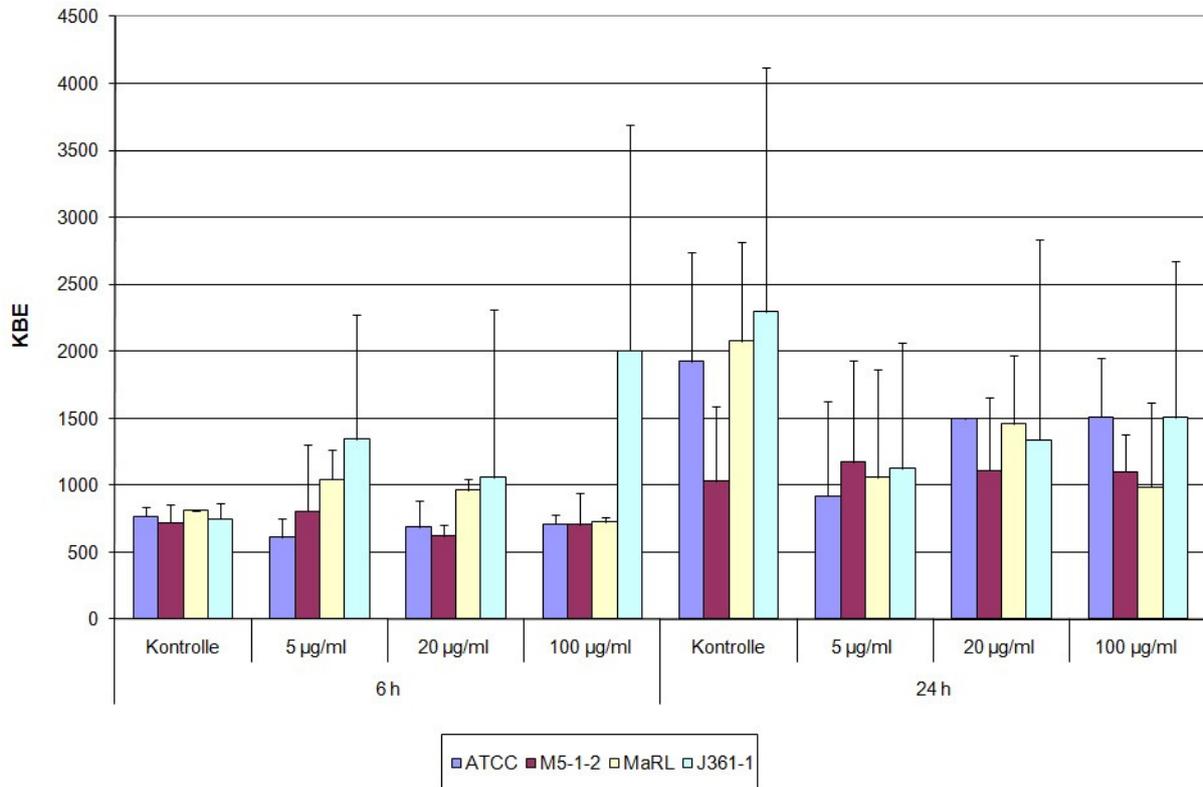


Abb.11:

Wirkung von Wasserstoffperoxid auf vorhandenen Biofilm aller vier Stämme nach 6 Stunden und 24 Stunden

6. Diskussion

Die Parodontitis ist eine entzündliche, bakteriell verursachte Erkrankung des Parodonts, die durch eine progressive Destruktion des Stützgewebes charakterisiert ist und bis zum Verlust der Zähne führen kann (Glockmann et al. 2011).

Sie gehört zu den häufigsten Volkskrankheiten, die die Mehrheit der erwachsenen Bevölkerung weltweit betrifft; so weisen 5-15% der Weltbevölkerung eine schwere Parodontitis auf (Burt et al. 2004, Petersen, WHO Global Oral Health Data Bank 2000). In Deutschland erkranken mehr als die Hälfte der 35- bis 44-Jährigen an Parodontitis, 40% der 65- bis 74-Jährigen leiden sogar an einer schweren Form dieser Erkrankung (DMS IV 2006).

Als besonders eng mit der Parodontitis assoziiert gilt *P. gingivalis*. Besonders häufig tritt der Keim bei der aggressiven und chronischen Parodontitis, sowie bei der Periimplantitis und rezidivierenden Parodontitis auf. *P. gingivalis* ist ein gram-negatives, obligat anaerob wachsendes Stäbchen der Mundhöhle aus der Familie der Bacteroidaceae (Theuretzbacher & Seewald 1999). Aufgrund seiner pathogenen Bedeutung wurde er in dieser Arbeit als Testkeim ausgewählt.

Die Behandlung der Parodontitis umfasst das regelmäßige Debridement mikrobieller Beläge, die supra- und subgingival der Zahn- und Wurzeloberfläche anhaften, sowie eine regelmäßige Instruktion und Remotivation des Patienten zu einer effektiven Mundhygiene. Bei besonderen Formen der Erkrankung ist auch die Verabreichung von Antibiotika indiziert. Dies betrifft insbesondere die aggressive Parodontitis, die schwere chronische Form, refraktäre Parodontiden nach vorangegangener Therapie oder Parodontiden mit begleitender Allgemeinsymptomatik wie Fieber oder systemischer Erkrankungen, die das Immunsystem beeinträchtigen (Wissenschaftliche Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Zahn-Mund- und Kieferheilkunde).

Das mechanische Entfernen bakterieller Beläge durch Scaling und Wurzelglättung wird über einen längeren Zeitraum durchgeführt. Dabei können die parodontopathogenen Erreger nicht immer vollständig eliminiert werden und es kommt häufig zur schnellen Rekolonisierung der Zahnoberfläche, die einen zusätzlichen therapeutischen Ansatz in der Behandlung notwendig macht

(Chaves et al. 2000). *P. gingivalis* zählt dabei zu den Keimen, die das parodontale Gewebe nach Therapie besonders schnell wieder besiedeln (Fujise et al. 2006) und mit einem fortschreitenden Knochenabbau assoziiert sind (Chaves et al. 2000). Hierbei hat sich als Ergänzung zum Debridement der Einsatz antiseptisch und antimikrobiell wirksamer Mundspüllösungen wie Chlorhexidingluconat im Praxisalltag bewährt (Filoche et al. 2005). Durch eine effektive Inhibition der proteolytischen Enzyme Gingipaine und der Spaltung der Pellikel-Matrix besitzt Chlorhexidin insbesondere bei der Behandlung von *P. gingivalis* infizierten Parodontiden ein hohes therapeutisches Potential (Cronan et al. 2006, Allaker & Douglas 2009).

Die zunehmende Resistenzentstehung vieler pathogener Keime gegenüber Antibiotika führte in den letzten Jahren zu einem steigenden Interesse an alternativen Behandlungskonzepten wie der Nutzung phytochemikalischer Substanzen (Suller & Russell 1999, Allaker & Douglas 2009). Zudem wurden bei der Behandlung von Parodontiden vereinzelt allergische Reaktionen auf Antibiotika und Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten beschrieben (Eickholz 2010). Darüber hinaus wirkt sich die systemische Gabe von Antibiotika über längerem Zeitraum gegenüber der natürlichen Darmflora nachteilig aus, da sich die Wirkung nicht spezifisch gegen die parodontopathogenen Erreger der Mundhöhle richtet, sondern auch die Standortflora des Darmtraktes schädigt (Herold & Leibold 1991).

Viele In-vitro- und In-vivo-Studien belegen einen erfolgreichen Einsatz alternativer Therapiemittel phytochemikalischer Herkunft in der Behandlung kariogener und parodontopathogener Keime. Hierbei gewinnt die Nutzung antibakteriell wirksamer Heilmittel floralen Ursprungs wie essentielle Öle, Miswak, grüne Tee-Extrakte, Ringelblume, Grapefruit, Rotwein, Zimt, Propolis und Honig zunehmend an steigendem Interesse (Filoche et al. 2005, Allaker & Douglas 2009). Zu den essentiellen Ölen, die eine signifikante antimikrobielle und anti-inflammatorische Aktivität gegenüber parodontopathogenen Keimen der Mundhöhle aufweisen, zählen Teebaumöl (*Melaleuca alternifolia*), Manuka, Pfefferminze, Eukalyptus und Salbei (Lauten et al. 2005, Allaker & Douglas 2009). In ihren Untersuchungen wiesen Cortelli et al. (2009) klinische Effekte von essentiellen Ölen in einer gesättigten Mundspüllösung nach. Durch eine signifikante Reduktion der Plaque und der gingivalen Entzündung wiesen diese Öle eine erfolgversprechende therapeutische

Nutzung als Bestandteile in Mundspüllösungen bei Gingivitiden und milden parodontalen Erkrankungen auf. Die Akkumulation von *P. gingivalis* konnte hier allerdings nicht vermindert werden. In ihren Untersuchungen wiesen demgegenüber Allaker und Douglas (2009) sowie Takarada et al. (2004) einen inhibitorischen Effekt auf die Adhäsion von *Streptococcus mutans* und *P. gingivalis* durch Teebaum- und Manukaöl nach.

