

Aus der Klinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie
(Direktor: Prof. Dr. C. Dörfer)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Biomedizinische Anwendung von Komplexen aus
Epigallocatechingallat-reichem Grünteeextrakt mit be-
ta-Lactoglobulin-reichem Molkenproteinisolat:
zytokompatible, antibakterielle und antioxidative
Eigenschaften**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Daniel Dawood

aus Sande

Kiel 2022

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christof Dörfer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Jörg Wiltfang,

Tag der mündlichen Prüfung: 29.07.2022

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 16.03.2022

Gez.: Prof. Dr. Christian Graetz

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

*Meinen Eltern Efstratia und Hany,
meinen Geschwistern Anna, Lena, Markos
und meiner Frau Kristin gewidmet*

Prof. Dr. Dörfer, PD Dr. Karim Fawzy El-Sayed, Mojgan Paymard-Stolz,
Timothy Douglas, Gilles Brackmann (Lancaster University), Julia Keppler (UKSH)

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung und Fragestellung	1
1.1 Hintergrund der Arbeit und bisherige Forschung	1
1.2 Was ist Epigallocatechingallat (EGCG)?	4
1.2.1 Wirkung von EGCG	5
1.3 Was ist beta-Lactoglobulin?.....	6
1.4 Ziel der Untersuchung	7
2 Material und Methoden	8
2.1 Materialien	8
2.1.1 Verbrauchsmaterial.....	8
2.1.2 Geräte.....	9
2.1.3 Chemikalien, Medien, Puffer, Reagenzien	10
2.2 Zellgewinnung der Fibroblasten	11
2.2.1 Biopsie (Probenentnahme).....	11
2.2.2 Präparation der Proben für Kultivierung der Fibroblasten	11
2.2.3 Kultivierung und Passagieren der Zellen	12
2.2.3.1 Kultivierung der Zellen	12
2.2.3.2 Passagieren der Zellen	12
2.2.4 Magnetic Activated Cell Sorting (MACS).....	13
2.2.4.1 MACS-Methode.....	13
2.2.4.2 Bestimmung der Zellzahl der Fibroblasten mit dem Hämozytometer	15
2.3 Zytokompatibilität von EGCG und b-LG	15

2.3.1 Verdünnungsprotokoll.....	15
2.3.2 Ansetzen der Wells-Probeplatten.....	16
2.3.3 MTT-Test	20
2.4 Antimikrobieller Test.....	21
2.4.1 Die verschiedenen Bakterien	21
2.4.2 Minimale Hemm-Konzentration	21
2.4.3 Bestimmung der minimalen Hemm-Konzentration.....	22
2.5 Antioxidativer Test.....	23
2.5.1 DPPH-Methode	23
2.6 Statistische Auswertung	24
3 Ergebnisse.....	25
3.1 Lichtmikroskopie der Fibroblasten.....	25
3.2 Lichtmikroskopie mit dem Phasenkontrastmikroskop.....	26
3.3 Zytokompatibilität von EGCG und b-LG	30
3.4 Antimikrobieller Test.....	37
3.5 Antioxidativer Test.....	38
4 Diskussion.....	39
5 Zusammenfassung	45
6 Abstract	47
7 Literaturverzeichnis	48
8 Anhang	53
8.1 Abbildungsverzeichnis	53
8.2 Tabellenverzeichnis	54

8.3 Abkürzungsverzeichnis	54
9. Eidesstattliche Versicherung	55
10. Danksagung	55
11. Publikationen.....	56

1. Einleitung und Fragestellung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Zytokompatibilität von Epigallocatechingallat (EGCG) und beta-Lactoglobulin (b-LG) mit gingivalen Fibroblasten. Hierzu wurden die zytokompatiblen, antibakteriellen und antioxidativen Eigenschaften von EGCG und b-LG getestet.

1.1 Hintergrund der Arbeit und bisherige Forschung

Fibroblasten spielen eine sehr wichtige Rolle bei der parodontalen Wundheilung. Zu den wichtigen Eigenschaften von Fibroblasten gehören eine schnelle Zellteilung und die Fähigkeit zur Herstellung von extrazellulärer Matrix, also Glucosaminglykane und Proteoglykane. Fibroblasten exprimieren Kollagenfasern, sind somit ein Hauptbestandteil des Bindegewebes und stabilisieren bei der Wundheilung in der ersten Phase das neu gebildete Gewebe.

Die parodontale Wundheilung ist ein komplexer Prozess, der aus drei Phasen besteht: die Exsudations-/Inflammationsphase, die Profilerations-/Granulationsphase und die Reparations-/Reifungsphase (Johnstone et al., 2005; Lloyd-Jones, 2007). In allen Phasen spielen Fibroblasten eine wichtige Rolle (Clark, 1996).

Der Name Exsudationsphase stammt von dem lateinischen Begriff *exsudat*, austretende Flüssigkeit. Durch eine Zerstörung des Gewebes bei der Wundentstehung kommt es zu einer Blutung durch die verletzten Blutgefäße, womit Fremdkörper aus der Wunde entfernt werden sollen. Nach 5 bis 10 Minuten kommt es zu einer Vasokonstriktion, also einer Verengung der Gefäße. Auf die Vasokonstriktion folgt wieder eine Ausweitung der Blutgefäße, die sogenannte Vasodilatation. Dies führt zu einer Rötung und einem Anstieg der Temperatur im Wundbereich. Die Kapillarwände werden durchlässiger, Blutzellen finden vermehrt den Weg in den Wundbereich und es kommt zu einem Austritt der Lymphe (Lippert, 2006). Durch die einströmende Flüssigkeit entsteht eine Schwellung, das Wundödem. Das Wundexsudat tritt aus und entfernt Zelltrümmer, Keime und Erreger aus der Wunde.

In der Proliferationsphase haben nun Thrombozyten an den Blutgefäßen Blutgerinnung gebildet. Diese locken weitere Blutplättchen in den Wundbereich ein. Es bildet sich ein Netz aus Fibrinfasern. Dieses initiierte Fibrinnetz ermöglicht ein Verkleben

der Wundränder. Die Zytokinese im Wundbereich nimmt zu. Makrophagen reifen aus Monozyten heran und beseitigen Zelltrümmer und nekrotisches Gewebe.

In diesem Zusammenhang spielen nun die Fibroblasten eine Rolle: Aus den randständigen Bindegewebszellen der Wunde entwickeln sich Fibroblasten, die sich durch Zellteilung vermehren und mit der Aufbauarbeit beginnen. Induziert durch Fibronektin am Wundrand kommt es zu einer Fibroblastenvermehrung (Bauknecht & Boese-Landgraf, 1988). Diese Fibroblasten exprimieren Kollagenfasern und extrazelluläre Matrix, bilden somit ein Granulationsgewebe, wodurch sich die Wunde langsam verschließen kann. Mit dem Aufbau des Granulationsgewebes (lat. *granulum* = Körnchen) geht der Abbau des Fibrinnetzes einher, die sogenannte Fibrinolyse. Haargefäße sprossen in das Gewebe ein. Die Fibroblasten produzieren die genannte extrazelluläre Matrix aus Polysacchariden und schließlich kollagene Bindegewebsfasern. Die Granulationsphase setzt mit dem zweiten bis vierten Tag ein und kann bis zu zwei Wochen dauern. Alle Phasen der Wundheilung laufen teils nebeneinander ab und lassen sich nicht immer vollständig auseinanderhalten (Vasel-Biergans & Probst, 2011). Die Ausreifung der kollagenen Fasern beginnt zwischen dem sechsten und zehnten Tag.

In der Reparations- beziehungsweise Reifungsphase kommt es zu einem Verschluss der Wundoberfläche durch eine Epithelisation. Die Fibroblasten bilden weitere Kollagenfasern und durch das entstandene Granulationsgewebe kommt es zu einer Wiederherstellung aller Hautschichten. Das Ergebnis dieser Epithelisation ist eine neue Hautschicht. Diese Hautschicht wird als Narbe bezeichnet. Diese überragt zunächst die normale Hautschicht, sinkt aber mit der Straffung des Bindegewebes wieder ein. Sie enthält keine Haar- oder Schweißdrüsen oder Melanozyten.

Das ursprünglich gefäßreiche Narbengewebe (rote Narbe) verfügt als kapillar- und zellarmes Bindegewebe (weiße Narbe) über wenig bis keine Elastizität, da keine elastischen Fasern gebildet werden (Vasel-Biergans & Probst, 2011).

Der Besitz von antibakteriellen, zytokompatiblen und antioxidativen Eigenschaften ist ein sehr wünschenswerter Effekt für Biomaterialien, die für eine Knochenregeneration verwendet werden sollen, speziell auf dem Gebiet der Mund- und Kieferchirurgie, insbesondere aufgrund der hohen mikrobiellen Belastung der Mundhöhle (Chen et al., 2010, George et al., 1994, Gosau et al., 2016). Dies ist besonders wichtig im Hinblick auf das zunehmende Auftreten von antibiotikaresistenten Bakterien, etwa Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Klein et al., 2016). Daher

besteht ein dringender Bedarf, alternative antibakterielle Materialien zu finden, die widerstandsfähig gegen Bakterien sind, als Antioxidantien wirken können und im besten Fall zudem kostengünstig sind.

Grüner Tee-Extrakt (GTE) ist dafür bekannt, dass er viele Polyphenole beinhaltet, die wiederum eine antibakterielle Aktivität besitzen (Gharib et al., 2013, Zhao et al., 2001, Steinmann et al., 2013). Ein wichtiges Polyphenol von GTE ist das Epigallocatechingallat (EGCG). EGCG zeigt eine antibakterielle Wirkung gegen MRSA (Gharib et al., 2013) und stimuliert das Wachstum und die osteogene Differenzierung von knochenbildenden Zellen (Vali et al., 2007, Jin et al., 2014). Darüber hinaus wurde herausgefunden, dass EGCG das Wachstum bestimmter Krebszellen hemmen kann (Kuhn et al., 2005, Johnson et al., 2010).

Allerdings oxidiert EGCG bei einem neutralen pH-Wert ziemlich schnell. Kombiniert man es jedoch mit einem Milchprotein, bleibt das Protein länger stabilisiert (Shpigelmann et al. 2011; 2012). Um diese Stabilität von EGCG zu fördern, wird es üblicherweise mit Trägerproteinen wie zum Beispiel dem globulären Protein beta-Lactoglobulin (b-LG) kombiniert (Keppler et al., 2015). Dieses besteht aus 162 Aminosäureresten, hat ein Molekulargewicht von ca. 18,4 kDa und ist bekanntermaßen in der Lage, hydrophobe Moleküle zu binden (Kontopidis et al., 2004). Neben der Anwendung als Trägerprotein wurde berichtet, dass b-LG die Proliferation verschiedener Säugetierzellen verbessert (Gillespie et al., 2015, Mahmud et al., 2004, Moullati et al., 1991). Daher kann man spekulieren, dass b-LG auch das Wachstum von Osteoblasten bzw. Fibroblasten positiv beeinflussen könnte. Dies wäre für Knochenregenerationsanwendungen wünschenswert.

B-LG ist auch der Hauptbestandteil von Molkenproteinisolat (MPI). MPI wird aus Milch gewonnen und in großen Mengen produziert, da es als Nahrungsergänzungsmittel, insbesondere im Bodybuilding-Bereich, verwendet wird (Marshall, 2004). Die zunehmende Aufmerksamkeit konzentriert sich jedoch auf Milch als Quelle biologisch aktiver Verbindungen.

Des Weiteren spielt oxidativer Stress eine sehr wichtige Rolle bei der Immunantwort des Menschen. Oxidativer Stress wurde in fast allen Organen als pathologischer Induktor identifiziert (Wauquier et al., 2009). Trotz seiner Rolle bei der Signalvermittlung in Zellen, besonders im Knochen, kann ein erhöhter Grad an oxidativem Stress einen Knochenverlust verursachen, der wiederum zur Knochenpathogenese führt, z.B. Osteoporose, Knochentumorentwicklung oder misslungenes Einwachsen von

Knochenimplantaten die sogenannte Periimplantitis. Die erhöhten Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) stimulieren Osteoklasten, die für die Knochenresorption verantwortlichen Zellen, um den Knochen abzubauen (Garrett et al., 1990, Bai et al., 2005). Somit könnten Substanzen mit antioxidativer Aktivität, die als Knochen-substitution verwendet werden, die Stabilität eines Implantats verbessern. EGCG und b-LG weisen beide eine antioxidative Aktivität auf, die sie als Kandidaten im Bereich der Trägermittel bei der Knochengewebsregeneration geeignet erscheinen lassen könnten (Tobi et al., 2002, Mann et al., 2015, Tong et al., 2000).

1.2 Was ist Epigallocatechingallat?

Epigallocatechingallat (EGCG) gehört zu den Phenolen und kommt in relativ großen Mengen in koffeinhaltigen Teesorten, besonders dem grünen Tee, vor. Der IUPAC-Name (International Union of Pure and Applied Chemistry) von EGCG lautet (2R,3R)-2-(3,4,5-Trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1(2H)-benzopyran-3,5,7-triol-3-(3,4,5-trihydroxybenzoat) und es kann als Ester aus Epigallocatechin und der Gallussäure hergestellt werden. EGCG weist zwei Phenyl-Strukturen und einen Benzopyr-anring auf, die durch weitere chemische Gruppen modifiziert sind.

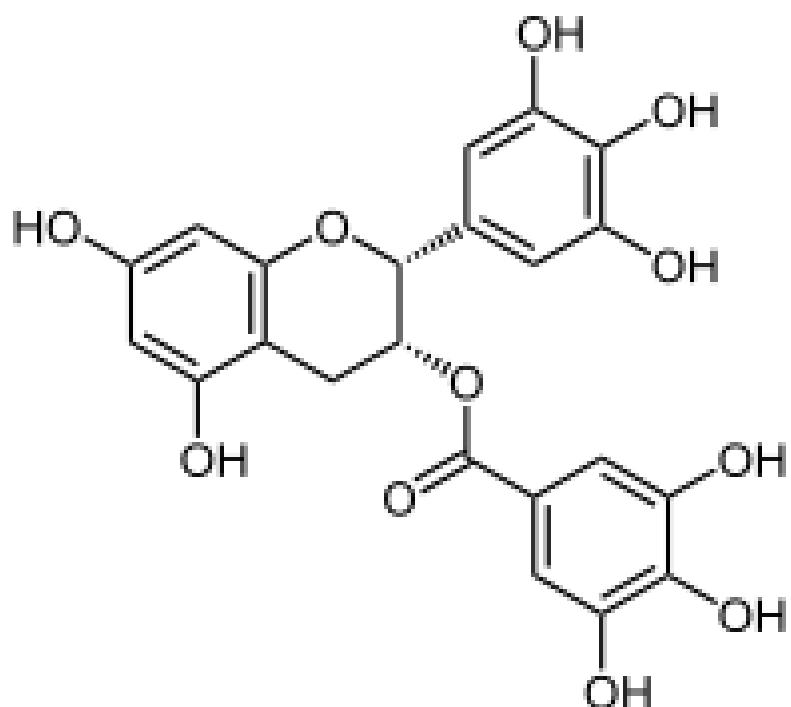


Abbildung 1: Strukturformel EGCG

Quelle:

https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/e4143?lang=de®ion=DE&cm_sp=Insite_-_-caSrpResults_srpRecs_srpModel_989-51-5_-srpRecs3-1

Im folgenden Versuch wurde EGCG von der Firma Oskar Tropitz e.K., Marktredwitz, Deutschland verwendet, welches folgende Zusammensetzung hatte:

- Trockenextrakt aus Grüntee > 95 %
- Phenole > 95 %
- Catechine > 75 %
- EGCG > 65 %.

1.2.1 Wirkung von EGCG

EGCG wird, wie bereits erwähnt, eine antioxidative Wirkung zugeschrieben. Diese wurde unter anderem schon in einen Zusammenhang mit der Prävention von Krebs gebracht (Kanwar, Taskeen et al., 2007). Weitere medizinische Effekte, die EGCG wissenschaftlich zugeschrieben werden, sind die anitiangiogenetischen Wirkungen (Wachstumshemmung von Blutgefäßen), die in der Krebsbehandlung zur Wachstumshemmung des Tumorgewebes eingesetzt werden könnten (Laschke et al., 2008). Auch über eine positive Beeinflussung der Elastizität der Blutgefäße (Endothelfunktion), die eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Arteriosklerose (Atherogenese) spielt, wurde berichtet (Widlansky et al., 2007). Ebenso wurde EGCG in der immunologischen Forschung, unter anderem bei Untersuchungen mit HIV (Jiang et al., 2010) und dem Influenza-Virus (Xiao et al., 2004), eingesetzt.

Des Weiteren gelten Catechine allgemein als Radikalfänger von reaktiven Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS). Diese beiden Typen von Verbindungen sind für oxidative Schäden an der DNA verantwortlich (Lee & Lee, 2006). Radikalfänger haben eine große physiologische Bedeutung, da sie ROS inaktivieren, deren übermäßiges Vorkommen zu oxidativem Stress führt. ROS in hohen Konzentrationen werden in Zusammenhang mit Krebs und Diabetes sowie Herz-Kreislauferkrankungen gebracht (Panth, Paudel, Parajuli, 2016). In niedrigen Dosen dienen ROS als wichtige Signalmoleküle (Ristow, 2014, Shadel & Horvath, 2015).

