

AUS DER POLIKLINIK FÜR KIEFERORTHOPÄDIE
DER KLINIKEN UND POLIKLINIKEN FÜR ZAHN-, MUND UND KIEFERHEILKUNDE „HANS MORAL“
DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

DIREKTORIN: PROF. DR. MED. DENT. HABIL. FRANKA STAHL

THERAPEUTISCHE WIRKUNG VON PROPOLIS IN DER ZAHNMEDIZIN AUF FIBROBLASTEN UND OSTEOLASTEN

INAUGURALDISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOKTOR DER ZAHNMEDIZIN
DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON

ANNA BÄHLCKE (GEB. MÜLLER) | GEB. AM 26.09.1992 IN ROSTOCK
AUS BAD DOBERAN

ROSTOCK, 2025

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00005681

Erstgutachter: Prof. Dr. med. dent. Franka Stahl

Einrichtung: Poliklinik für Kieferorthopädie, Universitätsmedizin Rostock

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. dent. Oliver Schierz

Einrichtung: Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik und Werkstoffkunde, Universitätsmedizin Rostock

Drittgutachter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Peter Proff

Einrichtung: Poliklinik für Kieferorthopädie, Universitätsklinikum Regensburg

Jahr der Einreichung: 2025

Jahr der Verteidigung: 2025

Meinen Eltern gewidmet

VORWORT

Zur besseren Lesbarkeit wird in dieser Dissertation die männliche Form bei Personenbezeichnungen und personenbezogenen Substantiven, wie zum Beispiel „Patient“ oder „Proband“, verwendet. Diese Bezeichnungen sind jedoch geschlechtsneutral zu verstehen und umfassen alle Geschlechter, im Einklang mit dem Prinzip der Gleichstellung.

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT.....	2
2.1	PROPOLIS ALS BIENENPRODUKT.....	2
2.2	ENTDECKUNG DER PROPOLIS UND HISTORIE.....	2
2.3	ZUSAMMENSETZUNG UND WIRKUNG DER PROPOLIS	3
2.4	DIE PROPOLIS IN DER ZAHNMEDIZIN.....	12
III.	MATERIAL UND METHODEN.....	16
3.1	AUSWAHL UND ANWENDUNG DER PROPOLISSORTEN UND KONTROLLSUBSTANZEN	16
3.1.1	PROPOLIS	16
3.1.2	KONTROLLSUBSTANZEN.....	18
3.2	AUSWAHL DER ZELLINIEN UND DEREN KULTIVIERUNG.....	19
3.3	TESTVERFAHREN.....	22
3.3.1	HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY	22
3.3.2	IMMUNHISTOCHEMIE	24
3.3.3	BIOCHEMISCHE ASSAYS.....	25
3.3.4	METHODEN ZUR ANALYSE DES ZELLMETABOLISMUS	28
3.4	STATISTISCHE AUSWERTUNG	30
IV.	ERGEBNISSE.....	31
4.1	HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY	31
4.2	IMMUNHISTOCHEMIE	32
4.3	BIOCHEMISCHE ASSAYS.....	34
4.4	METHODEN ZUR ANALYSE DES ZELLMETABOLISMUS	43
V.	DISKUSSION.....	49
VI.	THESEN	59
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	61
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	62
IX.	ANHANG	80

ABB. 1: STRUKTURFORMEL VON KAFFEESÄURE-PHENETHYLESTER(CAPE) MIT SUMMENFORMEL $C_{17}H_{16}O_4$.	5
ABB. 2: STRUKTURFORMEL VON PINOBANKSIN (PB) MIT DER SUMMENFORMEL $C_{15}H_{12}O_5$.	8
ABB. 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES VERSUCHSAUFBAUS.	25
ABB. 4: HPLC-CHROMATOGRAMM VON PROPOLIS A UND B SOWIE VON PB UND CAPE.	31
ABB. 5: IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG (+) VON ÖSTROGENREZEPTOR- α (ER- α), ÖSTROGENREZEPTOR- β (ER- β) UND VIMENTIN (VT) IN FIBROBLASTEN.	32
ABB. 6: IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG (+) VON ÖSTROGENREZEPTOR- α (ER- α) UND ÖSTROGENREZEPTOR- β (ER- β) IN OSTEOLASTEN.	33
ABB. 7: PROLIFERATION DER FIBROBLASTEN (N = 4) NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS.	35
ABB. 8: PROLIFERATION DER OSTEOLASTEN (N = 1) NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS.	36
ABB. 9: DIE VIABILITÄT DER FIBROBLASTEN (N = 4) NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS.	37
ABB. 10: DIE VIABILITÄT DER OSTEOLASTEN (N = 1) NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS.	38
ABB. 11: DIE APOPTOSE DER FIBROBLASTEN (N = 3) NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS.	39
ABB. 12: DIE APOPTOSE DER OSTEOLASTEN (N = 1) NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS.	40
ABB. 13: ZYTOTOXIZITÄT DER FIBROBLASTEN (N = 4) NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS.	41
ABB. 14: ZYTOTOXIZITÄT DER OSTEOLASTEN (N = 1) NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS.	42
ABB. 15: GEHALT DER GLUKOSE IM MEDIUM VON FIBROBLASTEN (N = 1) NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS.	43
ABB. 16: GEHALT DER GLUKOSE IM MEDIUM VON OSTEOLASTEN (N = 1) NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS.	44
ABB. 17: GEHALT DER LAKTATKONZENTRATION IM MEDIUM VON FIBROBLASTEN (N = 1) NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS.	45
ABB. 18: GEHALT DER LAKTATKONZENTRATION IM MEDIUM VON OSTEOLASTEN (N = 1) NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS.	46
ABB. 19: DARSTELLUNG DES PH-WERTES DER FIBROBLASTEN IM MEDIUM NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS.	47
ABB. 20: DARSTELLUNG DES PH-WERTES DER OSTEOLASTEN IM MEDIUM NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS.	48

TAB. 1: ENDKONZENTRATIONEN VON ZELLEN PRO WELL FÜR DIE EINZELNEN ZELLTESTS.....	21
TAB. 2: BEDINGUNGEN FÜR DIE HPLC-MESSUNG.....	23

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AG	Antigen
AK	Antikörper
BrdU	Bromdesoxyuridin
CAPE	Kaffeesäure-Phenethylester
COX	Cyclooxygenase
CPP-ACP	Casein-Phosphopeptid amorphes Calciumphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
ER- α	Estrogenrezeptor-Alpha
ER- β	Estrogenrezeptor-Beta
ESTR	Estradiol
FKS	fetales Kälberserum
IL	Interleukin
GOD	Glukose Oxidase
GTF	Glycosyltransferase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MCF-7	Mammakarzinom-Zelllinien
MDA-231	Mammakarzinom-Zelllinien
MRSA	methicillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NF- κ B	nukleare Faktor kappa B
PB	Pinobanksin
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDL	Parodontalligament
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
TAM	Tamoxifen
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha
TNT	Titanoxidnanotubes

I. EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG

Das Interesse an der Verwendung von Naturprodukten für den Menschen ist in den letzten Jahrzehnten stetig gewachsen. In der Medizin besteht ein zunehmendes Interesse an natürlichen Produkten, die in vielfältigen Bereichen zum Einsatz kommen. Zudem werden immer mehr Studien durchgeführt, um wissenschaftlich die Wirkung und Verwendbarkeit von Naturstoffen zu untersuchen.

Dieser Trend ist auch in der Zahnmedizin zu erkennen. Dabei geht es vor allem um die Verwendung von Inhaltsstoffen natürlichen Ursprungs anstelle von künstlichen Zusätzen. Der Fokus der dentalen Produkte richtet sich unweigerlich auf Problemstellungen, wie die Verbesserung der Mundgesundheit durch Plaqueeliminierung, Entzündungs- und Schmerzfreiheit sowie die Kariesbekämpfung. Im Hinblick darauf rückte Propolis als Naturheilstoff in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der zahnmedizinischen Forschung.

Propolis ist ein Naturprodukt, das von Bienen aus ihrem Speichelsekret und ausgewähltem Pflanzenmaterial hergestellt wird. Insbesondere ihre antibakteriellen, antimykotischen, antiviralen, krebshemmenden, antioxidativen und entzündungshemmenden Eigenschaften fanden in verschiedensten Veröffentlichungen Bestätigung [22, 157, 175]. Dieses breite pharmakologische Spektrum ist auf die komplexe Zusammensetzung der Propolis zurückzuführen. Sie besteht aus 50 % Harz, 30 % Wachs, 10 % ätherischen Ölen, 5 % Pollen und 5 % anderen Substanzen, die Mineralien und organische Verbindungen, wie Phenolsäuren, Flavonoide, Terpene, Steroide, aromatische Aldehyde, Fettsäuren, Aminosäuren, Vitamine und Enzyme umfassen [15]. In der komplexen Zusammensetzung der Propolis ließen sich bislang mehr als 500 Verbindungen identifizieren [120].

Die Zusammensetzung der Propolis hängt weiterhin stark von ihrer geografischen Herkunft ab. In der Literatur wurde vor allem die Wirkung von Propolis untersucht, welche aus Brasilien, Asien und dem Nahen Osten stammt. Die dort vorherrschenden klimatischen Bedingungen sind nicht mit der Vegetation in Deutschland vergleichbar. Daher unterscheidet sich die Propolis aus Deutschland in ihrer chemischen Zusammensetzung und demzufolge auch im Wirkspektrum von bisher untersuchter Propolis aus anderen Klimazonen der Erde.

Da es in der Literatur keine Studien zur prinzipiellen Wirkung von Propolis aus Deutschland gibt, war es das Ziel dieser Studie, zwei Arten von Propolis aus Deutschland zu vergleichen und deren konzentrationsabhängige Wirkung an dentooral relevanten Zellen zu untersuchen. Die Ergebnisse sollen als Grundlage für weiterführende Untersuchungen dienen, um eine zukünftige Einsetzbarkeit von Propolis aus Deutschland in der Zahnmedizin zu prüfen.

II. LITERATURÜBERSICHT

Nachfolgend wird ein Überblick über die Rolle der Bienen als Propolisproduzent und die historische Entwicklung von Propolis für den Nutzen in der Medizin gegeben. Des Weiteren wird auf die vorhandenen Forschungsarbeiten zur Wirkung von Propolis eingegangen. Abschließend befasst sich das Kapitel mit den bisher zahnmedizinisch relevanten wissenschaftlichen Studien zum Thema Propolis.

2.1 PROPOLIS ALS BIENENPRODUKT

Die bevorzugt von Bienen gesammelten Blütenbestandteile für die Herstellung von Propolis stammen von verschiedenen Baumarten, wie Pappeln, Weiden, Birken, Ulmen, Erlen, Buchen, Nadelbäumen und Kastanien [70]. Die Bienen mischen sie mit ihren Speichelsekreten aus den Hypopharynxdrüsen, um die Propolis anschließend im Bienenstock als Kittharz und Biozid zu verwenden [144]. Das harzige, lipophile Material ist im erwärmten Zustand klebrig und weich, jedoch hart und zerbrechlich, wenn es erkaltet. Zudem verfügt es über einen angenehmen, aromatischen Geruch und verschiedene Farbgebungen, wie Braun, Grün und Rot [7].

Durch ihre versiegelnden Eigenschaften schützt die Propolis den Bienenstock vor widrigen Witterungsbedingungen und verhindert das Eindringen von anderen Insekten, Nagetieren und Raubbienen. Wenn es zu einer Invasion des Stockes kommen sollte, wird durch die Umhüllung mit Propolis der fäulnisverursachenden Zersetzung der getöteten Eindringlinge vorgebeugt [23]. Das verhindert den Ausbruch von bakteriellen Infektionen und Epidemien im Bienenstock. Propolis hält die aseptischen Bedingungen und die optimale Temperatur im Bienenstock aufrecht. Im Bienenstock wirkt Propolis daher als Biozid, um Bakterien, Pilze und Viren abzutöten und gewährleistet eine gesunde Bienenpopulation. Propolis fungiert als eine Art natürliches Antibiotikum der Bienen und scheint gegen den Großteil der potenziellen Krankheitserreger effektiv zu sein [217]. Außerdem begrenzt es als harzige Kittsubstanz das Entweichen von Wasser und hält die Luftfeuchtigkeit im Bienenstock konstant [173].

2.2 ENTDECKUNG DER PROPOLIS UND HISTORIE

Die Verwendung von Propolis durch den Menschen hat eine lange Geschichte, die mit der Entdeckung des Honigs und mit dem Plündern der Bienenstöcke vor etwa 10.000 Jahren begann. Weitaus jünger ist die Domestizierung von Wildbienen, welche seine Ursprünge im alten Ägypten hat. In dem damals vergleichsweise ausgedehnt bewässerten Land voller

blühender Pflanzen war die Honigbienenhieroglyphe 3100 v. Chr. als eines der vielen bedeutsamen Symbole des Landes bekannt [45]. Den Stellenwert der Bienen zu der damaligen Zeit verdeutlicht der Pharaontitel "Bienenkönig" [45]. Früh fand Propolis Verwendung sowohl beim Einbalsamierungsprozess als auch für die Konservierung und bei der Heilung von Infektionen, Erkältungen, Halsentzündungen sowie dem Heilen von Wunden und Verbrennungen [48]. Das Wort Propolis wurde erstmals 350 v. Chr. durch Aristoteles erwähnt und leitet sich von den griechischen Wörtern "pro" (vor) und "polis" (Stadt) ab. Dieser Name „vor der Stadt“ sollte den schützenden Charakter der Substanz widerspiegeln. Schon v. Chr. berichteten viele weitere griechische und römische Autoren über die Anwendung von Propolis, dem so genannten dritten Naturprodukt der Bienen neben Honig und Wachs [94]. Hippokrates, der als Urvater der Medizin gilt, erkannte die heilenden Eigenschaften von Propolis und soll es unter anderem für die Behandlung von infizierten Wunden verwendet haben [50]. Über die Jahrhunderte hinweg fand Propolis vielfältig Verwendung in Form von Salben und Tinkturen. Die Erforschung der Propolis war eng mit der Entwicklung der Chemie verknüpft. Über die chemische Zusammensetzung von Propolis fanden am Anfang des 20. Jahrhunderts bereits erste wissenschaftliche Untersuchungen statt [105]. Es wurden erste Versuche zur Bestimmung der Zusammensetzung von Propolis mit Hilfe von einfacher Fraktionierung durchgeführt. Einer der frühesten Berichte ist der der deutschen Wissenschaftler Dieterich und Helfenberg in dem sie ihre Extraktionsmethoden vorstellten und Propolisbestandteile mit Hilfe von Alkohol, Chloroform und Ether auftrennten [54].

2.3 ZUSAMMENSETZUNG UND WIRKUNG DER PROPOLIS

Alle exogenen Einflüsse auf den Lebensraum des Bienenvolkes sind Faktoren für Variationen in der chemischen Zusammensetzung der Propolis [7]. Die Literatur zeigt, dass die chemische Zusammensetzung von Propolis schwer zu standardisieren ist, da sie von verschiedenen phytogeografischen Merkmalen abhängt [13, 179, 208]. Unter anderem wird die Propolisherstellung durch die Vegetation, die Jahreszeiten und die Umweltbedingungen des Sammelortes der Bienen beeinflusst, da die Bienen in ihren verschiedenen Lebensräumen unterschiedliche Pflanzen auswählen [12].

Die Propolis stammt aus verschiedenen Ländern und besitzt abhängig von den geographischen Merkmalen der Regionen unterschiedlich wirkende Verbindungen, wie unter anderem Phenolsäuren, Flavonoide, Terpene, Steroide, aromatische Aldehyde, Fettsäuren, Aminosäuren, Vitamine und Enzyme [15]. So sind Lignane typische Verbindungen der Propolis aus wärmeren Klimazonen, wie Brasilien, Kuba und Mexiko. Wiederum lassen sich

höhere Gehälter an Phenolsäuren vorzugsweise in europäischer und asiatischer Propolis nachweisen [43].

Die komplexe Zusammensetzung der Propolis, die mehr als 500 Verbindungen beinhalten kann [5], hat Auswirkungen auf ihre biologische Aktivität und ihre Farbenvielfalt [170].

Brasilien gehört zu den führenden Propolisproduzenten der Welt [42]. Die brasilianische Propolis lässt sich in die bekannte grüne, rote und die weniger erforschte braune Propolis unterteilen. Für die grüne Propolis, welche bisher das höchste wissenschaftliche und kommerzielle Interesse weckte, sammeln die Bienen hauptsächlich von Knospen der Pflanze *Baccharis dracunculifolia*, die vor allem im Südosten Brasiliens heimisch ist [120]. Ihre Besonderheit liegt in der hohen Konzentration von Phenylpropanoiden (z. B. Artepillin C) und Diterpenen, während Flavonoide nur einen geringen Anteil ausmachen [12, 200]. Die rote Propolis weist einen hohen Gehalt an Phenolsäuren und Flavonoiden auf und stammt von der *Dalbergia ecastophyllum*, eine Pflanze die vor allem in den nordöstlichen Mangrovenwäldern Brasiliens anzutreffen ist [200]. Die Verbindungen Pinocembrin und Quercetin gelten als Biomarker der brasilianischen roten Propolis [49]. Es existiert eine weitere rote Propolisart, die aus den westlichen Regionen Kubas stammt und von dem Blütenharz der *Dalbergia ecastophyllum* gewonnen wird. Ihre wichtigsten chemischen Bestandteile sind die Isoflavonoide [46, 152]. Aus ähnlich warmen klimatischen Bedingungen stammt die mexikanische Propolis, deren wichtigste pflanzliche Quelle die Pappelart *Populus fremontii* ist und die sich vor allem aus Pinocembrin zusammensetzt [79].

Unterschiede in den Wirkungen von Propolis aus lateinamerikanischen Ländern stellten Bruno J. Conti et al. fest [42]. Sie analysierten immunmodulatorische Prozesse von kubanischer, mexikanischer und brasilianischer Propolis anhand von Monozyten und deren Entzündungsmediatoren [42]. Die kubanische Propolis stimulierte die Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha (TNF- α) Produktion und hemmte die Interleukin-10 (IL-10) Produktion, während die mexikanische Propolis die TNF- α -Produktion hemmte und die IL-10-Produktion stimulierte. Die brasilianische Propolis stimulierte sowohl die TNF- α -Produktion als auch die IL-10-Produktion [42]. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass die brasilianische Propolis eine bessere entzündungshemmende Wirkung als andere lateinamerikanische Propolisarten besitzt.

Die Pappelpropolis, der auch die untersuchten Propolisproben der vorliegenden Studie angehören, ist eine weitere Propolisart, die durch spezifische Inhaltsstoffe gekennzeichnet ist. Knospenexsudate von Pappeln sind die Hauptquelle und typisch für die Propolis der gemäßigten Klimazone von Europa, Neuseeland, Nordamerika und einigen Regionen Asiens [14]. Die biologisch aktiven Bestandteile sind Flavonoide, Phenolsäuren und deren Ester [181]. In neuseeländischer Propolis liegt der Flavonoidgehalt bei 70 % und besteht vor allem aus Pinobanksin und Pinocembrin [121], was wesentlich höher ist als bei Proben aus Brasilien

oder China [21]. Eine weitere Studie unterstreicht den hohen Flavonoidgehalt und bestätigt eine damit einhergehende höhere antioxidative Aktivität der europäischen Pappelpropolis gegenüber der brasilianischen Propolis [65].

Ein relativ neuer Typ der europäischen Propolis ist der mediterrane Typ, der sich durch eine hohe Konzentration an Diterpenoiden auszeichnet und in subtropischen Regionen wie Griechenland [31, 155], Malta [154] und der Türkei [58, 178, 197] beheimatet ist. Als Hauptquelle dient hierbei das Harz der *Cupressus sempervirens*, welches hohe Mengen an Diterpenen aufweist [178, 197].

Eine Gemeinsamkeit der verschiedenen Propolisarten besteht im Vorhandensein von **Kaffeesäure-Phenethylester (CAPE)**. CAPE stellt einen der am besten erforschten Inhaltsstoffe der Propolis dar und wird im nächsten Abschnitt genauer beschrieben. Die Substanz CAPE gehört zu den Estern der Phenolsäure und ist einer der Hauptbestandteile der Propolis aus der gemäßigten Klimazone, zu der auch das Gebiet der BRD zählt [26, 80]. In Abb. 1 ist die zugehörige Strukturformel veranschaulicht.

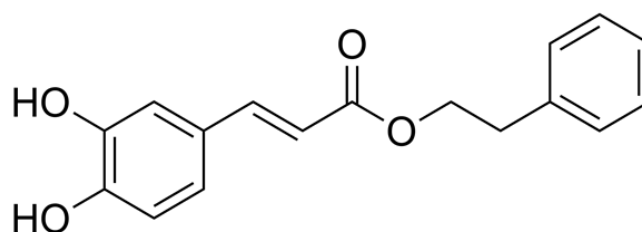


ABB. 1: STRUKTURFORMEL VON KAFFEESÄURE-PHENETHYLESTER(CAPE) MIT SUMMENFORMEL $C_{17}H_{16}O_4$.

Der besondere chemische Aufbau bzw. die Hydroxylgruppen innerhalb des Catecholrings sind verantwortlich für die verschiedenen Wirkungen von CAPE [203]. CAPE zeigte ein breites Spektrum an biologischer Aktivität. Unter anderem konnten antioxidative [26, 82, 132, 135, 174, 184, 203, 211], antikarzinogene [34, 36, 37, 39–41, 52, 71, 83, 87, 101, 109–111, 131, 138, 143, 159, 166, 195, 207], antiinflammatorische [35, 47, 56, 84] und antimikrobielle [64, 92, 98, 196] Eigenschaften nachgewiesen werden.

Uçan et al. untersuchten die Auswirkungen von CAPE auf die Knochenregeneration und die fibrotische Heilung in einem Rattenmodell. Nach Erzeugung eines experimentellen Knochendefektes wurde CAPE (10 µmol/kg) durch tägliche intraperitoneale Injektion verabreicht. Die Knochenregeneration, die fibrotische Heilung und die Osteoblastenaktivität wurden histopathologisch untersucht. CAPE verbesserte signifikant die Heilung von Knochendefekten *in vivo*, was unter anderem auf die Reduzierung des oxidativen Stresses durch CAPE während der frühen Knochenheilung zurückzuführen ist [191]. Eine Studie berichtet über das antioxidative Potenzial von CAPE in verschiedenen Hepatotoxizitätsmodellen. Unter anderem hemmte CAPE die reaktive Sauerstoffspezies-Produktion und förderte die Aktivität antioxidativer Enzyme, was auf eine antioxidative und hepatoprotektive Wirkung hindeutete [82].

CAPE gilt durch seine antioxidative Wirkung auch als die charakteristische Antitumorsubstanz in der Propolis [167]. In hohen Konzentrationen (50-80 µM) ist CAPE ein vielfach nachgewiesener Inhibitor des nukleären Faktors kappa B (NF-κB) und unterdrückt die Proliferation mehrerer menschlicher Krebszelllinien, darunter Brust-, Prostata-, Lungen- und Gebärmutterhalskrebszellen [167]. Wu et al. konnten die antikarzinogenen Effekte von CAPE *in vitro* und *in vivo* an Mammakarzinom-Zelllinien (MCF-7 und MDA-231) nachweisen, ohne dass CAPE dabei die normalen Zellen beeinträchtigte [206]. CAPE hemmte das Wachstum von MCF-7- und MDA-231-Zellen, indem es die Expression von Wachstums- und Transkriptionsfaktoren einschließlich NF-κB reduzierte und die Apoptose der Tumorzellen induzierte [206]. *In vitro* zeigte sich, dass 20 µM CAPE bei MCF-7-Zellen und MDA-231-Zellen, aufgrund einer erhöhten Proteinexpression von p21 und p27 und der kombinierten Wirkung von Zellzyklusregulatoren, einen Zellzyklusstillstand induzierten. In Bezug auf Apoptose wurde ein signifikanter Anstieg von Zellen beobachtet, die mit 40 µM CAPE behandelt wurden, obwohl MDA-231-Zellen als resistent gegen Apoptose gelten. Eine erhöhte Apoptose zeigten auch die mit 20 µM CAPE behandelten MCF-7-Zellen. Zusammenfassend legen diese Ergebnisse von Wu et al. nahe, dass die CAPE-induzierte Hemmung des Tumorwachstums auf eine Verlangsamung des Zellzyklus und eine Zunahme der Apoptose zurückzuführen ist.

Aus zahnmedizinischer Sicht sind vor allem die antikarzinogenen Eigenschaften von CAPE gegenüber oralen Plattenepithelkarzinomen hervorzuheben, die zu den häufigsten Malignomen der Mundhöhle gehören [213].