Einen effektiven Nutzen in der Behandlung pathogener Erreger zeigte auch die Verwendung von Honig in zahlreichen klinischen Studien und Laboruntersuchungen. Dieser weist signifikante antimikrobielle und anti-inflammatorische Eigenschaften auf (Molan 1992, Bogdanov 1997, Cooper et al. 2002). Honig wurde unter anderem erfolgreich bei chronisch infektiösen Wunden verschiedenen Typs eingesetzt, bei denen konventionelle Antibiotika wie Ampicillin, Oxytetracycline, Gentamycin, Chloramphenicol und Cephaline versagten. Er weist zudem eine signifikant antibakterielle Wirkung gegenüber Antibiotika-resistenten Stämmen wie MRSA und VRE auf (Efem 1988, Molan 2001).

Durch die Behandlung mit Honig kommt es zu einer schnelleren Wundreinigung und -heilung, da seine osmotische Wirkung ein feuchtes Klima innerhalb des Wundgebietes ermöglicht. Somit begünstigt Honig eine rasche Granulation und Epithelisierung des Wundgewebes (Bergmann et al. 1983). Zudem wurde in zahlreichen Untersuchungen eine reduzierte Schmerzempfindung, Schwellung und geringere Narbenbildung unter Anwendung von Honig beobachtet (Efem 1988).

Das therapeutische Spektrum von Honig umfasst die Behandlung infektiöser Wunden nach Verbrennungen, Hauttransplantationen und Geschwüren; er wird aber auch in der onkologischen unterstützenden Therapie, als Mixtur bei Hauterkrankungen und entzündlichen Magen-Darmerkrankungen erfolgreich angewandt (Molan 1992, Münstedt 2005).

Dabei weist der neuseeländische Manukahonig durch seine außerordentlich hohe antibakterielle Aktivität in der Wundbehandlung besonders hohen therapeutischen Nutzen auf. Er ist als einzige Honigsorte als medizinisches Produkt erhältlich (Molan 2001).

Ein breites Spektrum mikrobieller Spezies reagiert sensitiv auf Honig oder wird durch ihn inhibiert. Dazu zählen aerobe, anaerobe gram-positive und gram-negative Bakterien sowie Pilze. Die Empfindlichkeit bakterieller Spezies gegenüber den verschiedenen Honigsorten variiert dabei stark (Molan 1992,2, Lusby et al. 2002), was sich auch in unseren Ergebnissen widerspiegelt. Die vier verschiedenen *P. gingivalis* Keime ATCC 33277, M5-1-1, J361-1 und MaRL zeigten signifikante Unterschiede in ihrer Sensitivität gegenüber Honig und seinen Wirkstoffen.

In zahlreichen In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen konnte eine bakterizide oder wachstumshemmende Aktivität des Honigs gegenüber dem Pathogen *Staphylococcus aureus* (Dold et al. 1937, White & Subers 1963, Russell et al. 1990, Molan 1992, Bogdanov 1997, Cooper et al. 1999, Nzeako & Hamdi 2000, Cooper et al. 2002, Lusby et al. 2005), *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis* und *Escherichia coli* nachgewiesen werden (Postmes et al. 1993, Cooper et al. 1999., Efem 1988, Horn & Lüllmann 1992, Nzeako & Hamdi 2000, Bogdanov & Blumer 2001, Lusby et al. 2005, Mavric et al. 2008). Auch für *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium botulinum* und *perfringens* wurde eine bakterizide Wirkung des Honigs dokumentiert. *Acinetobacter spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, und *Enterobacter cloacae* besitzen ebenfalls sensitive Eigenschaften gegenüber Honig (Postmes et al. 1993, Nzeako & Hamdi 2000). Andere Mikroorganismen, die empfindlich auf Honig reagieren, sind *Micrococcus luteus* (Bogdanov & Blumer 2001), *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Mycobacterium phlei*, *Salmonella enteritidis* und *typhimurium*, *Shigella sonnei* und *Staphylococcus epidermidis* (Lusby et al. 2005).

Eine antifungale Wirkung wurde bei verschiedenen Candida-Spezies wie *Candida albicans*, *Candida serratia* sowie Spezies des *Aspergillus* und *Penicillium* beobachtet (Horn & Lüllmann 1992, Molan 1.1992, Nzeako & Hamdi 2000).

Gegenüber dem im Honig vorkommenden antibakteriellen Wirkstoff Wasserstoffperoxid zeigen Schimmelpilze und Hefen eine geringere Empfindlichkeit als Bakterien (White et al. 1963).

Aber auch gegenüber kariogenen Keimen wie *Streptococcus oralis*, *gordonii*, *mutans*, *salivarius*, *sanguis* und *sobrinus* sowie parodontopathogenen Erregern wie *P. gingivalis* besitzt Honig eine antibakterielle Aktivität (Molan 2001,c, Filoche et al. 2005, Allaker & Douglas 2009) und ist somit als therapeutisches Mittel für die Behandlung oraler Infektionen und Erkrankungen denkbar.

In dieser Arbeit wurden zwei Honigsorten verschiedener floraler Herkunft untersucht. Der einheimische Imkerhonig aus Jena war größtenteils peroxidalen Ursprungs und wies hauptsächlich Erträge aus Raps- und Obstblüten auf. Der neuseeländische Manukahonig (*Leptospermum scoparium*) hingegen enthielt einen hohen Gehalt an dem Wirkstoff Methylglyoxal und wies nur geringe Konzentration an Wasserstoffperoxid auf. Um die antibakterielle Wirksamkeit dieser Honige zu bewerten, wurden sie in verschiedenen Konzentrationen auf Agarplatten pipettiert, die mit vier Stämmen *P. gingivalis* überimpft waren. Bei dem Manukahonig lagen die Werte der minimalen Hemmkonzentration gegenüber *P. gingivalis* bei 5%, bei dem Imkerhonig bei 10%. Somit weist Manuka einen stärkeren keiminhibierenden Effekt als der einheimische Imkerhonig auf. Dieses Ergebnis wurde auch in verschiedenen Untersuchungen beobachtet. Je nach Honigsorte und der untersuchten Bakterien variieren in der Literatur die MHK-Werte von Honig stark zwischen 25% und 0,25%, 20% bis 0,6%, in anderen Studien sogar von 50% auf 1,5% (Molan 1992b). Bei dem Manukahonig wurden MHK-Werte von 2 – 3% für *S. aureus*, 5,5 – 8,7% für *Pseudomonas* ermittelt (Cooper et al. 1999).

Die antimikrobiellen Aktivität variiert zwischen den einzelnen Honigsorten je nach floraler Herkunft, dem Grad ihrer Reifung, der Lagerung des Honigs, dem Gehalt an Wasserstoffperoxid und der damit verbundenen Glucoseoxidaseaktivität sowie der Konzentration an phytochemischer Substanzen wie Methylglyoxal. Dabei unterscheiden sich aber nicht nur die verschiedenen Honigsorten in ihrer antibakteriellen Wirkung voneinander, sondern diese Eigenschaften variieren auch bei Honigen derselben Art (Molan & Russell 1988, Molan 1992, Postmes et al. 1993, Bogdanov & Blumer 2001).

Die antibakteriellen Wirkstoffe des Honigs, Inhibine genannt, sind teilweise pflanzlichen Ursprungs, teils aber auch durch die Bienen dem Honig beigemischt. Je nach Herkunft von Nektar und Honigtau werden somit durch die Honigbiene verschiedene Mengen an Inhibinen zugefügt (Bogdanov & Blumer 2001).

Diese variierende antibakterielle Wirkungsweise unterschiedlicher Honigsorten ist eine mögliche Erklärung, weshalb in unseren weiteren Untersuchungen der Imker- und der Manukahonig nur geringfügige Unterschiede aufwiesen.

Die antimikrobielle Eigenschaft des Honigs ist auf seinen hohen Zuckergehalt und den damit verbundenen osmotischen Effekt, dem niedrigen pH-Wert, Wasserstoffperoxid und phytochemischen Verbindungen wie Methylglyoxal zurückzuführen (White et al. 1962, Molan 1992, Bogdanov 1997, Adams et al. 2008). In vielen europäischen Honigen ist diese antimikrobielle Aktivität hauptsächlich durch das Inhibin Wasserstoffperoxid beschrieben. Andere Honigsorten, die meist aus Neuseeland und Australien stammen, weisen eine starke Wirkung nicht-peroxidalen Ursprungs auf. Untersuchungen belegen, dass diese Aktivität durch die 1,2-Dicarbonylverbindung Methylglyoxal hervorgerufen wird (Mavric et al. 2008). Auch phenolische Verbindungen steuern zu dieser nicht-peroxidalen Aktivität bei, sind aber nicht ursächlich dafür verantwortlich (Weston et al. 2000).

Das Inhibin Wasserstoffperoxid gilt seit Jahrzehnten als Hauptwirkstoff antibakterieller Aktivität im gelösten Honig der meisten Honigsorten und liegt in Konzentrationen von 5 – 100 µg/g bzw. 1 mmol/l vor (Molan 2001). Durch das licht- und hitzeempfindliche Enzym Glucoseoxidase, das aus der Speicheldrüse der Honigbiene stammt, wird im unreifen Honig aus Wasser und Glucose Wasserstoffperoxid umgesetzt.