1.3 Was ist beta-Lactoglobulin?

B-LG ist, wie schon kurz erwähnt, der Hauptbestandteil von Molkenprotein (A. Fiocchi, Brozek, Schünemann, 2010). Es wird hauptsächlich aus Milch gewonnen und findet besonders in der Bodybuilding-Szene als Nahrungsergänzungsmittel Verwendung (Marshall, 2004).

Molkenproteine sind eine Gruppe verschiedener Albumine und Globuline. Im Einzelnen handelt es sich dabei um:

- alpha-Lactalbumin ca. 20 % (0,1 % der Milch)
- beta-Lactoglobulin ca. 45 % (0,25 % der Milch)
- Immunoglobuline ca. 10 %
- Proteosepepton ca. 20 %
- Serumalbumin ca. 5 % (Belitz, Grosch, Schieberle, 2001).

Bei der Herstellung von Molkenproteinisolaten (MPI) kommen zwei unterschiedliche Verfahren zur Anwendung: Beim Ionentauschverfahren werden die Molkenproteine an den Ionentauscher adsorbiert und eluiert, wodurch die Proteinpräparationen mehr Salze enthalten. Bei einer Herstellung von MPI im Mikrofiltrationsverfahren werden keine Salze verwendet. Dadurch kann eine besonders hohe Reinheit erreicht werden, mit einem Proteinanteil von etwa 90 bis 96 % sowie einem geringen Fett- und Laktosegehalt von weniger als einem Prozent. Das hier verwendete MPI „BiPr“ der Firma Davisco Food International Inc., (Minnesota, USA) wurde per Mikrofiltrationsverfahren hergestellt. Dieses Verfahren trennt besonders Getränke oder Öle und besteht aus aufeinanderfolgenden Filtrationen durch Membranen mit einer Porengröße > 0,1 µm. Bei einer Ultrafiltration liegt die Porengröße unter 0,1 µm. Es handelt sich um ein rein physikalisches (mechanisches) Trenn-Membranverfahren. Es folgt dem Prinzip des Größenausschlusses, das heißt, alle Partikel in den Fluiden, die größer als die Membranporen sind, werden zurückgehalten.

1.4 Ziel der Untersuchung

Obwohl es einige Daten über die mikrobiologischen und zellbiologischen Effekte von GTE und MPI oder deren Komponenten gibt, bleiben die Effekte von GTE und MPI in Kombination bisher unerforscht. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde vermutet, dass b-LG die Wirkung von EGCG auf das mikrobielle Wachstum, das Fibroblastenwachstum und die antioxidative Aktivität der Zellen beeinflusst. Die Zytokompatibilität von EGCG und b-LG wurde in verschiedenen Konzentrationen auf gingivale Fibroblasten getestet.

Antioxidative Eigenschaften wurden nach der Waterhouse-Methode untersucht. Der antioxidative Versuchsteil wurde in Kooperation mit Julia K. Keppler von der Abteilung Lebensmitteltechnologie der Universität Kiel durchgeführt.

Die Wechselwirkung von EPGC und b-LG wurde durch Zentrifugation, Ultrafiltration und anschließende HPLC-Analysen untersucht. Die antimikrobielle Aktivität wurde gegen eine Reihe von Bakterien (sowohl Gram-positiv als auch Gram-negativ) und Pilzen getestet. Der antimikrobielle Versuchsteil wurde vollständig von Gilles Brackmann vom pharmazeutisch-mikrobiologischen Institut der Universität Gent, Belgien, begleitet. Seine Ergebnisse dürfen hier veröffentlicht werden, um die Doktorarbeit zu vervollständigen.

Es wurde mit gingivalen Fibroblasten gearbeitet, da diese als ein gutes Zellmodell für Zytokompatibilitätstests etabliert sind, bevor man die Ergebnisse auf die Osteoblastenproliferation anwenden kann. Falls in Zukunft EGCG und b-LG in der oralen Chirurgie verwendet werden sollen, sind gingivale Fibroblasten ebenfalls relevanter als andere Arten von Fibroblasten.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterial

Tabelle 1: Verbrauchsmaterial

Produkt	Quelle
6-Well-Platten	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
96-Well-Hard-Shell-Platte	Roche, Mannheim, Deutschland
Biosphere Quality Tips 10 µl	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere Quality Tips 100 µl	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere Quality Tips 100-1000 µl	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf Tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon-Röhrchen	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Küvetten	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Kyroröhrchen	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Membranfilterpapier 0,22 µm	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Objektträger	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Pasteurpipetten	Assistent, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland
serologische Pipetten, 10 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
serologische Pipetten, 25 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Skalpell	Hu-Friedy, Frankfurt am Main, Deutschland
Zellkulturplatte	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Zahnärztliche Pinzette	Hu-Friedy, Frankfurt am Main, Deutschland
Zellkulturflaschen	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber (Scraper)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenglas	Schott Duran, Singapur, Singapur

2.1.2 Geräte

Tabelle 2: Geräte

Geräte	Hersteller
Axiovision HRc	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Bio-Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
C24-Inkubator Shaker	New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland
Inkubator (Hera Cell)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Inkubator Heraeus	Heraeus, Hanau, Deutschland
J2-21MIE-Zentrifuge	Beckmann, Krefeld, Deutschland
LabsonicU	Braun, Kronberg, Deutschland
Light Cycler	Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, Indiana, USA
MACs MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank (Hera Safe)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Pipette 0,1-2,5 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette 10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette 20-100 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rotamax	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Sartorius-AC210S Waage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Spectra MAX Plus	Molecular Devices, Biberach, Deutschland
Spiegelreflexkamera	Canon, Tokio, Japan
Vakuklav 24	Melag, Berlin, Deutschland
Vakusafe Comfort	IBS Integra Biosciences, Chur, Schweiz
Vortex Genie 2	Bender&Holbein AG, Bruchsal, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zeiss Axiovert 40C	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.3 Chemikalien, Medien, Puffer, Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien, Medien, Puffer, Reagenzien

Produkt	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Akkutase	GE Healthcare, Berlin, Deutschland
adipogenes Stimulationsmedium	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Alcianblau	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Alizarin rot	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Amphotericin	BioWest, Nuailé, Frankreich
Aqua Dest.	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Langenhagen, Deutschland
Biofreeze	Biochrom, Berlin, Deutschland
Bovines Serum Albumin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Dulbecco MEM	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Fetal Bovine Serum	Biochrom, Berlin, Deutschland
L-Glutamine 200mM	Lonza, Basel, Schweiz
MACs-Puffer	PBS, 0,5 mM EDTA, 0,5% BSA
Micro Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Minimum essential Medium Eagle	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml/ 10.000 mg/ml	Biochrom, Berlin, Deutschland
Tryptanblau	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

2.2 Zellgewinnung der Fibroblasten

2.2.1 Biopsie (Probenentnahme)

Das Ethik-Votum (Nr. D513/17) wurde für die Zellproben von der Ethik-Kommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel erteilt. Die Patienten wurden mit dem Informationsblatt und der Einverständniserklärung für wissenschaftliche Untersuchungen an körpereigenem Material vor ihrer Einwilligung aufgeklärt. Die Einverständniserklärung wurde von den Patienten danach schriftlich eingeholt. Von 7 Patienten im Alter von 18-23 Jahren (vier weibliche, drei männliche) wurde im Zuge einer Weisheitszahnoperation eine Biopsie aus Zahn (Weisheitszahn) und restlichem Gingivabindgewebe entnommen. Nach der Entnahme wurden die Biopsien in sterilen 50-ml-Röhrchen im Transportmedium inkubiert und über Nacht gelagert. Das Transportmedium bestand aus Dulbecco's Modified Eagle Medium mit einem Zusatz von 10 % Fetal Bovine Serum, Streptomycin (100 U/ml), Penicillin (100 µg/ml) und 1% Amphotericin.

2.2.2 Präparation der Proben für Kultivierung der Fibroblasten

Zunächst wurde ein Selektivmedium für das Wachstum von Fibroblasten angesetzt, welches für das weitere Wachstum nötig ist (Medium I), bestehend aus:

1. 500 ml Minimum Essential Medium Eagle
2. 15 % Fetal Bovine Serum
3. 5 ml Penicillin 100 U/ml / Streptomycin (100 µg/ml))
4. 1 % Amphotericin
5. 5 ml L-Glutamin 200 mM.

Die 7 Proben wurden je auf eine Zellkulturplatte gegeben. Auf alle Proben wurde 5 ml steriles Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) zum Waschen gegeben und dies zweimal wiederholt. Die Proben wurden je in ein Zentrifugenglas (8 ml Röhre) mit Medium I überführt und für 10 Minuten bei 37°C zentrifugiert (Zentrifuge 5417 R). Die Proben wurden anschließend mit einem sterilen Skalpell in 1 bis 2 mm große

Stücke zerschnitten und im Abstand von 2 bis 3 cm auf je 3 bis 4 Zellkulturplatten verteilt.

Zum Anhaften auf den Zellkulturplatten wurde 20 Minuten abgewartet und danach langsam mit 3 ml Medium I zum Wachsen der Zellen aus dem Gewebe zugegeben. Die Zellkulturplatten wurden für 7 Tage im Inkubator bei 5%iger CO₂-Zufuhr und 37°C gelagert.

2.2.3 Kultivierung und Passagieren der Zellen

2.2.3.1 Kultivierung der Zellen

Nach 7 Tagen Inkubation wurde das Wachstum der Zellen mit einem Phasenkontrastmikroskop (Zeiss Axiovert 40C) kontrolliert. Das Medium der Zellkulturplatten wurde regelmäßig gewechselt. Das alte Medium musste hierzu abgesaugt und je mit 5 ml Selektivmedium wieder aufgefüllt werden. Dieses Vorgehen wurde für 14 Tage jeweils alle 3 Tage wiederholt. Während dieser 2 Wochen wurden die Zellkulturplatten im Inkubator mit 5%iger CO₂-Zufuhr bei 37°C gelagert.

2.2.3.2 Passagieren der Zellen

Um ein weiteres Wachstum zu erzielen, wurden die Zellen, nachdem sie 80 % Konfluenz erreicht hatten, durch Passagieren subkultiviert und auf Zellkulturflaschen verteilt. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit 5 ml DPBS gewaschen. Auf jede Zellkulturplatte wurde verdünnte Akkutase aufgetragen (1:10 also 5 ml Akkutase in 45 ml PBS verdünnt) und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch die Akkutase wurden die adhärenten Zellen gelöst. Die Zellen wurden auf Zellkulturflaschen mit Medium I (75 ml) verteilt. Für weitere 14 Tage wurde ein Mediumwechsel der Zellkulturflaschen alle 3 Tage durchgeführt, um ein gutes Wachstum zu erzielen.

2.2.4 Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)

Das Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) wird durchgeführt, um gingivale Stammzellen von anderen Zellen zu isolieren. Hierzu wird in diesem Verfahren der Antikörper STRO1 zusammen mit MicroBeads-Antikörpern verwendet, um die gingivalen Stammzellen von gingivalen Fibroblasten zu trennen, da Fibroblasten über kein STRO1-Antigen verfügen. Für die vorliegende Doktorarbeit wurden keine Stammzellen benötigt, jedoch wurden mithilfe der MACS-Methode die Stammzellen von den Fibroblasten getrennt.

2.2.4.1 MACS-Methode

Medium I wurde aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und die Zellen wurden mit DPBS zunächst gewaschen. Um die adhärenten Zellen vom Zellkulturflaschenboden zu lösen, wurde Akkutase verwendet. 10 ml Akkutase (1:9 verdünnt) wurde in jede Zellkulturflasche gegeben und diese für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Unter dem Mikroskop wurde kontrolliert, ob sich die Zellen gelöst hatten. Die Suspension jeder Zellkulturflasche wurde in Zentrifugenröhren pipettiert und für 5 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Es entstand ein Zellpellet am Boden jeder Zentrifugenröhre. Der flüssige Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wurde in 10 ml Medium resuspendiert. Zellmaterial für die Zellzahlbestimmung wurde entnommen und diese anschließend durchgeführt.

Das Magnetfeld wurde mit 70%igem Ethanol desinfiziert und die Säule nach Anweisungen des Herstellers am Magnetfeld befestigt. Die Säule wurde durch Spülen mit 500 µl MACS-Puffer, bestehend aus 0,5 % Rinderserumalbumin (BSA) und 2 mM EDTA in PBS, vorbereitet. Zwei Röhrchen wurden markiert und zur Aufnahme der Zellen unterhalb der Säule vorbereitet, eine für MACS-positive (MACS+) und eine für MACS-negative (MACS-) Zellpopulationen. Für die magnetische Markierung wurden zu den Zellen 20 µl STRO1-Antikörper gegeben und diese für 5 Minuten bei 4°C im Dunklen inkubiert. Dieser Zellsuspension wurden 20 µl MicroBeads-Antikörper hinzugegeben und die Zellen nochmals für 5 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nachdem beide Schritte abgeschlossen waren, wurden 80 µl MACS-Puffer hinzugegeben. Die Zellen wurden für weitere 15 Minuten bei 4 °C inkubiert und für 10 Minuten bei 1700 U/min und 4 °C zentrifugiert.

Die vorbehandelte Zellsuspension wurde in das Röhrchen gegeben und durchlief die magnetisierte Säule in dem Röhrchen. Bei diesem Schritt verblieben die mit dem STRO1- und MicroBeads-Antikörpern versehenen Stammzellen (MACS+) in der Säule, wohingegen die Fibroblasten (MACS-) die Säule weiter durchliefen und aufgefangen wurden. Nachdem die Zellsuspension durch das Röhrchen geflossen war, wurde der Auffangbehälter getauscht, die MACS+-Zellen wurden herausgepresst und aufgefangen. Die MACS- -Zellen (Fibroblasten) wurden auf Zellkulturflaschen verteilt. Zur weiteren Vermehrung dieser Zellen wurde Medium I zugegeben und die Zellkulaturflaschen verblieben für 10 Tage im Inkubator bei 5%iger CO₂-Zufuhr bei 37°C. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt.

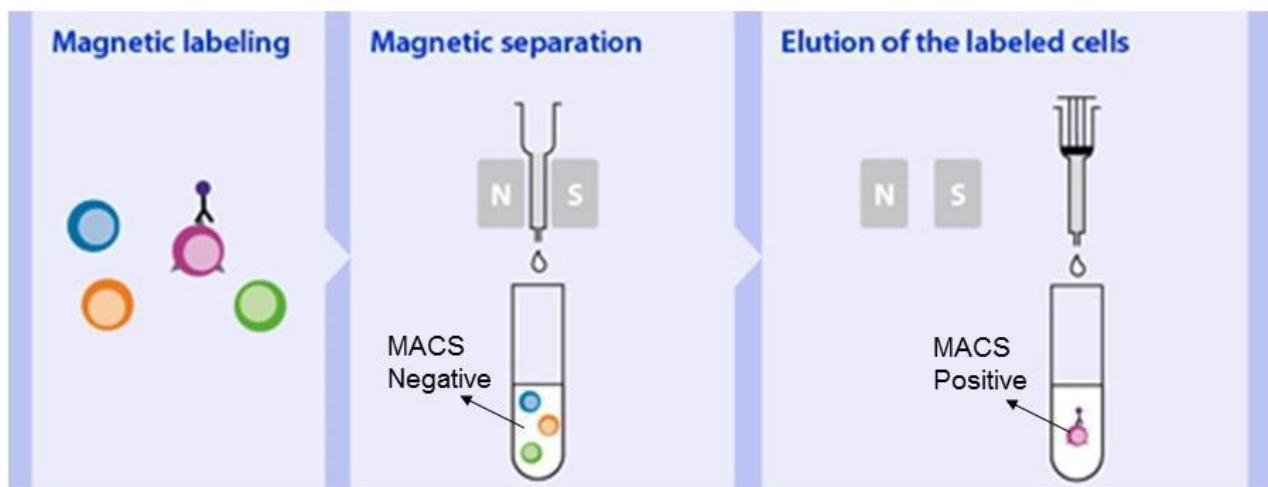


Abbildung 2: Magnetische Sortierung von markierten G-MSCs durch MACS-Technik

Quelle: http://www.miltenyibiotec.com/~media/Images/Navigation/Products-and-Services/ MACS-Cell-Separation/MACS-Technology/neu/flowchart_positive_selection_indirect_570.ashx

2.2.4.2 Bestimmung der Zellzahl der Fibroblasten mit dem Hämozytometer

Zur Bestimmung der Zellzahl der Fibroblasten wurde ein Hämozytometer verwendet. Die Oberfläche der Zählkammer und das Deckglas wurden mit 70%igem Ethanol gereinigt und die Zellen als Suspension ($0,9 \mu\text{l}$) in die Zählkammer gegeben. Die Zählkammer wurde unter das Mikroskop gelegt, 4 Quadrate (je 1 mm^2) wurden ausgezählt und der Mittelwert wurde berechnet. Die Zellzahl pro ml erhielt man durch Multiplizieren des Mittelwerts mit der Potenz 10^4 . Die gesamte Zellzahl wurde bestimmt durch Volumen der Zellsuspension mal Zellzahl pro ml.

2.3 Zytokompatibilität von EGCG und b-LG

96 Mikrotiterplatten wurden mit Zellen (5×10^3 Fibroblasten), verschiedenen Konzentrationen von EGCG (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 128 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 256 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 512 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1024 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2048 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 4096 $\mu\text{g}/\text{ml}$, jeweils 9 Wells pro Konzentration) und b-LG (erste Platte 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, zweite Platte 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und dritte Platte 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$) besetzt. Die Platten wurden für 24 Stunden inkubiert und am nächsten Tag mit dem MTT-Test, benannt nach dem Molekül (3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium-Bromid), weiterbearbeitet.