So zeigten Ying-Yu Kuo et al., dass CAPE in einer Konzentration von 5-100 µM die Zellproliferation und Koloniebildung von TW2.6-Zellen des menschlichen oralen Plattenepithelkarzinoms unterdrücken, ohne die Proliferation von normalen menschlichen oralen Fibroblasten negativ zu beeinflussen [101]. CAPE kann die NF-κB-Aktivierung in TW2.6-Zellen wirksam hemmen. Schon bei niedrigen Dosen von 10 µM hemmte CAPE die

Hochregulation vieler NF- κ B-Zielgene [41]. NF- κ B spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulierung der zellulären Antwort auf Stress und der Immunantwort auf Infektionen [151]. Eine Dysregulation von N- κ B wird mit Krebs, Entzündungen und Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. Ein weiterer nachgewiesener Effekt von CAPE ist die entzündungshemmende Wirkung, die vor allem durch Hemmung der NF- κ B, p38 Mitogen-Activated Protein Kinase und c-Jun N-terminal Kinase 1/2 vermittelt wird [25].

Sachiko Juman et al. berichten ebenfalls von den entzündungshemmenden Eigenschaften von CAPE und bewiesen mit 10 μ M CAPE behandelten Makrophagen eine Inhibition der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , TNF- α und Monocyte Chemoattractant Protein-1 [86]. Die NF- κ B-Inhibition durch CAPE hat zudem positive Auswirkungen auf die Therapie von Asthma und andere allergische Erkrankungen, da die Produktion von Zytokinen und Chemokinen durch menschliche Monozyten abgeleitete dendritische Zellen gehemmt wird [202].

Ein weiterer Mechanismus von CAPE mit antiinflammatorischer Wirkung beruht auf der Hemmung der Freisetzung von Arachidonsäure aus der Zellmembran [57, 82]. Außerdem hemmt es die COX-1- und COX-2-Aktivität und unterdrückt die Aktivierung der Gene, welche für die COX-2-Expression verantwortlich sind [108, 122, 125, 126, 140], was wiederum eine Entzündung inhibiert. Zudem führte eine CAPE-vermittelte Hemmung der T-Zell-Aktivierung zu einer immunsuppressiven Wirkung [160].

Einige Studien beschreiben die antimikrobielle Aktivität von CAPE gegen *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae* [64, 92, 98, 196]. Im Hinblick auf die antibakterielle Wirkung untersuchten Lee et al. [107] medizinisches Nahtmaterial, das sie mit CAPE benetzten. Außer den mechanischen Eigenschaften und der biologischen Abbaubarkeit wurde auch die freigesetzten Konzentrationen von CAPE aus dem Nahtmaterial gemessen. Das Ziel war die Maximierung der antimikrobiellen Wirkung gegenüber *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* (DH5 α). Die Ergebnisse zeigten, dass die maximale Hemmung des *Escherichia coli* Wachstums bei über 60,6 μ M CAPE erreicht wurde, da dann eine Schädigung der bakteriellen Außenmembrankomponenten eintrat. Das CAPE beladene Nahtmaterial erreichte gegen *Staphylococcus aureus* eine maximale antibakterielle Wirkung ab einer Konzentration von 115,5 μ M. Hier war eine deutliche Hemmzone um das CAPE beladene Nahtmaterial auf Agaragarplatten nach 24 h sichtbar. Die antibakterielle Wirkung gegenüber *Staphylococcus aureus* wurde auf die Synthese reaktiver Sauerstoffspezies zurückgeführt, welche die äußere Membran von Bakterien zerstören.

Ein weiterer Hauptbestandteil von Propolis sind die Flavonoide, zu denen auch **Pinobanksin (PB)** gehört. Sie machen etwa 25-30 % des Trockengewichtes von Propolis aus [17] und gelten auch als eine ihrer aktiven Komponenten [76]. Sie sind neben CAPE verantwortlich für die antioxidativen, antibakteriellen, antiviralen, antimykotischen, antikariogenen und entzündungshemmenden Eigenschaften der Propolis [146]. Zu den Flavonoiden der Propolis aus der gemäßigten Klimazone gehören unter anderem Chrysin, Galangin, Pinocembrin und PB [91]. Abb. 2 zeigt die Strukturformel von PB.

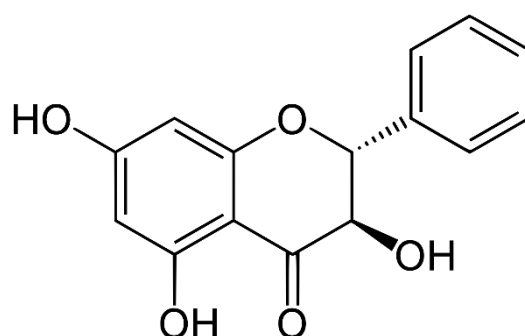


ABB. 2: STRUKTURFORMEL VON PINOBANKSIN (PB) MIT DER SUMMENFORMEL $C_{15}H_{12}O_5$.

Im Gegensatz zu CAPE finden sich nur wenige Studien, die das Propolisflavonoid PB als Reinsubstanz *in vitro* und *in vivo* untersucht haben [6, 62].

Alday et al. lieferten einen ersten Bericht über die Bioaktivität von PB und einigen seiner Esterderivate als Apoptose-Induktoren. Es konnte eine antiproliferative Aktivität auf eine B-Zell-Lymphom-Zelllinie durch Apoptose-Induktion mittels PB nachgewiesen werden. PB (52,1 μ M oder 14,2 μ g/ml) hatte hierbei einen stärkeren apoptotischen Effekt als seine Esterderivate. Der Effekt wurde hierbei durch Modulationen des mitochondrialen Membranpotentials und durch die Aktivierung des Caspasen-Signalweges vermittelt [6].

Weitere Untersuchungen konnten PB in Propolis nachweisen [13]. Die PB-haltige Propolis zeigte unter anderem eine Wirksamkeit gegenüber mikrobiellen Krankheitserregern. *In vitro* zeigten Zhang et al. die antibakterielle Aktivität eines chinesischen Propolisextraktes, in dessen Zusammensetzung PB nachweisbar war. Die Wirkung gegenüber *Staphylococcus aureus* und dem methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) wurde auf die Zerstörung deren Zellwand und deren Zellmembran zurückgeführt, was das Wachstum der Bakterien hemmt. Die minimalen Hemmkonzentrationen des Propolisextraktes betrugen hierbei 100 μ g/ml für *Staphylococcus aureus* und 50 μ g/ml für MRSA. Darüber hinaus wurden durch den PB-haltigen Propolisextrakt mehrere spezifische Gene herunterreguliert, die mit der

bakteriellen Biofilmbildung, der Autolyse, der Zellwandsynthese und der bakteriellen Virulenz bei MRSA in Verbindung stehen [214].

Auch in Bezug auf die Zahnmedizin gibt es Erkenntnisse zu dem Wirkspektrum von PB-haltiger Propolis. Unter anderem beobachteten Celerino de Moares Porto et al. mit ihren PB-haltigen Propolisextrakten, die als Zahnkavitätesinfektion Verwendung fanden, eine antimikrobielle Aktivität gegenüber den kariogenen Bakterien *Streptococcus mutans* und *Lactobacillus acidophilus* sowie eine antimykotische Aktivität für *Candida albicans* [32]. Des Weiteren wiesen Arafa et al. PB in ihren Propolisextrakten nach und schrieben ihm eine positive Wirkung bei der Therapie von aphthösen oralen Ulzerationen zu [8]. In der Studie wurde eine neue Generation von oromukosalen Klebefilmen (mukoadhäsive orale Folien) getestet, die Propolis zur kontrollierten Arzneimittelabgabe nutzten. Die Propolis beladenen Klebefilme führten bei Patienten mit aphthösen oralen Ulzerationen zu sehr zufriedenstellenden Ergebnissen in Bezug auf die Reduzierung der Ulzérationsgröße, die Schmerzlinderung und die verkürzte Heilungszeit.

Wie die bereits genannten Wirkungen von CAPE und PB hat die Propolis durch ihre komplexe Zusammensetzung noch weitere wichtige bioaktive Effekte. Die antioxidativen, entzündungshemmenden, krebshemmenden und antibakteriellen Eigenschaften der Propolis fanden in verschiedensten Veröffentlichungen ihre Bestätigung.

Antioxidative Wirkung

Die in Propolis enthaltenen Polyphenolverbindungen, zu denen auch die Flavonoide und Phenolsäuren gehören, besitzen eine besonders starke antioxidative Aktivität, welche sowohl *in vitro* [104, 210] als auch *in vivo* [136] bestätigt wurden. Oxidativer Stress ist mitverantwortlich für das Auftreten einer Vielzahl menschlicher Erkrankungen. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) schädigen Zellstrukturen, indem sie Veränderungen an Zellmembranen, Proteinen und Enzymen verursachen. Dadurch können ROS das Erbgut affizieren, Alterungsprozesse beschleunigen und Arteriosklerose begünstigen. Es wird angenommen, dass der durch ROS ausgelöste oxidative Stress an der Entstehung von Krebs, für Störungen des Immunsystems sowie bei rheumatischen und neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt ist. Der antioxidative Effekt von Propolis bzw. den enthaltenen Polyphenolen beruht auf der Hemmung der ROS-produzierenden Enzyme. Des Weiteren chelatisieren sie Metallionen, die am Prozess der Bildung freier Radikale beteiligt sind [75, 153]. Flavonoide und Phenolsäuren sind aufgrund ihres niedrigen Redoxpotentials thermodynamisch in der Lage mit hochreaktiven Formen von

Sauerstoff zu reagieren indem sie ein Wasserstoffatom spenden [153, 171]. Sie können dadurch ROS abfangen und unterbrechen die Reaktionskaskade, die zur Lipidperoxidation und dadurch zur Zellmembranschädigung führt. Außerdem haben Polyphenolverbindungen synergistische Wirkungen mit anderer Antioxidantien, wie Ascorbinsäure (Vitamin C) und Tocopherol (Vitamin E) [153].

Im Zusammenhang mit dem antioxidativen Effekt wurde berichtet, dass Propolis das Wachstum und die Regeneration von Hautgewebe stimuliert indem es die Kollagenproduktion moduliert [27, 43]. In mit Propolis behandelten Verbrennungswunden konnten niedrigere Konzentrationen freier Radikale festgestellt werden [137]. Die Propolis reduzierte den oxidativen Stress in Wunden, indem sie die Expression von Kollagen und Genen, die mit Antioxidantien im Zusammenhang stehen, förderte und die Zellschäden in Fibroblasten durch die Unterdrückung der Produktion von freien Radikalen abmilderte [27].

Antiinflammatorische Wirkung

Die entzündungshemmende Wirkung von Propolis hängt mit ihren antioxidativen Eigenschaften zusammen [210]. Propolis kann Entzündungsreaktionen kontrollieren, indem es die Produktion entzündungsfördernder Hormone beeinflusst. Unter dem Einfluss von Polyphenolen findet eine verminderte Synthese von Entzündungsmediatoren, wie Prostaglandin, Thromboxan, Leukotrien und Stickstoffmonoxid, statt [81, 130, 160]. Des Weiteren hemmen Flavonoide die Expression der IL-6, TNF- α und IL-13 in aus dem Knochenmark stammenden Mastzellen. Diese sind an Entzündungsreaktionen beteiligt [68]. In experimentellen Studien wurde die hemmende Wirkung von Propolisextrakt auf COX-1 und COX-2 nachgewiesen [164].

Antikarzinogene Wirkung

Eine weitere Aktivität von Propolis ist ihre antikarzinogene Wirkung. Propolis enthält biologisch aktive Substanzen, sogenannte Promotoren, welche die Zellproliferation oder Apoptose fördern. Diese Wirkungen basieren wiederum auf dem Polyphenolgehalt von Propolis [53]. Propolis kann dadurch spezifische onkogene Signalwege blockieren, die wiederum zu einer Verringerung der Krebszellproliferation führen, die Apoptoserate erhöhen und zudem antiangiogene Effekte auf die Umgebung des Tumors ausüben [9, 33]. Antiangiogene Effekte sind essenziell, um die Versorgung des Tumors zu unterbrechen.

Antibakterielle Wirkung

Die antibakterielle Wirkung von Propolis ist eine der am besten untersuchtesten Eigenschaften der Propolis. Sie konnte gegenüber verschiedenen Bakterienstämmen gezeigt werden und ist das Ergebnis der synergistischen Aktivität der vielen in Propolis enthaltenen Verbindungen. [99, 120, 127, 141, 172, 180]. Mehrere Autoren stellten eine bessere Affinität gegenüber grampositiven als gramnegativen Bakterien fest [7, 99]. Dieses Phänomen hängt mit der artspezifischen Struktur der äußeren Membran gramnegativer Bakterien und der Produktion hydrolytischer Enzyme zusammen, welche durch die Wirkstoffe der Propolis inaktiviert werden. Propolis hemmt die bakterielle Motilität und Enzymaktivität, was eine bakteriostatische Aktivität, als auch in hohen Konzentrationen, eine bakterizide Aktivität zur Folge hat [127]. Zudem hat Propolis einen positiven Effekt auf die natürliche Hautflora und zeigte in klinischen Studien eine präventive Wirksamkeit gegenüber der Entstehung von Dekubitus [11].

2.4 DIE PROPOLIS IN DER ZAHNMEDIZIN

In der Literatur existieren eine Reihe von Veröffentlichungen über die Wirksamkeit der Propolis in der Zahnmedizin. Unter anderem befassen sich diese Studien mit den Themen der Kariesprävention, der oralchirurgischen Wundheilung, der Behandlung von Dentinüberempfindlichkeit, der Anwendung in der Endodontie, der Einsatzfähigkeit von Propolis als Lagermedium für avulierte Zähne sowie als Mundspülung bei bakterieller Plaque [60, 148, 217].

Zahnerhaltung und Endodontie

Besonders in der Kariesprävention konnten umfangreiche Erkenntnisse gewonnen werden. Propolis hat antibakterielle Wirkungen auf die Zellmembran und die Zellwand von plaquebildenden Bakterien, die auf der Bakteriolyse und der Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese beruhen. Die minimale Hemmkonzentration eines polnischen Propolisextraktes ließ sich für *Streptococcus mutans* mit 1,1 mg/ml ermitteln und für ein weiteres in der Plaqueentstehung entscheidendes Bakterium *Lactobacilli* mit 0,7 mg/ml feststellen [59].

Streptococcus mutans bildet das Enzym Glycosyltransferase (GTF) mit dessen Hilfe es auf Zahnoberflächen haften kann und eine dichte Plaque bildet. Verschiedene Autoren untersuchten die Wirkung von Propolis auf das GTF-Enzym und stellten eine Hemmung der Aktivität des Enzyms fest [95]. Mehrere in der Propolis identifizierte Verbindungen, besonders das Flavon Apigenin, waren für die Inhibition der GTF-Aktivitäten verantwortlich und verhinderten die Entwicklung von Karies [97].

Die in Propolis enthaltenen Flavonoide verringerten die Aktivität des getesteten kariogenen Enzyms GTF um 40 bis 95 % in Lösung und auf Oberflächen um 15 bis 60 % bei einer Konzentration von 135 µg/ml. Apigenin hemmte 90,5 bis 95 % der Aktivität aller in Lösung getesteten GTFs bei einer Konzentration von 135 µg/ml und auf Oberflächen um 30 bis 60 % bei gleicher Konzentration [97].

Die kariostatische Wirkung von Propolis wird auch durch eine hohe Menge an Fettsäuren erzielt, die die Produktion von Säuren durch *Streptococcus mutans* verlangsamen und die Toleranz der Mikroorganismen gegenüber dem sauren pH-Wert verringern [78].

Auf Grund der bakteriostatischen, bakteriziden und antiadhärenten Eigenschaften gegenüber Mikroorganismen, ist Propolis wirksam bei der Reduzierung von Plaque [7]. Es gibt viele Studien welche deshalb Propolis-Mundspüllösungen für den präventiven Einsatz empfehlen

[51, 63, 73, 95, 114, 133, 150, 168]. Die Plaqueakkumulation kann durch den Einsatz von Propolis begrenzt werden und auch die entzündungshemmenden Eigenschaften tragen zu der Gesunderhaltung der Gingiva bei. Hervorzuheben ist die Studie von Koo et al. [95], die sich umfangreich mit der Thematik beschäftigt. In der Studie wurden für die Tests zur antibakteriellen Aktivität die minimalen Hemmkonzentrationen und die minimalen bakteriziden Konzentrationen brasilianischer Propolis gegen plaquebildende Bakterien (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* und *Streptococcus cricetus*) bestimmt. Die Zelladhärenz von *Streptococcus mutans* und *Streptococcus sobrinus* wurde spektrophotometrisch an einer Glasoberfläche gemessen. Die Bereiche der minimalen Hemmkonzentrationen lagen bei 50-400 µg/ml für *S. mutans*, und 25-400 µg/ml für *S. sobrinus* und *S. cricetus*. Die bakterizide Konzentration der Propolislösung betrug das Vier- bis Achtfache der minimalen Hemmkonzentrationen. Die Adhärenz von *S. mutans* und *S. sobrinus* zeigte eine 80%ige Hemmung der Zelladhäsion, wobei bei allen Konzentrationen signifikante Hemmungen im Vergleich zur Kontrolle (80 % Ethanol) festgestellt wurden [96]. Des Weiteren untersuchten Koo et al. den Plaqueindex von Probanden und die supragingivale Plaque auf unlösliche Polysaccharide. Der Plaqueindex der Versuchsgruppe lag bei 0,8 (numerischer Silness-Löe Plaque-Index) und damit deutlich unter der der Placebogruppe mit 1,4. Die 3%ige Propolis-Mundspülung reduzierte die unlösliche Polysaccharid-Konzentration in der supragingivalen Plaque signifikant um 61,7 % im Vergleich zum Placebo [95].

Die Plaquebildung auf propolishaltigem Zahnfüllungsmaterial wurde ebenfalls untersucht. Eine Studie kam zu dem Schluss, dass die ausgeprägte antibakterielle und antibiotische Wirksamkeit von propolishaltigem Glasionomerzement ein vielversprechendes Material für die Zahnrestauration darstellt [188]. Die minimalen Hemmkonzentration türkischer Propolis für *S. mutans* betrug 25 µg/ml und die von Topcuoglu et al. gemessene Bakteriendichte im Biofilm auf dem propolishaltigen Glasionomerzement war 50 % geringer als die Bakteriendichte des Biofilms auf reinem Glasionomerzement [188].

Ein strenges antimikrobielles Konzept ist ebenfalls die Basis einer erfolgreichen endodontischen Behandlung. Studien bestätigen, dass die antimikrobielle Aktivität von Propolis ähnlich der herkömmlicher Wurzelkanalspüllösungen ist [88, 165, 177, 198, 212]. Auch als effektive medikamentöse Einlage bewies sich Propolis bei der Behandlung von infizierten Wurzelkanälen [10, 116, 139]. 12%ige Propolislösung hemmte das Wachstum sowie die Vermehrung von *Enterococcus faecalis* in wurzelkanalbehandelten Zähnen [116].

Des Weiteren wurden Propolislösungen als Wurzelkanalspüllösung bereits in Studien getestet und dabei konnte der Einfluss auf menschlichen Fibroblast-Zelllinien bewertet werden. In vergleichbaren Veröffentlichungen lenken die Autoren die Aufmerksamkeit besonders auf die Zytotoxizität und zusätzlich auch auf den genotoxischen Einfluss der Propolis. Die

15%igen Propolis-Spüllösungen wirkten mit zunehmender Einwirkzeit stärker zytotoxisch auf die Fibroblasten [193]. Es wurde eine signifikante Abnahme der Zelllebensfähigkeit mit zunehmender Expositionszeit (4 und 24 Stunden) festgestellt. Für die üblicherweise verwendeten Natriumhypochlorid-Spüllösungen konnte hingegen keine signifikant zeitabhängige aber dafür eine höhere Toxizität festgestellt werden. Damit stellt die Propolis eine Alternative zu den üblicherweise verwendeten Natriumhypochlorid-Spüllösungen dar, da sie weniger toxisch auf umliegende Gewebe wirkt und geringere oxidative DNA-Schäden verursacht [193]. Es zeigte sich, dass Propolis dosisabhängig zu einer Fibroblast-Zellschädigung führen kann und es daher einen dringenden Bedarf an dosisfindungsorientierter Forschung gibt.

Für die Überkappung vom Pulpencavum zeigten sich die harzigen und adhäsiven Eigenschaften der Propolis als vorteilhaft. Sie versiegelten die Dentintubuli und dichteten sie ab. In Kombination mit Calciumhydroxid ist Propolis in der Pulpaüberkappung wirksam, da sie antibakterielle und immunmodulatorische Eigenschaften besitzt [158].

In Bezug auf die Wirkung der Propolis bei Dentinüberempfindlichkeit untersuchten Mahmoud et al. in einer klinischen Studie den Grad der Zufriedenheit bzw. der Schmerzunempfindlichkeit nach der Anwendung mit Propolis bei Patienten mit Dentinüberempfindlichkeit [119]. 85 % der Probanden empfanden das Ergebnis nach vier Wochen als sehr zufriedenstellend. Propolis zeigte eine signifikant effektivere Wirkung in der Behandlung von dentaler Hypersensibilität als andere Produkte, wie Casein-Phosphopeptid amorphes Calciumphosphat (CPP-ACP) und Natriumfluorid [115]. Die mit der Testgruppe behandelten Zähne zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe über einen Zeitraum von drei Monaten den höchsten Rückgang der mittleren Überempfindlichkeitswerte.

In einigen Studien wurde Propolis als geeignetes Lagermedium für avulsierte Zähne untersucht [122]. Die Anzahl der überlebenden parodontalen Ligamentzellen (PDL-Zellen), welche ausschlaggebend für die erfolgreiche Reimplantation der Zähne ist, war mit Propolis höher als mit anderen Lagermedien (Hank's balanced salt solution, Milch und Kochsalzlösung). In Bezug auf die Aufrechterhaltung der Lebensfähigkeit von PDL-Zellen nach Avulsion scheint die Lagerung mit Propolis einen positiven Effekt zu haben [122].

Ahangari et al. erzielten mit in 10%iger und 50%iger Propolislösung gelagerten PDL-Zellen von extrahierten Zähnen bemerkenswerte Ergebnisse. Es gab zwar keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Propolislösungen, jedoch wiesen beide Proben signifikant mehr lebensfähige PDL-Zellen im Vergleich zu den anderen Versuchsmedien (Hank's balanced salt solution, Milch und Eiweiß) auf [5].

Orale Wundheilung

Auch die oralchirurgische Wundheilung stellte sich Propolis als geeignete Substanz heraus. In der Studie von Magro-Filho et al. [118] mussten die Probanden nach einem oralchirurgischen Eingriff mit alkoholischem Propolis-Extrakt ihren Mund ausspülen. Um die Wirksamkeit für die Wundheilung der Alveole zu beurteilen, wurden bei den Patienten in verschiedenen zeitlichen Abständen nach der Operation zelluläre und klinische Untersuchungen durchgeführt. Die Beurteilung der Gewebe zeigte, dass die chirurgischen Wunden zufriedenstellend epithelisierten. Die wundheilungsfördernden, antiinflammatorischen und schmerzlindernden Eigenschaften von Propolis konnten damit bewiesen werden.

In der Implantologie wurde gezeigt, dass Propolis zu einer verbesserten Implantat-Einheilung beiträgt. So stellten Somsanith et al. die osseointegrationsfördernde Wirkung von Titanoxidnanotubes (TNT) auf Zahnimplantate im Rattenunterkiefer dar. Die TNT wurden mit 60%igen-Rohpropolis-Extrakt beladen. Das mit Propolis beladene TNT erhöhte die Proliferation und die Differenzierung der Osteoblasten [182]. In Bezug auf die gewebespezifische Konsequenz waren die Knochenneubildung und die Knochenmineraldichte bei den mit Propolis beladenen TNT-Implantaten im Vergleich zu den wirkstofffreien TNT-Implantaten deutlich höher. Die Osteoblasten konnten im Vergleich zur Kontrolle ohne Propolis auf der Oberfläche des Propolis-TNT-Implantates sehr gut adhären und sich ausbreiten. Die Verbesserung der Lebensfähigkeit der Zellen war auf das Vorhandensein von Propolis im TNT zurückzuführen [182].

Antimykotische Wirkung

Zusätzlich zu der antibakteriellen Wirkung zeigte sich auch ein antimykotisches Wirkspektrum der Propolis gegenüber Infektionen mit *Candida albicans*. Aufgrund der zunehmenden Resistenz gegen Fluconazol und der Toxizität einiger Antimykotika werden Alternativen für die Behandlung von oralen Pilzinfektionen gesucht. Dentale Gele mit 2,5 % Propolis und Mundspüllösungen mit 24 % Propolis zeigten in lokaler Anwendung ähnliche antimykotische Effekte wie Miconazol, wobei *Candida albicans* am empfindlichsten gegenüber Propolis reagierte und es keinen Unterschied in der Wirksamkeit zwischen den Behandlungsgruppen gab [28, 142]. Propolis kann den Zelltod induzieren indem es Signalwege über Metacaspasen und Ras-Signalisierung reguliert die beim Wachstum von *Candida albicans* auftreten [30].

III. MATERIAL UND METHODEN

Zwei, aus unterschiedlichen Regionen Deutschlands stammende Propolisarten wurden ausgewählt, um deren konzentrationsabhängige Wirkung auf Fibroblasten und Osteoblasten zu untersuchen. Die Untersuchung umfasste neben der Analyse des Zellmetabolismus eine Reihe biochemischer Assays.