Wasserstoffperoxid besitzt signifikant bakterizide und bakterio-statische Eigenschaften (Miller 1969, Hyslop et al. 1995) und wirkt zudem anti-inflammatorisch, was seinen großen therapeutischen Nutzen kennzeichnet.

In der Medizin dient Wasserstoffperoxid als Antiseptikum und wird zur lokalen Desinfektion von Oberflächen, Haut, Schleimhaut sowie zur Spülung und Reinigung von Wunden eingesetzt (Molan 2001).

Schon wenige Konzentrationen an Wasserstoffperoxid sind toxisch für bakterielle Zellen. So wirken bereits 25 – 50 µM bakterio-statisch gegenüber *E. coli*, eine komplette Bakterio-stase wurde in Untersuchungen allerdings erst bei Konzentrationen ab 100 µM verzeichnet (Hyslop et al. 1995). Eine bakterielle Wachstumshemmung zeigten auch Konzentrationen von 0,12 – 5,9 mmol/l (Molan 1992).

Geringe Dosen endogen gebildetes oder exogen zugeführtes Wasserstoffperoxid wirken proliferativ auf humane Zellen. Dabei fungiert Wasserstoffperoxid als intra-

und interzellulärer „second messenger“ und stimuliert so die Expression von Wachstumsgenen. Bereits niedrige Konzentrationen von 10 nM bis 1 μ M regen das Wachstum von Hamster- und Rattenfibroblasten an (Burdon 1995). Durch diesen wachstumssteigernden Einfluss auf Fibroblasten besitzt Wasserstoffperoxid in der Wundheilung einen bedeutsamen therapeutischen Nutzen.

Dagegen weist es aber bei hohen Konzentrationen von 500 μ M eine zytotoxische Wirkung auf Zellen des Organismus auf (Burdon 1995, Molan 2001,b). Die Toxizität von Wasserstoffperoxid auf humane und bakterielle Zellen wirkt dabei nicht spezifisch, sondern ist von dessen Konzentration abhängig.

Bei einer bakteriell verursachten Entzündung werden, durch die Wirtsabwehr vermittelt, Phagozytenzellen stimuliert, die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Wasserstoffperoxid im Bereich der Inflammation bilden und freisetzen. Die Produktion dieser hochreaktiven Sauerstoffradikale wirkt somit der bakteriellen Invasion entgegen. Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten setzen im entzündeten Gewebe diese Sauerstoffradikale frei, die in sehr hoher Konzentration aber auch die Lyse wichtiger humaner Zellen wie Erythrozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und Lymphoidzellen verantworten. Wasserstoffperoxid wirkt bei einer Konzentration von 100 μ M nicht toxisch auf humane Fibroblasten, bei 500 μ M wurden jedoch experimentell 50% der Zellen abgetötet (Hyslop et al. 1995). Andere Untersuchungen wiesen einen zytotoxischen Effekt von Wasserstoffperoxid auf unterschiedliche Zellen schon bei über 100 μ M nach (Burdon 1995).

Bei erhöhten Konzentrationen induziert Wasserstoffperoxid in bakteriellen und humanen Zellen eine Lipidperoxidation der Zellmembran, DNA-Strangbrüche und inhibiert die DNA-Replikation (Burdon 1995, Hyslop et al. 1995). Dabei unterscheiden sich die Zellen in ihrer Empfindlichkeit gegenüber der Sauerstoffradikalen.

Das Enzym Katalase wirkt diesem Mechanismus entgegen, indem es bei einer hohen Konzentration an reaktivem Sauerstoff die Konversion von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser katalysiert und somit einen schützenden Effekt auf Fibroblasten und andere humane Zellen ausübt. Im humanen Serum liegt es dabei in so geringen Dosen vor, dass die antibakterielle Wirksamkeit von Wasserstoffperoxid nur in geringem Maße reduziert wird.

Zusätzlich wirken intrazelluläre antioxidative Enzyme wie die Glutathionperoxidase und natürliche Radikalfänger wie Vitamin E und Glutathion den Sauerstoffradikalen

und einer erhöhten Konzentration an Wasserstoffperoxid protektiv entgegen (Simon et al. 1981, Burdon 1995, Hyslop et al. 1995).

Einige Honigsorten aus Neuseeland und Australien besitzen nachweislich einen hohen Wert an antibakterieller Aktivität nicht-peroxidalen Ursprungs. Der eindeutige Nachweis dieser nicht-peroxidalen wirksamen Verbindung konnte aber bisher noch nicht eindeutig geklärt werden. Vermutlich leitet sich diese Aktivität von der 1,2-Dicarbonylverbindung Methylglyoxal (MGO) ab (Mavric et al. 2008). Durch verschiedene enzymatische und nicht-enzymatische Reaktionen findet kontinuierlich im Gewebe die Bildung und der Abbau dieses hoch reaktiven α -Oxoaldehyds statt (Nemet et al. 2006). Im neuseeländischen Manukahonig wird Methylglyoxal durch eine nicht-enzymatische Konversion von Dihydroxyaceton, einer Verbindung aus dem Nektar der Manukablüten, erzeugt. Die Konzentration von MGO in frisch von Bienen gebildeten Manukahonig ist gering, der Gehalt an Dihydroxyaceton jedoch sehr hoch. Bei der Lagerung des Manukahonigs bei 37°C führt es zu einem Abfall von Dihydroxyaceton und damit zu einem Anstieg an Methylglyoxal. Durch die variierende Konzentration an Dihydroxyaceton im Nektar haben bestimmte Manukahonige ein hohes Potential an großer nicht-peroxidaler antibakterieller Aktivität (Ferguson et al. 1998, Adams et al. 2009).

Durch die industrielle Herstellung, Erhitzung und Lagerung von Honig und anderen Nahrungsmitteln über einen längeren Zeitraum werden Kohlenhydrate dieser Lebensmittel verschiedenen Abbaureaktionen ausgesetzt. Durch Karamelisation oder Maillard-Reaktionen, in der Aminosäuren und reduzierende Zucker miteinander reagieren, kommt es zur Bildung hoch reaktiver 1,2-Dicarbonylverbindungen.

3-Deoxyglucosulose, Glyoxal und Methylglyoxal werden hierbei gebildet. Methylglyoxal ist somit ein Zwischenprodukt der Maillard-Reaktion und ein Abbauprodukt von Kohlenhydraten. Dabei ist der MGO-Wert nach Erhitzen der Nahrungsmittel besonders in Monosacchariden erhöht (Weigel et al. 2004, Nemet et al. 2006, Adams et al. 2008). Honig, der bis zu 80% aus Zucker besteht, weist einen hohen Gehalt an Monosacchariden wie Glucose und Fructose auf.

MGO kommt neben Honig auch in Wein, Bier, Röstkaffee, Brot, Sojasauce und Milchprodukten vor, wobei die höchste Konzentration in Honig vorliegt (Adams et al. 2008, Mavric et al. 2008).

Der MGO-Gehalt im Manukahonig beträgt 38 bis 761 mg/kg (Mavric et al. 2008) bzw. 38 bis 828 mg/kg (Adams et al. 2008) und ist damit 100fach stärker als in herkömmlichen Honigsorten. In verschiedenen kommerziellen europäischen Honigen wurde eine Konzentration von 0,4 – 5,4 mg/kg, mit einem Mittelwert von 2,4 mg/kg (Weigel et al. 2004) nachgewiesen. In unseren Analysen wies der aus Neuseeland stammende Manukahonig mit einem UMF-Wert von 25+ einen Methylglyoxalgehalt von 982 mg/kg auf. Demgegenüber besaß der von uns verwendete einheimische Imkerhonig einen Gehalt von 2,0 mg/kg MGO. Der "Unique Manuka Factor" (UMF®-Wert) ist ein kommerziell genutzter Parameter in einem standardisierten Labortest, der die antibakterielle Aktivität des Manukahonigs festlegt. Je höher der UMF-Faktor eines Honigs ist, desto höher ist sein antibakterielles Potential. Mavric et al. (2008) beobachteten, dass der UMF-Wert dabei in direkter Beziehung zu dem Gehalt an Methylglyoxal steht.

In unseren In-vitro-Untersuchungen der minimalen Hemmkonzentration des Honigs auf verschiedene Stämme *P. gingivalis* wurde eine antibakterielle Aktivität für Methylglyoxal nachgewiesen. Diese Eigenschaft konnte jedoch in einem künstlich erzeugten Biofilm, der dem der Mundhöhle entsprach, nicht beobachtet werden. Eine anfangs dokumentierte bakteriostatische Aktivität von Wasserstoffperoxid und MGO ließ mit erhöhter Konzentration der Wirkstoffe nach. Diese Beobachtung wurde bereits von White et al. bei der Analyse von reinem Honig beschrieben (1963). Beide Wirkstoffe zeigten in unseren Einzelanalysen eine geringere antibakterielle Aktivität, im Honig jedoch wurde eine erhöhte Wirksamkeit nachgewiesen werden. Auch Molan (1992) vermutete, dass Wasserstoffperoxid in Einzelreaktionen seine Wirkung weniger entfaltet als im Honig.