2.3.1 Verdünnungsprotokoll

Eine Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) wurde zum Verdünnen verwendet. Das Medium I, in dem die Fibroblasten sich befanden, hatte folgende Zusammensetzung:

- RPMI 1640 500 ml
- 10 % FBS 80 ml
- 5 ml Strep/Pen 10.000 U/ml
- 5 ml Glutamin 200 nM
- 5 ml Amphotericin 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

RPMI ist ein Zellkulturmedium für tierische und humane Zelltypen. Das fetale Kälber-serum (FBS) wird aus Blut von Kuhfeten gewonnen und dient als Nährmedium. Strep/Pen ist eine Mischung aus Penicillin und Streptomycin, die in Zellkulturmedien zum Kultivieren tierischer Zellen häufig verwendet wird, um eine bakterielle Kontamination zu verhindern. Die essentielle Aminosäure L-Glutamin ist ebenso wichtig für die Zellkultur und nicht zuletzt Amphotericin, das als Antimycotikum dient.

Hierzu mussten die Reagenzien wie folgt verdünnt werden:

Verdünnung EGCG:

Zunächst erfolgte eine Umrechnung: 4096 µg/ml entspricht 4,096 mg/ml und dies wiederum entspricht 0,00409 g/ml. Somit muss man 0,409 g in 100 ml einsetzen. Es wurde 0,409 g des EGCG-Pulvers abgewogen, dies mit 10 ml der oben genannten Lösung steril gefiltert und dann mit 90 ml RPMI aufgefüllt.

Von diesen 10 ml wurde absteigend eine Verdünnungsreihe gestartet:

150 µl wurden in die erste Vertiefung der Mikrotiterplatte A3 gegeben, hiervon wurden 50 µl abpipettiert und in die Vertiefung B3 gegeben. Von B3 wurden 50 µl in C3 pipettiert und dies erfolgte über die ganze Reihe bis H3.

Verdünnung b-LG 800:

Die gewünschte Konzentration waren 800µg/ml, dies entspricht 0,0008mg/ml, also 0,08 g in 100 ml. Somit wurde 0,08 g des b-LG Pulvers abgewogen und mit 10 ml der oben genannten Lösung gemischt, steril filtriert und dann mit 90 ml RPMI aufgefüllt.

Verdünnung b-LG 50:

Die gewünschte Konzentration waren 50µg/ml, dies entspricht 0,05mg/ml, dies wiederum entspricht 0,00005g/ml. Demzufolge sind es 0,005g in 100 ml. Somit wurden 0,005g des b-LG-Pulvers abgewogen und mit 10 ml der oben genannten Lösung, steril filtriert, dann mit 90 ml RPMI aufgefüllt.

2.3.2 Ansetzen der Wells-Probeplatten

Somit ergaben sich folgende Konzentrationen und Mischungsverhältnisse in den drei Mikrotiterplatten:

In den Spalten 1 und 2 befanden sich absteigend jeweils nur eine verdünnte Zellreihe in Medium I (siehe Verdünnungsreihe), in der Spalte 12 jeweils nur Zellen und in den Fächern 12 G und 12 H nur Medium als Leerwert.

Tabelle 4 : Verdünnungsreihe EGCG 0 – 4096 µg/ml und b-LG 0 µg/ml (EGCG: Epigallocatechingallat B-LG: beta-Lactoglobulin)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	5x10 ³ Zellen	5x10 ³ Zellen	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 0µg/ml									
B	1:2	1:2	5x10 ³ Zellen EGCG 2048µg/ml B-LG 0µg/ml									
C	1:4	1:4	5x10 ³ Zellen EGCG 1024µg/ml B-LG 0µg/ml									
D	1:16	1:16	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 0µg/ml									
E	1:32	1:32	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 0µg/ml									
F	1:64	1:64	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 0µg/ml									
G	1:128	1:128	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 0µg/ml									
H	1:256	1:256	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 0µg/ml	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 0µg/ml								

Tabelle 5: Verdünnungsreihe EGCG 0 – 4096 µg/ml und b-LG 50 µg/ml (EGCG: Epigallocatechingallat B-LG: beta-Lactoglobulin)

Tabelle 6: Verdünnungssreihe EGCG 0 – 4096 µg/ml und b-LG 800 µg/ml (EGCG: Epigallocatechingallat B-LG: beta-Lactoglobulin)

2.3.3 MTT-Test

Der MTT-Test (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium-Bromid) ist ein Test zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen. Dieser Test wurde entwickelt, um Zellwachstum und -aktivität ohne radioaktive Isotope nachzuweisen (Mosman et al., 1983; Denizot, & Lang 1986; Hansen & Nielsen 1989; Maehara et al., 1986). Dieser nicht radioaktive Nachweis unter Verwendung von MTT wurde erstmals von Mosman et al. (1983) beschrieben und in den Folgejahren von verschiedenen Forschern weiterentwickelt (Tada et al., 1986, Denizot & Lang, 1986; Gerlier & Thomasset, 1986; Hansen & Nielsen, 1989; Vistica et al., 1991). Mithilfe des Tests kann Zellwachstum oder Zellzytotoxizität nachgewiesen werden. Seine Vorteile sind, dass er sicher, genau, sensitiv, schnell und einfach durchzuführen ist. Zellen werden *in vitro* mit dem namensgebenden Farbstoff, einem gelben Tetrazoliumsalz, behandelt, um ihre Lebensfähigkeit beziehungsweise den Anteil lebender Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe von Zellen zu messen. Der Nachweis der Zellvitalität mittels MTT-Test beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium-Bromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Früher wurde angenommen, dass MTT durch mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen reduziert wird. Untersuchungen in den letzten Jahren legen jedoch nahe, dass die Reduktion hauptsächlich von den pyridinhaltigen Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH und nur teilweise von Succinat abhängig ist. Die Menge des umgesetzten und letztendlich gemessenen Farbstoffs entspricht damit der Glykolyserate der Zellen und stellt somit einen Index für die Aktivität von Zellen. Die Reduktion von MTT durch NADH und NADPH ist abhängig von Enzymen des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Die Formazan-Kristalle werden gebildet, setzen sich ab und die daraus resultierende farbige Lösung wird mit einem Spektrophotometer quantifiziert. Dies sorgt für ein hohes Maß an Genauigkeit und ermöglicht eine digitale Computer-Verarbeitung der Daten und damit die schnelle und bequeme Handhabung einer hohen Anzahl von Proben.

Nachdem die gezüchteten Fibroblasten mit den verschiedenen Reagenzien in maximal 100 µl auf die 96 Wells- Platten verteilt worden waren, wurden diese bei 37 °C und bei 5 bis 6 % CO₂-Sättigung für 24 bis 96 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 10 µl MTT Labeling Agent dazugegeben und wiederum für 4 Stunden inku-

biert. In dieser Zeit war schon ein Farbumschlag zu sehen. Nach den 4 Stunden wurde die zweite Solubilisationslösung in jedes Well gegeben. Dann wurden die Wells-Platten über Nacht stehen gelassen und am nächsten Tag im dem ELISA-Reader bei einer Extinktion von 550 nm ausgelesen.

2.4 Antimikrobieller Test

2.4.1 Die verschiedenen Bakterien

Folgende Bakterien wurden verwendet:

- Propionibacterium acnes LMG 16711
- Staphylococcus aureus ATCC 700699
- Staphylococcus aureus ET 199
- Staphylococcus aureus LMG 10147
- Staphylococcus epidermidis ET 086
- Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027
- Candida albicans ATCC MYA-2876.

2.4.2 Minimale Hemm-Konzentration

Minimale Hemm-Konzentration (MHK) (englisch: MIC für Minimal Inhibitory Concentration) ist ein Begriff aus der Biologie. Sie bezeichnet die niedrigste Konzentration einer Substanz, bei der die Vermehrung von Mikroorganismen mit bloßem Auge nicht wahrgenommen werden kann. Sie beschreibt so die Konzentration einer Reagenz, die das Wachstum eines Bakterienstammes gerade noch hemmt.

2.4.3 Bestimmung der minimalen Hemm-Konzentration

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) wurde dreifach in 96-Well-Mikrotiterplatten unter Verwendung von Mueller-Hinton-Medium, RCM (P. acnes LMG 16711) oder RPMI (C. albicans ATCC MYA- 2876) bestimmt. Die MHK von EGCG und b-LG wurde mit zweifacher Verdünnung im Bereich zwischen 0,5 µg/ml und 1024 µg/ml bestimmt. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der MHK von EGCG in Gegenwart einer festen Konzentration von b-LG (0 µg/ml 50 oder 800 µg/ml). Das Inokulum wurde auf eine Optische Dichte (OD) von 0,05 für alle Stämme (mit Ausnahme von C. albicans ATCC MYA-2876, für die eine OD von 0,1 bis 0,15 verwendet wurde) 1/50 verdünnt und standardisiert.

Die Platte wurde bei 37°C für 24 Stunden inkubiert und die optische Dichte bei 590 nm in einem ELISA-Reader photometrisch bestimmt. Die niedrigste Konzentration der Verbindung war diejenige, für die eine ähnliche optische Dichte in den unbeimpften Vertiefungen der Wells-Platte beobachtet wurde.

Saphylococcus aureus ATCC 700699, ET199 und LMG10147, Staphylococcus epidermidis ET086 und Pseudomonas aeruginosa ATCC9027 wurden aerob in Mueller-Hinton-Bouillon (MH; Oxoid, Basingstoke, England) bei 37 °C kultiviert. Propionibacterium acnes LMG 16711 wurde in verstärktem Clostridiummedium (RCM; Oxoid) bei 37°C anaerob kultiviert. Candida albicans ATCC MYA-2876 wurde in RPMI 1640-Medium (Sigma-Aldrich, Diegem, Belgien) bei 37°C aerob kultiviert. Die Bestimmung MHK von EGCG allein oder in Gegenwart von b-LG (50 oder 800 µg/ml) wurde gemäß dem Mikrodilutionsprotokoll der EUCAST-Bouillon unter Verwendung von Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (TPP, Trasadingen, Schweiz). Das Inokulum wurde auf ungefähr 5×10^5 koloniebildende Einheiten (KBE)/ml standardisiert. Die getestete EGCG-Konzentration lag zwischen 0,5 und 1024 µg /ml. Die Platten wurden 24 Stunden bei 37°C inkubiert und die optische Dichte bei 590 nm wurde unter Verwendung eines Multilabel-Mikrotiterplattenlesegeräts (Envision; Perkin-Elmer LAS, Waltham, MA, USA) bestimmt. Die MHK wurde als niedrigste Konzentration von EGCG allein oder in Kombination mit b-LG aufgezeichnet, die eine ähnliche optische Dichte aufwies wie in inokulierten und leeren Vertiefungen.

2.5 Antioxidativer Test

2.5.1 DPPH-Methode

Das 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH-)Radikal zählt zu den ersten synthetischen Radikalen, das zur Bestimmung des antioxidativen Potentials von phenolischen Antioxidantien verwendet wurde. Der Vorteil dieses Radikals ist, dass es kommerziell erhältlich ist. Es dient bei der Reaktion gleichzeitig als Oxidationsquelle für die Antioxidantien und als Indikator für die Reaktion. Es handelt sich hierbei um ein Stickstoffradikal. Es könnte sein, dass Antioxidantien unterschiedlich mit diesen Radikalen reagieren (Frankel & Meyer, 2000). Es gibt andere Tests, bei denen Peroxylradikale verwendet werden, zum Beispiel Tests wie TRAP („total peroxyl radical trapping antioxidant parameter“), ORAC („oxygen radical absorbance capacity“), TEAC („trolox equivalent antioxidant capacity“), FRAP („ferric ion reducing antioxidant power“) oder PCL (Bestimmung der antioxidativen Kapazität mittels Photochemilumineszenz) (Huang & Ou, 2005; Popov & Lewin, 1999).

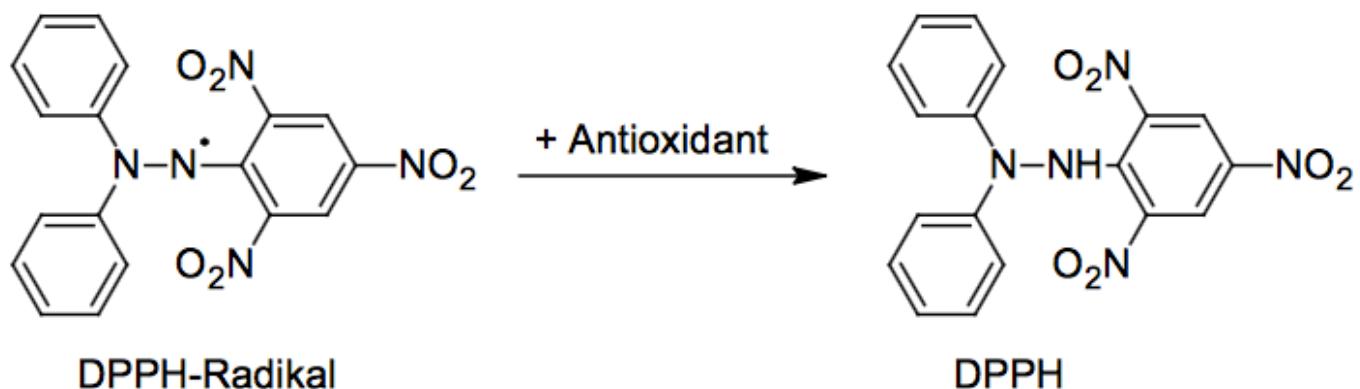


Abbildung 3: Strukturformel DPPH
Quelle: <https://www.dojindo.eu.com/DPPH-Antioxidant-Assay-Kit.aspx>

Der Abbau des lila DPPH-Radikals in die schwach gelbe nicht-radikale Form in methanolischer Lösung wird spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 515 nm gemessen (Frankel & Meyer, 2000). In der Regel werden die Ergebnisse als EC₅₀ angegeben. Dies entspricht der Menge an Probe, die benötigt wird, um 50 % der ursprünglichen Menge des DPPH[•]-Radikals einzufangen. Dabei ist die prozentuale

antioxidative Wirksamkeit von dem Anfangsgehalt des DPPH-Radikals abhängig. Die Verwendung von Ascorbinsäure oder Trolox als Äquivalenzsubstanz führt zu exakteren Ergebnissen (Magalhães et al., 2008).

Das Verfahren wurde ursprünglich entwickelt, um die antioxidative Effizienz von Polypheolen und verschiedenen Weinen und Traubensaften zu ermitteln (Frankel & Meyer, 2000). Der DPPH-Test wurde nach der Methode von Thaipong et al. (2006) angewandt. 150 µl Probe oder Standard (0,0625-0,75 mmol Trolox) wurden in eine Küvette pipettiert und 2850 µl der DPPH-Arbeitslösung zugegeben. Anschließend wurden die Küvetten mit Parafilm luftdicht verschlossen, um ein Verdunsten der methanolhaltigen Lösung zu vermeiden. Zum Mischen der Proben wurden die verschlossenen Küvetten vorsichtig umgeschwenkt. Die Proben wurden für 24 Stunden im Dunklen bei Raumtemperatur (ca. 22°C) gelagert. Die Absorption wurde am nächsten Tag bei einer Wellenlänge von 515 nm spektralphotometrisch gemessen. Die Ergebnisse wurden als Troloxäquivalente angegeben. Mithilfe der Troloxäquivalente kann die oxidative Kapazität einer Probe gemessen werden (Miller, Rice-Evans, C. et al., 1993; Pellegrini et al., 1999). Bei der Messung dient das Vitamin E-Derivat Trolox als Referenz, weswegen das Ergebnis in Trolox-Äquivalenten angeben wird. Das Prinzip der Messung der Trolox-Äquivalente (TEAC) basiert auf der Reaktion von Diammonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonat (ABTS) mit den in dem zu untersuchendem Medium enthaltenen Antioxidantien. ABTS bildet in einem oxidativen Milieu ein stabiles, grün gefärbtes Radikalkation, das bei der Reaktion mit antioxidativ wirksamen Substanzen seine Färbung verliert. Mittels photometrischer Messungen der ABTS-Lösung bei 734 nm vor und nach einer definierten Zeitspanne (meist 6 Minuten) nach Zugabe von Antioxidantien erhält man eine Extinktions-Differenz, aus der durch Vergleich mit der durch Trolox in verschiedenen Konzentrationen verursachten Minderung der Extinktion die antioxidative Kapazität der untersuchten Substanz ermittelt wird.

2.6 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung bestimmt und nach einer logarithmischen Transformation auf Normalität getestet. Die Unterschiede zwischen den Untersuchungen wurden unter Verwendung einer Ein-Weg-Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Post-hoc-Tukey-Test analysiert und alle Statisti-

ken wurden mit der SPSS- Software (SPSS Version 19, IBM, USA) erstellt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p = 0,05$ festgesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Lichtmikroskopie der Fibroblasten

Die folgenden Abbildungen zeigen die Fibroblasten nach 14 Tagen Zellkultivierung und einen Tag vor Beginn der Versuche. Es sind deutlich ausdifferenzierte, spindelförmige Fibroblasten zu erkennen.