3.1 AUSWAHL UND ANWENDUNG DER PROPOLISARTEN UND KONTROLLSUBSTANZEN

Neben den zwei Arten deutscher Propolis, die in verschiedenen Verdünnungsstufen angewandt worden sind, sind die in der Propolis enthaltenen Stoffe PB und CAPE als Reinsubstanzen vergleichend genutzt worden.

3.1.1 PROPOLIS

Die in der vorliegenden Studie verwendete Propolis stammt aus Deutschland und daher aus Regionen der gemäßigten Klimazone. Propolis A wurde in dem süddeutschen Bundesland Bayern gesammelt. Die norddeutsche Propolis B stammt aus dem Bundesland Mecklenburg-Vorpommern. Die Entfernung zwischen diesen beiden Regionen beträgt etwa 800 km. Die in Nord-Süd-Richtung weit auseinanderliegenden Sammlungsorte wurden gewählt, um einen eventuell vorhandenen Effekt der regionalen klimatischen Unterschiede auf Zusammensetzung und Wirkung der Propolis identifizieren zu können.

Um die Propolis effektiv ernten zu können, hängten die Imker sogenannte Sammelgitter in die Bienenstöcke, in denen die Propolis haften bleibt und anschließend weiterverarbeitet werden kann [134].

Propolis kann mit Hilfe unterschiedlicher Lösungsmittel gelöst werden. Die Literatur zeigt, dass Ethanol als geeignetes Lösungsmittel etabliert ist, um die einzelnen Substanzen der Propolis vollständig zu extrahieren.

Die als Propolis A bezeichnete Propolis-Lösung stammt aus einer ökologischer Bienenhaltung der Imkerei Oswald, die in Pfeffenhausen (Niederbayern, Deutschland) ansässig ist. Die Imker ernteten die Propolis im Isar-Hügelland im Zeitraum von März bis November. Die Imkerei betreibt eine Bienenhaltung, die der EU-Verordnung für Lebensmittel aus dem ökologischen Landbau entspricht [2]. Die Propolis wurde im Verhältnis 1:1 mit 70 %igem Ethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gelöst und als fertige Lösung kommerziell erworben.

Propolis B sammelten die Bienen der mecklenburgischen Imkerei Freiheit aus Satow [4]. Die Imker legten zum Zeitpunkt der Sommersonnenwende die Sammelgitter in den Bienenstock ein und ernteten die Propolis in den Sommer- und Herbstmonaten. Die Stammlösung der Propolis B lag gelöst in 96 %igem Ethanol (Roth) im Verhältnis 1:1 vor und wurde als fertige Propolis-Lösung für die Untersuchungen kommerziell erworben.

Propolis-Verdünnungsreihen

Um die konzentrationsabhängige Wirkung der beiden Propolisarten zu untersuchen, mussten Verdünnungsreihen hergestellt werden. Dazu wurden vorbereitend beide Propolis-Lösungen sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm, Sigma Aldrich GmbH, Darmstadt, Deutschland). Für die Herstellung der Verdünnungsreihen, mussten die Propolis-Stammlösungen mit der Verdünnung von 1:1 jeweils mit ihrem entsprechenden Lösungsmittel weiter verdünnt werden, so dass die Verdünnungsstufen 1:10, 1:50 und 1:100 vorlagen. Nach dem Verdünnungsprozess (24 h auf einem Schüttler) wurden die Propolisproben erneut filtriert (Porengröße 0,2 µm) und anschließend bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank (Liebherr Premium, Deutschland) dunkel bei 8 °C gelagert.

Die Zellkulturexperimente wurden in transparenten 96-Well-Platten (Greiner bio one, Deutschland) mit einem finalen Volumen von 100 µl pro Well durchgeführt. So wurde 1 µl einer Verdünnungsstufe zu 99 µl Zellkulturmedium pipettiert. Eine schematische Darstellung (Abb. 3) des Versuchsaufbaus wird im Kapitel 3.3.3 erläutert.

3.1.2 KONTROLLSUBSTANZEN

PB, ein wesentlicher Vertreter der in Propolis enthaltenen Flavonoide, und CAPE, ebenso ein Flavonoid und ein charakteristisches Phenolsäureester europäischer Propolis, wurden als Reinsubstanzen ausgewählt, um deren Wirkung im Vergleich zur Gesamtheit des Propolis-Stoffgemisches zu beurteilen.

Sowohl PB (Sigma Aldrich) als auch CAPE (Sigma Aldrich) sind kommerziell in Pulverform erworben worden, in dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen worden und auf eine Konzentration von 5×10^{-5} Mol/l (0,0014 g/ml) eingestellt worden.

Als Positivkontrolle diente in allen Testverfahren 17- β -Estradiol (ESTR, Roth, 2,7 mg/ml gelöst in 96 %igem Ethanol). Es ist bekannt, dass Estrogene die Zellproliferation in verschiedenen Geweben fördern [100].

Tamoxifen (TAM, Roth, 5,6 mg/ml gelöst in 96 %igem Ethanol) diente als Negativkontrolle, da es eine antiproliferative Wirkung auf die Zellen hat. Unter anderem findet es daher Verwendung in der Tumorthherapie [85]. Wie auch Flavonoide binden sowohl TAM als auch ESTR an die Zellrezeptoren der untersuchten Zellen, was eine Grundlage für die Auswahl dieser Substanzen darstellt [85, 100].

Der Zytotoxizitätstest verlangt als Negativkontrolle die Verwendung von Triton X-100 (TRI, Sigma Aldrich). Im Apoptosetest ist Caspase 3 und Caspase 7 als Negativkontrolle zu verwenden.

In jedem Testansatz wurden auch die Lösungsmittel als Vehikelkontrollen mitgeführt. Dazu wurden je 1 μ l 70 %iger bzw. 96 %iger Ethanol sowie DMSO auf 99 μ l Medium für ein Zielvolumen von 100 μ l pro Well pipettiert. Mit diesen Kontrollen wurde nachweislich sichergestellt, dass die Konzentration an Ethanol, die durch die gelöste Propolis auf die Zellen einwirkte, keinen Einfluss darstellte.

3.2 AUSWAHL DER ZELLINIEN UND DEREN KULTIVIERUNG

Um sich einen ersten Überblick über die Wirkung deutscher Propolis auf Zellen der Mundhöhle zu verschaffen, sind die Untersuchungen vergleichend an Fibroblasten und Osteoblasten durchgeführt worden. Diese beiden Zelltypen sind besonders relevant für die Untersuchung potenzieller Wirkungen von Propolis im zahnmedizinischen Kontext.

Fibroblasten sind spezifische ortsständige Zellen des Bindegewebes, die die extrazelluläre Matrix bilden und deren Menge und Zusammensetzung kontrollieren. Sie produzieren vor allem Kollagenfasern und sorgen für die entsprechende Festigkeit des Bindegewebes. [204] Zudem kommt ihnen eine entscheidende Rolle bei der Wundheilung zu, da sie dort in der ersten Phase das neu gebildete Gewebe stabilisieren [95].

Bei den im Rahmen dieser Promotionsarbeit verwendeten Fibroblasten handelt es sich um eine kommerziell erworbene Fibroblastenzelllinie (Normale humane Fibroblasten, Cat. Nr. C-12352, PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland).

Osteoblasten wiederum sind für die Knochenbildung zuständig, indem sie Kollagen für die Knochenlamellen synthetisieren. Das gebildete Kollagen besteht vor allem aus Typ-1-Kollagen. [204] Außerdem scheiden sie Calciumphosphat in Form von Hydroxylapatit in den interstitiellen Raum aus und steuern dadurch die Knochenmineralisation [95].

Die Wirkung von deutscher Propolis auf Osteoblasten wurde anhand einer ebenfalls kommerziell erworbenen Zelllinie (Normale humane Osteoblasten, Cat. Nr. C-12720, PromoCell GmbH) untersucht.

Beide Zelltypen lagerten bis zum Auftauen bei -188 °C (K Series Cryostage Systems Stickstoff-Kühlbehälter, Worthington Industries, USA) in 1,5 ml Tubes mit Einfriermedium. Für einen die Zellen schonenden Auftauprozess wurden die Zellen beim Überführen auf Eis und bei Raumtemperatur gelagert, bevor der Inhalt der Tubes dann mit 10 ml Medium versetzt wurde. Nach Vortexen (Vortex REAX 2000, Heidolph, Deutschland) und Zentrifugation (Zentrifuge Universal 320R, Hettich AG, Deutschland) wurde die Suspension dekantiert und das Zellpellet in 6 ml Medium aufgenommen. Erneutes Vortexen führte zum Vereinzeln der Zellen. Die Zellsuspension wurde in eine 25 cm² Zellkulturflasche pipettiert. Grundsätzlich erfolgte die Kultivierung der Fibroblasten in Fibroblasten-Wachstumsmedium (PromoCell GmbH) unter Zusatz des Supplement-Mix Growth Medium (PromoCell GmbH) und unter antibiotischer Abschirmung (1 % Penicillin/Streptomycin (c.c.pro GmbH, Oberdorla, Deutschland) und 0,5 % Amphotericin (c.c.pro GmbH)). Die Kultivierung von Osteoblasten erfolgte unter Verwendung des Osteoblast Growth Mediums (PromoCell GmbH) und ebenfalls

unter antibiotischer Abschirmung. Den Medien wurde mit einem Anteil von 10 % fetales Kälberserum (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten) zugesetzt. Die Inkubation der Zellen erfolgte unter physiologischen Bedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank (Brutschrank Function Line, Heraeus Instruments GmbH, Deutschland). Bei dem alle zwei Tage zügig stattfindenden Mediumwechsel wurde das Kulturmedium durch 5 ml frisches vorgewärmtes Nährmedium ersetzt.

Bei einer Konfluenz von 70 - 90 %, erfolgte die Passagierung der Zellen, wobei das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden durch die Verwendung von 5 ml Trypsin/EDTA (PAA Laboratories GmbH; 0,05 % / 0,02 %) und der Inkubation für 5 min bei 37 °C erfolgte. Dieser Schritt der Trypsinierung musste sofort nach Ablösung der Zellen mit 7,5 ml Medium gestoppt werden, da es andernfalls zur Schädigung der Zellen kommt. Nach Überführung der Suspension in ein 50 ml Tube und Vortexen erfolgte die Zentrifugation für 5 min bei 1000 Umdrehungen pro Minute. Nach Dekantierung des Überstandes wurde das Zellpellet mit 15 ml Medium resuspendiert und erneut gevortext. Diese Zellsuspension wurde entweder im Verhältnis von 1:6 auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt oder konnte direkt für die Versuche verwendet werden. Die Zellen wurden nach entsprechender Zellzählung (Tab. 1) für die biochemischen Assays sowie metabolischen Analysen in 96-Wellplatten (99 µl/Well) und für die Immunhistochemie in 24-Well-Platten (300 µl/Well) kultiviert und 24 h unter steriler wasserdampfgesättigter Atmosphäre (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert.

Bestimmung der Lebendzellzahl

Alle Zellversuche wurden an einer definierten Anzahl von Zellen vorgenommen, sodass die Bestimmung der Lebendzellzahl erforderlich war. Für diese Bestimmung wurden 20 µl Zellsuspension in 360 µl Medium aufgenommen und mit 20 µl Trypanblau versetzt, sodass sich eine Verdünnung der Zellsuspension von 1:20 ergab. Trypanblau ist ein anionischer Bisazofarbstoff, der von lebenden Zellen nicht aufgenommen werden kann. Bei devitalen Zellen, die keine intakte Zellmembran aufweisen, diffundiert der Farbstoff in die Zelle und färbt im Zytosol enthaltende Enzyme dunkelblau an. Durch Auszählen kann so die Anzahl an vitalen Zellen bestimmt werden [66]. Zur Auszählung der Lebendzellzahl diente die Bürker-Zählkammer. Auf die Zählkammern wurden je 10 µl der Zellsuspension aufgetragen und unter dem Lichtmikroskop die ungefärbten Zellen, die sich in den 25 Quadraten der beiden Kammern befinden, ausgezählt

Folgende Formel wurde für die Zellzahlberechnung verwendet:

$$\frac{\text{Lebendzellzahl}}{\text{ml}} = Z * x * VF * 10^4$$

Z = Mittelwert der gezählten Zellzahl

VF = Verdünnungsfaktor

V = 10 µl Volumen

10⁴ = Kammerfaktor

Um die in Tab. 1 genannten Endkonzentrationen von Zellen pro Well für die unterschiedlichen Zelltests zu erreichen, wurden die Zellsuspensionen entsprechend verdünnt, wobei das Zielvolumen pro Well einer 96-Well-Platte immer 99 µl betrug.

TAB. 1: ENDKONZENTRATIONEN VON ZELLEN PRO WELL FÜR DIE EINZELNEN ZELLTESTS.

Zelltest	Zellen pro 100 µl
Immunhistochemie	2 x 10 ⁵
Proliferationstest	3 x 10 ⁵
Viabilitätstest	3 x 10 ⁵
Apoptosetest	3 x 10 ⁵
Zytotoxizitätstest	3 x 10 ⁵
Metabolische Tests	4 x 10 ⁵

3.3 TESTVERFAHREN

Vor der Durchführung der zytologischen und metabolischen Untersuchungen wurden mit Hilfe der High Performance Liquid Chromatography (HPLC) beide Propolisarten in Bezug auf ihre Inhaltsstoffe analysiert. Es folgten die immunhistochemischen Untersuchungen der Zellen, um abschließend die biochemischen Assays und die metabolischen Tests durchzuführen.

3.3.1 HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Die HPLC ist eine effiziente, präzise sowie zuverlässige Methode zur Analyse und zum Nachweis der Inhaltsstoffe der Propolis [24, 149, 186, 199].

Die Wirkungen der bei den Zelltests verwendeten Reinsubstanzen CAPE und PB sollten im Vergleich zum gesamten Stoffgemisch der jeweiligen Propolisart, bei denen CAPE und PB anteilig enthalten sind, untersucht werden. Dazu war es erforderlich vorab mit Hilfe der HPLC und unter den in der Tab. 2 genannten Bedingungen den Nachweis zu erbringen, dass diese beiden Substanzen in den verwendeten Propolisarten enthalten sind.

Für die Durchführung wurde die HPLC-Software (ClarityChrom V 2.6, Knauer, Berlin, Deutschland) genutzt und die HPLC (Smartline, Knauer) hochgefahren. Der Elutionsgradient musste eingestellt werden, bevor die Messung starten konnte. Bevor beide Propolislösungen, CAPE und PB einzeln durch die HPLC analysiert wurden, erfolgte ein Leerlauf. Dann wurden 20 µl der Probe in die Injektionschleife injiziert. Das Probenmaterial gelangt automatisch in den Messkreislauf und die Aufzeichnung startet. Nach 40 min erfolgte die Beendigung der Messung und die Auswertung des Chromatogramms.

Je nach physikochemischen Eigenschaften des Inhaltsstoffes (CAPE und PB) wurden die Proben unterschiedlich von der HPLC durch die mobilen Phasen (Aquadest und DMSO) und einer stationären Phase (hydrophobe Kohlenstoffsäule C18) aufgeschlüsselt. Die Detektion der einzelnen Substanzen geschah mit einem UV-Detektor (Smartline UV-Detektor 2500, Knauer, der die Informationen an den Computer sendete und mit den Daten das Chromatogramm konstruierte [194]. Die Wellenlänge des Detektors betrug 254 nm, da hier die UV-Spektren charakteristisch für Flavonoide sind [20].

Nach abgeschlossenen Versuchssequenzen wurden alle Chromatogramme zusammengeführt und die Retentionszeit der Peaks verglichen.

TAB. 2: BEDINGUNGEN FÜR DIE HPLC-MESSUNG

Bedingungen
Elutionsmittel 1: Aquadest (10% Methanol)
Elutionsmittel 2: DMSO (10% Aquadest)
HPLC-Säule: Eurospher (Knauer) 100-5 C18 mit integrierter Vorsäule
Partikelgröße: 5 µm
Porengröße: 100 Å
Injektionsvolumen: 20 µl
Detektionswellenlänge: 254 nm
Flussrate: 1 ml/min

3.3.2 IMMUNHISTOCHEMIE

Es ist bekannt, dass Flavonoide eine Bindungsfähigkeit für Östrogenrezeptoren (ER- α und ER- β) besitzen und ihre Wirkung über die Bindung an Östrogenrezeptoren entfalten [189]. So musste für die ausgewählten Fibroblasten und Osteoblasten der Rezeptorstatus immunhistochemisch überprüft werden. Auch die Kontrollsubstanz ESTR wirkt über Östrogenrezeptoren [100]. Die Charakterisierung der Fibroblasten erfolgte zusätzlich über Vimentin.

Das Testprinzip basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, bei dem die Primärantikörper an spezifische Antigene binden [106]. Die Hormonrezeptoren der Zellen fungieren hierbei als Antigen und werden mit dem monoklonaren Primär-IgG-Antikörper (AK) des Kaninchens (Progesteron und Estrogen-Alpha) und der Maus (Estrogen-Beta) behandelt (ImmPRESS Reagent Kit Peroxidase, Vectorlabs, Burlingame, USA).

Die Zellen wurden dafür in 24-Well-Platten kultiviert (300 μ l/Well) und für 24 h inkubiert. Nach entsprechender vorbereitender Fixierung der Zellen mit 300 μ l Formafix 4 % je Well und mehrmaliger Waschung mit PBS wurden 200 μ l Horse-Serum (R.T.U. Normal Horse Blocking Serum 2,5 %, Vectorlabs, Burlingame, USA) je Well pipettiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abpipettieren des Horse-Serums (außer bei der Negativkontrolle) und Pipettieren von 200 μ l primären AK (orb178489, orb233679 und orb178430, BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland) je Well, erfolgte eine Inkubation (12 h) im Kühlschrank bei 8 °C. Anschließend erfolgt die Zugabe des Sekundärantiköpers, der mit einer Peroxidase markiert ist. Dafür wurde 200 μ l sekundären AK je Well pipettiert und wieder 30 min inkubiert bei Raumtemperatur. Zuletzt wurden 200 μ l LinRed-Lösung (LINARIS Biologische Produkte, Dossenheim, Deutschland) je Well pipettiert und eine 10 min lichtgeschützte Inkubation bei Raumtemperatur durchgeführt. Die LinRed-Lösung wurde dekantiert und die Reaktion mit Leitungswasser gestoppt. Durch Zugabe dieses Reagenz kommt es zu einer Farbreaktion bei vorhandenem Antigen, die lichtmikroskopisch (Lichtmikroskop Axiovert 40C, Zeiss, Jena, Deutschland) nachweisbar sind.

3.3.3 BIOCHEMISCHE ASSAYS

Um die Wirkung der Propolisarten A und B auf die ausgewählten Zellen beurteilen zu können, wurden biochemische Assays durchgeführt, die Aussagen zu Proliferation, Viabilität, Apoptose und Zytotoxizität liefern sollten. Alle Tests wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt (Fibroblasten $n = 4$, Osteoblasten $n = 1$).

Für die Zelltests wurden die Zellen, wie im Kapitel 3.2 beschrieben, in 96-Well-Platten kultiviert. Nach 24 h Inkubation wurden je Well 1 μl der Propolislösung in der jeweiligen Verdünnungsreihe bzw. 1 μl einer Kontrollsubstanz hinzugegeben und erneut 24 h vor Testdurchführung inkubiert. Die Abb. 3 zeigt eine schematische Darstellung der Vorgehensweise.

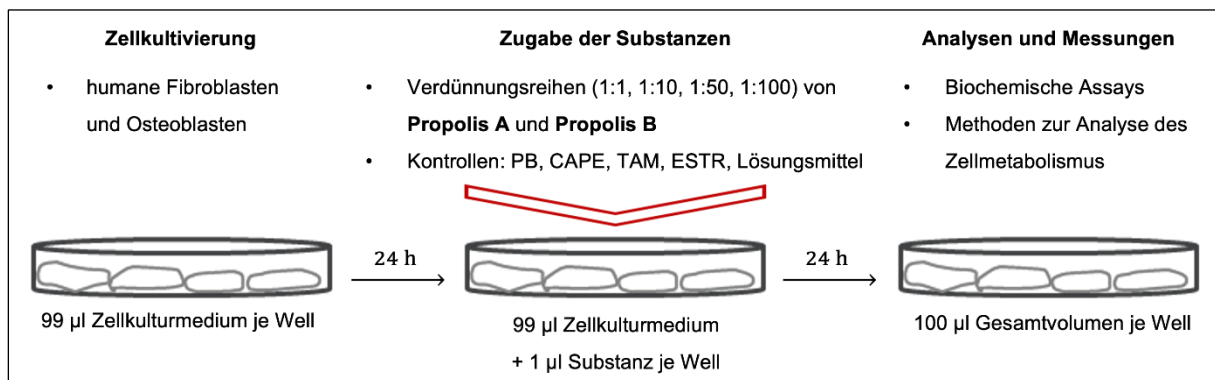


ABB. 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES VERSUCHSAUFBAUS.

Proliferationstest

Um eine Aussage über die Zellproliferation treffen zu können, wurde mit dem ELISA Proliferationskit (Roche Deutschland Holding GmbH, Freiburg, Deutschland) gearbeitet. Der Zellproliferations-ELISA-Test ist ein präziser kolorimetrischer Immunoassay zur Quantifizierung der Zellproliferation auf der Grundlage der Messung der Bromdesoxyuridin-Inkorporation während der DNA-Synthese in replizierenden Zellen [163]. Zu Beginn des Assays wurde Bromdesoxyuridin (BrdU), welches ein chemisches Analogon des Nukleosids Thymidin darstellt [117], in die einzelnen Wells zur Markierung proliferierender Zellen pipettiert. Während dieser Markierungsphase wurden die Zellen inkubiert unter steriler wasserdampfgesättigter Atmosphäre (37 °C, 5 % CO₂) und BrdU anstelle von Thymidin in die DNA der proliferierenden Zellen eingebaut. Nach Fixierung der Zellen, wird die DNA denaturiert, damit der Peroxidase-gekoppelte Anti-BrdU-Antikörper an BrdU binden kann. Die Immunkomplexe werden durch die Substratreaktion mit Tetramethylbenzidin kolorimetrisch nachgewiesen. Die Messung wurde am ELISA-Reader (Microplate Reader 680, Bio-Rad Laboratories Inc., USA) mit einer Wellenlänge von 420 nm und Referenzlänge von 620 nm abschließend durchgeführt.

Viabilitätstest

Zur Bestimmung der viablen Zellen in der Zellkultur diente der CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Fa. Promega, Madison, USA). Dieser Zelltest basiert auf der Quantifizierung des Lichtsignals, das proportional zum Gehalt an Adenosintriphosphat (ATP) ist und direkt proportional die Anzahl der lebenden Zellen widerspiegelt [3].

Durch die Zugabe des CellTiter-Glo[®]-Reagenz wird eine Zell-Lyse ausgelöst, wodurch ATP in den extrazellulären Raum gelangt. Simultan wird die ATPase gehemmt, um einen stabilen ATP-Gehalt zu gewährleisten und das Messergebnis nicht zu verfälschen. Die ATP-abhängige-Luciferase (Ultra-Glo[™] Recombinant Luciferase) bindet an das freie ATP, sodass das im Reagenz enthaltene Luziferin zu Oxyluciferin reagieren kann. Bei dieser Reaktion wird ein Lumineszenzsignal erzeugt, das dank der speziellen Reagenz-Luciferase von Glühwürmchen (*Photuris pennsylvanica*) sehr stabil ist und mit einem Lumineszenz-Reader (GloMax[®] 96 Microplate Luminometer, Fa. Promega) gemessen werden kann.

Apoptosetest

Um die Auswirkungen von Propolis A und B auf die Apoptoserate der Zellen ermitteln zu können, wurde mit dem Caspase-Glo® 3/7 Assay (Fa. Promega) gearbeitet. Bei der Enzymkaskade des programmierten Zelltodes spielen die sogenannten Effektorcaspasen, zu denen auch die Caspase 3 und 7 gehören, eine entscheidende Rolle [67]. Die Caspase-3/7-Aktivität wird bei dem oben genannten Test anhand von Lichtsignalen quantifiziert, die indirekt durch apoptotische Zellen ausgelöst werden.

Das in der Testreagenz enthaltene Z-DEVD-Aminoluciferin reagiert mit den extrazellulären Caspasen 3 und 7, wodurch das DEVD-Peptid von dem frei gewordenen Aminoluciferin abgespalten wird. Das Aminoluciferin reagiert nachfolgend mit der in der Reagenz ebenfalls enthaltenen Luciferase (UltraGlo™ Luciferase) und ein Lichtsignal wird ausgelöst, das mit dem Lumineszenz-Reader (GloMax® 96 Microplate Luminometer) gemessen werden kann [156].