Klinische Beobachtungen zeigen, dass Methylglyoxal ein höheres antimikrobielles Potential in vivo aufweist bzw. stärker bakterizid wirkt, als In-vitro-Untersuchungen beschreiben (Efem 1988, Molan & Russell 1988, Cooper et al. 1999, 2002). Das könnte die geringe keimreduzierende Wirkung von MGO im entstehenden und im etablierten Biofilm unserer Laboranalysen erklären. Auch zeigte der Manukahonig in der Wundbehandlung klinischer Studien therapeutisch größere Erfolge als non-peroxidale Honigsorten (Molan 1992, 2001, Bogdanov & Blumer 2001). Im humanen Serum ist Katalase enthalten, die Wasserstoffperoxid umwandelt und Honig so in seiner antibakteriellen Wirksamkeit herabsetzt (Cooper et al. 1999).

MGO ist zudem ein hochreaktiver Stoff. In Anwesenheit von Proteinen liegt er etwa zu 90% in gebundener Form vor, da MGO schnell mit Seitenketten von Arginin-, Lysin- und Cysteinresten von Proteinen reagiert (Nemet et al. 2006, Adams et al. 2008). Da der künstlich erzeugte Speichel in dieser Arbeit einen hohen Gehalt an Proteinen wie Mucin und Albumin aufwies, ist vermutlich die nachgewiesene geringere antibakterielle Aktivität von MGO im Biofilm darauf zurückzuführen. Möglicherweise reagierte MGO hier schnell mit Proteinen der künstlichen Speichellösung und konnte daher durch diese Bindung nicht vollständig seine antibakterielle Wirkung entfalten.

Einige Studien belegen demgegenüber auch für Methylglyoxal wachstumsinhibierende und zytotoxische Eigenschaften bei einer erhöhten Konzentration. Die Toxizität von MGO ist gekennzeichnet durch seine Eigenschaft, mit nukleophilen Zentren von Makromolekülen wie der DNA, RNA und Proteinen zu interagieren. Durch Veränderung der Proteinsynthese und einer Unterbrechung der DNA-Replikation wird beispielsweise das Wachstum von *E. coli* durch MGO gehemmt.

Andererseits sind viele gram-negative Bakterien wie *E. coli* bei einer Nährstoffimbalance durch die Wirkung des Enzyms Methylglyoxal-Synthase in der Lage, aus Dihydroxyaceton Phosphat (DHAP) MGO zu generieren. MGO reguliert unter bestimmten Umwelteinflüssen das Wachstum und die Kolonisierung bakterieller Zellen.

Bei einem erhöhten Gehalt an intrazellulären Methylglyoxal besitzt *E. coli* durch verschiedene Mechanismen die Fähigkeit MGO zu entgiften. Der zellschädigende Effekt von Elektrophilen wie MGO auf das Bakterium wird dabei von der Glutathion-abhängigen Glyoxalase I-II, der Glutathion-unabhängigen Glyoxalase III sowie durch die Methylglyoxal Reduktase und Dehydrogenase verhindert. Dabei entsteht als Abbauprodukt D-Lactat (Ferguson et al. 1998).

Durch die hohe Konzentration an metabolisierbaren phosphorylierten Zuckern bei einer hohen Zuckeraufnahme kommt es zur Akkumulation von Dihydroxyaceton Phosphat und somit zu einer Anhäufung von MGO im Bakterium. Die Möglichkeit zur Detoxifikation in den Bakterienzellen ist dann nur gering. Diese gesteigerte Akkumulation führt zur Inhibition des bakteriellen Wachstums und zum Zelltod

(Ferguson et al. 1998). Der hohe Zuckeranteil im Honig ist somit ein entscheidender Faktor seiner antibakteriellen Aktivität.

Während der Maillard-Reaktion werden durch Modifizierung von Arginin- und Lysinresten in Proteinen unter Beteiligung von MGO Advanced Glycation Endproducts (AGEs) gebildet, die mit Diabetes und neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Diese Wirkung kann aber durch Antioxidantien, die auch im Honig enthalten sind, vermindert werden.

In Tierexperimenten wurden degenerative Veränderungen im Gewebe schon bei Aufnahme geringer Dosen von Methylglyoxal über einen längeren Zeitraum beobachtet. Somit ist MGO nicht unbedenklich in der Behandlung der Parodontiden einzustufen, da auch Diabetes ein erhöhter Risikofaktor in der Pathogenese der Parodontitis darstellt (Nemet et al. 2006, Adams et al. 2008).

Molan (1992,1) wies in seinen Untersuchungen nach, dass die Wirkstoffe des Honigs Methylglyoxal und Wasserstoffperoxid ihre Aktivität verstärkt in Wechselwirkung mit anderen Produkten entfalten. So kann die bakterizide Aktivität von Wasserstoffperoxid durch Ascorbinsäure und Metall-Ionen wie Eisen, Kupfer, Chrom, Kobalt und Magnesium potenziert werden. Ascorbinsäure stimuliert die Enzymaktivität von Glucoseoxidase im Honig und begünstigt somit die vermehrte Produktion von Wasserstoffperoxid. Zudem weist dieses Antioxidans einen zellprotektiven Effekt gegenüber der schädigenden Wirkung von *P. gingivalis* auf (Staudte et al. 2003).

Miller beschrieb bereits 1969 die antibakterielle Wirkung beider Reagenzien Wasserstoffperoxid und Ascorbinsäure auf gram-negative Bakterien. Dabei wird durch die Bildung kurzlebiger freier Radikale die Integrität der bakteriellen Zellwand zerstört und dadurch ihre selektive Permeabilität verändert. Wasserstoffperoxid penetriert somit durch die bakterielle Zellmembran ins Innere (Simon et al. 1981, Burdon 1995). Die Empfindlichkeit der Organismen auf humane bakteriolytische Lysozyme ist damit signifikant erhöht und führt zur bakteriellen Lyse. Ein optimaler bakterizider Effekt von Wasserstoffperoxid und Ascorbinsäure wird dabei bei einem pH-Wert von 5 erreicht (Miller 1969). Der pH-Wert des Honigs beträgt 3,2 – 4,5.

Honig wirkt nicht nur antibakteriell, sondern weist auch signifikante anti-inflammatorische und antioxidative Eigenschaften auf, die eine schnelle Wundheilung begünstigen. Die antioxidative Aktivität wird hauptsächlich durch phenolische Verbindungen wie Flavonoide, Coumarine und phenolische Säuren bestimmt, die protektiv der parodontalen Gewebeschädigung durch freie Sauerstoffradikale entgegenwirken (Molan 2001, Gómez et al. 2006).

Honig besitzt die Fähigkeit, die Aktivierung von Monozytenzellen zu modulieren und damit die Freisetzung von Zytokinen zu stimulieren (Tonks et al. 2001). Durch seinen hohen Zuckergehalt weist Honig eine hohe Anzahl von glycosylierten Proteinen auf, die eine Vielzahl von Zellen wie Monozyten anregen können. Zudem stellt Honig durch sein hohes Zuckerangebot Substrate für die Glycolyse bereit, die zur Energieproduktion in Makrophagen genutzt werden und für den respiratorischen Burst zur Bekämpfung der Erreger essentiell sind (Molan 2001,c).

In Untersuchungen von Tonks et al. (2001) reduzierten ein Wiesen- und ein Manukahonig signifikant die Produktion von reaktiven oxydativen Intermediaten (ROI), die bei einer Entzündung im Gewebe von aktivierten Makrophagen generiert werden. Die Herabsetzung dieser ROI begünstigt den Heilungsprozess, indem die Gewebeerstörung reduziert und der oxidative Stress im Gewebe herabgesetzt wird. Dabei wurde bei dem Wiesenhonig eine starke Reduktion der reaktiven oxydativen Intermediaten beobachtet, was auf seinen erhöhten Gehalt an Wasserstoffperoxid zurückzuführen ist. Zusätzlich wurde bei beiden Honigsorten die Freisetzung von TNF- α in MM6-Zellen erhöht.

In Zellkulturen wurde eine Stimulation von B- und T-Lymphozyten sowie die Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch Honig beobachtet. Zusätzlich wurden Monozyten zur Freisetzung von TNF- α und IL-6 angeregt (Molan 2001,b,c). Dabei spielt Wasserstoffperoxid eine maßgebliche Rolle, indem es die T-Zellfunktion unterstützt und NF-kB sowie dessen abhängige Gene IL-2 und TNF- α aktiviert (Burdon 1995). Wasserstoffperoxid regt durch die Aktivierung von Leukozyten die Wirtsantwort auf das Immunsystem an und stimuliert die Bildung neuer Kapillaren und damit die Blutzufuhr im Wundgebiet (Molan 2001).