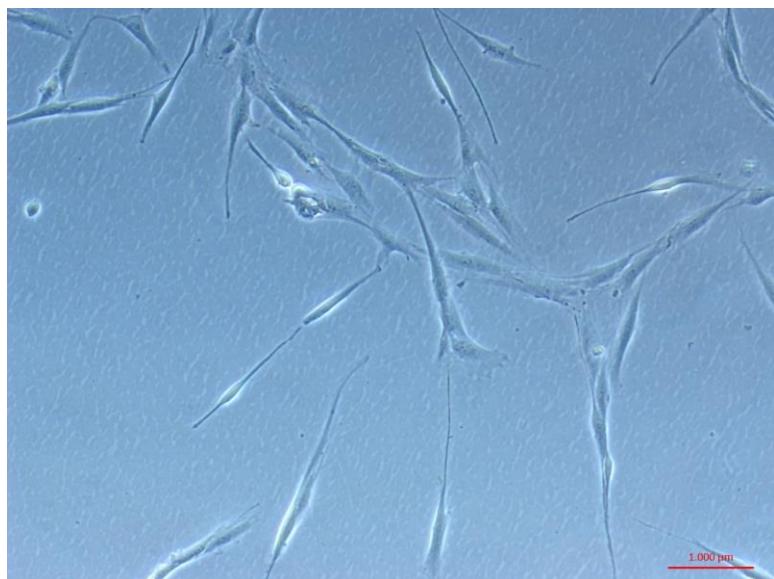


Abbildung 4 Fibroblasten 2 Tage vor dem Versuch 10-fache Vergrößerung
Maßstabsbalken 1000 μm



Abbildung 5: Fibroblasten 1 Tag vor dem Versuch 10-fache Vergrößerung
Maßstabsbalken 100 µm

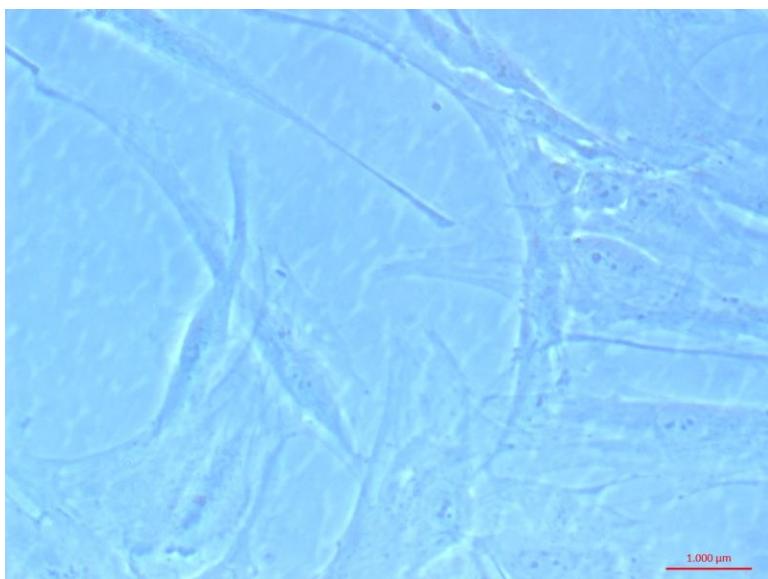


Abbildung 6: Fibroblasten 1 Tag vor dem Versuch 32-fache Vergrößerung
Maßstabsbalken 1000 µm

3.2 Lichtmikroskopie mit dem Phasenkontrastmikroskop

Die folgenden Abbildungen 7, 8, 9 zeigen mit dem Phasenkontrastmikroskop aufgenommene Fotos. Aufgrund der hohen Anzahl wurden hier repräsentativ für jede Mikrotiterplatte jeweils 9 Fotos zusammengestellt. Platte 1 mit 0 µg/ml b-LG und den Vertiefungen A 4, 7, 10, E 4, 7, 10 und G 4, 7, 10. Platte 2 mit 50 µg/ml b-LG und den Vertiefungen A 4, 7, 10, E 4, 7, 10 und G 4, 7, 10 und zuletzt Platte 3 mit 800 µg/ml

b-LG und den Vertiefungen A 4, 7, 10, E 4, 7, 10 und G 4, 7, 10. Eine Übersicht ist den Abbildungen 10, 11 und 12 zu entnehmen.

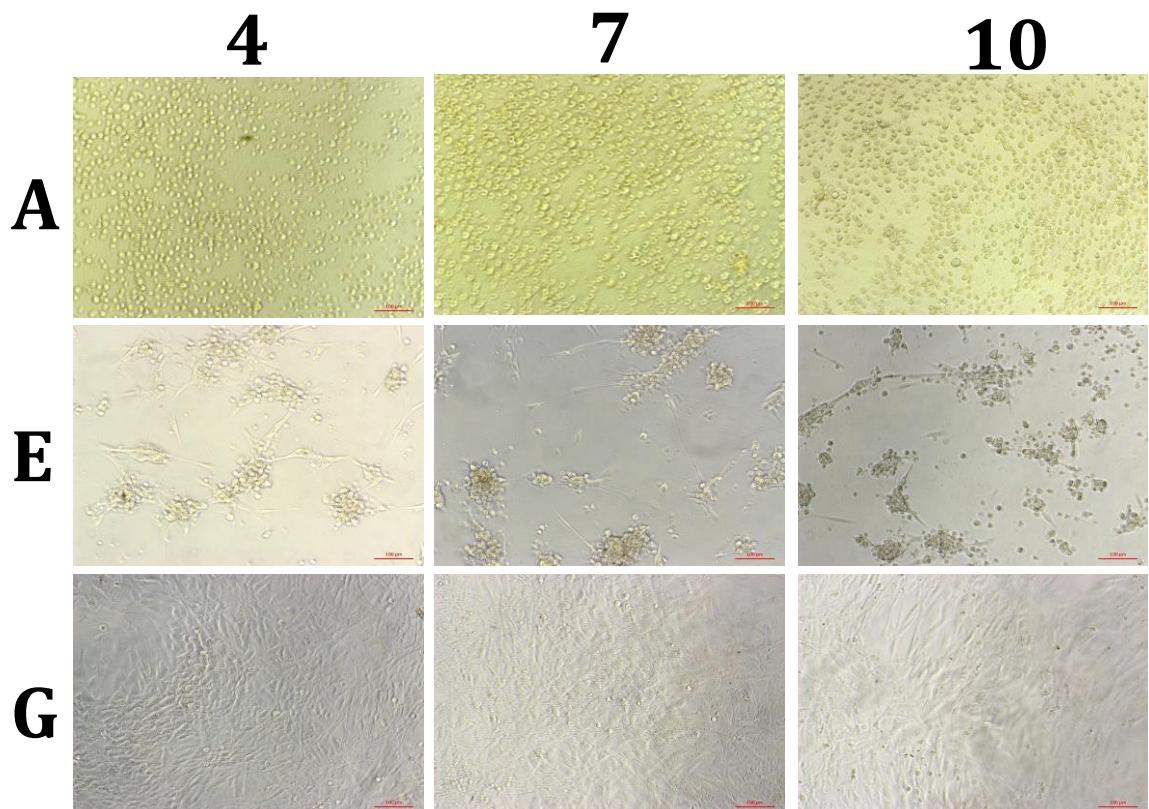


Abbildung 7: Platte 1
A4, A7, A10 mit 0 µg/ml b-LG /4096 µg/ml EGCG
E4, E7, E10 mit 0 µg/ml b-LG /256 µg/ml EGCG
G4, G7, G10 mit 0 µg/ml b-LG /64 µg/ml EGCG
Maßstabsbalken 1000 µm
(EGCG: Epigallocatechingallat b-LG: beta-Lactoglobulin)

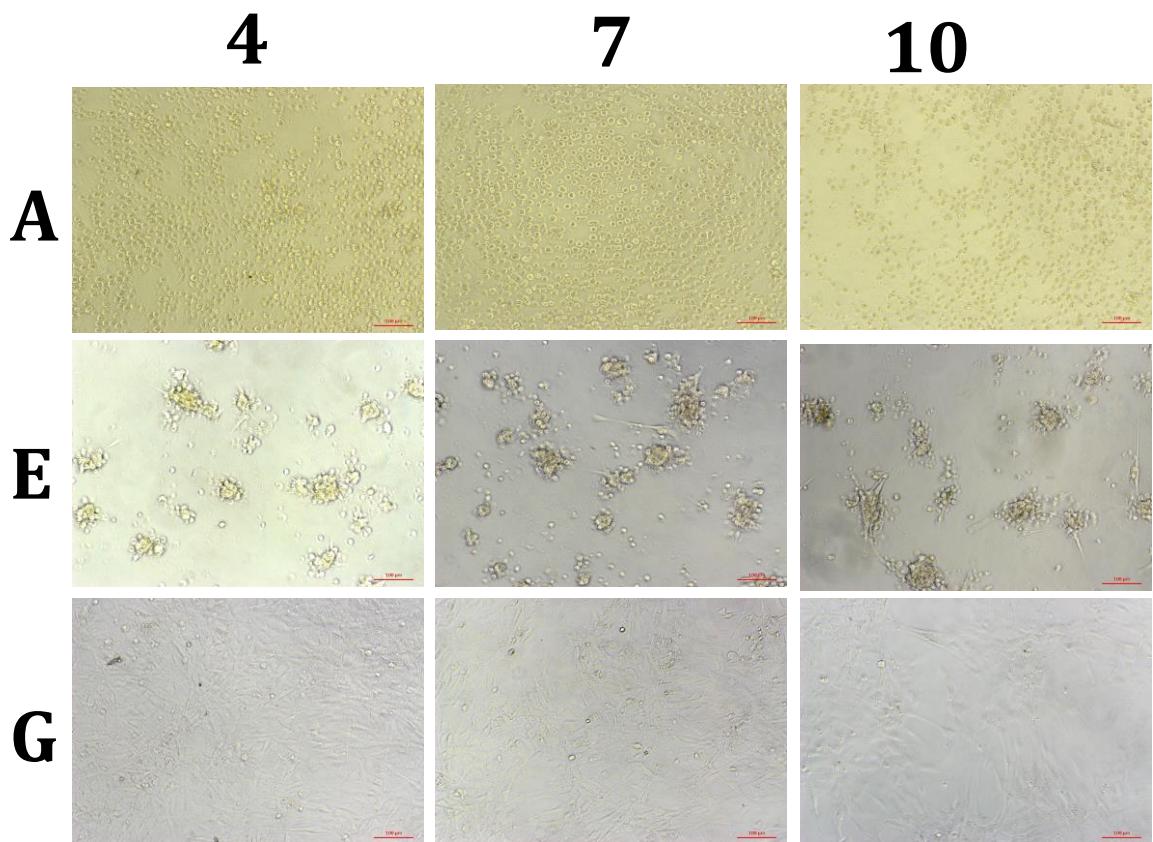


Abbildung 8: Platte 2

A4, A7, A10 mit 50 µg/ml b-LG / 4096 µg/ml EGCG

E4, E7, E10 mit 50 µg/ml b-LG / 256 µg/ml EGCG

G4, G7, G10 mit 50 µg/ml b-LG / 64 µg/ml EGCG

Maßstabsbalken 1000 µm

(EGCG: Epigallocatechingallat b-LG: beta-Lactoglobulin)

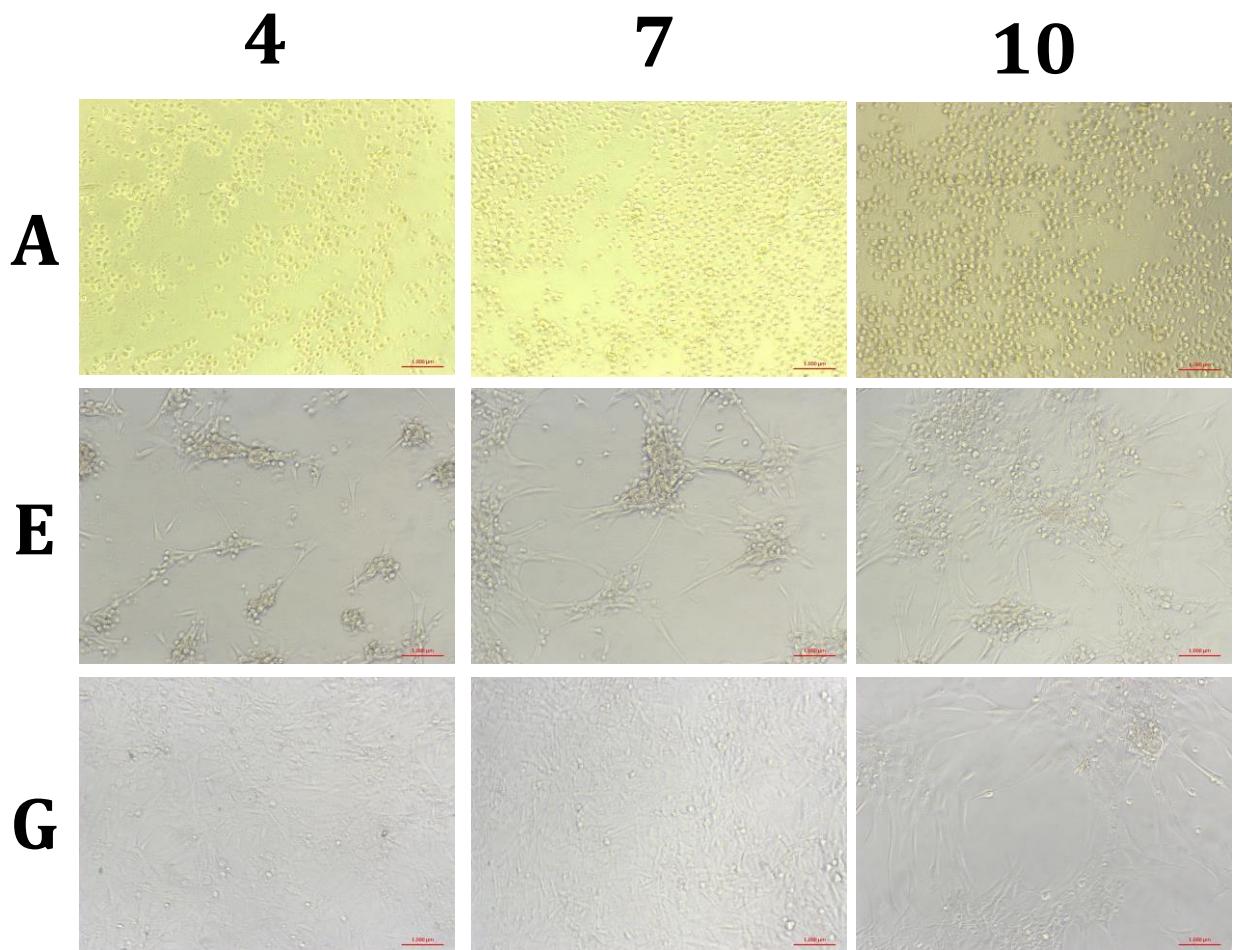


Abbildung 9: Platte 3

A4, A7, A10 mit 800 µg/ml b-LG / 4096 µg/ml EGCG

E4, E7, E10 mit 800 µg/ml b-LG / 256 µg/ml EGCG

G4, G7, G10 mit 800 µg/ml b-LG / 64 µg/ml EGCG

Maßstabsbalken 1000 µm

(EGCG: Epigallocatechingallat b-LG: beta-Lactoglobulin)

Lichtmikroskopisch zeigte sich in Abwesenheit von mit EGCG kultivierten Fibroblasten eine für gesunde Fibroblasten typische spindelartige Morphologie, ebenso bei denjenigen, die allen b-LG Konzentrationen ausgesetzt waren (0, 50 und 800 µg/ml), siehe Abbildung 7, 8 und 9. Steigende Konzentrationen von EGCG schienen jedoch die Bildung runder apoptotischen Körper zu fördern, was darauf hinweist, dass sich die Zellen auf die Zelllyse vorbereiten beziehungsweise sich in der Phase der Zelllyse befinden und daher nicht mehr lebensfähig waren. Bei einer EGCG-Konzentration von 64 µg/ml wurden keine apoptotische Körper beobachtet. Bei 128 µg/ml EGCG stieg die Anzahl an toten Zellen und bei 256 µg/ml waren die meisten Zellen tot und nur noch einzelne spindelförmige Fibroblasten vorhanden. Bei höheren Konzentrationen aufwärts von 256 µg/ml EGCG wurden nur noch apoptotische Zellkörper beobachtet. Eine Erhöhung der b-LG-Konzentration auf 50 oder 800 µg/ml führte nicht zu einer merklichen Verringerung des Zelltods.

3.3 Zytokompatibilität von EGCG und b-LG

Die folgenden Tabellen 7, 8 und 9 enthalten zunächst die Belegung der 96 Vertiefungen der drei Platten mit den verschiedenen Reagenzien und Zellen sowie die in Rot angezeigten photometrischen Ergebnisse.

Die Abbildungen 10, 11 und 12 zeigen eine fotografische Dokumentation der Platten, nach der Zugabe der beiden MTT-Reagenzien und der Inkubation von 24 Stunden.