Zytotoxizitätstest

Um die zytotoxischen Wirkungen der ausgewählten Propolisarten A und B auf die Zellen beurteilen zu können, wurde der CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay (Fa. Promega) verwendet. Dieser Zelltest besteht aus zwei Messungen und basiert auf der Quantifizierung von Lichtsignalen. Während der ersten Messung wird die Anzahl der toten Zellen dargestellt und bei zweiter Messung wird die gesamte Zellzahl widerspiegelt [44].

Das in der Testreagenz enthaltene Alanyl-Alanyl-Phenylalanyl-Aminoluciferin (AAF-Glo™ Substrat) tritt nicht durch die Zellmembran intakter Zellen hindurch, sondern reagiert extrazellulär mit einer von toten Zellen stammenden Protease (Dead-Cell-Protease). Bei dieser Reaktion wird ATP und Sauerstoff frei. Durch eine darauffolgende Reaktion mit einer ATP-abhängigen Luciferase wird wiederum ein Lichtsignal erzeugt, das bei der ersten Messung im Lumineszenz-Reader ausgelesen wird.

Vor der zweiten Messung wird eine totale Zell-Lyse durch Zugabe einer weiteren Reagenz (Digitonin) provoziert. Digitonin führt zu einer Auflösung der Zellmembran, wodurch ATP in den Extrazellulärraum eintritt und die ATP-abhängige Luciferasereaktion auslöst. Das anschließend quantifizierte Lichtsignal stellt das Maß für die Gesamtzellzahl dar.

3.3.4 METHODEN ZUR ANALYSE DES ZELLMETABOLISMUS

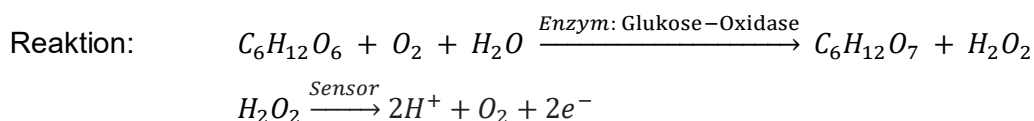
Die Analysen des Zellmetabolismus wurden im Zellkulturmedium durchgeführt, dafür mussten die Zellkulturen, wie im schematischen Versuchsaufbau in Abb. 3 (Kapitel 3.3.3) beschrieben, vorbereitet werden. Anschließend erfolgte das Pipettieren der Wells. Die Wells mit gleichem Inhaltsstoffen wurden in ein Eppendorfgefäß zusammengeführt, um ein Zielvolumen von 400 µl zu erreichen. Der zentrifugierte zellfreie Mediumüberstand wurde abschließend untersucht (Fibroblasten und Osteoblasten n=1).

Messung der Glukosekonzentration

Um Rückschlüsse auf den Glukosestoffwechsel der Zellen ziehen zu können, die unter dem Einfluss von Propolis und der Reinsubstanzen stehen, wurde der Glukose-Oxidase-Test genutzt. Bei dieser enzymatischen Nachweismethode von Glukose [90], wird die Glukosekonzentration im Medium ermittelt.

Für die Untersuchung wurden 20 µl des zellfreien Mediumüberstandes verwendet, welches in 1 ml Pufferlösung (Glukosetestserum, EKF Diagnostic GmbH, Deutschland) überführt wurde. Für das enzymatische Messprinzip der Glukosekonzentrationsbestimmung wurde das Glukosemessgerät Biosen 5140 (EKF Diagnostic GmbH, Deutschland) verwendet.

Elektrochemisches Messprinzip



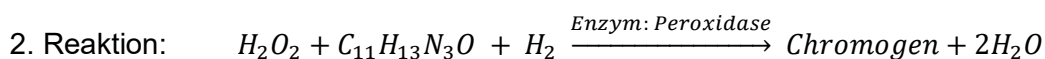
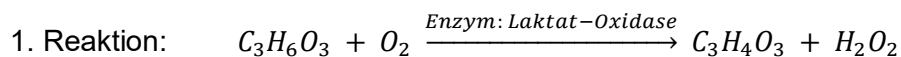
Messung: β-D-Glukose oxidiert mithilfe der enzymatischen Katalyse durch Glukose-Oxidase zu D-Gluconsäure und Wasserstoffperoxid. Der elektrochemische Chipsensor reagiert mit dem Reaktionsprodukt Wasserstoffperoxid und ein elektrisches Signal entsteht. Der daraus resultierende Stromfluss ist proportional zur Glukosekonzentration [61].

Messung der Laktatkonzentration

Ergänzend zur Messung der Glukosekonzentration wurde mit Hilfe eines enzymatischen Farbttests (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) ein weiterer metabolischer Parameter, das Laktat, im Zellmedium bestimmt. Laktat stellt das Endprodukt der anaeroben Glykolyse dar [112].

Hinführend zu der Analyse wurde analog die Vorbereitung wie bei der Glukosekonzentrationsbestimmung durchgeführt und auch 20 µl des zellfreien Mediumüberstandes verwendet. Anschließend konnte die Laktatbestimmung mit dem Laktatmessgerät AU 480 (Beckman Coulter) stattfinden.

Photometrisches Messprinzip



Messung: L-Laktat oxidiert mithilfe des Enzyms Laktat-Oxidase zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid. Das entstandene Wasserstoffperoxid reagiert in einer zweiten Reaktion mit 4-Aminoantipyrin und einem Wasserstoffdonator unter Einfluss von Peroxidase zu einem Chromogen und Wasser. Das Chromogen zeigt eine Farbintensität, die sich photometrisch bestimmen lässt und die proportional zur Laktatkonzentration in der zu untersuchenden Probe ist [16].

Bestimmung des pH-Wertes

Die Messung des pH-Wertes dient als eine Möglichkeit, den relativen Säuregrad bzw. die Alkalität der Zellmedien zu vergleichen. Zellkulturmedien müssen einen annähernd konstanten und leicht basischen pH-Wert besitzen, um eine optimale Versorgung und ein optimales Wachstum der normalen humanen Zellen zu gewährleisten.

Die Vorbereitung der Analyse erfolgte analog zur Vorbereitung der Glukose- und Laktatkonzentrationsbestimmungen. Für die pH-Messung mussten 300 µl zellfreier Mediumüberstand verwendet werden.

Nachdem die Kalibrierung der pH-Glaselektrode (Orion 3 Star pH Benchtop, Fa. Thermo Scientific, USA). stattfand, tauchte die Spitze der Messelektrode in das Medium ein. Die Messungen derselben Lösungen (n=1) erfolgten jeweils dreimal und die einzelnen Werte wurden notiert. Nach jeder Messung wurde die Elektrode gereinigt und erneut kalibriert.

3.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Analyse der biochemischen Assays der Fibroblasten wurde mit der Software SPSS Statistics Version 25 (IBM, Corporation, USA) berechnet. Die Normalverteilung wurde mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests berechnet. Normalverteilte Daten (BrdU, Viabilität, Zytotoxizität, Apoptose) wurden mittels Einweg-ANOVA mit dem Bonferroni-Post-Hoc-Test analysiert. Das Signifikanzniveau wurde auf $P \leq 0,05$ gesetzt. $P \leq 0,1$ zeigte einen Trend zur statistischen Signifikanz an.

Eine statistische Auswertung der biochemischen Assays der Osteoblasten und der metabolischen Zelltests konnte aufgrund von $n=1$ nicht erfolgen. Die Zellkultivierung der anspruchsvollen Osteoblasten erwies sich für den zeitlich begrenzten Rahmen als stark erschwert, um mehrere Tests durchführen zu können.

IV. ERGEBNISSE

4.1 HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Die phenolische Verbindung CAPE und das Flavonoid PB sind in Form von Reinsubstanzen im Vergleich zu den Stoffgemischen der beiden Propolisorten betrachtet worden. Die qualitative HPLC-Analyse diente als Nachweismethode der beiden Substanzen in den Propolisorten A und B. Das Chromatogramm der HPLC-Analysen (Abb. 4) bestätigt das Vorhandensein von CAPE und PB in den ethanolischen Extrakten beider Propolisorten. Die Überlagerung der Chromatogramme bei 254 nm zeigte, dass die Peaks der Stoffkomponenten der beiden Propolisorten ähnlich waren. Verschiedene Peaks traten in unterschiedlicher Ausprägung zur gleichen Retentionszeiten auf. Die in Abb. 4 mit Pfeilen gekennzeichneten Kurvenverläufe markieren die überlagerten Signalpeaks von PB (grün; 21,5 min) und CAPE (gelb; 24,3 min) innerhalb der Chromatogramme von Propolis A (blau) und B (rot).

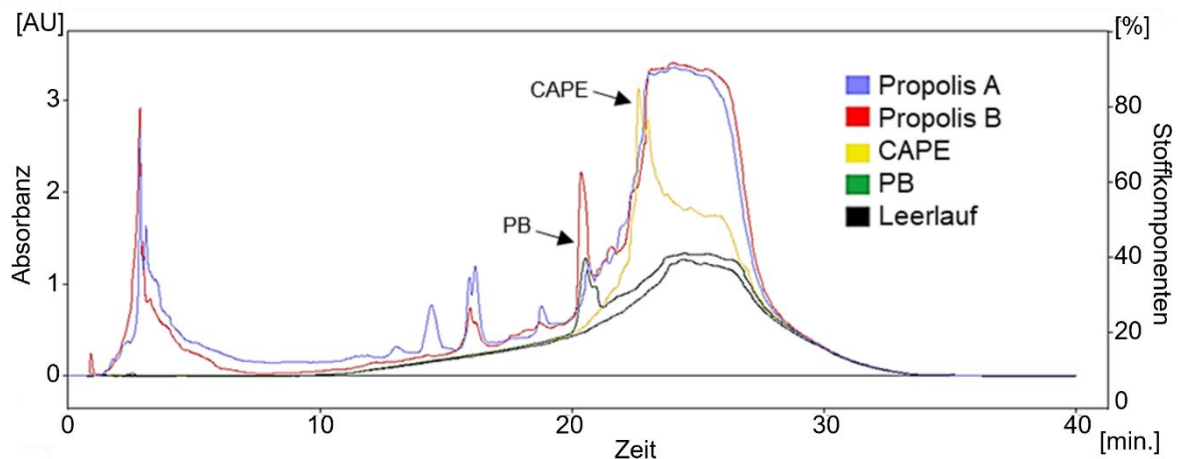


ABB. 4: HPLC-CHROMATOGRAMM VON PROPOLIS A UND B SOWIE VON PB UND CAPE.

4.2 IMMUNHISTOCHEMIE

Die immunhistochemische Färbung der Zellen zeigte, dass sowohl Fibroblasten (Abb. 5) als auch Osteoblasten (Abb. 6) die ER- α und ER- β besaßen. Die Anfärbungen sind rot dargestellt und exemplarisch mit Pfeilen gekennzeichnet.

Weiterhin ist eine deutlich erkennbare Färbung des Zytoskelettproteins Vimentin in den Fibroblasten sichtbar, welche die verwendeten Zellen als fibroblastische Zellen charakterisiert (Abb. 5).

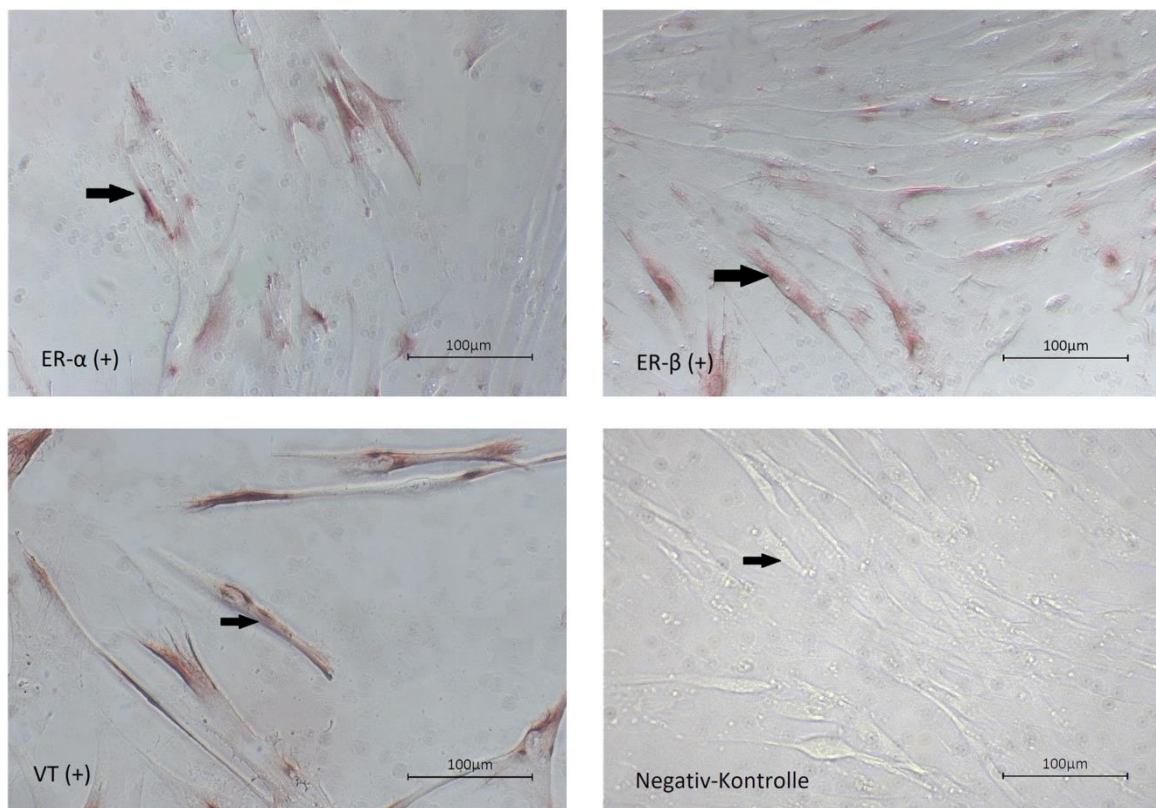


ABB. 5: IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG (+) VON ÖSTROGENREZEPTOR- α (ER- α), ÖSTROGENREZEPTOR- β (ER- β) UND VIMENTIN (VT) IN FIBROBLASTEN. ALS NEGATIVKONTROLLE DIENTEN UNBEHANDELTE ZELLEN.

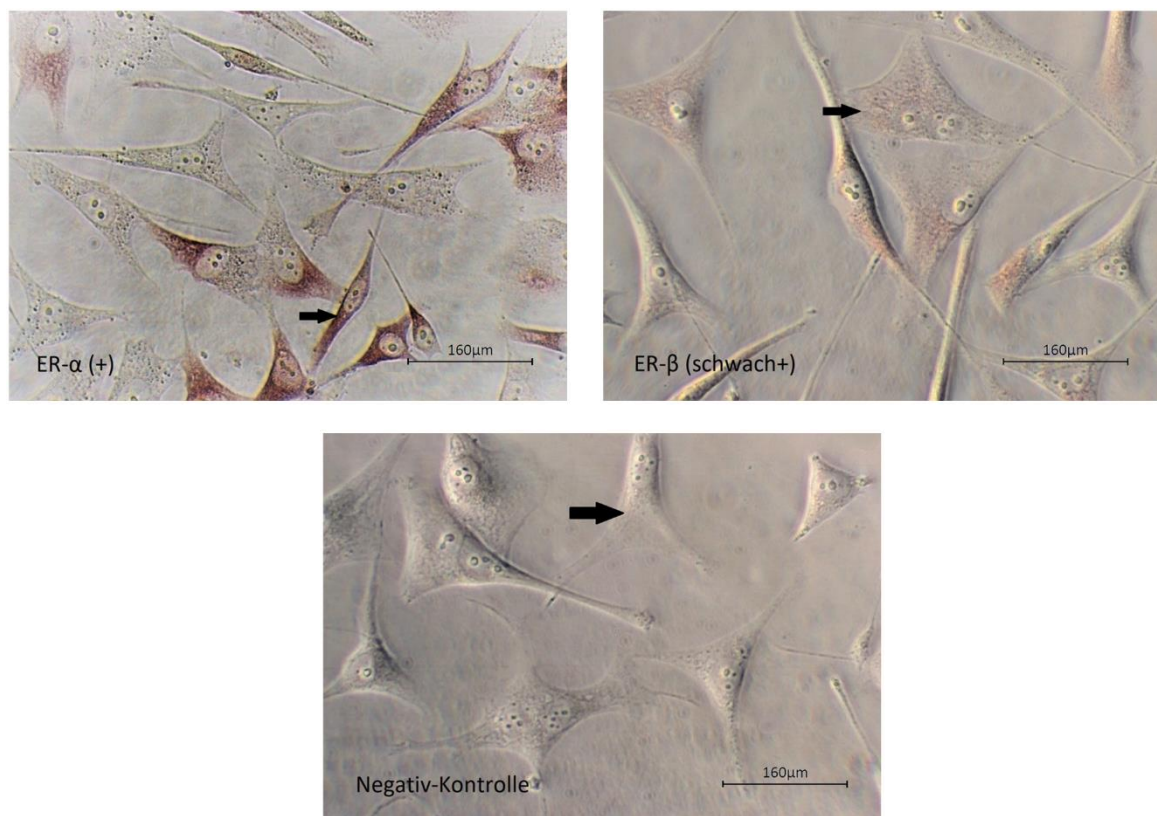


ABB. 6: IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG (+) VON ÖSTROGENREZEPTOR- α (ER- α) UND ÖSTROGENREZEPTOR- β (ER- β) IN OSTEOLASTEN. ALS NEGATIVKONTROLLE DIENTEN UNBEHANDELTE ZELLEN.

4.3 BIOCHEMISCHE ASSAYS

Proliferationstest

Fibroblasten

In Abb. 7 ist die konzentrationsabhängige Wirkung von Propolis A und B auf die Proliferation dargestellt. Der verwendete BrdU-Assay zeigt die Rate der DNA-Synthese in den Zellen.

Mit ansteigendem Grad der Verdünnung steigt die Proliferation unter Einfluss von Propolis an. Hoch konzentrierte Propolis (1:1), unabhängig von der Propolisorte, verursacht eine Reduktion der Proliferation auf 0 %. Die Verdünnungsstufen 1:10 (Propolis A: $41,4 \pm 6,0$ %; Propolis B: $53,2 \pm 7,9$ %; $p < 0,05$) und 1:50 (Propolis A: $81,4 \pm 4,7$ %; Propolis B: $95,8 \pm 2,5$ %; $p < 0,05$) zeigen im Vergleich zur Verdünnungsstufe 1:1 ansteigende Proliferationsraten. Für die höchste Verdünnungsstufe (1:100) übersteigt die Proliferationsrate der Zellen unter Einfluss von Propolis A ($112,1 \pm 4,6$ %, $p < 0,05$) signifikant die Rate der Zellen, die nur in Medium kultiviert worden sind. Propolis B ($107,0 \pm 3,8$ %) zeigt hingegen für die Verdünnungsstufe 1:100 keinen signifikanten Unterschied zu den unbehandelten Zellen im Medium. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Propolisorten A und B konnte innerhalb der Verdünnungsstufen 1:10 und 1:50 beobachtet werden, wobei die Raten unter Einfluss von Propolis B höher waren.

Die Einzelsubstanzen CAPE und PB induzierten eine signifikant reduzierte Proliferationsrate, jedoch in deutlich unterschiedlichem Ausmaß (CAPE: $18,6 \pm 4,7$ %; PB: $87,1 \pm 6,7$ %, $p < 0,05$). Mit ESTR ($98,2 \pm 5,7$ %) zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Proliferation im Vergleich zu unbehandelten Zellen. TAM induziert hingegen eine signifikante Reduktion der Proliferation auf 0 %.

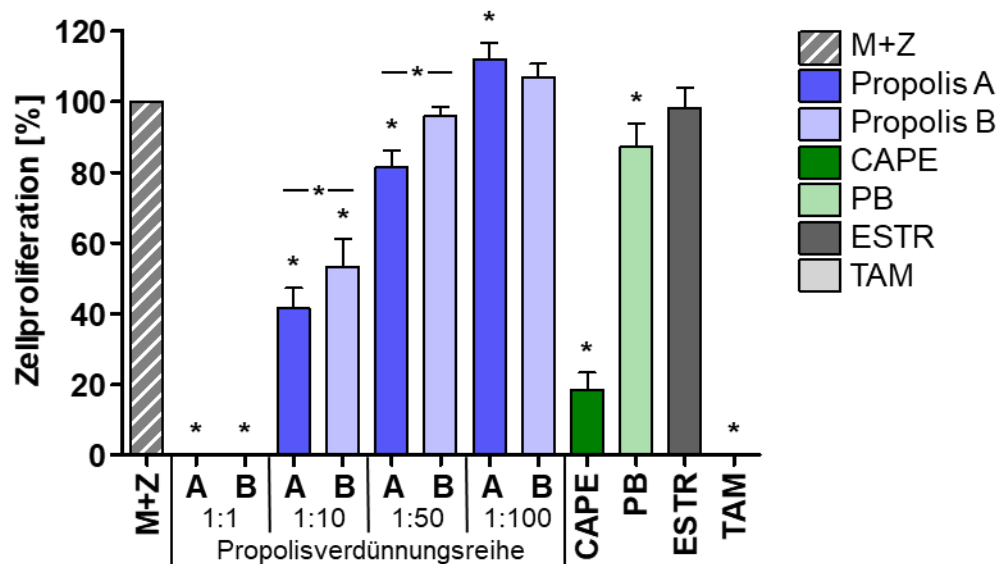


ABB. 7: PROLIFERATION DER FIBROBLASTEN (N = 4) NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS UND DEN KONTROLLSUBSTANZEN. UNBEHANDELTE ZELLEN IN MEDIUM (M+Z) WURDEN AUF 100 % GESETZT. PROPOLIS A UND PROPOLIS B BEZEICHNEN ZWEI UNTERSCHIEDLICHE PROPOLISSORTEN. CAPE (KAFFEESÄURE-PHENETHYLESTER), PB (PINOBANKSIN), ESTR (ESTRADIOL) UND TAM (TAMOXIFEN) SIND DIE VERWENDETEN SUBSTANZEN. EIN STRICH MIT STERNCHEN (*) MARKIERT EINE STATISTISCHE SIGNIFIKANTE ABWEICHUNG INNERHALB DER JEWEILIGEN GRUPPE ($P < 0,05$), WÄHREND EIN STERNCHEN OHNE STRICH EINE SIGNIFIKANTE ABWEICHUNG GEGENÜBER M+Z DARSTELLT. DIE DATEN BASIEREN AUF MITTELWERTEN $\pm$ STANDARDABWEICHUNG.

Osteoblasten

Die konzentrationsabhängige Wirkung von Propolis A und B auf die Zellproliferation der Osteoblasten zeigt die Abb. 8. Auch hier ist unabhängig von der Propolisorte eine vollständige Hemmung (0 %) der Proliferation unter Einfluss der höchsten Konzentration an Propolis (1:1) zu beobachten. Mit den Verdünnungsstufen 1:10 (Propolis A: 25,6 %, Propolis B: 30,2 %) ist die Proliferation deutlich reduziert. Mit zunehmender Verdünnung (1:50) steigt die Proliferationsrate (Propolis A: 50,6 %, Propolis B: 63,6 %) an und erreicht den höchsten Wert mit Propolis in der Verdünnungsstufe 1:100 (Propolis A: 68,8 %, Propolis B: 90,6 %). Hierbei ist auch ein Unterschied des prozentualen Anstiegs, abhängig von den Propolisorte, erkennbar. Die Messwerte von Propolis B sind hierbei höher als die von Propolis A. Eine antiproliferative Wirkung auf die Osteoblasten hatten die Substanzen CAPE (3,1 %) und TAM (1,3 %). Wohingegen Zellen, die mit PB behandelt wurden, eine niedrige Proliferation zeigten (PB: 47,0 %). ESTR hatte eine ähnlich hohe Proliferationsrate, wie Osteoblasten unter Einfluss von Propolis B in 1:100 (ESTR: 89,7 %).

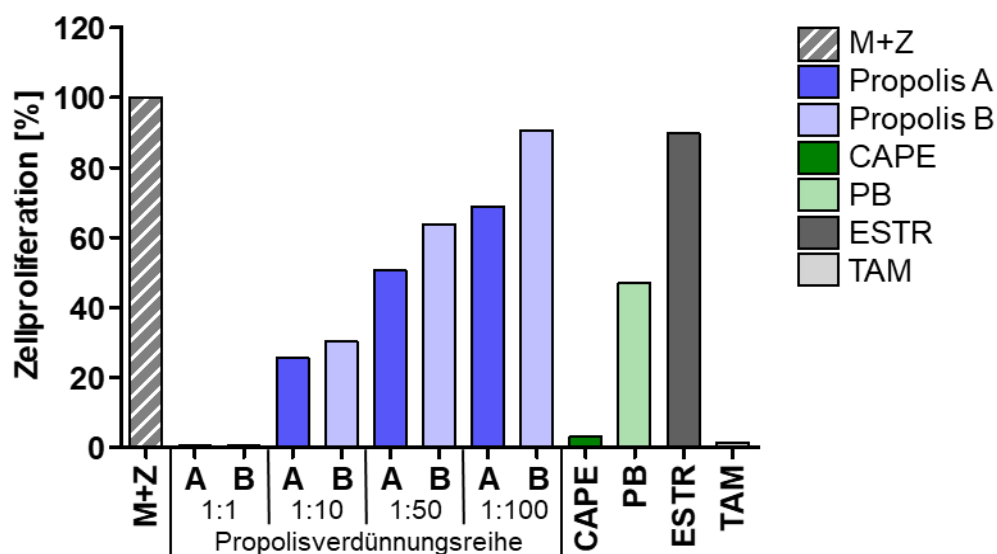


ABB. 8: PROLIFERATION DER OSTEOLASTEN (N = 1) NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS UND DEN KONTROLLSUBSTANZEN. UNBEHANDELTE ZELLEN IN MEDIUM (M+Z) WURDEN AUF 100 % GESETZT. PROPOLIS A UND PROPOLIS B BEZEICHNEN ZWEI UNTERSCHIEDLICHE PROPOLIS-VARIANTEN. CAPE (KAFFEEESÄURE-PHENETHYLESTER), PB (PINOBANKSIN), ESTR (ESTRADIOL) UND TAM (TAMOXIFEN) SIND DIE VERWENDETEN SUBSTANZEN. DIE DATEN BASIEREN AUF MITTELWERTEN.