Die antibakteriellen Eigenschaften des Honigs beruhen zum großen Teil auf seinem Zuckergehalt. Dieser bedingt zum einen den hohen osmotischen Effekt, der den parodontopathogenen Erregern das lebensnotwendige Wasser entzieht, und enthält

antibakteriell wirksame zuckerhaltige Abbauprodukte wie die 1,2-Dicarbonylverbindung Methylglyoxal.

Durch seine große Zuckerkonzentration weist Honig aber auch ein hohes kariogenes Potential auf. Der hohe Gehalt an Monosacchariden wie Glucose und Fructose begünstigt die Entstehung von Karies und ist somit Nährstoff von Keimen, die an der Zahnoberfläche adhären (Molan 2001,c). Die schwedische Vipeholmstudie aus den 40er Jahren wies in der Ätiologie der Kariesentstehung nach, dass neben der Gesamtmenge des zugeführten Zuckers und der Häufigkeit seiner Einnahme auch die Konsistenz, also die Klebrigkeit des Nahrungsmittels für die Entstehung einer Karies entscheidend ist (Gustafsson et al. 1954). Honig besitzt nachweislich eine hohe zähflüssige Konsistenz und ermöglicht damit dem Zucker eine lange Verweildauer in der Mundhöhle.

Somit ist Honig bei der Therapie von Parodontopathien kritisch zu beurteilen. Andererseits liegt Honig in der Mundhöhle durch seine hydrophilen Eigenschaften im gelösten Zustand vor und adhärert daher gering an der vom Speichel umspülten Zahnoberfläche. Einige Studien zeigen zudem, dass Honig auch gegenüber Bakterien, die Karies verursachen, antibakteriell wirkt. Die Säureproduktion und Dextranbildung der kariogenen Bakterien wird inhibiert. Somit kann sich das Kariesrisiko unter der Behandlung eines Honigs mit hohem antibakteriellen Level minimieren (Molan 2001,c).

In klinischen Untersuchungen wurden bei den Probanden mit einer topischen Behandlung durch Honig keinerlei nachteilige Effekte auf den Organismus oder Allergien beobachtet (Efem 1988, Lusby et al. 2002). Durch eine mögliche Verunreinigung des Honigs mit *Clostridium botulinum* besteht bei Kindern theoretisch die Gefahr zur Erkrankung an Botulismus. Bisher wurden aber keine Fälle dieser Art bei der Verwendung von Honig in der Wundbehandlung beschrieben (Snowdon & Cliver 1995). Eine radiographische Bestrahlung zur Sterilisierung von kommerziellem Honig schließt dieses Risiko aus und gewährleistet weiterhin die antibakterielle Aktivität (Molan 2001).

Honig besitzt ein hohes therapeutisches Potential für die Behandlung von infektiösen Wunden und parodontalen Erkrankungen bei einer Vielzahl von Keimen, bei denen

herkömmliche Therapeutika versagen. *P. gingivalis*, als einer der Haupterreger der Parodontitis, wirkt dabei nachweislich sensitiv auf Honig. Dabei sind die antibakteriellen, antioxidativen und anti-inflammatorischen Eigenschaften des Honigs sowie die Fähigkeit, das Wachstum von Granulationsgewebe und Epithelzellen und die Angiogenese zu stimulieren, entscheidend. Die antibakterielle Aktivität des Honigs ist eng mit beiden Wirkstoffen Wasserstoffperoxid und Methylglyoxal assoziiert.

Einige gram-positive und -negative Bakterien können unter bestimmten Umweltbedingungen MGO produzieren. Sie verfügen aber auch über Mechanismen, diese toxische Verbindung wieder abzubauen. Möglicherweise ist eine Störung der bakteriellen Entgiftung von Methylglyoxal durch Disregulation der MGO-Synthese innerhalb des Bakteriums in der antibakteriellen Therapie erfolgsversprechend (Ferguson et al. 1998). Weitere Untersuchungen sind dafür noch notwendig.

Somit könnte Honig wahrscheinlich als adjuvantes Therapeutikum in der Behandlung von oralen Infektionen erfolgreich eingesetzt werden. Dabei muss bei der therapeutischen Auswahl des Honigs berücksichtigt werden, dass die antibakterielle Potenz zwischen den Honigsorten erheblich schwankt und der UMF-Faktor des Manukahonigs beachtet wird. Bisher wurden jedoch nur wenige Studien über die Wirkung von Honig in der Mundhöhle veröffentlicht. Weitere klinische Untersuchungen sind daher für die Beurteilung einer effizienten Behandlung von Parodontitis durch Honig erforderlich.

7. Schlussfolgerung

In den Untersuchungen wiesen beide Honigsorten eine antibakterielle Aktivität gegenüber *P. gingivalis* auf. Der aus Neuseeland stammende Manukahonig zeigte dabei eine höhere keiminhibierende Wirkung als der einheimische Imkerhonig.

Die antimikrobielle Aktivität des Honigs wird durch seinen hohen Zuckergehalt und den damit verbundenen osmotischen Effekt, den niedrigen pH-Wert, sowie charakteristischen chemischen Verbindungen bestimmt.

Das Inhibin Wasserstoffperoxid, welches in den meisten Honigsorten enthalten ist, wirkt nachweislich antibakteriell gegenüber parodontopathogenen Erregern, die Erkrankungen wie Gingivitis und Parodontitis verursachen. Andere, meist aus Neuseeland und Australien stammende Honigsorten wie der Manukahonig, weisen eine starke antibakterielle Wirkung nicht-peroxidalen Ursprungs auf. Bislang konnte diese Verbindung noch nicht vollständig identifiziert werden. In vielen Studien wird die Wirkung jedoch durch die phytochemische Verbindung Methylglyoxal beschrieben (Molan 2001, Mavric et al. 2008). Auch unsere Untersuchungen belegen dieses Ergebnis.

Die Inhaltsstoffe des Honigs, Wasserstoffperoxid und Methylglyoxal, wirken antibakteriell auf *P. gingivalis*, besitzen aber keine oder nur geringfügige keiminhibierende Eigenschaften im Biofilm. Beide Honigsorten weisen jedoch signifikante bakteriostatische Aktivität im jungen und etablierten Biofilm auf. Die dentale Plaque ist ein komplexer organisierter Biofilm, der sich aus mehr als 700 Bakterienspezies (Rylev & Kilian 2008) zusammensetzt. Antimikrobielle Agenzien durchdringen daher geringer diesen natürlichen Biofilm *in vivo* als unsere verwendeten Nährmedien, die ausschließlich mit *P. gingivalis* überimpft wurden. Methylglyoxal wirkt jedoch *in vivo* stärker als Laboranalysen zeigen (Molan 2001). Für die klinische Anwendung Methylglyoxals ist somit eine höhere antibakterielle Aktivität zu erwarten als unsere Untersuchungen belegen.

Bei Lichtexposition, Erwärmung während des Herstellungsprozesses und langer Lagerung nimmt die Wirksamkeit des Imkerhonigs durch den reduzierten Gehalt an Wasserstoffperoxid ab. Die antibakterielle Aktivität des Manukahonigs wird demgegenüber durch seine phytochemikalische Substanzen, die hitze- und lichtstabil

sind, bestimmt. Er ist somit weniger anfällig als Imkerhonig und für den klinischen Gebrauch indiziert.

Honig weist zusätzlich signifikante anti-inflammatorische und antioxidative Eigenschaften auf, die eine schnelle Wundheilung begünstigen. Diese werden durch seine phenolischen Verbindungen und Wasserstoffperoxid bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen, dass Honig und seine Inhaltsstoffe durch ihre antimikrobiellen und anti-inflammatorischen Eigenschaften die Therapie der Parodontitis günstig beeinflussen könnten. Da für die erfolgreiche Behandlung eine deutliche Keimreduktion nötig ist, muss für den zähflüssigen Honig eine effiziente Applikationsform in die parodontale Tasche gefunden werden. Ergänzend zu dem regelmäßigen Debridement der supra- und subgingivalen Beläge der Zahnoberfläche stellt Honig somit ein mögliches adjuvantes Therapeutikum dar.