Mikrotiterplatte 1

Tabelle 7: Photometrische Messung Platte 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	5x10 ³ Zellen 0,6	5x10 ³ Zellen 0,5	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 0µg/ml 2,4	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 0µg/ml 2,4	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 0µg/ml 2,3	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 0µg/ml 2,4	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 0µg/ml 2,5	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 0µg/ml 2,4	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 0µg/ml 2,3	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 0µg/ml 2,3	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 0µg/ml 2,4	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 0µg/ml 0,7
B	1:2 0,5	1:2 0,4	5x10 ³ Zellen EGCG 2048µg/ml B-LG 0µg/ml 1,8	5x10 ³ Zellen EGCG 2048µg/ml B-LG 0µg/ml 1,6	5x10 ³ Zellen EGCG 2048µg/ml B-LG 0µg/ml 1,7	5x10 ³ Zellen EGCG 2048µg/ml B-LG 0µg/ml 1,8	5x10 ³ Zellen EGCG 2048µg/ml B-LG 0µg/ml 1,9	5x10 ³ Zellen EGCG 2048µg/ml B-LG 0µg/ml 1,8				
C	1:4 0,5	1:4 0,3	5x10 ³ Zellen EGCG 1024µg/ml B-LG 0µg/ml 1,3	5x10 ³ Zellen EGCG 1024µg/ml B-LG 0µg/ml 1,2	5x10 ³ Zellen EGCG 1024µg/ml B-LG 0µg/ml 1,3	5x10 ³ Zellen EGCG 1024µg/ml B-LG 0µg/ml 1,3	5x10 ³ Zellen EGCG 1024µg/ml B-LG 0µg/ml 1,2	5x10 ³ Zellen EGCG 1024µg/ml B-LG 0µg/ml 1,3	5x10 ³ Zellen EGCG 1024µg/ml B-LG 0µg/ml 1,2	5x10 ³ Zellen EGCG 1024µg/ml B-LG 0µg/ml 1,2	5x10 ³ Zellen EGCG 1024µg/ml B-LG 0µg/ml 1,2	5x10 ³ Zellen EGCG 1024µg/ml B-LG 0µg/ml 1,2
D	1:16 0,3	1:16 0,2	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 0µg/ml 0,9	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 0µg/ml 0,9	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 0µg/ml 0,9	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 0µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 0µg/ml 0,9	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 0µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 0µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 0µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 0µg/ml 0,9	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 0µg/ml 0,9
E	1:32 0,1	1:32 0,1	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 0µg/ml 0,9	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 0µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 0µg/ml 0,7	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 0µg/ml 0,7	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 0µg/ml 0,7					
F	1:64 0,01	1:64 0,01	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 0µg/ml 0,7	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 0µg/ml 1,0	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 0µg/ml 0,7	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 0µg/ml 0,6	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 0µg/ml 0,6	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 0µg/ml 0,6	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 0µg/ml 0,5	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 0µg/ml 1,2	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 0µg/ml 0,7	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 0µg/ml 0,7
G	1:128 0,04	1:128 0,04	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 0µg/ml 0,7	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 0µg/ml 0,6	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 0µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 0µg/ml 0,7	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 0µg/ml 0,6	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 0µg/ml 0,6	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 0µg/ml 0,7	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 0µg/ml 0,6	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 0µg/ml 0,7	Leerwert 0,0
H	1:256 0,02	1:256 0,02	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 0µg/ml 0,6	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 0µg/ml 0,4	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 0µg/ml 0,5	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 0µg/ml 0,6	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 0µg/ml 0,4	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 0µg/ml 0,5	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 0µg/ml 0,4	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 0µg/ml 0,5	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 0µg/ml 0,5	Leerwert 0,0

Extinktion 550nm (EGCG: Epigallocatechingallat b-LG: beta-Lactoglobulin)

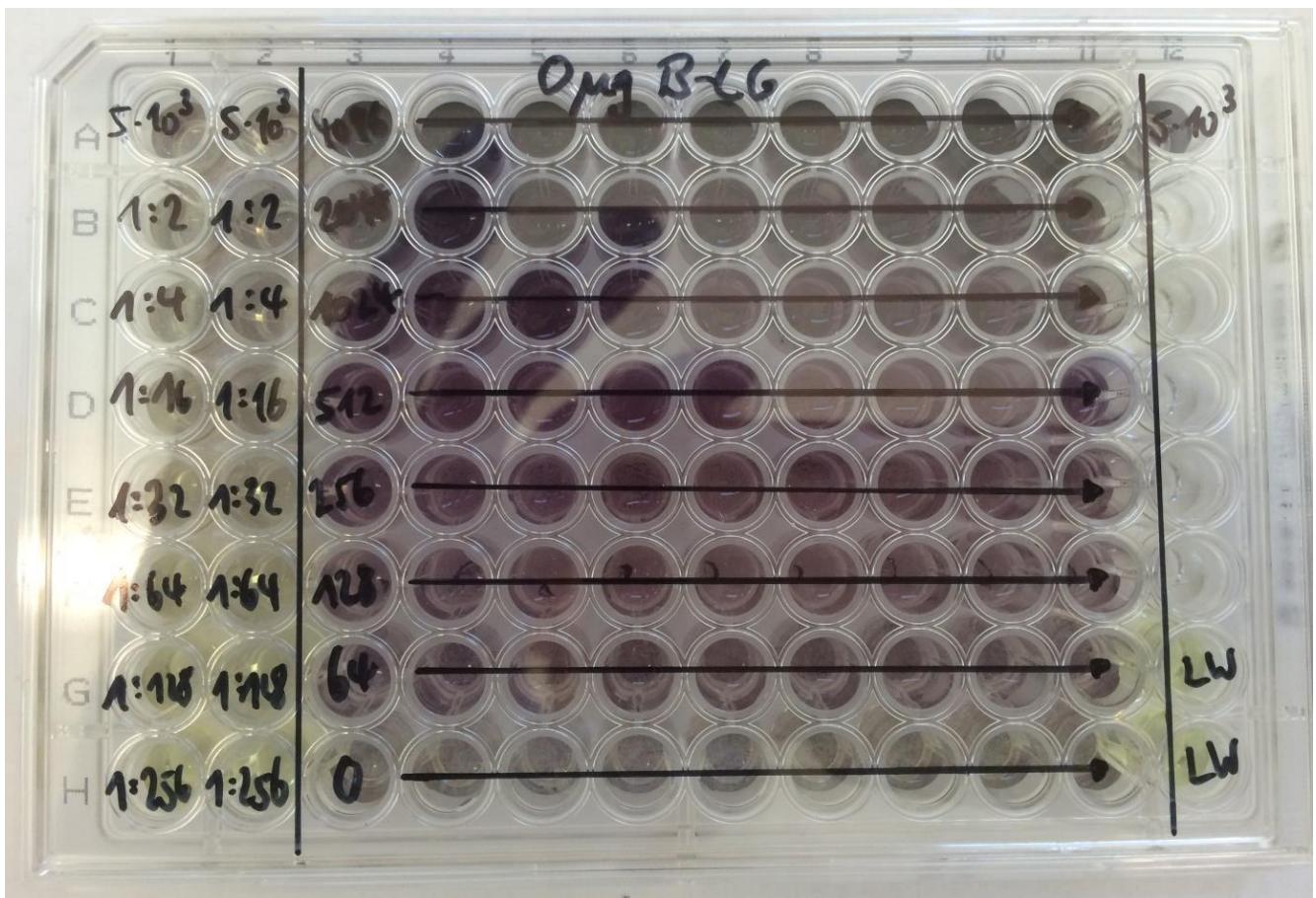


Abbildung 10: Foto der Platte 1 (EGCG: Epigallocatechingallat b-LG: beta-Lactoglobulin)

Mikrotiterplatte 2

Tabelle 8: Photometrische Messung Platte 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	5x10 ³ Zellen 0,6	5x10 ³ Zellen 0,7	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 50µg/ml 2,7	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 50µg/ml 2,7	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 50µg/ml 2,8	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 50µg/ml 2,8	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 50µg/ml 2,7	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 50µg/ml 2,4	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 50µg/ml 2,7	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 50µg/ml 2,6	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 50µg/ml 2,4	5x10 ³ Zellen 0,6	
B	1:2 0,4	1:2 0,4	5x10 ³ Zellen EGCG 2048µg/ml B-LG 50µg/ml 2,0	5x10 ³ Zellen EGCG 2048µg/ml B-LG 50µg/ml 2,1	5x10 ³ Zellen EGCG 2048µg/ml B-LG 50µg/ml 2,0	5x10 ³ Zellen EGCG 2048µg/ml B-LG 50µg/ml 2,0							
C	1:4 0,2	1:4 0,2	5x10 ³ Zellen EGCG 1024µg/ml B-LG 50µg/ml 1,4	5x10 ³ Zellen EGCG 1024µg/ml B-LG 50µg/ml 1,4	5x10 ³ Zellen EGCG 1024µg/ml B-LG 50µg/ml 1,4	5x10 ³ Zellen EGCG 1024µg/ml B-LG 50µg/ml 1,4	5x10 ³ Zellen EGCG 1024µg/ml B-LG 50µg/ml 1,3	5x10 ³ Zellen EGCG 1024µg/ml B-LG 50µg/ml 1,4	5x10 ³ Zellen EGCG 1024µg/ml B-LG 50µg/ml 1,3	5x10 ³ Zellen EGCG 1024µg/ml B-LG 50µg/ml 1,4	5x10 ³ Zellen EGCG 1024µg/ml B-LG 50µg/ml 1,4		
D	1:16 0,2	1:16 0,2	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 50µg/ml 1,0	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 50µg/ml 1,0	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 50µg/ml 1,0	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 50µg/ml 1,0	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 50µg/ml 0,9	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 50µg/ml 0,9					
E	1:32 0,1	1:32 0,1	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 50µg/ml 0,9	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 50µg/ml 0,9	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 50µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 50µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 50µg/ml 0,9	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 50µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 50µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 50µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 50µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 50µg/ml 0,8	
F	1:64 0,06	1:64 0,06	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 50µg/ml 0,7	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 50µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 50µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 50µg/ml 0,7	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 50µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 50µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 50µg/ml 0,7	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 50µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 50µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 50µg/ml 0,8	
G	1:128 0,04	1:128 0,04	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 50µg/ml 0,5	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 50µg/ml 0,7	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 50µg/ml 0,7	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 50µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 50µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 50µg/ml 0,7	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 50µg/ml 0,7	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 50µg/ml 0,7	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 50µg/ml 0,7	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 50µg/ml 0,7	Leerwert 0,0
H	1:256 0,03	1:256 0,03	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 50µg/ml 0,6	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 50µg/ml 0,5	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 50µg/ml 0,5	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 50µg/ml 0,5	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 50µg/ml 0,6	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 50µg/ml 0,6	Leerwert 0,0				

Extinktion 550 nm (EGCG: Epigallocatechingallat b-LG: beta-Lactoglobulin)

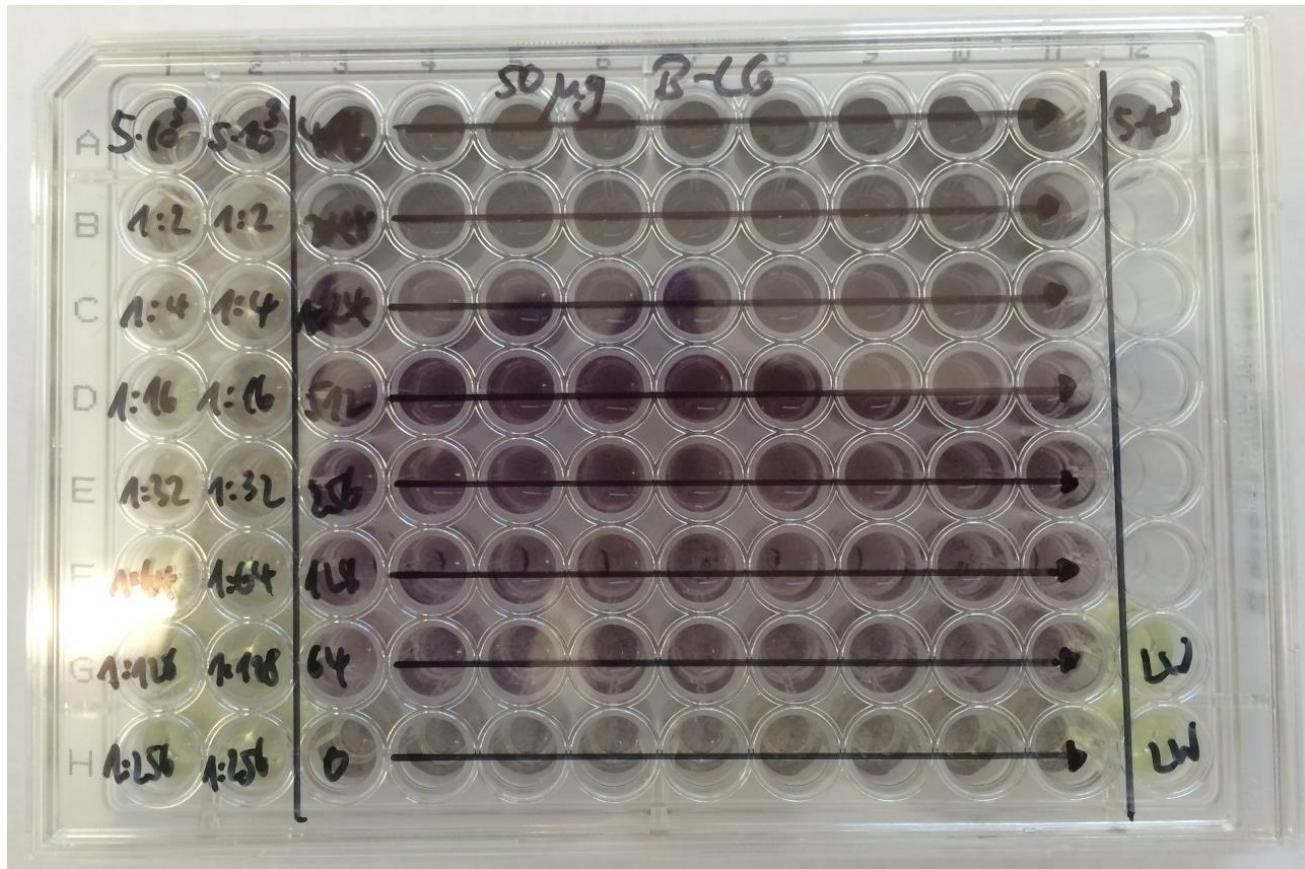


Abbildung 11: Foto der Platte 2 (EGCG: Epigallocatechingallat b-LG: beta-Lactoglobulin)

Mikrotiterplatte 3

Tabelle 9: Photometrische Messung Platte 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	5x10 ³ Zellen 0,5	5x10 ³ Zellen 0,6	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 800µg/ml 2,5	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 800µg/ml 2,3	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 800µg/ml 2,4	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 800µg/ml 2,4	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 800µg/ml 2,3	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 800µg/ml 2,3	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 800µg/ml 2,4	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 800µg/ml 2,4	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 800µg/ml 2,6	5x10 ³ Zellen EGCG 4096µg/ml B-LG 800µg/ml 2,4
B	1:2 0,4	1:2 0,4	5x10 ³ Zellen EGCG 2048µg/ml B-LG 800µg/ml 1,9	5x10 ³ Zellen EGCG 2048µg/ml B-LG 800µg/ml 1,8	5x10 ³ Zellen EGCG 2048µg/ml B-LG 800µg/ml 1,6	5x10 ³ Zellen EGCG 2048µg/ml B-LG 800µg/ml 1,8						
C	1:4 0,4	1:4 0,4	5x10 ³ Zellen EGCG 1024µg/ml B-LG 800µg/ml 1,2	5x10 ³ Zellen EGCG 1024µg/ml B-LG 800µg/ml 1,2	5x10 ³ Zellen EGCG 1024µg/ml B-LG 800µg/ml 1,0	5x10 ³ Zellen EGCG 1024µg/ml B-LG 800µg/ml 1,2						
D	1:16 0,3	1:16 0,3	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 800µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 800µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 800µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 800µg/ml 0,9	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 800µg/ml 0,9	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 800µg/ml 0,9	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 800µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 800µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 800µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 512µg/ml B-LG 800µg/ml 1,0
E	1:32 0,2	1:32 0,1	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 800µg/ml 0,7	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 800µg/ml 0,7	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 800µg/ml 0,6	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 800µg/ml 0,7	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 800µg/ml 0,7	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 800µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 800µg/ml 0,7	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 800µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 800µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 256µg/ml B-LG 800µg/ml 0,8
F	1:64 0,1	1:64 0,1	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 800µg/ml 0,4	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 800µg/ml 0,5	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 800µg/ml 0,4	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 800µg/ml 0,6	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 800µg/ml 0,9	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 800µg/ml 0,9	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 800µg/ml 0,6	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 800µg/ml 0,6	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 800µg/ml 0,6	5x10 ³ Zellen EGCG 128µg/ml B-LG 800µg/ml 0,5
G	1:128 0,04	1:128 0,04	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 800µg/ml 0,5	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 800µg/ml 0,4	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 800µg/ml 0,4	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 800µg/ml 0,8	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 800µg/ml 0,6	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 800µg/ml 0,6	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 800µg/ml 0,6	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 800µg/ml 0,5	5x10 ³ Zellen EGCG 64µg/ml B-LG 800µg/ml 0,5	Leerwert 0,0
H	1:256 0,03	1:256 0,03	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 800µg/ml 0,4	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 800µg/ml 0,5	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 800µg/ml 0,4	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 800µg/ml 0,5	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 800µg/ml 0,4	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 800µg/ml 0,4	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 800µg/ml 0,5	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 800µg/ml 0,5	5x10 ³ Zellen EGCG 0µg/ml B-LG 800µg/ml 0,5	Leerwert 0,0