Viabilitätstest

Fibroblasten

Die Abb. 9 zeigt eine zunehmende Viabilität der Fibroblasten mit steigender Propolisverdünnung und den Einfluss der Kontrollsubstanzen auf die Zellen.

Hoch konzentrierte Propolis (1:1), unabhängig von der Sorte, induzierte eine völlige Hemmung der Viabilität (Propolis A und B: 0 %, $p < 0,05$). Es sind keine lebenden Zellen mehr messbar gewesen, analog zur Negativkontrolle TAM. Ebenfalls stark viabilitätsinhibierende Effekte zeigte CAPE ($2,8 \pm 1,8$ %, $p < 0,05$). Eine signifikante Inhibition der Viabilität von unter 50 % war bei einer sortenunabhängigen Propolisverdünnung von 1:10 zu erkennen (Propolis A: $41,5 \pm 3,2$ %, Propolis B: $47,4 \pm 2,4$ %, $p < 0,05$). Die Verdünnungsstufen 1:50 und 1:100 hatten hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität. Die Fibroblasten, die mit 1:50 verdünnte Propolis behandelt wurden sind, wiesen eine Viabilität von über 90 % auf (Propolis A: $93,9 \pm 0,9$ %, Propolis B: $97,4 \pm 7,2$ %) und die mit der Verdünnungsstufe 1:100 behandelten Zellen von über 100 % (Propolis A: $108,8 \pm 3,6$ %, Propolis B: $107,1 \pm 7,3$ %). Damit unterschieden sich beide Verdünnungsstufen (1:50 und 1:100) statistisch nicht von unbehandelten Zellen im Zellkulturmedium. Auch ESTR hatte keinen signifikanten Effekt auf die Viabilität der Zellen (ESTR: $102,3 \pm 2,3$ %). Nur PB ($112,6 \pm 4,5$ %, $p < 0,05$) zeigte eine signifikant viabilitätssteigernde Wirkung auf die Fibroblasten.

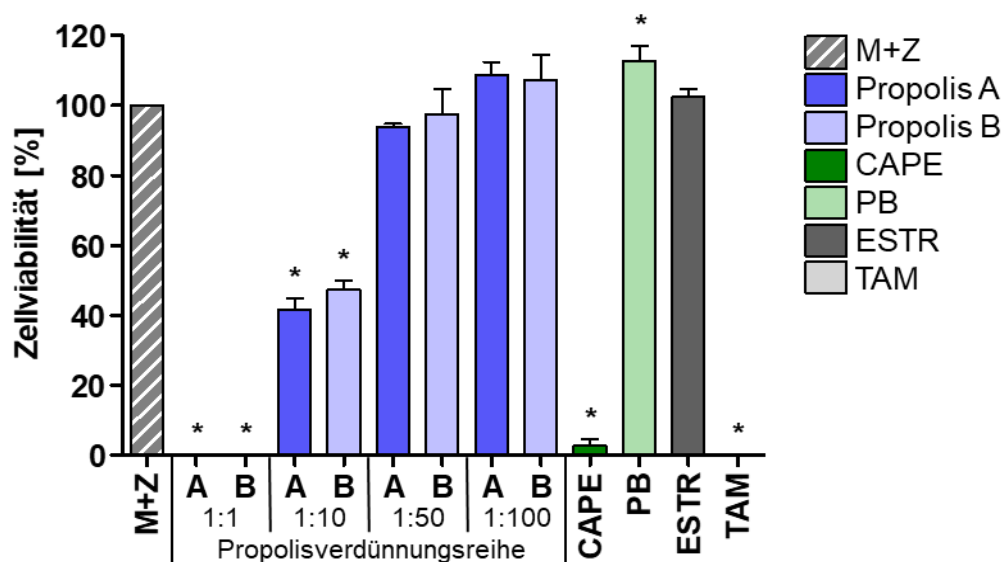


ABB. 9: DIE VIABILITÄT DER FIBROBLASTEN (N = 4) NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS UND DEN KONTROLLSUBSTANZEN. UNBEHANDELTE ZELLEN IN MEDIUM (M+Z) WURDEN AUF 100 % GESETZT. PROPOLIS A UND PROPOLIS B BEZEICHNEN ZWEI UNTERSCHIEDLICHE PROPOLIS-VARIANTEN. CAPE (KAFFEESÄURE-PHENETHYLESTER) UND PB (PINOBANKSIN) SOWIE DIE WEITEREN SUBSTANZEN ESTRADIOL (ESTR) UND TAMOXIFEN (TAM) SIND DIE VERWENDETEN SUBSTANZEN. EIN STRICH (*) MARKIERT EINE STATISTISCH SIGNIFIKANTE ABWEICHUNG INNERHALB DER JEWEILIGEN GRUPPE ($p < 0,05$), WÄHREND EIN STERNCHEN OHNE STRICH EINE SIGNIFIKANTE ABWEICHUNG GEGENÜBER M+Z DARSTELLT. DIE DATEN BASIEREN AUF MITTELWERTEN $\pm$ STANDARDABWEICHUNG.

Osteoblasten

Auch bei den Osteoblasten zeigen die Ergebnisse des Viabilitätstest, welche in Abb. 10 dargestellt sind, dass die hoch konzentrierten Propolisorten (1:1) zu einer vollständigen Inhibition der Zellviabilität führten (Propolis A: und B: 0 %). In der Verdünnungsstufe 1:10 der Propolis A (70,7 %) stieg die Viabilität auf über 70 % an. Während Propolis B (80,8 %) in der Verdünnungsstufe 1:10 die Viabilität auf über 80 % steigerte. Mit zunehmender Verdünnungsstufe war auch eine sortenunabhängige Steigerung der viablen Zellen messbar (1:50 Propolis A: 94,7 %, 1:50 Propolis B: 92,7 %, 1:100 Propolis A: 101,9 %, 1:100 Propolis B: 98,2 %). Ähnlich induzierende Effekte zeigten auch die Kontrollen mit PB (98,4 %) und ESTR (84,0 %). Wohingegen CAPE (2,2 %) und TAM (0,7 %) die Zellviabilität stark inhibierten.

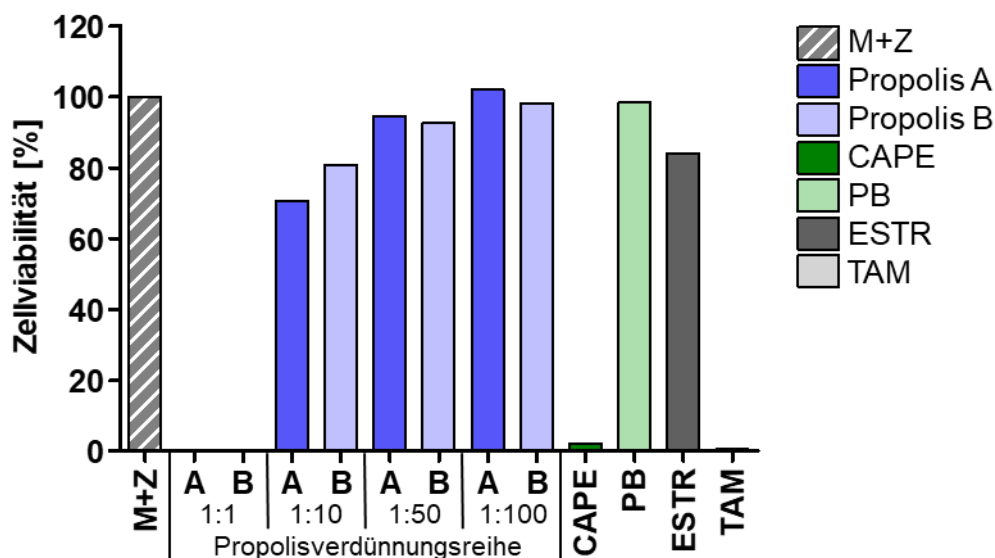


ABB. 10: DIE VIABILITÄT DER OSTEOLASTEN (N = 1) NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS UND DEN KONTROLLSUBSTANZEN. UNBEHANDELTE ZELLEN IN MEDIUM (M+Z) WURDEN AUF 100 % GESETZT. PROPOLIS A UND PROPOLIS B BEZEICHNEN ZWEI UNTERSCHIEDLICHE PROPOLIS-VARIANTEN. CAPE (KAFFEEsäURE-PHENETHYLESTER) UND PB (PINOBANKSIN) SOWIE DIE WEITEREN SUBSTANZEN ESTRADIOL (ESTR) UND TAMOXIFEN (TAM) WURDEN GETESTET. DIE DATEN BASIEREN AUF MITTELWERTEN.

Apoptosetest

Fibroblasten

Die Apoptoserate der unbehandelten Fibroblasten ($21,2 \pm 2,0 \%$) und der mit Propolis sowie mit Kontrollsubstanzen behandelten Zellen ist in Abb. 11 veranschaulicht.

Unter dem Einfluss von allen Propolisverdünnungsstufen zeigte sich eine sortenunabhängige signifikante Reduzierung der Apoptoserate. In der Zellkultur mit hochkonzentrierter Propolis (1:1) war keine Apoptoserate mehr messbar (Propolis A und B: 0% , $p < 0,05$). Auch für die Zellen, die mit den Verdünnungsstufen 1:10 behandelt wurden, war nur eine sehr schwache Rate nachweisbar (Propolis A: $5,5 \pm 1,5 \%$, Propolis B: $2,0 \pm 0,2 \%$, $p < 0,05$). Die Apoptoserate belief sich auf rund 10% mit zunehmender Verdünnungsstufe (1:50 Propolis A: $10,6 \pm 2,4 \%$, 1:50 Propolis B: $9,8 \pm 1,0 \%$, 1:100 Propolis A: $12,0 \pm 1,7 \%$, Propolis B: $11,7 \pm 1,2 \%$, $p < 0,05$).

Die Messwerte der mit CAPE ($21,8 \pm 6,3 \%$) behandelten Fibroblasten unterschieden sich statistisch nicht von den der unbehandelten Zellen. Die Substanzen PB ($55,1 \pm 12,8 \%$) und ESTR ($59,8 \pm 15,7 \%$) induzierten hingegen die apoptotischen Zellen auf über 50% . Eine maximale Apoptoserate (100% , $p < 0,05$) wurde mit Caspase erreicht.

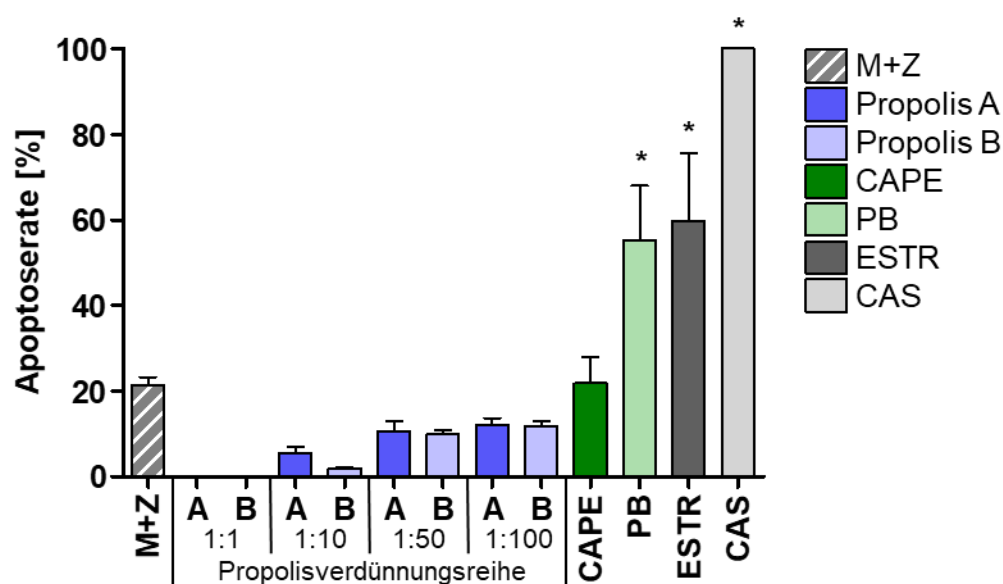


Abb. 11: Die Apoptose der Fibroblasten (N = 3) nach der Einwirkung von Propolis und den Kontrollsubstanzen.

Mit Caspase (CAS) behandelte Zellen wurden auf 100% gesetzt. Propolis A und Propolis B bezeichnen zwei unterschiedliche Propolis-Varianten. CAPE (Kaffeensäure-Phenethyl-ester) und PB (Pinobanksin) sowie die weiteren Substanzen Estradiol (ESTR) und CAS (Caspase) wurden getestet. Ein Sternchen (*) stellt eine signifikante Abweichung gegenüber unbehandelten Zellen in Medium (M+Z) dar. Die Daten basieren auf Mittelwerten $\pm$ Standardabweichung.

Osteoblasten

Wie in Abb. 12 dargestellt betrug die Apoptoserate für die unbehandelten Osteoblasten 22,6 % und die maximale Rate von 100 % wurde durch Caspase induziert. Die Propolisverdünnungen und auch die Kontrollsubstanzen zeigten eine reduzierte Anzahl apoptotischer Zellen, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen im Medium.

Auch bei den Osteoblasten führte die hochkonzentrierte Propolis (1:1) sortenunabhängig zu einer Senkung der Apoptoserate auf 0 % und die Verdünnungsstufe 1:10 hatte nur sehr geringe apoptotische Effekte (Propolis A: 3,7 %, Propolis B: 2,9 %). In den Verdünnungsstufen 1:50 (Propolis A: 10,7 %, Propolis B: 10,8 %) und 1:100 (Propolis A: 12,7 %, Propolis B: 11,7 %) stiegen die Messwerte auf über 10 % an.

Der Einfluss von CAPE war mit 8,2 % ähnlich gering, wie der von hochverdünnter Propolis. Wohingegen PB (18,0 %) und ESTR (18,7 %) eine ähnliche Anzahl apoptotischer Zellen aufwiesen, wie die unbehandelten Osteoblasten im Medium.

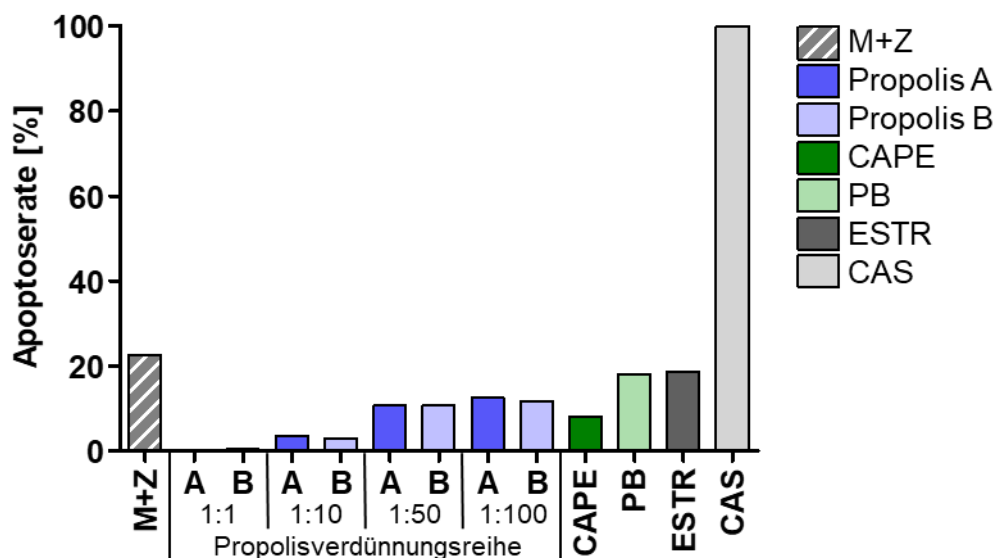


ABB. 12: DIE APOPTOSE DER OSTEOLASTEN (N = 1) NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS UND DEN KONTROLLSUBSTANZEN. MIT CASPASE (CAS) BEHANDELTE ZELLEN WURDEN AUF 100 % GESETZT. PROPOLIS A UND PROPOLIS B BEZEICHNEN ZWEI UNTERSCHIEDLICHE PROPOLIS-VARIANTEN. CAPE (KAFFEESÄURE-PHENETHYLESTER) UND PB (PINOBANKSIN) SOWIE DIE WEITEREN SUBSTANZEN ESTRADIOL (ESTR) UND CAS (CASPASE) WURDEN GETESTET. DIE DATEN BASIEREN AUF MITTELWERTEN.

Zytotoxizitätstest

Fibroblasten

Die zytotoxische Wirkung von Propolis und den Kontrollsubstanzen ist prozentual in Abb. 13 dargestellt. Sie spiegelt die Dead-Cell-Protease-Aktivität wieder und diente als Maß für die Anzahl der geschädigten Zellen in der Zellkultur.

Die Kontrolle mit Triton X-100 (TRI) führte zu einer 100 %igen Zytotoxizität, somit ließen sich keine lebenden Zellen im Medium feststellen. CAPE induzierte ebenfalls eine fast vollständige zytotoxische Wirkung ($96,9 \pm 4,5 \%$, $p < 0,05$). Auch hochkonzentrierte Propolis (Verdünnungsstufe 1:1) hatte einen starken signifikanten zytotoxischen Effekt, der für beide Propolisarten 100% betrug ($p < 0,05$). Alle anderen verwendeten Propolisverdünnungsstufen und Kontrollsubstanzen (PB und ESTR) zeigten keinen signifikant unterschiedlichen Gehalt an zytotoxischen Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Fibroblasten ($M+Z$: $24,4 \pm 10,5 \%$).

Für die 1:10 Propolisverdünnung war die Messung nicht auswertbar auf Grund eines unbekannten Messfehlers und konnte deswegen nicht im Diagramm dargestellt werden.

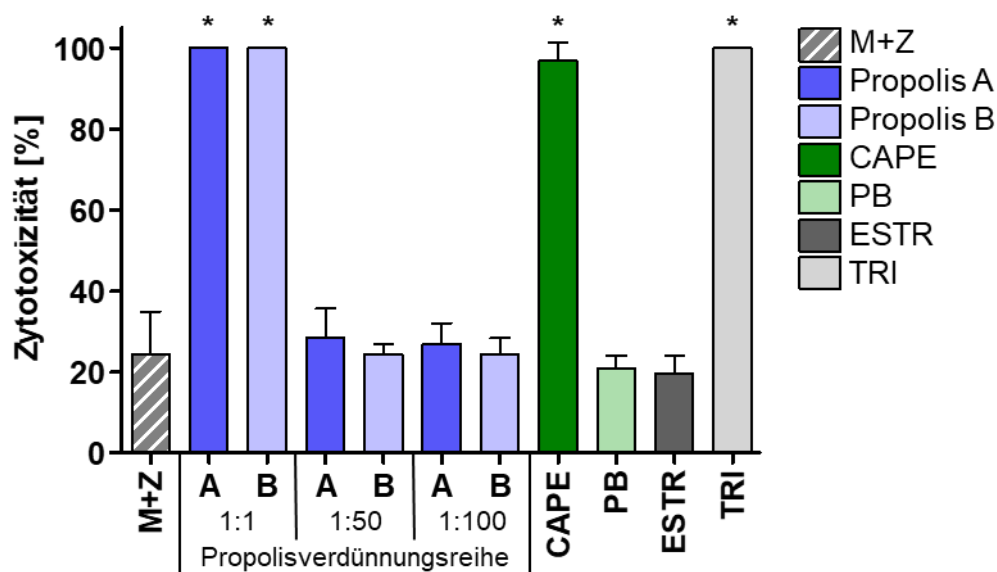


ABB. 13: ZYTOTOXIZITÄT DER FIBROBLASTEN (N = 4) NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS. ZELLEN, DIE MIT TRITON X-100 (TRI) BEHANDELT WURDEN, WURDEN AUF 100 % GESETZT. PROPOLIS A UND PROPOLIS B BEZEICHNEN ZWEI UNTERSCHIEDLICHE PROPOLIS-VARIANTEN. CAPE (KAFFEESÄURE-PHENETHYLESTER) UND PB (PINOBANKSIN) SOWIE DIE WEITEREN SUBSTANZEN ESTRADIOL (ESTR) UND TRI (TRITON X-100) WURDEN GETESTET. EIN STERNCHEN (*) STELLT EINE SIGNIFIKANTE ABWEICHUNG GEGENÜBER UNBEHANDELTE ZELLEN IN MEDIUM (M+Z) DAR. DIE DATEN BASIEREN AUF MITTELWERTEN $\pm$ STANDARDABWEICHUNG.

Osteoblasten

Die Abb. 14 stellt die zytotoxischen Effekte der Propolisverdünnungen und Kontrollsubstanzen auf die ausgewählten Osteoblasten dar. Unbehandelte Osteoblasten zeigten eine geringe Anzahl (9,9 %) zytotoxischer Zellen im Medium. Die Kontrolle mit Triton X-100 (TRI) führte hingegen zum vollständigen Zelluntergang und die Toxizität betrug demzufolge 100 %. Hochkonzentrierte Propolis (Verdünnungsstufe 1:1) hatte dieselben zytotoxischen Effekte auf die Osteoblasten, daher waren keine lebenden Zellen messbar (Propolis A und B: 0 %). Auch die Verdünnungsstufe 1:10 verursachte in der Zellkultur eine sortenunabhängig hohe zytotoxische Aktivität (Propolis A: 77,9 %, Propolis B: 79,2 %). Eine inhibierende Wirkung auf die Zytotoxizität zeigten hingegen beide Propolisarten der Verdünnungsstufe 1:50 (Propolis A: 7,2 %, Propolis B: 5,6 %). Eine ähnlich geringe Zytotoxizität, wie die der unbehandelten Osteoblasten, waren für die Zellen mit der Verdünnungsstufe 1:100 (Propolis A: 16,1 %, Propolis B: 13,7 %), PB (16,6 %) und ESTR (19,0 %) nachweisbar.

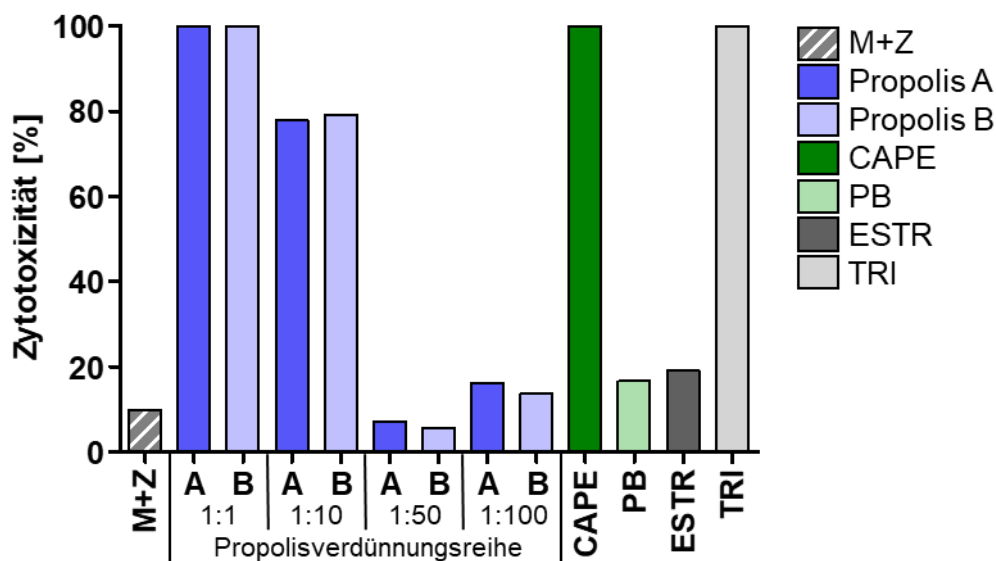


ABB. 14: ZYTOTOXIZITÄT DER OSTEOLASTEN (N = 1) NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS. ZELLEN, DIE MIT TRITON X-100 (TRI) BEHANDELT WURDEN, WURDEN AUF 100 % GESETZT. PROPOLIS A UND PROPOLIS B BEZEICHNEN ZWEI UNTERSCHIEDLICHE PROPOLIS-VARIANTEN. CAPE (KAFFEEESÄURE-PHENETHYLESTER) UND PB (PINOBANKSIN) SOWIE DIE WEITEREN SUBSTANZEN ESTRADIOL (ESTR) UND TRI (TRITON X-100) WURDEN GETESTET.