8. Literaturverzeichnis

1. **Adams CJ, Boulton CH, Deadman BJ, Farr JM, Grainger MNC, Manley-Harris M, Snow MJ.** 2008. Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. Carbohydrate Research, 343(4):651-659.
2. **Adams CJ, Manley-Harris M, Molan PC.** 2009. The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. Carbohydrate Research, 344(8):1050-1053.
3. **Allaker RP, Douglas CWI.** 2009. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. International Journal of Antimicrobial Agents, 33(1):8-13.
4. **Allenspach-Petrzilka GE, Guggenheim B.** 1983. Bacterial invasion of the periodontium; an important factor in the pathogenesis of periodontitis? Journal of Clinical Periodontology, 10(6):609-617.
5. **Al-Mamary M, Al-Meerri A, Al-Habori M.** 2002. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. Nutrition Research, 22:1041-1047.
6. **Al-Shaher A, Wallace J, Agarwal S, Bretz W, Baugh D.** 2004. Effect of Propolis on Human Fibroblasts from the Pulp and Periodontal Ligament. Journal of endodontics, 30(5):359-361.
7. **Amano A.** 2003. Molecular Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with Host Cells: Implication for the Microbial Pathogenesis of Periodontal Disease. Journal of Periodontology, 74(1):90-96.
8. **Andrian E, Grenier D, Rouabhia M.** 2004. In Vitro Models of Tissue Penetration and Destruction by *Porphyromonas gingivalis*. Infection and Immunity, 72(8):4689-4698.
9. **Antranikian G,** Hrsg. 2005. Angewandte Mikrobiologie. Berlin: Springer-Verlag.
10. **Armitage GC.** 1999. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. Annals of Periodontology, 4(1):1-6.
11. **Armitage GC.** 2004. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. Periodontology 2000, 34(1):9-21.
12. **Baelum V, Lopez R.** 2003. Defining and classifying periodontitis: need for a paradigm shift? European Journal of Oral Sciences, 111(1):2-6.
13. **Bast E.** 2001. Mikrobiologische Methoden. Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken. Zweite Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
14. **Berger F.** 1916. Von Biene, Honig und Wachs und ihrer kulturhistorischen und medizinischen Bedeutung. Zürich: Art Institut Orell Füssli.
15. **Bergman A, Yanai J, Weiss J, Bell D, David MP.** 1983. Acceleration of wound healing by topical application of honey: An animal model. The American Journal of Surgery, 145(3):374-376.
16. **Bigg J.** 1993. Honey and Heliobacter. The Lancet, 342(8875):858.
17. **Blatz R.** 1999. Medizinische Mikrobiologie und Immunologie systematisch. Bremen: UNI-MED.
18. **Blomfield R.** 1973. Honey for decubitus ulcers. Journal of the American Medical Association, 224(6):905.
19. **Bogdanov S, Rieder K, Rüegg M.** 1987. Neue Qualitätskriterien bei Honiguntersuchungen. Apidologie, 18(3):267-278.
20. **Bogdanov S.** 1997. Nature and Origin of the Antibacterial Substances in Honey. Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie, 30(7):748-753.
21. **Bogdanov S, Blumer P.** 2001. Natürliche antibiotische Eigenschaften des Honigs. Schweiz Bienen-Zeitung, 124(2):18-21.
22. **Bose B.** 1982. Honey or sugar in treatment of infected wounds? The Lancet, 319(8278):963.
23. **Burdon RH.** 1995. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. Free Radical Biology and Medicine, 18(4):775-794.

24. **Burkhardt F**, Hrsg. 1992. Mikrobiologische Diagnostik. Stuttgart, New York: Thieme-Verlag.
25. **Burt B. et al.** 2005. Epidemiology of Periodontal Diseases. *Journal of Periodontology*, 76(8):1406-1419.
26. **Chaves ES, Jeffcoat MK, Ryerson CC, Snyder B.** 2000. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. *Journal of Clinical Periodontology*, 27(12):897-903.
27. **Chu L, Bramanti TE, Ebersole JL, Holt SC.** 1991. Hemolytic activity in the periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis*: kinetics of enzyme release and localization. *Infection and Immunity*, 59(6):1932-1940.
28. **Cochran DL.** 2008. Inflammation and Bone Loss in Periodontal Disease. *Journal of Periodontology*, 79(8s):1569-1576.
29. **Cooper RA, Molan PC, Harding KG.** 1999. Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 92:283-285.
30. **Cooper RA, Molan PC, Harding KG.** 2002. The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *Journal of Applied Microbiology*, 93(5):857-863.
31. **Cowan MM.** 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4):564-582.
32. **Cortelli SC, Cortelli JR, Holzhausen M, Franco GCN, Rebelo RZ, Sonagere AS, Queiroz CS, Costa FO.** 2009. Essential oils in one-stage full-mouth disinfection: double-blind, randomized clinical trial of long-term clinical, microbial and salivary effects. *Journal of Clinical Periodontology*, 36(4):333-342.
33. **Cronan CA, Potempa J, Travis J, Mayo JA.** 2006. Inhibition of *Porphyromonas gingivalis* proteinases (gingipains) by chlorhexidine: synergistic effect of Zn(II). *Oral Microbiology and Immunology*, 21(4):212-217.
34. **Cypionka H.** 2005. Grundlagen der Mikrobiologie. Dritte Aufl. Berlin: Springer-Verlag.
35. **Dany B.** 1991. Selbstgemachtes aus Bienenprodukten: Vollwertkost, Sportnahrung, Naturkosmetik, Naturheilmittel. Dritte Aufl. München: Ehrenwirth.
36. **Dierickx K, Pauwels M, Laine ML, Van Eldere J, Cassiman J-J, van Winkelhoff AJ, van Steenberghe D, Quirynen M.** 2003. Adhesion of *Porphyromonas gingivalis* Serotypes to Pocket Epithelium. *Journal of Periodontology* June 2003, 74(6):844-848.
37. **Dold H, Du DH, Dziao ST.** 1937. Nachweis antibakterieller, hitze- und lichtempfindlicher Hemmungsstoffe (Inhibine) im Naturhonig (Blütenhonig). *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 120:155-167.
38. **Duncan MJ, Nakao S, Skobe Z, Xie H.** 1993. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. *Infection and Immunity*, 61(5):2260-2265.
39. **Dyke van TE.** 2008. Inflammation and Periodontal Diseases: A Reappraisal. *Journal of Periodontology*, 79(8):1501-1502.
40. **Efem SEE.** 1988. Clinical observations on the wound healing properties of honey. *British Journal of Surgery*, 75(7):679-681.
41. **Eick S, Reißmann A, Rödel J, Schmidt K-H, Pfister W.** 2006. *Porphyromonas gingivalis* survives within KB cells and modulates inflammatory response. *Oral Microbiology and Immunology*, 21(4):231-237.
42. **Eickholz P.** 2010. Parodontale Therapie mit lokalen Antibiotika. *Zahnärztliche Mitteilungen* 100(12a):54-61.
43. **Ende A.** 1999. Heilmittel der Natur. Manuka. München: Südwest-Verlag.
44. **Enersen M, Olsen I, Kvalheim Ø, Caugant DA.** 2008. *fimA* Genotypes and Multilocus Sequence Types of *Porphyromonas gingivalis* from Patients with Periodontitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(1):31-42.
45. **Ferguson GP, Töttemeyer S, MacLean MJ, Booth IR.** 1998. Methylglyoxal production in bacteria: suicide or survival? *Archives of Microbiology*, 170(4):209-218.

46. **Filoche SK, Soma K, Sissons CH.** 2005. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiology and Immunology*, 20(4): 221-225.
47. **Ford PJ, Gemmell E, Chan A, Carter CL, Walker PJ, Bird PS, West MJ, Cullinan MP, Seymour GJ.** 2006. Inflammation, heat shock proteins and periodontal pathogens in atherosclerosis: an immunohistologic study. *Oral Microbiology and Immunology*, 21(4):206-211.
48. **Fravalo P, Ménard C, Bonnaure-Mallet M.** 1996. Effect of *Porphyromonas gingivalis* on epithelial cell MMP-9 type IV collagenase production. *Infection and Immunity*, 64(12):4940-4945.
49. **Fuchs G,** Hrsg. 2006. Allgemeine Mikrobiologie. Achte Aufl. Stuttgart: Thiemeverlag.
50. **Fujise O, Miura M, Hamachi T, Maeda K.** 2006. Risk of *Porphyromonas gingivalis* Recolonization During the Early Period of Maintenance in Initially severe Periodontitis Sites. *Journal of Periodontology*, 77(8):1333-1339.
51. **Gallien R.** 1990. Mikrobiologische Diagnostik: Ein Leitfadens. Zweite Aufl. Stuttgart, New York: Fischer-Verlag.
52. **Gatermann S, Loos M,** Hrsg. 1996. Medizinische Mikrobiologie. Berlin, Wiesbaden: Ullstein, Mosby.
53. **Genco RJ.** 2008. Clinical Innovations in Managing Inflammation and Periodontal Diseases: The Workshop on Inflammation and Periodontal Diseases. *Journal of Periodontology*, 79(8):1609-1611.
54. **Glockmann E, Panzner KD, Huhn P, Glockmann K.** 2011. Ursachen des Zahnverlustes in Deutschland-Dokumentation einer bundesweiten Erhebung (2007). *IDZ-Information*, 2/2011.
55. **Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa ELR, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ.** 2005. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiology Immunology*, 20(4):211-215.
56. **Gómez-Caravaca AM, Gómez-Romero M, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A.** 2006. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4):1220-1234.
57. **Graves D.** 2008. Cytokines That Promote Periodontal Tissue Destruction. *Journal of Periodontology*, 79(8s):1585-1591.
58. **Groß U.** 2006. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Stuttgart, New York: Thieme-Verlag.
59. **Gülzow HJ, Strübig W.** 1987. Über den Abbau von Honig durch Mikroorganismen der menschlichen Mundhöhle. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*, 42(1):598-600.
60. **Gustafsson BE, Quensel CE, Lanke LS, Lundqvist C, Grahnen H, Bonow BE, Krasse B.** 1954. The Vipeholm dental caries study; the effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. *Acta Odontologica Scandinavica*, 11(3-4):232-64.
61. **Hahn H, Falke D, Klein P,** Hrsg. 1991. Medizinische Mikrobiologie. Berlin: Springer-Lehrbuch.
62. **Heidemann D,** Hrsg. 2005. Praxis der Zahnheilkunde. Parodontologie. Vierte Aufl. München: Urban und Fischer.
63. **Hellwig E, Klimek J, Attin Th.** 2003. Einführung in die Zahnerhaltung. Dritte Aufl. München, Jena: Urban und Fischer.
64. **Henderson B.** 2002. Oral bacterial disease and the science of cellular conversation. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 95:77-80.
65. **Herold E, Leibold G.** 1991. Heilwerte aus dem Bienenvolk: Honig, Pollen, Gelee royale, Wachs, Propolis und Bienengift, ihre Bedeutung für die Gesundheit und Behandlung von Krankheiten. Zwölfte Aufl. München: Ehrenwirth.
66. **Hof H, Dörries R,** Hrsg. 2002. Medizinische Mikrobiologie. Zweite Aufl. Stuttgart: Thieme-Verlag.