Extinktion 550 (EGCG: Epigallocatechingallat b-LG: beta-Lactoglobulin)

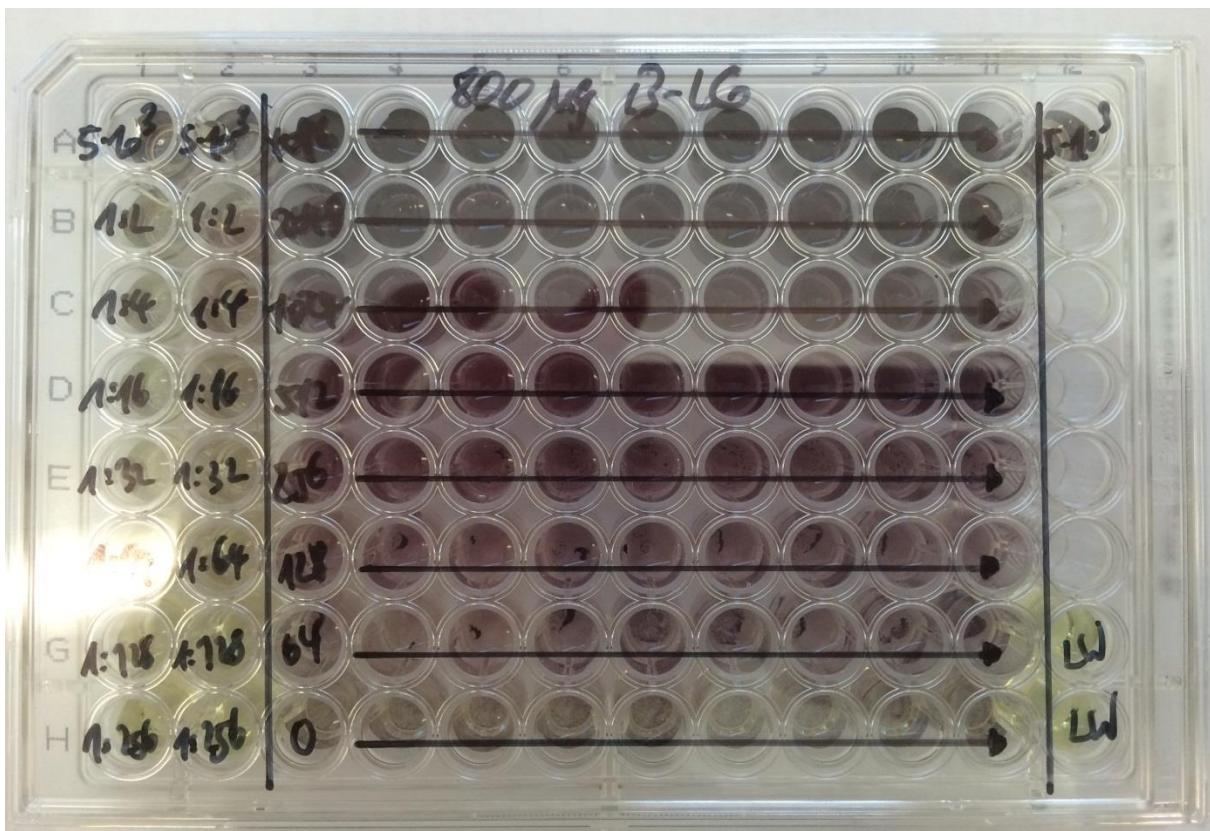


Abbildung 12: Foto der Platte 3 (EGCG: Epigallocatechingallat b-LG: beta-Lactoglobulin)

Für alle Abbildungen 10, 11, 12 zeigen sich stärkere Verfärbungen in den Bereichen mit hohem EGCG-Anteil. Die Leerwerte sind nahezu farblich identisch mit den Vertiefungen von A 1-2 bis H 1-2, in denen sich Zellen in unterschiedlicher Konzentration, nur ohne die Substanzen EGCG und b-LG befinden.

Die Werte der Extinktion bei 550 nm aus den Tabellen 7, 8 und 9 sind ebenso gut vergleichbar und sind in allen drei Platten relativ identisch. Die Werte der Extinktionen entsprechen dem Farbverlauf der Abbildungen 10, 11 und 12. An jenen Stellen, an denen die Vertiefungen der Mikrotiterplatten dunkler verfärbt sind, ist die Extinktion entsprechend höher. Da in allen Platten, jeweils in den Reihen von Stelle 2 – 11, die gleichen Lösungen und Zellen vorhanden sind und nahezu identische Ergebnisse gemessen wurden, spricht dies für eine gründliche Pipettierung, ein gutes Verdünnungsprotokoll, ein sauberes Besetzen der Mikrotiterplatten und somit für eine genaue laboratorische Arbeit.

3.4 Antimikrobieller Test

Für die antibakterielle Aktivität ergab die Bestimmung der MHK (Tabelle 10), dass in Abwesenheit von MPI die zur Hemmung des Wachstums der Bakterien erforderliche GTE-Konzentration zwischen 128 und 256 µg/ml lag. GTE verhinderte das Wachstum von Gram-positiven Bakterien stärker als das von Gram-negativen *P. aeruginosa*. Die Zugabe von MPI verringerte die MHK von GTE gegenüber Gram-positiven *S. aureus* ATCC 700699 und *S. epidermidis* ET086 und insbesondere *P. acnes* LMG 16711. Im Gegensatz dazu erhöhte MPI die MHK in Richtung Gram-negativer *P. aeruginosa* ATCC 9027. Das Wachstum der Hefe *C. albicans* ATCC MYA-2876 wurde nicht von GTE beeinflusst (MHK > 1.024 µg/ml, unabhängig von der Zugabe von MPI).

Tabelle 10: MHK von GTE in 3 verschiedenen Konzentrationen von MPI auf verschiedene Bakterien

	MHK von GTE, µg/ml		
	0 µg/ml MPI	50 µg/ml MPI	800 µg/ml MPI
Gram-positive Bakterien			
<i>P. acnes</i> LMG 16711	128	32	16
<i>S. aureus</i> Mu50	128	64	64
<i>S. aureus</i> ET199	128	128	128
<i>S. aureus</i> LMG 10147	128	128	128
<i>S. epidermidis</i> ET086	128	64	64
Gram-negative Bakterien			
<i>P. aeruginosa</i> ATCC9027	256	1,024	1,024
Pilz			
<i>C. albicans</i> SC5314	>1,024	>1,024	>1,024

MHK, minimale Hemm-Konzentration; GTE, Grüntee-Extrakt;
MPI, Molkenproteinisolat (englisch: WPI, Whey Protein Isolate)

3.5 Antioxidativer Test

Im DPPH-Test (Abb. 13) wurden die antioxidativen Kapazitäten von MPI und GTE anhand ihrer Fähigkeit getestet, das freie DPPH-Radikal abzufangen. Das Diagramm zeigt die DPPH- Hemmung, in Abhängigkeit von verschiedenen GTE-Konzentrationen (0,64,128 µg/ml) und MPI Konzentrationen (0,50,800 µg/ml). GTE allein zeigte eine Auffangkapazität von 20 bzw. 28% für 64 bzw. 128 µg/ml GTE. Die Zugabe von MPI hatte jedoch einen erheblichen negativen Einfluss auf die Radikalfängerkapazität von GTE. Wenn zum Beispiel 800 µg/ml MPI eingeschlossen wurden, wurde die Hemmung für 64 bzw. 128 µg/ml GTE auf etwa 13 und 24 % reduziert. Es gab keinen radikalischen Auffangeffekt von MPI alleine.

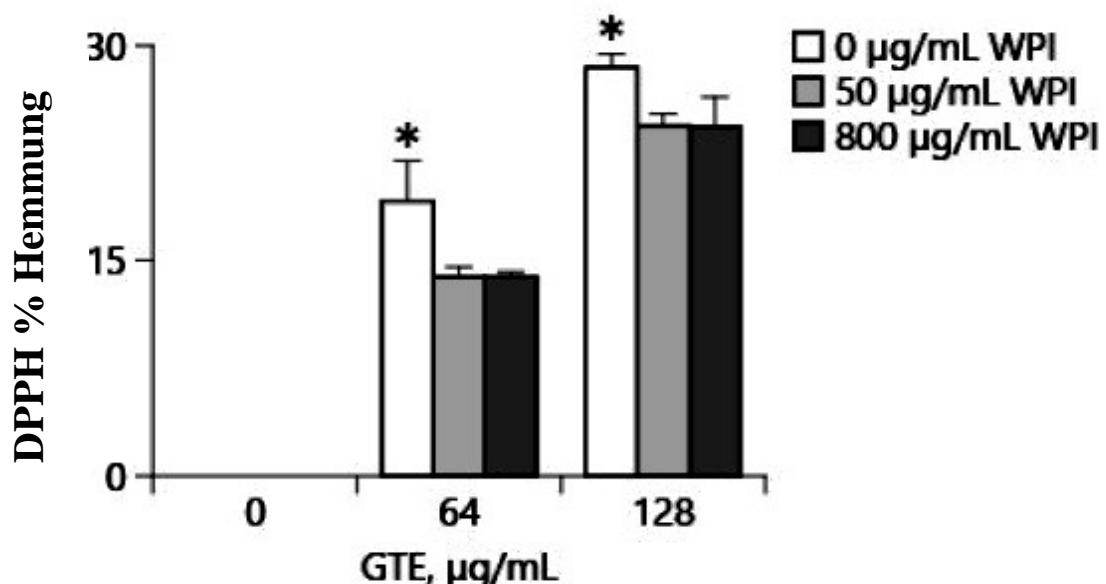


Abbildung 13: Antioxidative Kapazität (DPPH-Test) verschiedener Konzentrationen von GTE, mit oder ohne Zugabe von 800 oder 50 µg/ml WPI (Whey Protein Isolat). Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 3$) angegeben. * $p < 0,05$. (Ein-Weg-Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Post-hoc-Tukey-Test, Signifikanzniveau wurde auf $p = 0,05$ festgesetzt).

4 Diskussion

Diese Arbeit zielte darauf ab, die kombinierten Wirkungen von EGCG und b-LG zu ermitteln und sich auf Merkmale zu konzentrieren, die für Knochenregenerationsmaterialien nützlich sind, wie z. B. antimikrobielle, zytokompatible und antioxidative Aktivität. Es sollte aufgezeigt werden, inwieweit sich EGCG und b-LG in Kombination beeinflussen, und ob die antioxidativen, antimikrobiellen und zytokompatiblen Fähigkeiten durch die Wechselwirkung verbessert werden können oder sich verschlechtern. Bisher wurden die beiden Moleküle nur einzeln erforscht, die Kombination jedoch noch nicht.

Für die Zellgewinnung und Proliferation wurde eine einfach anwendbare Technik entwickelt (El-Sayed et al., 2015b). Hierfür wurden die entnommenen Zahnfleischproben von extrahierten Weisheitszähnen nicht wie bei anderen Untersuchungen durch Kollagenasen enzymatisch gespalten (Devitt et al., 2015). Die plastische Gebeadehärenz wird sich hier zunutze gemacht, indem die Gingivafragmente auf Zellkulturplatten aufgebracht werden. Somit werden eine exzessive Gewebemanipulation und die damit verbundenen Nebenwirkungen auf den Zellen vermieden. Gerade Fibroblasten haben eine gute plastische Adhärenz, haften sehr gut an der Plastik-Gewebekulturoberfläche und wachsen ganz einfach aus dem Zahnfleischgewebe heraus. Durch die schnelle Zellteilung erhält man durch Zellkultivierung und Passagieren rasch eine hohe Anzahl und Dichte von Fibroblasten.

Der MTT-Test ist schon lange etabliert und wurde erstmals von Mosmann et al. (1983) beschrieben. Lebendige Zellen wandeln einen membrangängigen Farbstoff durch mitochondriale Dehydrogenasen in dunkelblaue Formazan-Kristalle um. Diese sind danach nicht mehr membrandurchgängig und akkumulieren dadurch in unbeschädigten Zellen. Durch die spätere Lyse der Zellen und Solubilisierung kann der Farbstoff durch eine colorimetrische Messung bei 550 nm quantifiziert werden. Da der Farbstoff bzw. die Farbkristalle direkt proportional zu der Anzahl der proliferierenden Zellen sind, kann auf eine Zellzahl rückgeschlossen werden.

Ein sehr wichtiges Ergebnis dieser Doktorarbeit ist, dass der MTT für einen solchen Versuchsaufbau für die Zukunft ungeeignet ist. Das EGCG verfärbt das Medium des MTT-Tests zu schnell und zu deutlich, sodass eine Messung mittels Extinktion das Ergebnis verfälschen kann. Jedoch kommt man aufgrund der lichtmikroskopischen

Fotos zu einem eindeutigen Ergebnis, wonach ab 256 µg/ml EGCG die hier vorhandenen Zellen, Fibroblasten nicht überlebensfähig sind.

Es gibt verschiedene Methoden zur Bestimmung des antioxidativen Potentials. Die DPPH-Methode ist schon lange etabliert, jedoch gibt es keine Methode, die für alle Proben geeignet ist. Die hier verwendete Methode bietet den Vorteil, dass sie schnell, kostengünstig und einfach anzuwenden ist und liefert sie Informationen aus erster Hand über die gesamte antioxidative Kapazität der zu untersuchenden Probe (Kedare et al., 2011).

Zur Zytokompatibilität von EGCG und b-LG in verschiedenen Konzentrationen auf Fibroblasten ergab sich in vorliegender Untersuchung, dass nicht die Konzentration von b-LG, sondern die von EGCG entscheidend ist. b-LG hat keinen Einfluss auf die Entwicklung der Zellen. Dies erkennt man deutlich auf den Abbildungen 7, 8, 9 und lichtmikroskopisch auf den Fotos in den Abbildungen 10, 11, 12.

In hoher Konzentration wirkte EGCG zellhemmend und in mittlerer Konzentration unter 256 µg/ml entwickelten sich die Fibroblasten am besten, ersichtlich durch die natürliche Fibroblastenzellenmorphologie mit Dentriten, spindelförmigen Zellkernen, guter Adhäsion in Abwesenheit von runden apoptotischen Zellkernen. Bei Konzentrationen von 1024 µg/ml oder sogar 2048 µg/ml waren lebendige Fibroblasten zu finden. Die Tabellen 7, 8 und 9 stützen dieses Ergebnis: Die Werte der Extinktionen waren nahezu identisch unabhängig von der Konzentration von b-LG. Aufgrund dessen, dass in den Vertiefungen A-G von 2-11 dieselben Zellen und Lösungen vorhanden waren und wir auch dort ähnliche Ergebnisse erhalten haben, lässt sich ein gründlicher und genauer laboratorischer Arbeitsablauf ableiten.

Die Zellreaktion zu den getesteten Materialien musste jedoch auch bestimmt werden, um die Zytokompatibilität vor einer möglichen klinischen Anwendung sicherzustellen. Mikroskopische Bilder halfen, einen qualitativen Einblick in die Auswirkungen von EGCG und b-LG auf Fibroblasten zu erhalten, und zeigten, dass b-LG keinen offensichtlichen Einfluss auf die Zelladhäsion oder -morphologie hatte. Die Erhöhung der EGCG-Konzentration verursachte jedoch signifikante Änderungen in der Zellmorphologie und -anhaftung und erhöhte Mortalität. Dies ist ähnlich zu den Befunden in einer anderen Studie, in der gezeigt wurde, dass sowohl normale als auch keloidale

Fibroblasten unter EGCG-Behandlung dosisabhängig die Proliferation verringern (Park et al., 2008).

Alternativ verringerte der GTE-Einschluss insbesondere in späteren Zeitintervallen die Proliferation, was durch die Zugabe von MPI nur teilweise gemindert wurde. Frühere Arbeiten berichten, dass das MPI, insbesondere sein Bestandteil b-LG, eine mitosefördernde Wirkung auf verschiedene Zelltypen ausübt. Zum Beispiel haben Gillespie et al. (2015) berichtet, dass b-LG (312,5–2,500 µg/ml) die Proliferation von enteroendokrinen Zellen verbesserte, während eine andere Studie Mäusemilzruhezellen untersuchte. Hier wurde ein proliferativer Effekt im Konzentrationsbereich von 50–500 µg/ml über 12 bis 96 Stunden gefunden (Mahmud et al., 2004). Für GTE-Polyphenole wird in der Literatur oft ein positiver Effekt auf den Knochenstoffwechsel berichtet, wie zum Beispiel die erhöhte Reifung der Osteoblasten und die Produktion von mineralisiertem Material (Ko et al., 2009).

Frühere Studien haben gezeigt, dass EGCG und ECG zwei der stärksten radikalfangenden Flavonoide sind, die in GTE vorliegen (Salah et al., 1995; Hirano et al., 2001). Die Zugabe von MPI hatte jedoch einen maskierenden Effekt auf die Abfangaktivität von GTE, was sich in einer Abnahme der prozentualen Hemmung zeigte. Ein solcher Effekt auf proteingebundene Polyphenole wird wahrscheinlich durch Wasserstoffbrückenbindungen vermittelt, die zwischen den Hydroxylgruppen der Catechine und dem Protein auftreten (Kanakis et al., 2011).