4.4 METHODEN ZUR ANALYSE DES ZELLMETABOLISMUS

Messung der Glukosekonzentration

Fibroblasten

Die Untersuchungen zeigten (Abb. 15) nur geringe Schwankungen der Glukosekonzentration im Medium der behandelten und unbehandelten Fibroblasten. Das Medium ohne Zellen hatte eine Konzentration von 20,7 mmol/l und zeigte nach der Zellkultivierung eine minimal geringere Konzentration von 19,6 mmol/l, welche für die Messung als Vergleichswert diente. Beide Propolisarten der Verdünnungsstufen 1:1 hatten nur unwesentlichen Einfluss auf die Glukosekonzentration (Propolis A: 19,3 mmol/l, Propolis B: 19,1 mmol/l). In der Verdünnungsstufe 1:10 stieg die Konzentration sortenunabhängig an. Unterschiedliche Wirkungen der Sorten waren in den Verdünnungsstufen 1:50 und 1:100 erkennbar. Während die Propolis A (1:50: 18,7 mmol/l) und Propolis B (1:100: 18,8 mmol/l) reduzierte Glukosekonzentrationen aufwiesen, zeigte sich eine Erhöhung für die mit Propolis B (1:50: 19,7 mmol/l) und Propolis A (1:100: 20,7 mmol/l) behandelten Fibroblasten.

Die Kontrollsubstanzen CAPE (18,4 mmol/l) und PB (17,6 mmol/l) wirkten inhibierend, wobei die Glukosekonzentration im Medium der mit PB behandelten Zellen am niedrigsten von allen Testsubstanzen war. Fibroblasten mit ESTR (20,0 mmol/l) und TAM (21,7 mmol/l) hatten die höchsten Glukosekonzentrationen. TAM überstieg damit nicht nur die der unbehandelten Zellen überstieg, sondern auch die des zellfreien Mediums.

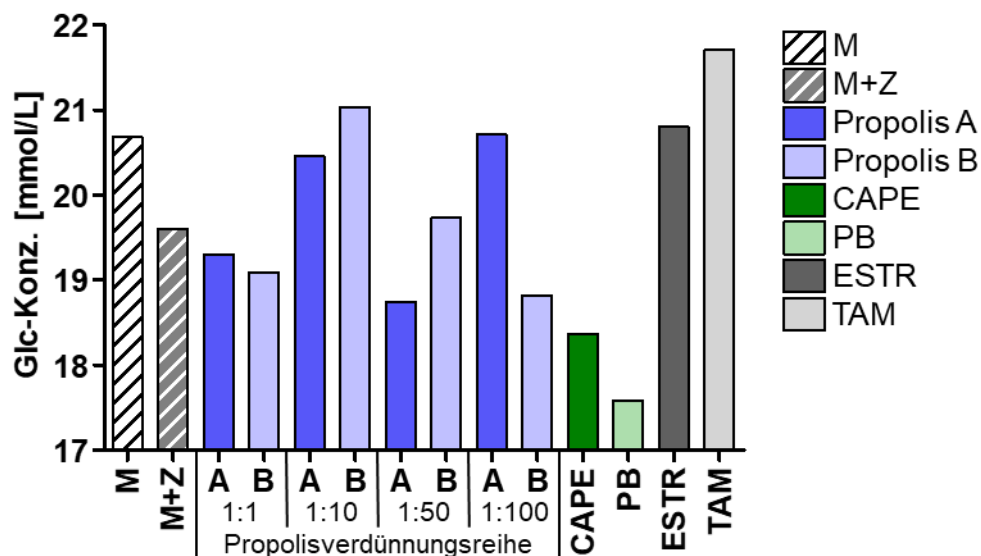


ABB. 15: GEHALT DER GLUKOSE IM MEDIUM VON FIBROBLASTEN (N = 1) NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS UND DEN KONTROLLSUBSTANZEN. M STEHT FÜR MEDIUM OHNE ZUSÄTZE UND M+Z FÜR ZELLEN IN MEDIUM. PROPOLIS A UND PROPOLIS B BEZEICHNEN ZWEI UNTERSCHIEDLICHE PROPOLIS-VARIANTEN. CAPE (KAFFEESÄURE-PHENETHYLESTER) UND PB (PINOBANKSIN) SOWIE DIE WEITEREN SUBSTANZEN ESTRADIOL (ESTR) UND TAMOXIFEN (TAM) WURDEN GETESTET. DIE DATEN BASIEREN AUF MITTELWERTEN.

Osteoblasten

Die Abb. 16 zeigt die Glukosekonzentration der Osteoblasten im Medium. Für eine bessere Darstellung wurde eine Skalierung von 4,5 mmol/l bis 6,5 mmol/l verwendet. Das Medium der kultivierten Zellen zeigte eine Glukosekonzentration von 4,9 mmol/l und diente als Vergleichswert.

Einen geringeren Wert als unbehandelte Osteoblasten zeigten nur behandelte Zellen mit Verdünnungsstufe 1:100 der Propolis A (4,8 mmol/l) sowie PB (4,7 mmol/l) oder ESTR (4,6 mmol/l). Alle anderen Propolisverdünnungen und Kontrollsubstanzen vermittelten einen Anstieg des Glukosegehaltes im Medium.

Keine Substanz verursachte eine Zunahme der Glukosekonzentration im Vergleich zu dem zellfreien Medium (6,34 mmol/l).

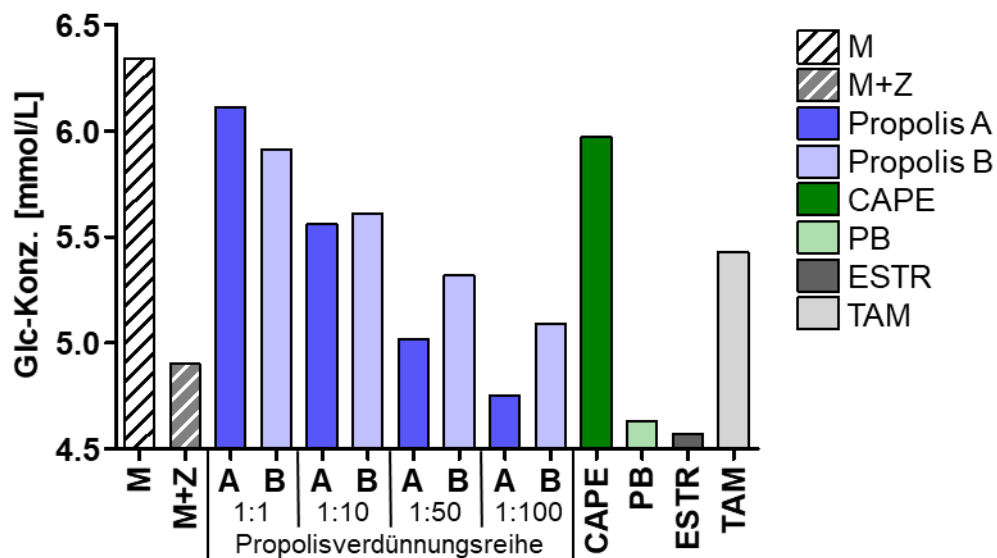


Abb. 16: GEHALT DER GLUKOSE IM MEDIUM VON OSTEOLASTEN (N = 1) NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS UND DEN KONTROLLSUBSTANZEN. M STEHT FÜR MEDIUM OHNE ZUSÄTZE UND M+Z FÜR ZELLEN IN MEDIUM. PROPOLIS A UND PROPOLIS B BEZEICHNEN ZWEI UNTERSCHIEDLICHE PROPOLIS-VARIANTEN. CAPE (KAFFEEsäURE-PHENETHYLESTER) UND PB (PINOBANKSIN) SOWIE DIE WEITEREN SUBSTANZEN ESTRADIOL (ESTR) UND TAMOXIFEN (TAM) WURDEN GETESTET. DIE DATEN BASIEREN AUF MITTELWERTEN.

Messung der Laktatkonzentration

Fibroblasten

Die Laktatkonzentration von kultivierten Fibroblasten belief sich auf 4,0 mmol/l. Unter Zugabe der Propolisverdünnungen, unabhängig von der Sorte, sowie den Kontrollsubstanzen zeigte sich eine Absenkung der Laktatkonzentration im Zellmedium (Abb. 17). Besonders deutlich wurde dies bei der Propolisverdünnungsstufe 1:1 (Propolis A und B: 1,5 mmol/l). Mit steigender Verdünnungsstufe stieg auch die Laktatkonzentration leicht an, wobei 2,7 mmol/l (Propolis B 1:50) nicht von den Propolisarten überschritten wurden. PB und ESTR zeigten hingegen mit über 3 mmol/l die höchsten Messwerte (PB: 3,3 mmol/l, ESTR: 3,5 mmol/l). Das zellfreie Medium (M: 2,1 mmol/l) zeigte eine auf 50 % reduzierte Laktatkonzentration im Vergleich zu den kultivierten Fibroblasten.

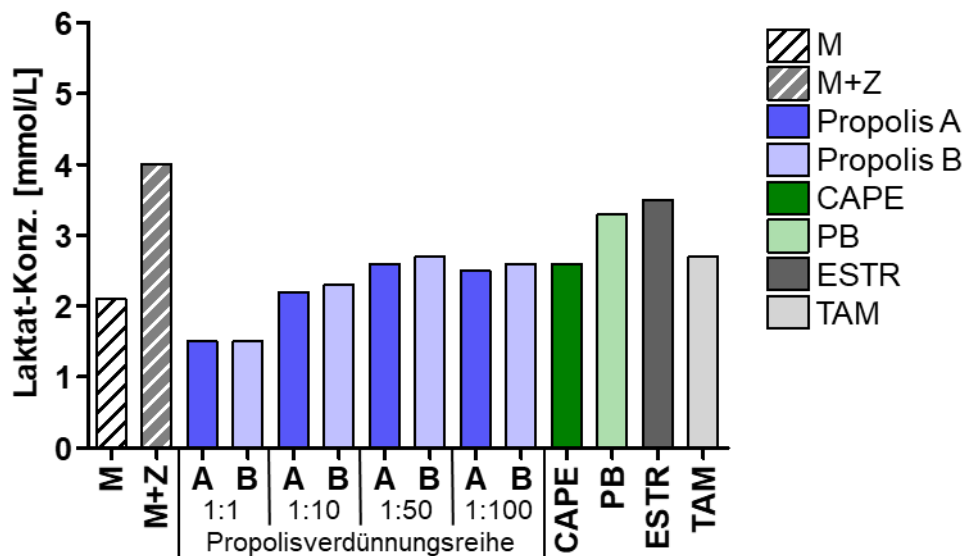


Abb. 17: GEHALT DER LAKTATKONZENTRATION IM MEDIUM VON FIBROBLASTEN (N = 1) NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS UND DEN KONTROLLSUBSTANZEN. M STEHT FÜR MEDIUM OHNE ZUSÄTZE UND M+Z FÜR ZELLEN IN MEDIUM. PROPOLIS A UND PROPOLIS B BEZEICHNEN ZWEI UNTERSCHIEDLICHE PROPOLIS-VARIANTEN. CAPE (KAFFEESSÄURE-PHENETHYLESTER) UND PB (PINOBANKSIN) SOWIE DIE WEITEREN SUBSTANZEN ESTRADIOL (ESTR) UND TAMOXIFEN (TAM) WURDEN GETESTET. DIE DATEN BASIEREN AUF MITTELWERTEN.

Osteoblasten

In der Abb. 18 ist die Laktatkonzentration der Osteoblasten dargestellt. Auch hier ist die Laktatkonzentration der unbehandelten Zellen am größten (M+Z: 5,8 mmol/l). Mit zunehmender Propolisverdünnung steigt auch der Laktatwert im Medium an und erreicht auch hier den höchsten Wert mit Propolis B in der Verdünnungsstufe 1:50 (4,6 mmol/l). Werden die Kontrollsubstanzen betrachtet, so zeigt sich bei den mit PB kultivierten Zellen (5,7 mmol/l) eine ähnlich hohe Laktatkonzentration, wie die im Medium der unbehandelten Zellen.

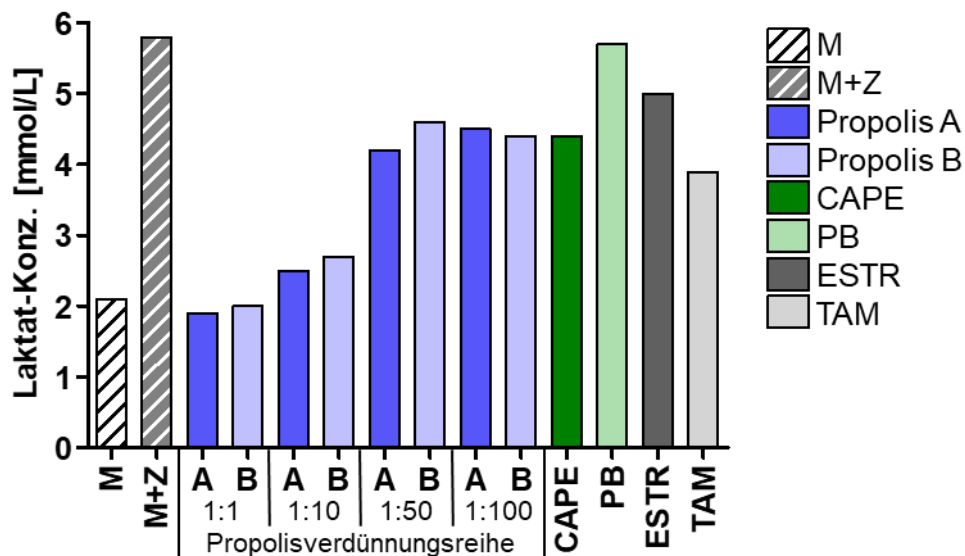


ABB. 18: GEHALT DER LAKTATKONZENTRATION IM MEDIUM VON OSTEOLASTEN (N = 1) NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS UND DEN KONTROLLSUBSTANZEN. M STEHT FÜR MEDIUM OHNE ZUSÄTZE UND M+Z FÜR ZELLEN IN MEDIUM. PROPOLIS A UND PROPOLIS B BEZEICHNEN ZWEI UNTERSCHIEDLICHE PROPOLIS-VARIANTEN. CAPE (KAFFEESÄURE-PHENETHYLESTER) UND PB (PINOBANKSIN) SOWIE DIE WEITEREN SUBSTANZEN ESTRADIOL (ESTR) UND TAMOXIFEN (TAM) WURDEN GETESTET. DIE DATEN BASIEREN AUF MITTELWERTEN.

Bestimmung des pH-Wertes

Fibroblasten

Die verwendeten Propolisorten in den verschiedenen Verdünnungsstufen und die Kontrollsubstanzen beeinflussten den pH-Wert nur in geringem Maße, wie die Abb. 19 veranschaulicht. Die pH-Werte bewegten sich zwischen 8,00 bis 8,21. Ab einer Verdünnungsstufe von 1:10 zeigte sich eine Tendenz der Propolis B für höhere pH-Werte im Vergleich zu Propolis A.

Alle Substanzen wiesen einen höheren pH-Wert als die unbehandelten Fibroblasten auf (M+Z: 8,00).

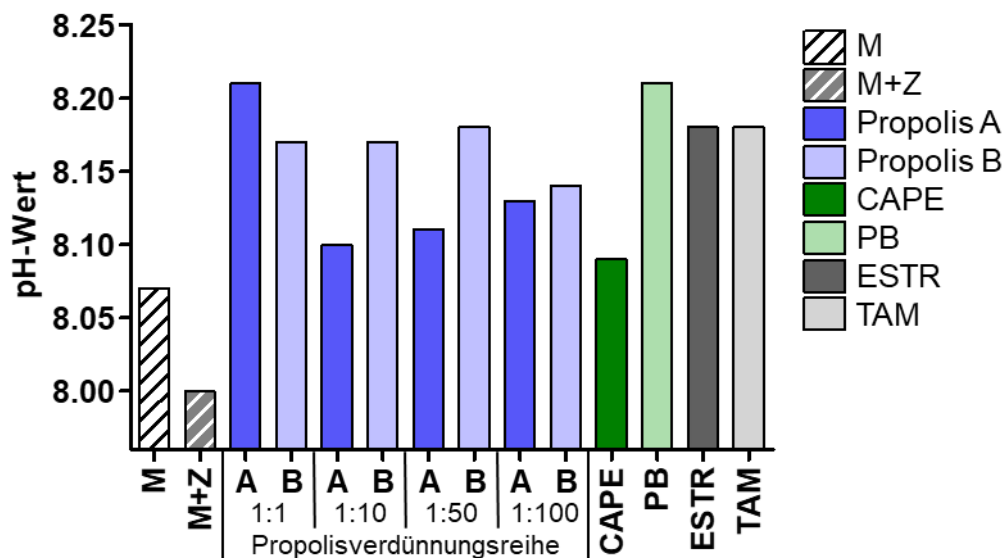


ABB. 19: DARSTELLUNG DES pH-WERTES DER FIBROBLASTEN IM MEDIUM NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS UND DEN KONTROLLSUBSTANZEN. M STEHT FÜR MEDIUM OHNE ZUSÄTZE UND M+Z FÜR MEDIUM MIT ZUSÄTZEN. PROPOLIS A UND PROPOLIS B BEZEICHNEN ZWEI UNTERSCHIEDLICHE PROPOLIS-VARIANTEN. CAPE (KAFFEESÄURE-PHENETHYLESTER) UND PB (PINOBANKSIN) SOWIE DIE WEITEREN SUBSTANZEN ESTRADIOL (ESTR) UND TAMOXIFEN (TAM) WURDEN GETESTET. DIE DATEN BASIEREN AUF MITTELWERTEN.

Osteoblasten

Die Abb. 20 stellt die pH-Werte der Osteoblasten im Medium dar. Auch bei den Osteoblasten haben die verwendeten Propolisarten in den verschiedenen Verdünnungsstufen und die Kontrollsubstanzen einen unwesentlichen Einfluss auf den pH-Wert des Zellkulturmediums. Alle Messwerte bewegten sich zwischen 8,01 bis 8,20.

Es lässt sich eine Tendenz für höhere pH-Werte bei Kultivierung der Zellen mit Propolis B im Vergleich zu Propolis A erkennen. Die mit Propolis A behandelte Zellen, unabhängig von der Verdünnungsstufe, hatten einen niedrigeren pH-Wert als unbehandelte Zellen (M+Z: 8,11). In der Verdünnungsstufe 1:10 von Propolis A (8,01) wurde sogar der pH-Wert des zellfreien Mediums (M: 8,04) unterschritten.

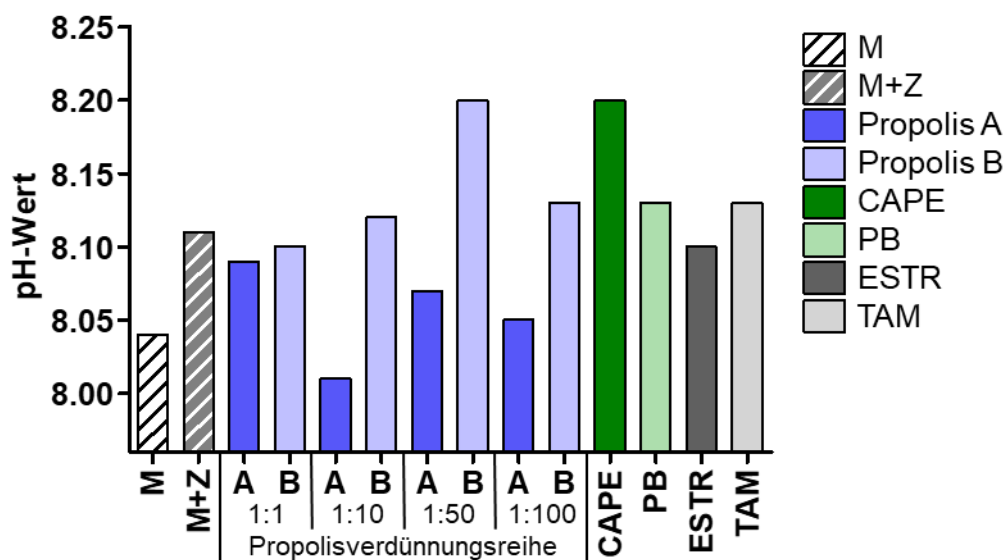


Abb. 20: DARSTELLUNG DES pH-WERTES DER OSTEOLASTEN IM MEDIUM NACH DER EINWIRKUNG VON PROPOLIS UND DEN KONTROLLSUBSTANZEN. M STEHT FÜR MEDIUM OHNE ZUSÄTZE UND M+Z FÜR MEDIUM MIT ZUSÄTZEN. PROPOLIS A UND PROPOLIS B BEZEICHNEN ZWEI UNTERSCHIEDLICHE PROPOLIS-VARIANTEN. CAPE (KAFFEESÄURE-PHENETHYLESTER) UND PB (PINOBANKSIN) SOWIE DIE WEITEREN SUBSTANZEN ESTRADIOL (ESTR) UND TAMOXIFEN (TAM) WURDEN GETESTET. DIE DATEN BASIEREN AUF MITTELWERTEN.

V. DISKUSSION

Die vorliegende Studie untersuchte die biologischen Effekte zweier deutscher Propolisarten und zwei isolierten Inhaltsstoffen (CAPE und PB) auf menschliche Fibroblasten und Osteoblasten unter Berücksichtigung eines breiten Spektrums an Konzentrationen.

Die Auswahl der verwendeten Zelltypen basiert auf ihrer zentralen Bedeutung für die Wundheilung und Geweberegeneration, die essenziell für den zahnmedizinischen Kontext sind und eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf klinische Anwendungen ermöglichen soll. Fibroblasten spielen eine Schlüsselrolle bei der Heilung von Weichgewebe durch die Kollagensynthese und Zellmigration, während Osteoblasten für die Knochenbildung und Regeneration von Hartgewebe unverzichtbar sind [169, 183]. Beide Zelltypen zeichnen sich zudem auch durch ihre Robustheit und Reproduzierbarkeit in Zellkulturen aus, was sie zu geeigneten Modellen für *in vitro* Studien macht [187].

Die Einwirkzeit der Propolis auf die Zellen wurde auf 24 Stunden festgelegt, was ein Standard für *in vitro* Studien zur Untersuchung initialer Effekte bioaktiver Substanzen darstellt [72]. Diese Zeitspanne war ausreichend, um erste zelluläre Reaktionen auf Propolis zu detektieren, ohne adaptive Mechanismen oder chronische Einflüsse zu berücksichtigen.

Die Untersuchung umfasste verschiedene Verdünnungen von Propolis (1:1, 1:10, 1:50 und 1:100), wobei die Konzentration von 1:1 die höchste Propolis-Dosierung repräsentiert, die vollständig mit Ethanol gelöst werden konnte. Die weiteren Verdünnungsstufen wurden mit Ethanol hergestellt, um die konzentrationsabhängige Wirkung von Propolis auf Zellproliferation, Viabilität, Apoptose, Zytotoxizität und dem Zellmetabolismus zu bewerten. Des Weiteren repräsentieren die gewählten Verdünnungen mögliche praxisnahe therapeutische Einsatzszenarien, erschweren jedoch den Vergleich mit Studien, die Konzentrationen in Mikrogramm pro Milliliter angeben. Eine chemische Umrechnung könnte in zukünftigen Studien dazu beitragen, die Ergebnisse direkt mit bestehenden Daten zu vergleichen.

Die Wahl des Lösungsmittels bei der Extraktion von Propolis beeinflusst maßgeblich die Zusammensetzung und biologische Aktivität der gewonnenen Extrakte [147]. Unterschiedliche Lösungsmittel können verschiedene bioaktive Komponenten extrahieren, was zu variierenden therapeutischen Eigenschaften führt. Ethanol, insbesondere in Konzentrationen zwischen 60 % und 80 %, wird häufig zur Extraktion von Propolis verwendet [120]. Studien zeigen, dass 70 %iger Ethanol eine hohe Ausbeute an phenolischen Verbindungen und Flavonoiden liefert [147], die für die antimikrobielle und antioxidative Aktivität verantwortlich sind [147, 185, 216].

Daher wurden für die Untersuchungen mit Ethanol gelöste Propolis verwendet. Die Verdünnungen wurden jeweils mit der ursprünglichen Ethanolkonzentration hergestellt (70 % Ethanol für Propolis A, 96 % Ethanol für Propolis B), um die Zusammensetzung der Extrakte nicht durch einen Lösungsmittelwechsel zu verändern.