67. **Horn H, Lüllmann C.** 1992. Das große Honigbuch: Entstehung, Gewinnung, Zusammensetzung, Qualität, Gesundheit und Vermarktung. München: Ehrenwirth.
68. **Hyslop PA, Hinshaw DB, Scraufstatter IU, Cochrane CG, Kunz S, Vosbeck K.** 1995. Hydrogen peroxide as a potent bacteriostatic antibiotic: Implications for host defense. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(1):31-37.
69. **Iauk L, Lo Bue AM, Milazzo I, Rapisarda A, Blandino G.** 2003. Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria. *Phytotherapy Research*, 17(6):599-604.
70. **Ijaz T, Ranjha FA, Shahzad MK, Khan MA, Imran M, Ijaz N, Ijaz S.** 2008. Antibacterial and Antifungal Activity of Different Honeys. *International Journal of Infectious Diseases*, 12(1):e403.
71. **Inagaki S, Ishihara K, Yasaki Y, Yamada S, Okuda K.** 2003. Antibody Responses of Periodontitis Patients to Gingipains of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontology*, 74(10):1432-1439.
72. **Jacinto RC, Gomes BPPA, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ.** 2006. Incidence and antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* isolated from mixed endodontic infections. *International Endodontic Journal*, 39(1):62-70.
73. **Kamma J, Mombelli A, Tsinidou K, Vasdekis V, Giannopoulou C.** 2009. Cytokines in gingival crevicular fluid of adolescents and young adults. *Oral Microbiology Immunology*, 24(1):7-10.
74. **Kassenzahnärztliche Bundesvereinigung und Bundeszahnärztekammer** (Hrsg). 2006. Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV).
75. **Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM, Böttger EC, Haller O, Deplazes P.** 2005. Medizinische Mikrobiologie. Zwölfte Aufl. Stuttgart: Thieme-Verlag.
76. **Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G,** Hrsg. 2001. Medizinische Mikrobiologie. Achte Aufl. München, Jena: Urban und Fischer.
77. **Kornman KS.** 2008. Mapping the Pathogenesis of Periodontitis: A New Look. *Journal of Periodontology*, 79(8):1560-1568.
78. **Krämer J.** 2007. Lebensmittel-Mikrobiologie. Fünfte Aufl. Stuttgart: UTB-Verlag.
79. **Kumada H, Haishima Y, Watanabe K, Hasegawa C, Tsuchiya T, Tanamoto K, Umemoto T.** 2008. Biological properties of the native and synthetic lipid A of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(1):60-69.
80. **Lamont RJ, Chan A, Belton CM, Izutsu KT, Vasel D, Weinberg A.** 1995. *Porphyromonas gingivalis* Invasion of Gingival Epithel Cells. *Infection and Immunity*, 63(10):3878–3885.
81. **Lauten JD, Boyd L, Hanson MB, Lillie D, Gullion C, Madden TE.** 2005. A Clinical Study: Melaleuca, Manuka, Calendula and Green Tea Mouth Rinse. *Phytotherapy Research*, 19(11):951-957.
82. **Lee H, Churey JJ, Worobo RW.** 2008. Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1-2):240-244.
83. **Li L, Michel R, Cohen J, DeCarlo A, Kozarov E.** 2008. Intracellular survival and vascular cell-to-cell transmission of *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiology*, 8(26):1-11.
84. **Lin X, Wu J, Xie H.** 2006. *Porphyromonas gingivalis* Minor Fimbriae Are Required for Cell-Cell Interactions. *Infection and Immunity*, 74(10):6011–6015.
85. **Lis-Balchin M, Hart SL, Deans SG.** 2000. Pharmacological and antimicrobial studies on different tea-tree oils (*Melaleuca alternifolia*, *Leptospermum scoparium* or Manuka and *Kunzea ericoides* or Kanuka), originating in Australia and New Zealand. *Phytotherapy Research*, 14(8):623-629.
86. **Listgarten MA.** 1986. Pathogenesis of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 13(5):418-425.
87. **Lusby PE, Coombes A, Wilkinson JM.** 2002. Honey: A potent agent for wound healing? *Journal of WOCN*, 29(6):295-300.

88. **Lusby PE, Coombes A, Wilkinson JM.** 2005. Bactericidal Activity of Different Honeys against Pathogenic Bacteria. *Archives of Medical Research*, 36(5):464-467.
89. **Masuda T, Murakami Y, Noguchi T, Yoshimura F.** 2006. Effects of Various Growth Conditions in a Chemostat on Expression of Virulence Factors in *Porphyromonas gingivalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5):3458–3467.
90. **Marsh P, Martin MV.** 2003. *Orale Mikrobiologie*. Stuttgart: Thieme-Verlag.
91. **Mavric E, Wittmann S, Barth G, Henle T.** 2008. Identification and qualification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Molecular nutrition & food research*, 52(4):483-489.
92. **Miller TE.** 1969. Killing and Lysis of Gram-negative Bacteria Through the Synergistic Effect of Hydrogen Peroxide, Ascorbic Acid, and Lysozyme. *Journal of Bacteriology*, 98(3): 949–955.
93. **Molan PC, Russell KM.** 1988. Non-peroxide antibacterial activity in some New Zealand honeys. *Journal of Apicultural Research*, 27(1):62-67.
94. **Molan PC.** 1992. The antibacterial activity of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee world*, 73(1):5-28.
95. **Molan PC.** 1992. The antibacterial activity of honey. 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. *Bee world*, 73(1):59-76.
96. **Molan PC.** 2001. Honey as a topical antibacterial agent for treatment of infected wounds. *World Wide Wounds*, aufgerufen am 14.03.2010. (www.worldwidewounds.com/2001/november/Molan/honey-as-topicalagent.html/).
97. **Molan PC.** 2001. Why honey is effective as a medicine. 2. The scientific explanation of its effects. *Bee World*, 82(1):22-40.
98. **Mujtaba Quadri KH.** 1983. Manuka Honey for central Vein Catheter Exit Site Care. *Clinical and Experimental Dialysis and Apheresis*, 7:397-398.
99. **Munk K,** Hrsg. 2008. *Taschenlehrbuch Biologie: Mikrobiologie*. Erste Aufl. Stuttgart: Thieme-Verlag.
100. **Müller HP.** 2006. *Parodontologie-Checklisten der Zahnmedizin*. Zweite Aufl. Stuttgart, New York: Thieme-Verlag.
101. **Münstedt K.** 2005. Honig als Medizin. Neue wissenschaftliche Untersuchungen belegen die Heilwirkung von Honig. *Die Biene/ADIZ/Imkerfreund*, 11:20-21.
102. **Nakano K, Nemoto H, Nomura R, Inaba H, Yoshioka H, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T.** 2009. Detection of oral bacteria in cardiovascular specimens. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(1):64-68.
103. **Nemet I, Varga-Defterdarović L, Turk Z.** 2006. Methylglyoxal in food and living organisms. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(12):1105-1117.
104. **Nzeako BC, Hamdi J.** 2000. Antimicrobial potential of honey on some microbial isolates. *SQU Journal for Scientific Research - Medical Sciences*, 2(2):75-79.
105. **Page RC, Kornman KS.** 1997. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology*, 14(1):9-11.
106. **Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Visvanathan K, Hamilton JA, Reynolds EC.** 2007. Flow Cytometric Analysis of Adherence of *Porphyromonas gingivalis* to Oral Epithel Cells. *Infection and Immunity*, 75(5):2484–2492.
107. **Postmes T, Van Den Bogaard AE, Hazen M.** 1993. Honey for wounds, ulcers, and skin graft preservation. *The Lancet*, 341(8847):756-757.
108. **Pulcini P, Allegrini F, Festuccia N.** 2006. Fast SPE extraction and LC-ESI-MS-MS analysis of flavonoids and phenolic acids in honey. *Apiacta*, 41:21-27.
109. **Ranney RR.** 1993. Classification of periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 2(1):13-25.
110. **Rateitschak KH, Wolf HF,** Hrsg. 1989. *Farbatlanten der Zahnmedizin*. 1. Parodontologie. Zweite Aufl. Stuttgart, New York: Thieme-Verlag.
111. **Rosan B, Lamont RL.** 2000. Dental plaque formation. *Microbes and Infection*, 2(13):1599-1607.