Ein ähnlicher Maskierungseffekt wurde für Casein mit Grüntee-Catechinen mittels des Trolox-Äquivalenz-Antioxidationsmittel-Tests beobachtet (TEAC) (Arts et al., 2001) und für b-LG und EGCG-Komplexe unter Verwendung des Ferri-Reduktionsfähigkeits-Plasmas (FRAP) (Zorilla et al., 2011). Die von GTE verursachte Hemmung nimmt nach Zugabe von 50 bzw. 800 µg/ml MPI um etwa 4 bis 7 % ab.

Der Bindungstest zeigte jedoch eine Wechselwirkung von ungefähr 50 % der GTE. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Bindung in der Weise erfolgt, dass antioxidative Gruppen von GTE selbst nach der Interaktion mit dem Protein teilweise verfügbar sind.

Der Hauptnachteil des DPPH-Tests ist die geringe Löslichkeit von DPPH in Wasser, wodurch Ethanol in das System eingeführt wird, das den MPI denaturieren könnte. Es wurde berichtet, dass denaturierte Molkenproteine leichter mit GTE-Catechinen interagieren (Keppler et al., 2014), was zu einer Überschätzung des Maskierungseffekts für native MPI führen könnte. Es sollte weiterhin beachtet werden, dass die hier

(und in der Literatur) verwendeten Tests zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität für eine Stabilisierung des Radikals in Lösung optimiert wurden, was entweder Lösungsmittel wie Ethanol oder Methanol oder die Zugabe verschiedener Salze erfordert. Dies beeinflusst die Analyse der antioxidativen Kapazität von Protein-Polyphenol-Komplexen immer aufgrund der Empfindlichkeit der nicht kovalenten Bindungsreaktionen, die wahrscheinlich sogar durch den Zusatz von Salzen oder geringfügige Änderungen des pH-Werts verändert werden.

Die erwartete antibakterielle Aktivität von GTE wurde in dieser Studie bestätigt, wobei der Einschluss bei Konzentrationen zwischen 128 und 256 µg/ml das Wachstum aller getesteten Bakterien hemmt. Dies stimmt mit ähnlichen Arbeiten auf dem Gebiet überein, bei denen gezeigt wurde, dass GTE-Extrakte verschiedener Formen verschiedene antibakterielle Aktivität aufweisen, z. B. gegen *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. acnes* und *P. aeruginosa* (Lee et al. 2009a; Sharma et al., 2012; Radji et al., 2013). In dieser Studie erleichterte die Zugabe von MPI die antibakterielle Aktivität von GTE gegenüber *P. acnes* LMG 16711, wobei die MHK von 128 auf 32 µg/ml (50 µg/ml MPI) und sogar auf 16 µg/ml (800 µg/ml MPI) abnahm. Ein ähnlicher Trend wurde auch für *S. aureus* ATCC 700699 und *S. epidermidis* ET086 beobachtet, obwohl die MHK-Verringerung viel geringer war und wahrscheinlich innerhalb der Fehlerquote des Tests lag.

Für Gram-negativem *P. aeruginosa* wurde der gegenteilige Effekt beobachtet, wobei die Zugabe von MPI zu einer drastischen Erhöhung der MHK (von 256 auf 1.024 µg/ml) führte. Obwohl die Gründe für die beobachteten Unterschiede zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien unklar bleiben, kann das Vorhandensein einer zweiten (äußereren) Membran in den letzteren, also Gram-negativen, Bakterien eine wichtige Rolle spielen. Es kann angenommen werden, dass proteingebundene Catechine weniger in der Lage sind, mit Peptidoglycan in der Bakterienzellwand zu interagieren, was es diesen Komplexen erschwert, die äußere Membran der Gram-negativen Bakterien zu durchqueren. Bei Gram-negativen Arten liegt auf dem Peptidoglycan noch eine äußere Membran auf. Durch Lipopolysaccharide (LPS) der äußeren Schicht der äußeren Membran sind Gram-negative Arten von einer Polysaccharid-Schicht umgeben. Dieses LPS-Netzwerk erschwert die Interaktion mit den proteingebundenen Catechinen.

EGCG hat auch eine negative Ladung, was möglicherweise ein Grund für die geringere Affinität zu Gram-negativen Bakterien ist (Yoda et al., 2004). Darüber hinaus sei

darauf hingewiesen, dass in einer früheren Arbeit (Radji et al., 2013) *P. aeruginosa* eine MHK doppelt so hoch wie die von *S. aureus* hatte (dh 800 vs. 400 µg/ml), was den Anstieg in unserem Versuch teilweise erklären könnte. Schließlich reagierte der Pilz *C. albicans* überhaupt nicht auf die GTE-Behandlung (MHK > 1.024 µg/ml). Zuvor hatten Hirasawa und Takada (2004) berichtet, dass EGCG einen Anti-*C. Albicans*-Effekt hatte, der mit steigendem pH-Wert und Konzentration zunimmt. In unserer Studie lag der pH-Wert bei 7,4 und die Konzentration war 1.000-fach niedriger, was die fehlende Reaktion erklären könnte. Der Wirkmechanismus des Effekts von GTE auf den Anti-*C. Albicans*-Effekt bleibt dennoch offen.

EGCG bleibt weiterhin ein interessantes Molekül, welches durchaus viel Potential aufweist, weitere Forschungsarbeiten anzuschließen.

Die antioxidative Fähigkeit von EGCG konnte wie in früheren Studien bestätigt werden, jedoch hat die Kombination mit MPI einen negativen Effekt. MPI alleine hat keinen radikalischen Abfangeffekt. EGCG kann weiterhin als Radikalfänger von ROS dienen und für medizinische Produkte verwendet werden, jedoch nicht in Kombination mit MPI, das dazu dienen sollte, EGCG zu stabilisieren.

Die Konzentration von EGCG wird hierbei eine wichtige Rolle spielen, da ab einer Konzentration von 256 µg/ml die Mortalität der Zellen angestiegen ist. Dies deckt sich mit früheren Studien (Park et al., 2008). EGCG muss in niedrigen Dosen > 256 µg/ml verwendet werden. Definitiv konnten die antibakteriellen Eigenschaften bestätigt werden, was EGCG zum Einsatz gegen Bakterien befähigt. Gram-positive Bakterien werden stärker gehemmt, als Gram-negative. Gegenüber Pilzen konnte kein Effekt nachgewiesen werden.

Gute antibakterielle und antioxidative Eigenschaften sind wünschenswerte Eigenschaften für Regenerationsmaterialien und helfen dabei, eine heilende Wunde nach einem Knochenschaden beziehungsweise Knochendefekt zu unterstützen. EGCG bringt diese Eigenschaften mit sich, spielt jedoch in der regenerativen Geweberegeneration bisher keine Rolle. Aktuellere Untersuchungen haben 2015 gezeigt, dass die Zahnfleischentzündung, die sogenannte Gingivitis, und die damit verbundene Plaque-Adhäsion (die Anhaftung von Zahnbelag) mit Mundspülungen auf Basis von grünem Tee genauso effizient reduziert werden können wie mit Chlorhexidin (Radafshar G. et al., 2015). Hierzu muss erwähnt werden, das Chlorhexidin (CHX) der Goldstandard der antimikrobiellen Mundlösungen ist (Varoni et al., 2012) ist. So-

mit bleibt besonders GTE ein interessantes Molekül, welches in der Zahnheilkunde bei der Plaque- Adhäsion und zur Bekämpfung von Bakterien in der Mundhöhle und in Zahnfleischtaschen eingesetzt werden könnte, da es Bakterien hemmen und auf der anderen Seite körpereigene Zellen wie Fibroblasten und Knochenzellen unterstützen kann. Weitere Forschung in dieser Richtung soll die Funktionalisierung von Biomaterialien mit GTE und MPI erzielen.

5 Zusammenfassung

Zur Bestimmung der antioxidativen Fähigkeiten von EGCG und b-LG-Komplexen wurde der DPPH-Test durchgeführt. Hierbei wurde der Abbau des lila DPPH-Radikals in die schwach gelbe nicht-radikale Form, in methanolischer Lösung, spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 515 nm gemessen (Frankel & Meyer, 2000).

Um die antibakteriellen Eigenschaften zu bestimmen, wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) von EGCG allein oder in Kombination von MPI (50 oder 800 µg / ml) auf verschiedenen Bakterien (Gram-positiv, Gram-negativ) ermittelt. Die Platte wurde bei 37°C für 24 Stunden inkubiert und die optische Dichte bei 590 nm in einem ELISA-Reader photometrisch bestimmt.

Die zytotoxischen Eigenschaften von Komplexen aus EGCG und b-LG wurden mittels MTT-Test untersucht. Hierfür wurden 96 Mikrotiterplatten mit Zellen (5×10^3 Fibroblasten), verschiedenen Konzentrationen von EGCG und b-LG besetzt. Der Nachweis der Zellvitalität mittels MTT-Test beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium-Bromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan, wobei diese Farbveränderung photometrisch gemessen werden kann.

In geringeren Konzentrationen können die antimikrobiellen und antioxidativen Eigenschaften von EGCG erhalten werden, während die Zytotoxizität insbesondere durch die b-LG-Aufnahme eingeschränkt wird.

EGCG zeigte eine ausgezeichnete antioxidative Kapazität, die durch die Zugabe von b-LG nicht signifikant beeinflusst wurde, obwohl möglicherweise ein Maskierungseffekt auftrat. Darüber hinaus zeigte EGCG eine antimikrobielle Aktivität gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien, wobei die b-LG-Zugabe diesen Effekt auf verschiedene Arten von Gram-positiven Bakterien potenzierte. Auf die Bakterienstämme zeigte EGCG zytotoxische und supprimierende Wirkungen, insbesondere bei Konzentrationen von ≥ 128 µg/ml.

Für die zytotoxischen Eigenschaften stellte sich heraus, dass die Fibroblasten sich ebenso bei einer Konzentration unter 256 µg/ml am besten entwickelten, die Mortalität stieg hier mit steigender Konzentration des EGCG.

Des Weiteren wurde aufgezeigt, dass ein MTT-Test für eine Versuchsreihe mit EGCG ungeeignet ist.

Diese Ergebnisse machen daher deutlich, dass sowohl b-LG als auch EGCG nützliche Eigenschaften aufweisen, die jedoch aufgrund der Zytotoxizität von EGCG für die Aufnahme in ein Material zur Gewebs- bzw. Knochenregeneration ungeeignet sind.

6 Abstract

Polyphenols are known for their antimicrobial activity, whilst both polyphenols and the globular protein β -lactoglobulin (b-LG) are suggested to have antioxidant properties and promote cell proliferation. These are potentially useful properties for a tissue-engineered construct, though it is unknown if they are retained when both compounds are used in combination. In this study, a range of different microbes and an osteoblast-like cell line (human fetal osteoblast, hFOB) were used to assess the combined effect of: (1) green tea extract (GTE), rich in the polyphenol epigallocatechin gallate (EGCG), and (2) whey protein isolate (WPI), rich in b-LG. It was shown that approximately 20-48% of the EGCG in GTE reacted with WPI. GTE inhibited the growth of Gram-positive bacteria, an effect which was potentiated by the addition of WPI. GTE alone also significantly inhibited the growth of hFOB cells after 1, 4, and 7 days of culture. Alternatively, WPI significantly promoted hFOB cell growth in the absence of GTE and attenuated the effect of GTE at low concentrations (64 μ g/mL) after 4 and 7 days. Low concentrations of WPI (50 μ g/mL) also promoted the expression of the early osteogenic marker alkaline phosphatase (ALP) by hFOB cells, whereas GTE inhibited ALP activity. Therefore, the antioxidant effects of GTE can be boosted by WPI, but GTE is not suitable to be used as part of a tissue-engineered construct due to its cytotoxic effects which negate any positive effect WPI has on cell proliferation.

Veröffentlicht auf pubmed von der KARGER AG, Basel

„Whey Protein Complexes with Green Tea Polyphenols: Antimicrobial, Osteoblast-Stimulatory, and Antioxidant Activities“; Matthew Carson, Julia K Keppler, Gilles Brackman, Daniel Dawood, Marta Vandrovčová, Karim Fawzy El-Sayed, Tom Coenye, Karin Schwarz, Susan A Clarke, Andre G Skirtach, Timothy E L Douglas; Cell Tissues Organs, 2018;206(1-2): 106-117. doi: 10.1159/000494732. Epub 2019 Jan 24.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30677765/>

7 Literaturverzeichnis

- A. FIOCCHI, J. BROZEK, H. SCHÜNEMANN, S. L. BAHNA, A. VON BERG, K. BEYER, M. BOZZOLA, J. BRADSHER, E. COMPALATI, M. EBISAWA, M. A. GUZMAN, H. LI, R. G. HEINE, P. KEITH, G. LACK, M. LANDI, A. MARTELLI, F. RANCÉ, H. SAMPSON, A. STEIN, L. TERRACCIANO, S. VIETHS: World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. In: The World Allergy Organization journal. Band 3, Nummer 4, April 2010, S. 57–161)
- A. STEINBÜCHEL: Mikrobiologisches Praktikum, Springer-Verlag, 2003
- AKTAS, T. PROZOROVSKI, A. SMORODCHENKO, N. E. SAVASKAN, R. LAUSTER, P. M. KLOETZEL, C. INFANTE-DUARTE, S. BROCKE, F. ZIPP: Green tea epigallocatechin-3-gallate mediates T cellular NF-kappa B inhibition and exerts neuroprotection in autoimmune encephalomyelitis. In: Journal of Immunology. November 2004
- ANDREAS PAETZ, Wörterbuch Umweltuntersuchung: Begriffe, Definitionen und Erläuterungen aus den Bereichen Abfall, Boden, Wasser. Beuth Verlag, 2011, ISBN 3410171274, S. 157
- BAI, X. C., LU, D., LIU, A. L., ZHANG, Z. M., LI, X. M., ZOU, Z. P., ZENG, W. S., CHENG, B. L. & LUO, S. Q. 2005. Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF-kappa B ligand expression in osteoblast. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 17497-17506.
- BAUKNECHT, KLAUS-JÜRGEN, BOESE-LANDGRAF, JOACHIM: Wunde, Wundheilung, Wundheilungsstörung, Wundbehandlung, Tetanusprophylaxe. 1988, S. 12
- BELTZ LA., BAYER DK, MOSS AL, SIMET IM, Mechanisms of cancer prevention by green and black tea polyphenols , Anticancer Agents Med Chem. 2006 Sep; 6(5):389-406.
- CHEN, T., YU, W. H., IZARD, J., BARANOVA, O. V., LAKSHMANAN, A. & DEWHIRST, F. E. 2010. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database-the Journal of Biological Databases and Curation*.
- CLARK RAF, Wound repair: overview and considerations; The Molecular and Cellular Biology of wound repair, 2nd edition, New York, 1996; 3-50.
- DEVITT, S. M., C. M. CARTER, R. DIEROV, S. WEISS, R. P. GERSCH, and I. PERCEC. 2015. 'Successful isolation of viable adipose-derived stem cells from human adipose tissue subject to long-term cryopreservation: positive implications for adult stem cell-based therapeutics in patients of advanced age', Stem Cells International, 2015: 146421
- DOUGLAS T.E., A. DOKUPIL, K. RECZYNSKA, G. BRACKMAN, M. KROK-BORKOWICZ, J.K. KEPPLER, ET AL.(2016) Enrichment of enzymatically mineralized gellan gum hydrogels with phlorotanninrichEcklonia cava extract Seanol® to endow antibacterial properties and promote mineralization. Biomed Mater 11: 045015
- E. BAST: Mikrobiologische Methoden: eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken, Spektrum, Akad. Verl., 1999
- EL-SAYED, K. M., S. PARIS, C. GRAETZ, N. KASSEM, M. MEKHEMAR, H. UNGEFROREN, F. FANDRICH, and C. DORFER. 2015b. 'Isolation and characterisation of human gingival margin-derived STRO-1/MACS(+) and MACS(-) cell populations', International Journal of Oral Science, 7: 80-8