Zwar hat sich Ethanol als effektives Lösungsmittel etabliert, doch birgt seine Verwendung potenzielle Nachteile. Ethanol kann die Mundschleimhaut reizen und bei längerer Anwendung eine zytotoxische Wirkung entfalten [162], was bei der therapeutischen Nutzung in der Zahnmedizin problematisch sein könnte. Ein vielversprechender Ansatz für zukünftige Studien könnte die Untersuchung alternativer Lösungsmittel zur Extraktion deutscher Propolis sein, insbesondere im Hinblick auf die Anwendung in der Zahnmedizin. Wässrige Extrakte könnten eine weniger irritierende Alternative für die Anwendung auf der Mundschleimhaut darstellen. Ein Nachteil ist jedoch, dass sie hauptsächlich wasserlösliche Komponenten extrahieren und die Konzentration an bioaktiven Verbindungen oft geringer ist [147, 185]. Einen Kompromiss stellen wässrige Ethanolextrakte dar, sie sind milder und besser verträglich für die Schleimhäute. Durch den Zusatz geringer Ethanolumengen kann die Extraktion von phenolischen Verbindungen verbessert werden, ohne die Biokompatibilität wesentlich zu beeinträchtigen [185].

In einer anderen Studie zeigten Propolisextrakte, die mit Aceton und DMSO gelöst wurden, dass DMSO-Extrakte im Vergleich zu Aceton-Extrakte eine stärkere antimikrobielle Wirkung gegen eine Vielzahl von Mikroorganismen entfalten, aber es wurden keine Aussagen in Hinblick auf die Biokompatibilität getätigt [192].

Zukünftige Untersuchungen sollten darauf abzielen, alternative Lösungsmittel für Propolis für die Zahnmedizin zu bewerten, um die Extraktionseffizienz und die biokompatiblen Eigenschaften zu optimieren. Ziel sollte es sein, Extrakte zu entwickeln, die sowohl wirksam als auch gut verträglich sind, um die klinische Anwendung von Propolis zu erleichtern.

Eine zusätzliche Herausforderung stellt die weltweit variierende chemische Zusammensetzung von Propolis dar. Ein wichtiger Punkt dieser Arbeit war es daher, die Wirkung deutscher Propolis zu untersuchen, um die Forschungslücken von Propolis aus unterschiedlichen Regionen der Welt zu verkleinern.

Standardisierte Formulierungen und analytische Methoden wie die HPLC können dazu beitragen, spezifische bioaktive Verbindungen zu identifizieren und zu quantifizieren, um reproduzierbare und sichere Anwendungen zu gewährleisten.

Die HPLC-Analyse der vorliegenden Studie zeigte, dass die zwei deutschen Propolisarten ein leicht abweichendes Substanzprofil aufwiesen. Das bestätigt den Einfluss durch klimatische und geografische Variablen auf die chemische Zusammensetzung und die

biologische Aktivität von Propolis [13]. Die chemische Zusammensetzung von Propolis wird auch durch Umweltfaktoren wie Temperatur, Vegetation und Bienenarten, beeinflusst [7, 12]. Studien zeigen [21, 120, 170] dass saisonale Schwankungen die Mengen und Arten der enthaltenen Flavonoide und Phenolsäuren verändern können, was die Unterschiede zwischen Propolis A und B erklären könnte. Diese Erkenntnisse betonen die Notwendigkeit einer detaillierten chemischen Analyse, um die therapeutischen Eigenschaften von Propolis besser zu verstehen und die Wirkungen vorherzusagen.

Die Standardisierung von Propolis stellt eine wesentliche Herausforderung dar, da wie bereits erwähnt, die chemische Zusammensetzung von Faktoren wie geografischer Herkunft, klimatischen Bedingungen und der lokalen Flora abhängt [7, 12, 89]. Aufgrund dieser natürlichen Variabilität ist es schwierig, einheitliche Qualitätsstandards für Propolis festzulegen. Die fehlende Standardisierung kann die Vergleichbarkeit von Forschungsergebnissen beeinträchtigen und die therapeutische Anwendung erschweren. Ein Ansatz zur Standardisierung könnte der EPP-AF® (Extracto de Própolis Padronizado Apis Flora) darstellen. Der EPP-AF® stammt aus Brasilien und wurde von der Firma Apis Flora entwickelt und hergestellt. Es handelt sich um einen patentierten standardisierten Propolisextrakt, der auf die chemische Zusammensetzung brasilianischer Propolis basiert [1]. Dieser Ansatz versucht, die natürliche Variabilität von Propolis durch die Festlegung spezifischer chemischer Marker wie Flavonoide, Phenolsäuren und anderen bioaktiven Verbindungen zu minimieren. Es wird eine reproduzierbare Zusammensetzung angestrebt, die durch chemische Analysen und Qualitätskontrollen gewährleistet werden soll. Eine Studie zeigt, dass dieser standardisierte Extrakt antimikrobielle, entzündungshemmende und wundheilungsfördernde Eigenschaften besitzt, wobei eine optimale Konzentration von 3,6 % für die therapeutische Anwendung identifiziert wurde [18]. Der Hersteller von EPP-AF® weist trotz patentierter Herstellung auf die natürliche Variabilität der Propolis hin, was die langfristige Reproduzierbarkeit erschwert. Dennoch kann die Verwendung von standardisierten Extrakten die Vergleichbarkeit zwischen Studien verbessern und die Entwicklung medizinischer Produkte erleichtern.

Variationen in den chemischen Bestandteilen von Propolis beeinflussen nicht nur dessen Zusammensetzung, sondern auch die Art und Weise, wie es mit Zielzellen und Geweben interagiert. Dies macht deutlich, wie wichtig die gezielte Auswahl spezifischer Zellkulturen ist, die repräsentativ für die angestrebten klinischen Anwendungen sind. Dabei spielt die Fähigkeit der Zellen, auf die bioaktiven Komponenten von Propolis zu reagieren, eine entscheidende Rolle.

Ein zentraler Mechanismus in der Zellbiologie und Pharmakologie ist die Bindung von bioaktiven Substanzen (Liganden) an spezifische Rezeptoren auf oder in Zellen. Diese Interaktion löst eine Reihe biologischer Prozesse aus, die von Signaltransduktion bis zur Zellantwort reichen. In diesem Zusammenhang war die immunhistochemische Untersuchung in der vorliegenden Studie unerlässlich, um die Präsenz und Expression der relevanten Rezeptoren sicherzustellen. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass die getesteten Propolisbestandteile an die Zielzellen binden und somit ihre Wirkung entfalten können. Die immunhistochemische Analyse dieser Studie hatte das Ziel, die Expression von Östrogenrezeptoren (ER- α und ER- β) in den verwendeten Zelllinien, Fibroblasten und Osteoblasten, zu untersuchen. Diese Untersuchung ist zentral, da Östrogenrezeptoren als Zielstrukturen für bioaktive Bestandteile von Propolis, insbesondere CAPE und Flavonoide wie PB, bekannt sind [6, 125]. Frühere Studien haben gezeigt, dass diese Verbindungen mit Östrogenrezeptoren interagieren und deren Signalwege modulieren können [100, 189]. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Expression von ER- α und ER- β in beiden Zelltypen. Dies deutet darauf hin, dass die bioaktiven Effekte von deutscher Propolis durch ER-vermittelte Signalwege induziert werden. Des Weiteren kann CAPE über die ER-Rezeptorbindung entzündungshemmende sowie antioxidative Prozesse auslösen, indem sie an Östrogenrezeptoren binden und deren Aktivierung fördern [145]. Die in dieser Studie dokumentierten Unterschiede zwischen den Effekten von Propolis A und Propolis B könnten auf unterschiedliche Affinitäten der Hauptbestandteile zu ER-Subtypen zurückzuführen sein. Des Weiteren konnte durch die immunhistochemischen Untersuchungen sichergestellt werden, dass die verwendete Positivkontrolle ESTR und Negativkontrolle TAM, die über ER- α und ER- β binden, gegensätzlich auf die Zellen einwirken können. ESTR fördert über den ER-Signalweg die Zellproliferation und Viabilität, ohne zytotoxisch zu wirken, indem es spezifische Gene und die MAPK im Zellkern aktiviert [74, 124]. Wohingegen TAM, ein ER-Antagonist, apoptotische Signalwege aktiviert und so Zelluntergang über die Aktivierung von Caspase-3 fördert [209]. Die Verwendung dieser Kontrollen verdeutlicht den Beitrag der Östrogenrezeptoren zu den beobachteten Effekten und ermöglicht eine Einordnung der Propoliswirkungen. Dennoch bleibt offen, in welchem Ausmaß diese Rezeptoren spezifisch für die Effekte der Propolisbestandteile verantwortlich sind und müssen in weiteren Studien noch näher untersucht werden.

Die Verbindung zwischen Rezeptorbindung und zellulären Reaktionen erlaubt eine detaillierte Analyse der durch Propolis ausgelösten Effekten für Fibroblasten und Osteoblasten. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde in den Zelltests untersucht, wie Propolis und seine Verdünnungen Zellproliferation, Viabilität, Apoptose und Zytotoxizität beeinflussen.

Die Untersuchung der Zellproliferation zeigte, dass beide Propolisarten eine konzentrationsabhängige Wirkung auf Fibroblasten und Osteoblasten hatten. Propolis A förderte in niedrigen bis mittleren Konzentrationen (1:50 und 1:100) die Proliferation der Fibroblasten. Andere Autoren konnten auch den konzentrationsabhängigen Einfluss von europäischer Propolis nachweisen, wobei die Konzentration von 50 µg/ml zu einer Stimulierung des proinflammatorischen Zytokins IL-8 bei den behandelten Fibroblasten führte [102], was eine Schlüsselrolle in der Wundheilung spielt [123]. Ein ähnlicher proliferationsfördernder Effekt von Propolis wurde in einer anderen Studie beschrieben. Klósek et al. zeigten, dass polnische Propolis in Konzentrationen zwischen 25 und 100 µg/ml die Proliferation humaner Gingivafibroblasten steigert, was auf die Freisetzung wachstumsfördernder Faktoren wie des Fibroblasten-Wachstumsfaktors aFGF zurückzuführen ist [93]. Dies deckt sich mit den hier beobachteten Effekten, die insbesondere bei Propolis A (1:100) signifikant waren. Des Weiteren sind diese Ergebnisse konsistent mit früheren Studien, die zeigen, dass CAPE über den NF-κB-Signalweg proliferationsfördernd wirkt und oxidativen Stress reduziert [201, 215].

Auch im Hinblick auf die Osteoblasten konnten Rückschlüsse auf den Effekt für die Knochenneubildung geschlossen werden. Propolis steigerte die Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten, führte aber gleichzeitig zu einer Abnahme von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1β und TNF-α [182]. In der vorliegenden Studie zeigten die deutschen Propolisarten dennoch einen insgesamt geringeren proliferationsfördernden Effekt auf die Osteoblasten. Propolis B führte nur zu einer moderaten Steigerung der Proliferation in niedrigen Konzentrationen (1:100), im Vergleich zu höheren Konzentrationen, die hemmend wirkten. Dies steht im Einklang mit Studien, die beschreiben, dass Osteoblasten spezifischere Stimuli benötigen, um ihre Proliferation und Differenzierung zu fördern [55]. Die geringere Wirkung auf die Osteoblasten, im Vergleich zu den Fibroblasten, könnte darauf hindeuten, dass die regenerativen Effekte von Propolis auf den Knochenstoffwechsel vor allem durch die Unterstützung der Differenzierung und Mineralisierung des Knochengewebes erfolgen als durch die direkte Indizierung der Proliferation von einzelnen Osteoblasten [205].

Des Weiteren berichtet eine Studie darüber, dass thailändische Propolis bei Osteoblasten in niedrigen Konzentrationen (50 µg/ml) die Proliferation und Differenzierung fördern konnte, während höhere Konzentrationen hemmend wirkten [60]. Ähnliche Beobachtungen fanden sich in der vorliegenden Studie, in der höhere Konzentrationen von Propolis die Proliferation von Osteoblasten reduzierten. Diese Ergebnisse sind für potenzielle Anwendungen in der Geweberegeneration relevant, da sie zeigen, dass Propolis in niedrigen Konzentrationen die Zellproliferation gezielt fördern kann, ohne zytotoxisch zu wirken.

Die Zellviabilität wurde durch die Behandlung mit beiden Propolisarten gesteigert, insbesondere bei der Verdünnung von 1:100. CAPE und PB sind als potente Antioxidantien bekannt und reduzieren oxidativen Stress, der eine der Hauptursachen für zelluläre Schäden ist [29, 103]. Die Fähigkeit von CAPE, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu neutralisieren, könnte die gesteigerte Viabilität insbesondere der Fibroblasten erklären, da diese Zellen empfindlich auf oxidative Schäden reagieren [161]. Diese Effekte verdeutlichen, dass Propolis durch seine antioxidativen und zellschützenden Eigenschaften zur Förderung der Zellviabilität beitragen kann.

Interessanterweise war der Effekt auf die Viabilität bei Osteoblasten ebenfalls messbar, jedoch weniger ausgeprägt als bei Fibroblasten. Diese Zelltypspezifität könnte auf Unterschiede im Stoffwechsel und in den Signalwegen der Zellen zurückzuführen sein. Während Fibroblasten durch antioxidative Wirkstoffe wie CAPE stark geschützt werden, scheinen Osteoblasten eine geringere Sensitivität gegenüber Propolis antioxidativen Inhaltsstoffen zu zeigen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass CAPE eine Apoptoseinduktion in Fibroblasten bewirkt. Dieser Effekt steht im Einklang mit der Literatur, denn die Inhaltsstoffe der Propolis, insbesondere CAPE, sind bekannte Aktivatoren apoptotischer Signalwege, die die Caspase-Aktivität steigern können [6, 87]. Es wurde berichtet, dass CAPE in hohen Konzentrationen von 25 bis 50 µg/ml Apoptose in menschlichen Leukämiezellen induziert [38]. Auch Dragana et al. untersuchten die Wirkung von Propolis und CAPE auf fibroblastartige Zelltypen (McCoy-Plovidiv-Zellen) und zeigten, dass sowohl Propolis als auch CAPE in höheren Konzentrationen (Propolis: 10 mg/l; CAPE: 16 mg/l) eine signifikante Hochregulation von Tumorsuppressor p53 induzierten und apoptotischen Zelltod herbeiführten [57].

Interessanterweise zeigten die eigenen Ergebnisse, dass Propolis in niedrigeren Konzentrationen (1:50 und 1:100) die Apoptose hemmte, was auf eine protektive Wirkung gegenüber normalen Zelltypen hinweist. Dieser Effekt könnte wieder durch die antioxidativen Eigenschaften von CAPE und PB erklärt werden, die oxidativen Stress reduzieren und Zellschäden verhindern [6, 82, 203].

Diese Ergebnisse verdeutlichen die konzentrationsabhängige Aktivierung apoptotischer Signalwege durch Propolis und seine Inhaltsstoffe. Zukünftige Studien sollten darauf abzielen, die spezifischen Signalwege der Propolis-induzierten Apoptose in zelltypspezifischen Kontexten weiter aufzuklären. Ein besonderer Fokus könnte hierbei auf der Rolle der mitochondrialen Signalwege und der Regulation von Caspase-Aktivitäten liegen.

Die zytotoxische Wirkung der Propolisarten nahm mit steigender Konzentration deutlich zu, wobei die höchste Konzentration (1:1) eine vollständige Hemmung der Zellviabilität und Proliferation bei Fibroblasten und Osteoblasten verursachten. Ähnliche Beobachtungen

machte eine Studie, die konzentrationsabhängige zytotoxische Effekte auf humane Leukozyten zeigte [128]. In einer weiteren Studie wurde festgestellt, dass Propolis bei einer Konzentration von 0,01 % eine antiproliferative und zytotoxische Wirkung auf humane Fibroblasten ausübt [190].

Die in hohen Konzentrationen (1:1 und 1:10) beobachtete zytotoxische Wirkung von Propolis könnte durch die Aktivierung toxischer Signalwege vermittelt werden, die die Zellviabilität und Proliferation sowohl bei Fibroblasten als auch bei Osteoblasten verminderten. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen die berichteten, dass brasilianische Propolis in Konzentrationen von bis zu 50 µg/ml die Viabilität dermalen Fibroblasten steigert, während bei höheren Konzentrationen toxische Effekte auftreten [113].

Diese Effekte, bei denen niedrige Konzentrationen zellschützend wirken, während hohe Konzentrationen zytotoxisch sind, könnten klinisch genutzt werden, um spezifische Anwendungen von Propolis zu entwickeln, beispielsweise zur Unterstützung der Wundheilung oder zur Hemmung pathologischer Zellproliferation.

Die Ergebnisse zur Glucose-, Laktat- und pH-Wert-Messung im Zellmedium liefern wertvolle Einblicke in die metabolischen Effekte von Propolis auf Fibroblasten und Osteoblasten. Diese Daten sind jedoch nicht isoliert zu betrachten, sondern stehen in enger Verbindung mit anderen Parametern wie Proliferation, Viabilität und Zytotoxizität, da Änderungen im Zellstoffwechsel häufig durch die Zellaktivität und -anzahl beeinflusst werden.

Die Glucosekonzentration zeigte in Abhängigkeit von den Propolisverdünnungen unterschiedliche Wirkungen. Bei Fibroblasten wurden nur geringe Schwankungen festgestellt, während bei Osteoblasten teils stärkere Veränderungen auftraten. Hohe Propoliskonzentrationen (1:1 und 1:10) führten nicht zu einem Glukoseverbrauch im Medium, was auf eine eingeschränkte metabolische Aktivität und möglicherweise eine Reduktion der Zellzahl hinweist. Diese Beobachtungen korrelieren mit den zytotoxischen Effekten der hohen Konzentrationen, die eine Reduktion der Zellviabilität und Proliferation verursachten.

Interessanterweise zeigten niedrige Verdünnungen (1:100) je nach Propolisart und Zelltyp gegensätzliche Effekte. Während bei Propolis A ein Anstieg der Glucosekonzentration im Medium der Fibroblasten festgestellt wurde, könnte dies auf eine verringerte Aufnahme oder metabolische Nutzung hindeuten. Studien unterstützen diese Beobachtungen, indem sie zeigen, dass Propolis und CAPE den mitochondrialen Stoffwechsel moduliert und so die Energieproduktion beeinflusst [126, 176]. Diese Unterschiede zwischen den Propolisarten A und B könnten durch die variierende chemische Zusammensetzung erklärt werden, die die mitochondriale Aktivität unterschiedlich stark beeinflusst.

Die Laktatkonzentrationen im Zellmedium zeigten eine deutliche dosisabhängige Wirkung. Hohe Propolis-Konzentrationen führten zu einer Reduktion der Laktatwerte, was auf eine Hemmung der Glykolyse oder einen verminderten Zellstoffwechsel hinweist. Dies korreliert mit den zytotoxischen Wirkungen hoher Propolis-Konzentrationen, die eine Abnahme der Zellzahl und metabolischen Aktivität verursachen.

Niedrigere Konzentrationen (1:50 und 1:100) führten hingegen zu einer moderaten Steigerung der Laktatwerte, insbesondere bei Osteoblasten. Diese Ergebnisse deuten auf eine gesteigerte metabolische Aktivität hin, die mit der erhöhten Proliferation und Viabilität in den niedrigeren Konzentrationen zusammenhängt.

Diese Daten zeigen, dass Propolis den Zellstoffwechsel dosisabhängig beeinflusst. In niedrigen Konzentrationen könnte Propolis eine unterstützende Wirkung auf die Energiehomöostase und metabolische Aktivität der Zellen haben, während hohe Konzentrationen mit zytotoxischen Effekten assoziiert sind. Diese metabolischen Parameter ergänzen die zellulären Beobachtungen und liefern ein umfassenderes Bild der biologischen Wirkungen von Propolis.

Die pH-Werte des Zellmediums blieben in allen getesteten Konzentrationen stabil, was darauf hindeutet, dass Propolis keine negativen Auswirkungen auf die Säure-Basen-Homöostase der Zellen hat. Ein stabiler pH-Wert ist essenziell für die Zellfunktion und Viabilität, und die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Propolis in diesem Bereich keine nachteiligen Effekte ausübt. Jedoch ist hierbei zu berücksichtigen, dass die pH-Homöostase maßgeblich von der ursprünglichen Pufferkapazität des Mediums abhängt, welche unter den verwendeten Versuchsbedingungen ausreichend hoch war.

Die Ergebnisse dieser Studie unterstreichen das Potenzial von Propolis als vielseitiges Therapeutikum in der Zahnmedizin. Die proliferations- und viabilitätsfördernden Eigenschaften bei moderaten Verdünnungen (1:50 und 1:100) bieten eine vielversprechende Grundlage für den Einsatz in der Regeneration von Weichgewebe, beispielsweise nach chirurgischen Eingriffen wie Zahnextraktionen oder Implantatsetzungen. Diese positiven Effekte könnten insbesondere zur Verbesserung der Wundheilung und zur Unterstützung postoperativer Prozesse beitragen. Darüber hinaus könnten die apoptotischen und zytotoxischen Effekte, die bei hohen Propolis-Konzentrationen (1:1 und 1:10) beobachtet wurden, gezielt genutzt werden, um pathologische oder entzündungsfördernde Zellpopulationen zu eliminieren. Dies ist besonders relevant für die Behandlung von entzündlichen Erkrankungen wie Parodontitis oder periimplantären Infektionen, bei denen die Kontrolle des entzündlichen Mikromilieus essenziell ist. Auch in Bezug auf Reizungen im Mundraum während kieferorthopädischer Behandlungen,

könnte Propolis und seine Bestandteile die entzündlichen Reaktionen reduzieren und die Regeneration des Gewebes fördern. Dies trägt zu einem verbesserten Patientenkomfort bei und kann die gesamte Behandlung positiv beeinflussen.

Die Einwirkzeit der Propolisproben wurde in der vorliegenden Studie auf 24 Stunden standardisiert, um initiale zelluläre Effekte zu analysieren. Auswirkungen längerer oder kürzerer Expositionszeiten wurden jedoch nicht untersucht, was eine wichtige Limitation darstellt. Zukünftige Studien sollten sich auf die detaillierte Analyse variierender Expositionszeiten konzentrieren, da diese die zellulären Reaktionen signifikant beeinflussen könnten. Frühere Untersuchungen deuten darauf hin, dass Propolis bei längerer Anwendung entzündungshemmende und regenerative Prozesse modulieren kann [89], was besonders relevant für den zahnmedizinischen Einsatz ist. Insbesondere bei der kontinuierlichen Anwendung in Form von Salben oder Mundspülungen könnten verlängerte Expositionszeiten sowohl die therapeutische Wirksamkeit steigern als auch potenzielle Risiken bergen. Um eine sichere Anwendung zu gewährleisten, ist es daher essenziell, mögliche Nebenwirkungen durch übermäßig lange Expositionszeiten auszuschließen und die optimale Behandlungsdauer zu bestimmen. Außerdem sollte auch die Kombination von Propolis mit anderen Substanzen (z.B. klassische Antibiotika) betrachtet werden, um synergistische Effekte zu untersuchen.

Gleichzeitig wird deutlich, dass die gewonnenen Erkenntnisse durch die Untersuchung auf Gewebeebene ergänzt werden müssen, um die komplexen Interaktionen zwischen Zellen, Matrix und Propolis vollständig zu verstehen. Daher ist eine zentrale Limitation dieser Studie die ausschließliche Verwendung kommerzieller Zelllinien für Fibroblasten und Osteoblasten, die zwar eine hohe Reproduzierbarkeit und Standardisierung ermöglichen, aber die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf klinische Anwendungen einschränken.

Die geringe Stichprobengröße, insbesondere bei den Osteoblasten ($n = 1$), stellt eine weitere Einschränkung dar. Um belastbare Daten zu erhalten, sind Studien mit größeren Stichproben notwendig. Die Ergebnisse einer so kleinen Stichprobe können nicht auf eine größere Population verallgemeinert werden, da sie anfällig für Zufallseffekte und individuelle Variabilität sind [19]. Groß angelegte *in vivo*-Modelle könnten komplexere Interaktionen, wie die Einflüsse des Immunsystems oder der extrazellulären Matrix, besser abbilden und aussagekräftigere Ergebnisse liefern. Zukünftige Untersuchungen sollten diese Aspekte berücksichtigen, um die hier gewonnenen Erkenntnisse weiter zu validieren und zu erweitern.

Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen, dass deutsche Propolis positive Effekte auf die Zellproliferation und Viabilität von Fibroblasten und Osteoblasten ausübt und damit ein

vielversprechendes Potenzial für den Einsatz in der Zahnmedizin bietet. Diese Studie leistet einen wichtigen Beitrag zur wissenschaftlichen Grundlage für die Anwendung von deutscher Propolis als natürliches Therapeutikum, insbesondere im Kontext der Geweberegeneration und Wundheilung.

Obwohl niedrige Propoliskonzentrationen überwiegend vorteilhafte Wirkungen zeigen, wird in hohen Konzentrationen eine deutliche Zytotoxizität beobachtet, die potenzielle Nebenwirkungen mit sich bringen könnte. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, präzise Dosierungsrichtlinien zu entwickeln, um die positiven Eigenschaften von Propolis zu maximieren und gleichzeitig unerwünschte Effekte zu minimieren. Insbesondere Sicherheitsstudien, die langfristige Anwendungen und mögliche Langzeiteffekte untersuchen, sind entscheidend, um Propolis sicher und effektiv in die zahnmedizinische Praxis zu integrieren.