112. **Russell KM, Molan PC, Wilkins AL, Holland PT.** 1990. Identification of Some Antibacterial Constituents of New Zealand Manuka Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(1):10-13.
113. **Rylev M, Kilian M.** 2008. Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(s8):346-361.
114. **Sato T, Miyata G.** 2000. The nutraceutical benefit, part III: honey. *Nutrition*, 16(6):468-469.
115. **Sato N.** 2008. *Parodontal-restaurative Langzeittherapie: Klinischer Atlas*. Berlin: Quintessenz-Verlag.
116. **Schroeder HE.** 1986. Discussion: Pathogenesis of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 13(5):426-428.
117. **Simon RH, Scoggin CH, Patterson D.** 1981. Hydrogen peroxide causes the fatal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. *Journal of Biological Chemistry*, 256(14): 7181-7186.
118. **Slaney JM, Gallagher A, Aduse-Opoku J, Pell K, Curtis MA.** 2006. Mechanisms of Resistance of *Porphyromonas gingivalis* to Killing by Serum Complement. *Infection and Immunity*, 74(9):5352–5361.
119. **Snow MJ, Manley-Harris M.** 2004. On the nature of non-peroxide antibacterial activity in New Zealand manuka honey. *Food Chemistry*, 84(1):145-147.
120. **Snowdon JA, Cliver DO.** 1996. Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*, 31(1-3):1-26.
121. **Stathopoulou PG, Benakanakere MR, Galicia JC, Kinane DF.** 2009. The host cytokine response to *Porphyromonas gingivalis* is modified by gingipains. *Oral Microbiology Immunology*, 24(1):11-17.
122. **Staudte H, Sigusch BW, Klinger G, Glockmann E.** 2003. Hemmung der zytotoxischen Wirkung von *P. gingivalis* durch Ascorbinsäure. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*, 58 (5):295-297.
123. **Stegemann CA, Davis JR.** 2007. *Zahnmedizin und Ernährung. Basiswissen - Beratung - Prävention*. München: Urban und Fischer.
124. **Sturk A, Deventer van SJH, Wouterten JC, Büller HR, Thijs LG, Levin J.** 1991. *Bacterial Endotoxins. Cytokine Mediators and New Therapies for Sepsis. Progress in Clinical and Biological Research*. New York: Wiley-Liss-Verlag.
125. **Suller MTE, Russell AD.** 1999. Antibiotic and biocide resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococcus. *Journal of Hospital Infection*, 43(4):281-291.
126. **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 and Immunology*, 19(1):61-64.
127. **Tamura M, Ochiai K.** 2009. Zinc and copper play a role in coaggregation inhibiting action of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(1):56-63.
128. **Taubman MA, Kawai T, Han X.** 2007. The new concept of periodontal disease pathogenesis requires new and novel therapeutic strategies. *Journal of Clinical Periodontology*, 34(5):367-369.
129. **Theuretzbacher U, Seewald M.** 1999. *Mikrobiologie im klinischen Alltag. Erreger, Diagnostik, Therapie*. Stuttgart: Kohlhammer-Verlag.
130. **Tonks A, Cooper RA, Price AJ, Molan PC, Jones KP.** 2001. Stimulation of TNF- α release in monocytes by honey. *Cytokine*, 14(4):240-242.
131. **Van der Velden U.** 2005. Purpose and problems of periodontal disease classification. *Periodontology 2000*, 39(1):13-21.
132. **Visavadia BG, Honeysett J, Danford MH.** 2008. Manuka honey dressing: An effective treatment for chronic wound infections. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 46(1):55-56.
133. **Weston RJ, Brocklebank LK.** 1999. The oligosaccharide composition of some New Zealand honeys. *Food Chemistry*, 64(1):33-37.
134. **Weston RJ, Mitchell KR, Allen KL.** 1999. Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. *Food Chemistry*, 64(3):295-301.

135. **Weston RJ.** 2000. The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chemistry*, 71(2):235-239.
136. **Weston RJ, Brocklebank LK, Lu Y.** 2000. Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys. *Food Chemistry*, 70(4):427-435.
137. **Weigel KU, Opitz T, Henle T.** 2004. Studies on the occurrence and formation of 1,2-dicarbonyls in honey. *European Food Research and Technology*, 218(2):147-151.
138. **Werner H, Heizmann WR, Döller PC.** 1991. *Medizinische Mikrobiologie*. Stuttgart, New York: Schattauer Verlag.
139. **Whitaker EJ, Pham K, Feik D, Rams TE, Barnett ML, Pan P.** 2000. Effect of an essential oil-containing antiseptic mouthrinse on induction of platelet aggregation by oral bacteria in vitro. *Journal of Clinical Periodontology*, 27(5):370-373.
140. **White JW Jr, Subers MH.** 1963. Studies on honey inhibine. 2. A chemical assay. *Journal of Apicultural Research*, 2(2):93-100.
141. **White JW Jr, Subers MH, Schepartz AI.** 1963. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey Glucose-oxidase system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Enzymological Subjects*, 73(1, 7):57-70.
142. **Williams DM, Hughes FJ, Odell EM.** 1997. *Pathologie der Parodontalerkrankungen*. München: Hanser Fachbuchverlag.
143. **Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS.** 2000. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 27(9):648-657.
144. **Yao L, Datta N, Tomás-Barberán FA, Ferreres F, Martos I, Singanusong R.** 2003. Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chemistry*, 81(2):159-168.
145. **Yilmaz Ö.** 2008. The chronicles of *Porphyromonas gingivalis*: the microbium, the human oral epithelium and their interplay. *Microbiology*, 154:2897-2903.
146. **Zouh J, Windsor L.** 2006. *Porphyromonas gingivalis* affects host collagen degradation by affecting expression, activation, and inhibition of matrix metalloproteinases. *Journal of Periodontal Research*, 41(1):47-54.
147. **Zumla A, Lulat A.** 1989. Honey - a remedy rediscovered. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 82: 384-385.

9. Anhang

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Schäfer, geborene Kober
Vorname: Gesine
Geburtsdatum, -ort: 05.05.1983, Jena
Familienstand: verheiratet
Nationalität: deutsch

Schulischer Werdegang:

1989 - 1993 Grundschule Johann-Gottlieb-Fichte, Jena
1994 - 2001 Staatliche Jenaplan-Schule, Jena
2001 - 2003 Christliches Gymnasium, Jena
2003 Abitur

Hochschulausbildung Zahnmedizin

10/2003 - 09/2004 Erstes vorklinisches Studienjahr an der Universität Leipzig
10/2004 - 06/2008 Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität
Jena
02/2009 Approbation als Zahnärztin

Berufliche Tätigkeit:

08/2009 – 08/2010 Angestellte Zahnärztin in der privaten Zahnarztpraxis
Sjøholt Tannklinikk in Ørskog/Norwegen
03/2010 – 08/2010 Angestellte Zahnärztin in der öffentlichen Zahnklinik
Distriktstannklinikk Sykkylven in Sykkylven/Norwegen
09/2010 – 12/2010 Angestellte Zahnärztin in der privaten Zahnarztpraxis
Sykkylven Tannklinikk in Sykkylven/ Norwegen
Seit 01/2011 Angestellte Zahnärztin in der Zahnarztpraxis *Dr. Bernhardt
und Dr. Mrowietz* in Berlin

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die die Entstehung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. habil. Sigrun Eick von der Klinik für Parodontologie der Universität Bern und Herrn Professor Dr. med. habil. Wolfgang Pfister vom Medizinischen Institut für Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena für die intensive Betreuung, stetige Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Ohne deren fachliche Anregung und persönliche Betreuung hätte diese Arbeit nicht entstehen können.

Für die Unterstützung bei der Ausführung der praktischen Versuche danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, insbesondere Claudia Ranke.

Wilfried Dölz danke ich für die großzügige Bereitstellung der Honigproben.

Herrn Professor Dr. rer. nat. Dr.-Ing. habil. Thomas Henle vom Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Dresden möchte ich für die Quantifizierung des Gehaltes an Methylglyoxal unserer Honigproben danken.

Mein Dank gilt ebenfalls dem Strahlenschutzbevollmächtigten aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena und des Universitätsklinikums Jena Dr. Marcel Scheithauer für Sterilitätsmessung des Honigs.

Vielen Dank an Herrn Professor Dr. Jürgen W. Einax aus dem Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena für seine Hilfe bei der Quantifizierung des Gehalts an Wasserstoffperoxid in den verwendeten Honigsorten.

Besonders möchte ich meinem Mann Franz-Martin, meinem Bruder Martin und meiner Mutter, die mich beim Erstellen der Arbeit unterstützt haben und mir viele Anregungen zur Verbesserung gaben, danken.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Gesine Schäfer, geborene Kober am 05. 05. 1983 in Jena,

dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

dass ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

dass mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. med. habil. W. Pfister

PD Dr. med. habil. S. Eick,

dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Berlin, den 30.07.2011

Gesine Schäfer