- F. JIANG, W. CHEN, K. YI, Z. WU, Y. SI, W. HAN, Y. ZHAO: The evaluation of catechins that contain a galloyl moiety as potential HIV-1 integrase inhibitors. In: *Clin Immunol*. Dezember 2010,
- FRANKEL, E., N., MEYER, A., S. (2000). The problems of using one dimensional methods to evaluated multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* 80(13), 1925-1941.
- G. DREWS: *Mikrobiologisches Praktikum*, Springer-Verlag, 1983
- GARRETT, I. R., BOYCE, B. F., OREFFO, R. O. C., BONEWALD, L., POSER, J. & MUNDY, G. R. 1990. Oxygen-Derived Free-Radicals Stimulate Osteoclastic Bone-Resorption in Rodent Bone In vitro and In vivo. *Journal of Clinical Investigation*, 85, 632-639.
- GEORGE, K., ZAFIROPOULOS, G. G. K., MURAT, Y., HUBERTUS, S. & NISENGARD, R. J. 1994. Clinical and Microbiological Status of Osseointegrated Implants. *Journal of Periodontology*, 65, 766-770.
- GHARIB, A., FAEZIZADEH, Z. & GODARZEE, M. 2013. Therapeutic efficacy of epigallocatechin gallate-loaded nanoliposomes against burn wound infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Skin Pharmacol Physiol*, 26, 68-75.
- GILLESPIE A.L., D. CALDERWOOD, L. HOBSON, B.D. GREEN (2015) Whey proteins have beneficial effects on intestinal enteroendocrine cells stimulating cell growth and increasing the production and secretion of incretin hormones. *Food Chem* 189: 120–128.
- GOSAU, M., HAUPT, M., THUDE, S., STROWITZKI, M., SCHMINKE, B. & BUERGERS, R. 2016. Antimicrobial effect and biocompatibility of novel metallic nanocrystalline implant coatings. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 104, 1571-1579.
- HANS- DIETER BELITZ, Werner Grosch, Peter Schieberle (Hrsg.): Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Edition: 5, Springer, 2001, S. 494.
- HUANG D, OU B, Prior RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agricultural Food Chem* 53:1841–1856.
- J AM COLL NUTR. 2007 Apr;26(2):S 95-102. Acute EGCG supplementation reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease; Widlansky ME1, Hamburg NM, Anter E, Holbrook M, Kahn DF, Elliott JG, Keaney JF Jr, Vita JA.
- JOHNSTONE C., FARLEY A., HENDRY C.; The physiological basics of wound healing; *Nursing standart* 2005; 19 (43), 59-65.
- K. MUNK: *Mikrobiologie*, Spektrum Verlag, 2001
- K. W. LEE, H. J. LEE: The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. In: *BioFactors*. Band 26, Nummer 2, 2006, S. 105–121
- KANAKIS C.D., I. HASNI, P. BOURASSA, P.A. TARANTILIS, M.G. POLISSIOU, H.A. TAJMIR-RIAHI (2011) Milk β -lactoglobulin complexes with tea polyphenols. *Food Chem* 127: 1046–1055.
- KANWAR, TASKEEN M, MOHAMMAD I, HUO C, CHAN TH, DOU QP; Recent advances on tea polyphenols; *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012 Jan 1;4:111-31.
- KAVANAGH K.T., S. ABUSALEM, L.E. CALDERON (2017) The incidence of MRSA infections in the United States: is a more comprehensive tracking system needed? *Antimicrob Resist Infect Control* 6: 34.
- KEDARE B.S., SINGH R.P. (2011); Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay; *J Food Sci Technology*, August 2011; 48(4): 412-422
- KEPPLER J.K., D. MARTIN, V.M. GARAMUS, C. BERTON-CARABIN, E. NIPOTI, T. COENYE, ET AL. (2017) Functionality of whey proteins covalently modified by

- allyl isothiocyanate. 1. Physicochemical and antibacterial properties of native and modified whey proteins at pH 2–7. *Food Hydrocoll* 65: 130–143.
- KEPPLER J.K., D. MARTIN, V.M. GARAMUS, K. SCHWARZ (2015) Differences in binding behavior of (–)- epigallocatechin gallate to β -lactoglobulin heterodimers (AB) compared to homodimers (A) and (B). *J Mol Recognit* 28: 656–666.
- KEPPLER J.K., F.D. SONNICHSEN, P.C. LORENZEN, K. SCHWARZ (2014) Differences in heat stability and ligand binding among β -lactoglobulin genetic variants A, B and C using H-1 NMR and fluorescence quenching. *Biochim Biophys Acta* 1844: 1083–1093.
- KEPPLER, J. K., MARTIN, D., GARAMUS, V. M. & SCHWARZ, K. 2015. Differences in binding behavior of (–)-epigallocatechin gallate to -lactoglobulin heterodimers (AB) compared to homodimers (A) and (B). *Journal of Molecular Recognition*, 28, 656-666.
- KLEIN, S., NURJADI, D., EIGENBROD, T. & BODE, K. A. 2016. Evaluation of antibiotic resistance to orally administrable antibiotics in staphylococcal bone and joint infections in one of the largest university hospitals in Germany: is there a role for fusidic acid? *Int J Antimicrob Agents*, 47, 155-7.
- KONTOPIDIS, G., HOLT, C. & SAWYER, L. 2004. Invited review: beta-lactoglobulin: binding properties, structure, and function. *J Dairy Sci*, 87, 785-96.
- KUHN, D., LAM, W. H., KAZI, A., DANIEL, K. G., SONG, S., CHOW, L. M., CHAN, T. H. & DOU, Q. P. 2005. Synthetic peracetate tea polyphenols as potent proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells. *Front Biosci*, 10, 1010-23.
- LEE J.H., J.S. SHIM, M.S. CHUNG, S.T. LIM, K.H. KIM (2009a) In vitro anti-adhesive activity of green tea extract against pathogen adhesion. *Phytother Res* 23: 460–466.
- LEE Y.L., C.Y. HONG, S.H. KOK, K.L. HOU, Y.T. LIN, M.H. CHEN, ET AL. (2009b) An extract of green tea, epigallocatechin-3-gallate, reduces periapical lesions by inhibiting cysteine-rich 61 expression in osteoblasts. *J Endodont* 35: 206–211.
- LIN- SHIAU SY. 1999, Cancer chemoprevention by tea polyphenols through mitotic signal transduction blockade; *Biochem Pharmacol*. 1999 Sep 15;58(6): 911-5.
- LÜLLMANN RAUCH, Histologie 1998
- MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. ET AL.: "A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates". In: *Clinical Science*, 1993, 84 (4), S. 407–412.
- M. E. WIDLANSKY, N. M. Hamburg u. a.: Acute EGCG supplementation reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. In: *Journal of the American College of Nutrition*. Band 26, Nummer 2, April 2007, S. 95–102.
- M. LORENZ, S. WESSLER, E. FOLLMANN, W. MICHAELIS, T. DÜSTERHÖFT, G. BAUMANN, K. STANGL, V. STANGL: *A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-dependent protein kinase-, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation.* In: *Journal of Biological Chemistry*. Februar 2004
- M. W. LASCHKE, C. SCHWENDER u. a.: Epigallocatechin-3-gallate inhibits estrogen-induced activation of endometrial cells in vitro and causes regression of endometriotic lesions in vivo. In: *Human Reproduction*. Band 23, Nummer 10, Oktober 2008, S. 2308–2318
- MAGALHÃES, L., M., SEGUNDO, M., A., REIS, S., LIMA, J., L., F., C. (2008).

- MANN, B., KUMARI, A., KUMAR, R., SHARMA, R., PRAJAPATI, K., MAHBOOB, S. & ATHIRA, S. 2015. Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 52, 3235-3241.
- MARSHALL, K. 2004. Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicine Review*, 9, 136-156.
- Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytical Chimica Acta*, 613(1), 1-19.
- MOSMANN, T. ET AL (1983) *J. Immunol. Methods* 65, 55-63
- MOULTI-MATI, F., MATI, A., CAPIAUMONT, J., BELLEVILLE, F., LINDEN, G. & NABET, P. 1991. Rôle de la beta-lactoglobuline dans l'activité proliférative du lactosérum. *Lait*, 71, 543-553.
- PELLEGRINI, N. ET AL.: "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay." In: *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 26(9-10), S. 1231–1237.
- PIOTEK S., TOUTENHAHN J.: *Physiologie der Wundheilung*. In H. Lippert: *Wundatlas*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2006, ISBN 3-13-140832-4, S. 28–33.
- POPOV I, LEWIN G (1999) Antioxidative homeostasis: characterization by means of chemiluminescent technique. *Meth Enzymol* 300:437–456.
- RADAFSHAR.G, GHOTBIZADEH M., SAADAT F., MIRFARHADI N., Effects of green tea (*Camellia sinensis*) mouthwash containing 1% tannin on dental plaque and chronic gingivitis: a double-blinded, randomized, controlled trial. *J Investig Clin Dent*. 2017 Feb;8(1). doi: 10.1111/jicd.12184. Epub 2015 Aug 14.
- RADJI M., R.A. AGUSTAMA, B. ELYA, C.R. TJAMPAKASARI (2013) Antimicrobial activity of green tea extract against isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pac J Trop Biomed* 3: 663–667.
- RISTOW M.: Unraveling the truth about antioxidants: mitohormesis explains ROS-induced health benefits. In: *Nature Medicine*. 20, 2014, S. 709–711.
- PANTH N., PAUDELK. R., PARAJULI K.: Reactive Oxygen Species: A Key Hallmark of Cardiovascular Disease. In: *Advances in medicine*. Band 2016.
- SALAH N., N.J. MILLER, G. PAGANGA, L. TIJBURG, G.P. BOLWELL, C. RICEEVANS (1995) Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous-phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys* 322: 339–346.
- SERFERT Y., C. LAMPRECHT, C.P. TAN, J.K. KEPPLER, E. APPEL, F.J. ROSSIER-MIRANDA, ET AL. (2014) Characterisation and use of β -lactoglobulin fibrils for microencapsulation of lipophilic ingredients and oxidative stability thereof. *J Food Engin* 143: 53–61.
- SETZER B., M. BACHLE, M.C. METZGER, R.J. KOHAI (2009) The gene-expression and phenotypic response of hFOB 1.19 osteoblasts to surface-modified titanium and zirconia. *Biomaterials* 30: 979–990.
- SHADEL G. S., HORVATH, T. L.: Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. In: *Cell*. 163, 2015, S. 560–569.
- SHARMA A., S. GUPTA, I.P. SARETHY, S. DANG, R. GABRANI (2012) Green tea extract: possible mechanism and antibacterial activity on skin pathogens. *Food Chem* 135: 672–675.
- SHPIGELMAN, A., ISRAELI, G. & LIVNEY, Y. D. 2010. Thermally-induced protein-polyphenol co-assemblies: beta lactoglobulin-based nanocomplexes as protective nanovehicles for EGCG. *Food Hydrocolloids*, 24, 735-743.

- STEINMANN, J., BUER, J., PIETSCHMANN, T. & STEINMANN, E. 2013. Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea. *Br J Pharmacol*, 168, 1059-73.
- THAIPONG, K., BOONPRAKOB, U., CROSBY, K., CISNEROS-ZEVALLOS, L., HAWKINS BYRNE, D: (2006). Comparision of ABTS, DPPH, FRAP , and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Comp. Anal.*, 19, 669-675.
- TOBI, S. E., GILBERT, M., PAUL, N. & MCMILLAN, T. J. 2002. The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, protects against the oxidative cellular and genotoxic damage of UVA radiation. *International Journal of Cancer*, 102, 439-444.
- TONG, L. M., SASAKI, S., MCCLEMENTS, D. J. & DECKER, E. A. 2000. Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1473-1478.
- VALI, B., RAO, L. G. & EL-SOHEMY, A. 2007. Epigallocatechin-3-gallate increases the formation of mineralized bone nodules by human osteoblast-like cells. *J Nutr Biochem*, 18, 341-7.
- VARONI E., TARCE M. et al. Chlorhexidine (CHX) in dentistry: state of the art. *Minerva Stomatol*, 2012;61:399–419.
- VASEL-BIERGANS A., PROBST, W.: Wundversorgung für die Pflege. Ein Praxisbuch. Wiss. Verlagsges. Stuttgart, Stuttgart 2011, S. 16–22.
- WAUQUIER, F., LEOTOING, L., COXAM, V., GUICHEUX, J. & WITTRANT, Y. 2009. Oxidative stress in bone remodelling and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 15, 468-477.
- X. XIAO, Z. Q. YANG, L. Q. SHI, J. LIU, W. CHEN: [Antiviral effect of epigallocatechin gallate (EGCG) on influenza A virus]. In: Zhongguo Zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica. Band 33, Nummer 22, November 2008, S. 2678–2682
- Y. ZOU, H. CHEN, Y. DENG: Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. In: *Talanta*. Band 57, Nummer 2, Mai 2002, S. 307–316,
- YODA Y., Z.Q. HU, W.H. ZHAO, T. SHIMAMURA (2004) Different susceptibilities of *Staphylococcus* and Gram-negative rods to epigallocatechin gallate. *J Infect Chemother* 10: 55–58.
- ZHAO W.H., Z.Q. HU, S. OKUBO, Y. HARA, T. SHIMAMURA (2001) Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1737–1742.
- ZORILLA R., L. LIANG, G. REMONDETTO, M. SUBIRADE (2011) Interaction of epigallocatechin-3-gallate with β -lactoglobulin: molecular characterization and biological implication. *Dairy Sci Technol* 91: 629–644.

8 Anhang

Die Ethik-Zulassung (Nr. D513/17) wurde vom Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, erteilt. Die Einverständniserklärung wurde von den Patienten eingeholt.

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel EGCG (**Seite 4**)

Quelle:

https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/e4143?lang=de®ion=DE&cm_sp=Insite_-_-caSrpResults_srpRecs_srpModel_989-51-5_-srpRecs3-1

Abbildung 2: Magnetische Sortierung von markierten G-MSCs durch MACS-Technik (**Seite 14**) Quelle:

http://www.miltenyibiotec.com/~/media/Images/Navigation/Products-and-Services/MACS-Cell-Separation/MACS-Technology/neu/flow-chart_positive_selection_indirect_570.ashx

Abbildung 3: Strukturformel DPPH (**Seite 23**)

Quelle: <https://www.dojindo.eu.com/DPPH-Antioxidant-Assay-Kit.aspx>

Abbildung 4: Fibroblasten 2 Tage vor dem Versuch 10-fache Vergrößerung (**Seite 25**)

Abbildung 5: Fibroblasten 1 Tag vor dem Versuch 32- fache Vergrößerung (**Seite 26**)

Abbildung 6: Fibroblasten 1 Tag vor dem Versuch 10-fache Vergrößerung (**Seite 26**)

Abbildung 7: Zellfotografie Platte 1 (**Seite 27**)

Abbildung 8: Zellfotografie Platte 2 (**Seite 28**)

Abbildung 9: Zellfotografie Platte 3 (**Seite 29**)

Abbildung 10: Foto Platte 1 (**Seite 32**)

Abbildung 11: Foto Platte 2 (**Seite 34**)

Abbildung 12: Foto Platte 3 (**Seite 36**)

Abbildung 13: Antioxidative Kapazität (DPPH-Test) verschiedener Konzentrationen von GTE, mit oder ohne Zugabe von 800 oder 50 µg / ml MPI. Alle Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung (n = 3). * p <0,05. (**Seite 38**)

8.2 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Verbrauchsmaterial (**Seite 8**)
Tabelle 2: Geräte (**Seite 9**)
Tabelle 3: Chemikalien, Medien, Puffer, Reagenzien (**Seite 10**)
Tabelle 4: Verdünnungsreihe EGCG 0 – 4096 µg/ml und B-LG 0 µg/ml (**Seite 17**)
Tabelle 5: Verdünnungsreihe EGCG 0 – 4096 µg/ml und B-LG 50 µg/ml (**Seite 18**)
Tabelle 6: Verdünnungsreihe EGCG 0 – 4096 µg/ml und B-LG 800 µg/ml
(Seite 19)
Tabelle 7: photometrische Messung Platte 1 (**Seite 31**)
Tabelle 8: photometrische Messung Platte 2 (**Seite 33**)
Tabelle 9: photometrische Messung Platte 3 (**Seite 35**)
Tabelle 10: MIK von GTE in 3 verschiedenen Konzentrationen von MPI auf verschiedene Bakterien (**Seite 37**)

8.3 Abkürzungsverzeichnis

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EGCG	Epigallocatechingallat
b-LG	beta-Lactoglobulin
GTE	Grüntee-Extrakt
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
min	Minuten
ml	Milliliter
MHK	Minimale Hemm Konzentration
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
MPI	Molkenproteinisolat
WPI	Whey Protein Isolate
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid
OD	Optische Dichte
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Oxidative Spezies
µ	mikro

9. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und dass die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

10. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Prof. Dr. Christof Dörfer, Leiter der Abteilung für Konservative Zahnheilkunde und Parodontologie an der Universität Kiel, dafür bedanken, dass ich die Möglichkeit bekommen habe meine Dissertation in seiner Abteilung zu schreiben.

Des Weiteren möchte ich PD Dr. Karim M. Fawzy Elsayed, Leiter der Forschungseinrichtung der Abteilung für Konservative Zahnheilkunde und Parodontologie sowie Privatdozent an der Universität Kiel, für die herzliche, zuverlässige und kompetente Betreuung meiner Arbeit danken.

Ebenso geht meine große Wertschätzung an Dr. Timothy Douglas, von der Lancaster Universität in Gent, der meine Arbeit mitbetreut hat und die Versuchsprotokolle für die Doktorarbeit erstellte.

Des Weiteren spreche ich Julia Keppler meinen Dank für die gute Zusammenarbeit mit der Abteilung für Lebensmittelforschung der Universität Kiel aus. Sie betreute den antioxidativen Teil.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Mojgan Paymard-Stolz für ihre einmalige, fachliche und menschliche Unterstützung. Sie war stets offen für Fragen und nur mit ihr war es möglich, eine konzentrierte sowie erfolgreiche Forschung durchzuführen.

Ein besonderer Dank gilt natürlich auch meinen Eltern Hany und Efstratia Dawood, meinen Geschwistern und meiner Frau Kristin, die mich auf meinem Weg durch das Studium und die Zeit der Promotion begleitet haben und mir in allen Situationen zur Seite standen und geholfen haben.

11. Publikationen

„Whey Protein Complexes with Green Tea Polyphenols: Antimicrobial, Osteoblast-Stimulatory, and Antioxidant Activities”; Matthew Carson, Julia K. Keppler, Gilles Brackman, Daniel Dawood, Marta Vandrovčová, Karim Fawzy El-Sayed, Tom Coenye, Karin Schwarz, Susan A. Clarke, Andre G. Skirtach, Timothy E. L. Douglas; Cell Tissues Organs, 2018;206(1-2): 106-118. doi: 10.1159/000494732. Epub 2019 Jan. 24.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30677765/>