Es ist zu beachten, dass Propolis bei sensibilisierten Personen allergische Reaktionen auslösen kann [69]. Die Hauptallergene, wie CAPE, können durch Oxidation Haptene bilden, die das Immunsystem sensibilisieren und allergische Reaktionen hervorrufen [77, 129].

Die klinischen Erscheinungsformen reichen von Kontaktdermatitis über Urtikaria, Rhinitis und Konjunktivitis bis hin zu seltenen anaphylaktischen Reaktionen. Besonders exponierte Gruppen wie Imker zeigen eine Sensibilisierungsrate von bis zu 28,6 % [129].

Die Bedeutung einer genauen Anamnese und allergologischen Testung bei Verdacht auf eine Propolis-Allergie kann nicht genug betont werden, um eine sichere Anwendung zu gewährleisten. Trotz der positiven Eigenschaften von Propolis bleibt das Risiko allergischer Reaktionen eine Limitation, die sowohl bei der Entwicklung als auch bei der klinischen Anwendung berücksichtigt werden sollte.

Zusammenfassend zeigt Propolis ein bemerkenswertes Wirkprofil: Während niedrige Dosierungen regenerative Prozesse fördern und gesunde Zellen schützen, könnten hohe Konzentrationen genutzt werden, um pathologische oder entzündungsfördernde Zellen gezielt zu eliminieren. Dieses einzigartige Profil macht Propolis zu einem vielversprechenden Kandidaten für vielseitige zahnmedizinische Anwendungen. Um dieses therapeutische Potenzial vollständig auszuschöpfen, sind jedoch standardisierte Propolisformulierungen, präzise Einwirkzeiten sowie fundierte Dosierungsempfehlungen unerlässlich. Insbesondere die Standardisierung europäischer bzw. deutscher Propolis stellt eine Schlüsselaufgabe dar, um eine sichere und reproduzierbare Anwendung in der Zahnmedizin zu gewährleisten.

VI. THESEN

1. Propolis ist ein natürliches Bienenprodukt mit vielseitigen pharmakologischen Eigenschaften, darunter antibakterielle, entzündungshemmende und wundheilungsfördernde Wirkungen. Diese Eigenschaften machen Propolis zu einem vielversprechenden Kandidaten für Einsatz in der Zahnmedizin.
2. Die chemische Zusammensetzung von Propolis variiert je nach geografischer Herkunft, klimatischen Bedingungen und Sammelpflanzen. Diese Variabilität beeinflusst die biologische Aktivität und stellt eine Herausforderung für die Standardisierung dar.
3. Die vorliegende Studie verwendete Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), um CAPE und PB in deutscher Propolis nachzuweisen und deren Wirkung auf Fibroblasten und Osteoblasten zu untersuchen.
4. Die Auswahl geeigneter Zellkulturen ist essenziell für die Untersuchung biologischer Effekte von Propolis. Fibroblasten und Osteoblasten sind aufgrund ihrer zentralen Rolle in der Geweberegeneration und ihrer Reproduzierbarkeit *in vitro* geeignete Modelle für zahnmedizinische Anwendungen.
5. Niedrige Konzentrationen von Propolis (1:50, 1:100) fördern die Zellproliferation und Viabilität von Fibroblasten und Osteoblasten. Fibroblasten reagieren dabei empfindlicher als Osteoblasten, die eine geringere Sensitivität zeigen.
6. Hohe Konzentrationen von Propolis (1:1, 1:10) zeigen zytotoxische Effekte und induzieren apoptotische Signalwege bei Fibroblasten und Osteoblasten.
7. Propolis moduliert den Zellstoffwechsel, indem es dosisabhängig die Glukoseaufnahme und Laktatproduktion der Zellen beeinflusst.
8. Die fehlende Standardisierung europäischer Propolisextrakte erschwert die Vergleichbarkeit von Studien und erfordert eine präzise Charakterisierung bioaktiver Inhaltsstoffe für eine reproduzierbare klinische Anwendung.

9. Die Wirkung von Propolis ist stark dosisabhängig, weshalb präzise Dosierungsempfehlungen für den therapeutischen Einsatz unerlässlich sind. Langfristige Sicherheitsstudien sind erforderlich, um mögliche Nebenwirkungen bei der längeren therapeutischen Anwendung in der Zahnmedizin zu minimieren.
10. Die Wahl biokompatibler und effizienter Extraktionsmethoden ist entscheidend, um die biologische Aktivität von Propolis zu erhalten und die klinische Anwendung in der Zahnmedizin zu verbessern.
11. Die Kombination aus standardisierten Propolisformulierungen, optimierten Extraktionsmethoden und präzisen Dosierungsempfehlungen ist essenziell für eine erfolgreiche Integration von Propolis in die zahnmedizinische Praxis.
12. Diese Arbeit zeigt das Potenzial deutscher Propolis für den therapeutischen Einsatz in der Zahnmedizin. Weitere Forschung zur Standardisierung, Sicherheit und langfristigen Wirkung ist notwendig, um eine sichere und effektive klinische Anwendung zu ermöglichen.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Propolis, ein von Bienen produziertes Naturprodukt, wird aufgrund seiner vielfältigen pharmakologischen Eigenschaften, darunter antibakterielle, antimykotische, antivirale und entzündungshemmende Effekte, zunehmend als potenzielles Heilmittel erforscht. In dieser Studie liegt der Fokus auf der Untersuchung der Wirkung von zwei verschiedenen deutschen Propolisarten und zwei Vertreter ihrer chemischen Hauptklassen (CAPE und PB) auf menschlichen Fibroblasten und Osteoblasten.

Die zwei Propolisarten wurden hinsichtlich ihrer konzentrationsabhängigen Wirkungen auf die Zellen analysiert. Es wird betont, dass geografische Unterschiede in der Herkunft von Propolis zu variierenden chemischen Zusammensetzungen führen können. Zur Untersuchung wurden HPLC, Immunhistochemie und Analysen des Zellmetabolismus eingesetzt. Zudem kamen biochemische Assays zum Einsatz, um Proliferation, Viabilität, Apoptose und Zytotoxizität der Zellen zu bewerten. Die Ergebnisse zeigen, dass beide Propolisarten in niedrigen Konzentrationen die Zellproliferation und Zellviabilität fördern, während hochkonzentrierte Propolis eine hemmende Wirkung aufweist. Dabei wird deutlich, dass Propolis stark dosisabhängige Wirkungen auf die Zellen hat.

Trotz vielversprechender Ergebnisse weist die Studie auf einige Limitationen hin, darunter die begrenzte Stichprobengröße für die Osteoblasten und Tests des Zellmetabolismus.

Weitere Forschung ist notwendig, um die genauen Mechanismen der Propolisarten zu verstehen. Unter anderen sollten klinischer Studien die Wirksamkeit und Sicherheit von Propolis in der zahnärztlichen Praxis untersuchen. Eine geeignete Dosierung muss zukünftig ermittelt werden, um die Anwendung von Propolis in der Wundheilung und Regeneration im Bereich der Zahnmedizin zu verbessern.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. EPPAF - Ciência da Própolis - Apis Flora (2024) EPP-AF® - EPPAF - Ciência da Própolis - Apis Flora. <https://cienciadapropolis.com.br/en/what-is-epp-af/epp-af/>. Accessed 29 Dec 2024
 2. Hans Georg Oswald, Ruth Oswald (2020) Biopropolis von Imkerei Oswald 20ml. <https://bio-honig.com/shop/propolis-vom-imker-propolis-bio/>. Accessed 09 Feb 2020
 3. CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. https://www.promega.de/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter_glo-luminescent-cell-viability-assay/?catNum=G7570. Accessed 18 Feb 2020
 4. Satower Land e.V. Artikel über Bienenhof Freiheit. http://www.satower-land.de/html/main/i_sehenswertdetail2.php?kategorie=5&id=11. Accessed 09 Feb 2020
 5. Ahangari Z, Alborzi S, Yadegari Z et al. (2013) The effect of propolis as a biological storage media on periodontal ligament cell survival in an avulsed tooth: an in vitro study. *Cell J* 15(3): 244–249
 6. Alday E, Valencia D, Carreño AL et al. (2015) Apoptotic induction by pinobanksin and some of its ester derivatives from Sonoran propolis in a B-cell lymphoma cell line. *Chem Biol Interact* 242: 35–44. doi: 10.1016/j.cbi.2015.09.013
 7. Anjum SI, Ullah A, Khan KA et al. (2019) Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences* 26(7): 1695–1703. doi: 10.1016/j.sjbs.2018.08.013
 8. Arafa MG, Ghalwash D, El-Kersh DM et al. (2018) Propolis-based niosomes as oromuco-adhesive films: A randomized clinical trial of a therapeutic drug delivery platform for the treatment of oral recurrent aphthous ulcers. *Sci Rep* 8(1): 18056. doi: 10.1038/s41598-018-37157-7
 9. Araújo JR, Gonçalves P, Martel F (2011) Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutr Res* 31(2): 77–87. doi: 10.1016/j.nutres.2011.01.006
 10. Awawdeh L, Al-Beitawi M, Hammad M (2009) Effectiveness of propolis and calcium hydroxide as a short-term intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*: a laboratory study. *Australian Endodontic Journal* 35(2): 52–58. doi: 10.1111/j.1747-4477.2008.00125.x
 11. Azevedo IB de, Sampaio RF, Montes JC et al. (1986) Tratamento das escaras de decúbito com própolis (Treatment of decubitus ulcers with propolis). *Rev Bras Enferm* 39(2-3): 33–37. doi: 10.1590/s0034-71671986000300007
 12. Bankova V (2005) Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol* 100(1-2): 114–117. doi: 10.1016/j.jep.2005.05.004
-

13. Bankova V, Popova M, Bogdanov S et al. (2002) Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Zeitschrift für Naturforschung C* 57(5-6): 530–533. doi: 10.1515/znc-2002-5-622
 14. Bankova VS, Castro SL de, Marcucci MC (2000) Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31(1): 3–15. doi: 10.1051/apido:2000102
 15. Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S (2001) Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res* 15(7): 561–571. doi: 10.1002/ptr.1029
 16. Beckman Coulter Technical Bulletin for Beckman Coulter AU analyzers (Lactate). <https://www.beckmancoulter.com/de/support/tech-docs>, Accessed 09 Feb 2025
 17. Benković V, Kopjar N, Horvat Knezevic A et al. (2008) Evaluation of radioprotective effects of propolis and quercetin on human white blood cells in vitro. *Biol Pharm Bull* 31(9): 1778–1785. doi: 10.1248/bpb.31.1778
 18. Berretta AA, Nascimento AP, Bueno PCP et al. (2012) Propolis standardized extract (EPP-AF®), an innovative chemically and biologically reproducible pharmaceutical compound for treating wounds. *Int J Biol Sci* 8(4): 512–521. doi: 10.7150/ijbs.3641
 19. Biau DJ, Kernéis S, Porcher R (2008) Statistics in brief: the importance of sample size in the planning and interpretation of medical research. *Clin Orthop Relat Res* 466(9): 2282–2288. doi: 10.1007/s11999-008-0346-9
 20. Bohm BA (op. 1998) Introduction to flavonoids. Chemistry and biochemistry of organic natural products, vol 2. Harwood Academic Publishers, Australia [etc.]
 21. Bonvehí JS, Coll FV, Jordà RE (1994) The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *J Am Oil Chem Soc* 71(5): 529–532. doi: 10.1007/BF02540666
 22. Braakhuis A (2019) Evidence on the Health Benefits of Supplemental Propolis. *Nutrients* 11(11). doi: 10.3390/nu11112705
 23. Brumfitt W, Hamilton-Miller JM, Franklin I (1990) Antibiotic activity of natural products: 1. Propolis. *Microbios* 62(250): 19–22
 24. Bruschi ML, Franco SL, Gremião MPD (2003) Application of an HPLC Method for Analysis of Propolis Extract. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 26(14): 2399–2409. doi: 10.1081/JLC-120023254
 25. Búfalo MC, Ferreira I, Costa G et al. (2013) Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF-κB and MAPK activation in macrophages. *J Ethnopharmacol* 149(1): 84–92. doi: 10.1016/j.jep.2013.06.004
 26. Çakır T, Özkan E, Dulundu E et al. (2011) Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pharm Pharmacol* 63(12): 1566–1571. doi: 10.1111/j.2042-7158.2011.01359.x
-

27. Cao X-P, Chen Y-F, Zhang J-L et al. (2017) Mechanisms underlying the wound healing potential of propolis based on its in vitro antioxidant activity. *Phytomedicine* 34: 76–84. doi: 10.1016/j.phymed.2017.06.001
28. Capistrano HM, Assis EM de, Leal RM et al. (2013) Brazilian green propolis compared to miconazole gel in the treatment of Candida-associated denture stomatitis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 947980. doi: 10.1155/2013/947980
29. Castro C, Mura F, Valenzuela G et al. (2014) Identification of phenolic compounds by HPLC-ESI-MS/MS and antioxidant activity from Chilean propolis. *Food Res Int* 64: 873–879. doi: 10.1016/j.foodres.2014.08.050
30. Castro PA de, Bom VLP, Brown NA et al. (2013) Identification of the cell targets important for propolis-induced cell death in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* 60: 74–86. doi: 10.1016/j.fgb.2013.07.001
31. Çelemlı ÖG, Hatjina F, Charistos L et al. (2013) More Insight into the Chemical Composition of Greek Propolis; Differences and Similarities with Turkish Propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C* 68: 429. doi: 10.5560/ZNC.2013.68c0429
32. Celerino de Moraes Porto IC, Chaves Cardoso de Almeida D, Vasconcelos Calheiros de Oliveira Costa G et al. (2018) Mechanical and aesthetics compatibility of Brazilian red propolis micellar nanocomposite as a cavity cleaning agent. *BMC Complement Altern Med* 18(1): 219. doi: 10.1186/s12906-018-2281-y
33. Chan GC-F, Cheung K-W, Sze DM-Y (2013) The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. *Clinic Rev Allerg Immunol* 44(3): 262–273. doi: 10.1007/s12016-012-8322-2
34. Chang H, Wang Y, Yin X et al. (2017) Ethanol extract of propolis and its constituent caffeic acid phenethyl ester inhibit breast cancer cells proliferation in inflammatory microenvironment by inhibiting TLR4 signal pathway and inducing apoptosis and autophagy. *BMC Complement Altern Med* 17(1): 471. doi: 10.1186/s12906-017-1984-9
35. Chen M-F, Keng PC, Lin P-Y et al. (2005) Caffeic acid phenethyl ester decreases acute pneumonitis after irradiation in vitro and in vivo. *BMC Cancer* 5: 158. doi: 10.1186/1471-2407-5-158
36. Chen M-F, Wu C-T, Chen Y-J et al. (2004) Cell killing and radiosensitization by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in lung cancer cells. *J Radiat Res* 45(2): 253–260. doi: 10.1269/jrr.45.253
37. Chen M-J, Chang W-H, Lin C-C et al. (2008) Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis of human pancreatic cancer cells involving caspase and mitochondrial dysfunction. *Pancreatology* 8(6): 566–576. doi: 10.1159/000159843

38. Chen YJ, Shiao MS, Hsu ML et al. (2001) Effect of caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *J Agric Food Chem* 49(11): 5615–5619. doi: 10.1021/jf0107252
39. Chen YJ, Shiao MS, Wang SY (2001) The antioxidant caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis associated with selective scavenging of hydrogen peroxide in human leukemic HL-60 cells. *Anticancer Drugs* 12(2): 143–149. doi: 10.1097/00001813-200102000-00008
40. Chung L-C, Chiang K-C, Feng T-H et al. (2017) Caffeic acid phenethyl ester upregulates N-myc downstream regulated gene 1 via ERK pathway to inhibit human oral cancer cell growth in vitro and in vivo. *Mol Nutr Food Res* 61(9). doi: 10.1002/mnfr.201600842
41. Chuu C-P, Lin H-P, Ciaccio MF et al. (2012) Caffeic acid phenethyl ester suppresses the proliferation of human prostate cancer cells through inhibition of p70S6K and Akt signaling networks. *Cancer Prev Res (Phila)* 5(5): 788–797. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-12-0004-T
42. Conti BJ, Santiago KB, Búfalo MC et al. (2015) Modulatory effects of propolis samples from Latin America (Brazil, Cuba and Mexico) on cytokine production by human monocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 67(10): 1431–1438. doi: 10.1111/jphp.12431
43. Cornara L, Biagi M, Xiao J et al. (2017) Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. *Front. Pharmacol.* 8: 412. doi: 10.3389/fphar.2017.00412
44. Corporation P CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay Technical Bulletin TB359. https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/cytotox-glo-cytotoxicity-assay-protocol.pdf?rev=8ace451fc706450b91dd1c3cc845bc93&sc_lang=en, Accessed 30 Jan 2025
45. Crane E (2004) A short history of knowledge about honey bees (*Apis*) up to 1800. *Bee World* 85(1): 6–11. doi: 10.1080/0005772X.2004.11099604
46. Cuesta-Rubio O, Piccinelli AL, Fernandez MC et al. (2007) Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the brown, red, and yellow Cuban varieties of propolis. *J Agric Food Chem* 55(18): 7502–7509. doi: 10.1021/jf071296w
47. da Cunha FM, Duma D, Assreuy J et al. (2004) Caffeic acid derivatives: in vitro and in vivo anti-inflammatory properties. *Free Radical Research* 38(11): 1241–1253. doi: 10.1080/10715760400016139
48. Da Veiga PAS (2009) Health and medicine in ancient Egypt. Magic and science. BAR international series, vol 1967. Archaeopress, Oxford

49. Dausch A, Moraes CS, Fort P et al. (2008) Brazilian red propolis--chemical composition and botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med* 5(4): 435–441. doi: 10.1093/ecam/nem057
50. Dealey C (1995) Common problems in wound care: caring for the skin around wounds. *Br J Nurs* 4(1): 43–44. doi: 10.12968/bjon.1995.4.1.43
51. Dehghani M, Abtahi M, Hasanzadeh N et al. (2019) Effect of Propolis mouthwash on plaque and gingival indices over fixed orthodontic patients. *J Clin Exp Dent* 11(3): e244-e249. doi: 10.4317/jced.55026
52. Demestre M, Messerli SM, Celli N et al. (2009) CAPE (caffeic acid phenethyl ester)-based propolis extract (Bio 30) suppresses the growth of human neurofibromatosis (NF) tumor xenografts in mice. *Phytotherapy research : PTR : an international journal devoted to clinical and pharmacological evaluation of herbal medicines, nutraceuticals and natural product derivatives* 23(2): 226–230
53. Díaz-Carballo D, Malak S, Bardenheuer W et al. (2008) The contribution of plukenetione A to the anti-tumoral activity of Cuban propolis. *Bioorg Med Chem* 16(22): 9635–9643. doi: 10.1016/j.bmc.2008.10.019
54. Dieterich K (1911) Weitere Beiträge zur Kenntnis des Bienenharzes (Propolis), Leipzig
55. Dimitriou R, Babis GC (2007) Biomaterial osseointegration enhancement with biophysical stimulation. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 7(3): 253–265
56. dos Santos JS, Monte-Alto-Costa A (2013) Caffeic acid phenethyl ester improves burn healing in rats through anti-inflammatory and antioxidant effects. *J Burn Care Res* 34(6): 682–688. doi: 10.1097/BCR.0b013e3182839b1c
57. Draganova-Filipova MN, Georgieva MG, Peycheva EN et al. (2008) Effects of propolis and CAPE on proliferation and apoptosis of McCoy-Plovdiv cell line. *Folia Med (Plovdiv)* 50(1): 53–59
58. Duran N, Muz M, Culha G et al. (2011) GC-MS analysis and antileishmanial activities of two Turkish propolis types. *Parasitol Res* 108(1): 95–105. doi: 10.1007/s00436-010-2039-z
59. Dziedzic A, Kubina R, Wojtyczka RD et al. (2013) The antibacterial effect of ethanol extract of polish propolis on mutans streptococci and lactobacilli isolated from saliva. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 681891. doi: 10.1155/2013/681891
60. Ekeuku SO, Chin K-Y (2021) Application of Propolis in Protecting Skeletal and Periodontal Health-A Systematic Review. *Molecules* 26(11). doi: 10.3390/molecules26113156
61. EKF-diagnostic GmbH (2013) BIOSEN C_line Clinic, GP+ Glukose/Laktat Messsystem Bedienungsanleitung

62. Elangovan B (2024) A review on pharmacological studies of natural flavanone: pinobanksin. *3 Biotech* 14(4): 111. doi: 10.1007/s13205-023-03904-5
 63. Ercan N, Erdemir EO, Ozkan SY et al. (2015) The comparative effect of propolis in two different vehicles; mouthwash and chewing-gum on plaque accumulation and gingival inflammation. *Eur J Dent* 9(2): 272–276. doi: 10.4103/1305-7456.156851
 64. Erdemli HK, Akyol S, Armutcu F et al. (2015) Antiviral properties of caffeic acid phenethyl ester and its potential application. *J Intercult Ethnopharmacol* 4(4): 344–347. doi: 10.5455/jice.20151012013034
 65. Fabris S, Bertelle M, Astafyeva O et al. (2013) Antioxidant Properties and Chemical Composition Relationship of Europeans and Brazilians Propolis. *PP* 04(01): 46–51. doi: 10.4236/pp.2013.41006
 66. Farah ME, Maia M, Furlani B et al. (2008) Current concepts of trypan blue in chromovitrectomy. *Dev Ophthalmol* 42: 91–100. doi: 10.1159/000138980
 67. Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10(1): 76–100. doi: 10.1038/sj.cdd.4401160
 68. Funakoshi-Tago M, Okamoto K, Izumi R et al. (2015) Anti-inflammatory activity of flavonoids in Nepalese propolis is attributed to inhibition of the IL-33 signaling pathway. *International Immunopharmacology* 25(1): 189–198. doi: 10.1016/j.intimp.2015.01.012
 69. Garrido Fernández S, Lasa Luaces E, Echechipía Modaz S et al. (2004) Allergic contact stomatitis due to therapeutic propolis. *Contact Dermatitis* 50(5): 321. doi: 10.1111/j.0105-1873.2004.00341h.x
 70. Ghisalberti EL (1979) Propolis: A Review. *Bee World* 60(2): 59–84. doi: 10.1080/0005772X.1979.11097738
 71. Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K et al. (1988) Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* 44(3): 230–232. doi: 10.1007/bf01941717
 72. Gstraunthaler G (2000) Standardisierung in der Zellkultur - wo fangen wir an? In: Schöffl H (ed) *Forschung ohne Tierversuche 2000*. Springer, Wien, New York, pp 40–49
 73. Halboub E, Al-Maweri SA, Al-Wesabi M et al. (2020) Efficacy of propolis-based mouthwashes on dental plaque and gingival inflammation: a systematic review. *BMC Oral Health* 20(1): 198. doi: 10.1186/s12903-020-01185-5
 74. Hall JM, Couse JF, Korach KS (2001) The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 276(40): 36869–36872. doi: 10.1074/jbc.R100029200
 75. Harborne JB, Williams CA (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55(6): 481–504. doi: 10.1016/s0031-9422(00)00235-1
-

76. Havsteen BH (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* 96(2-3): 67–202. doi: 10.1016/S0163-7258(02)00298-X
77. Hay KD, Greig DE (1990) Propolis allergy: a cause of oral mucositis with ulceration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 70(5): 584–586. doi: 10.1016/0030-4220(90)90403-f
78. Hayacibara MF, Koo H, Rosalen PL et al. (2005) In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. *J Ethnopharmacol* 101(1-3): 110–115. doi: 10.1016/j.jep.2005.04.001
79. Hernandez J, Goycoolea FM, Quintero J et al. (2007) Sonoran propolis: chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta Med* 73(14): 1469–1474. doi: 10.1055/s-2007-990244
80. Huang S, Zhang C-P, Wang K et al. (2014) Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules* 19(12): 19610–19632. doi: 10.3390/molecules191219610
81. Iravani S, Zolfaghari B (2011) Pharmaceutical and nutraceutical effects of *Pinus pinaster* bark extract. *Res Pharm Sci* 6(1): 1–11
82. Iraz M, Ozerol E, Gulec M et al. (2006) Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) administration on cisplatin-induced oxidative damage to liver in rat. *Cell Biochem Funct* 24(4): 357–361. doi: 10.1002/cbf.1232
83. Ishida Y, Gao R, Shah N et al. (2018) Anticancer Activity in Honeybee Propolis: Functional Insights to the Role of Caffeic Acid Phenethyl Ester and Its Complex With gamma-Cyclodextrin. *Integr Cancer Ther* 17(3): 867–873. doi: 10.1177/1534735417753545
84. Jo S-Y, Lee N, Hong S-M et al. (2013) Caffeic acid phenethyl ester inhibits diesel exhaust particle-induced inflammation of human middle ear epithelial cells via NOX4 inhibition. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 122(9): 595–600. doi: 10.1177/000348941312200910
85. Jordan VC (2003) Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. *Nat Rev Drug Discov* 2(3): 205–213. doi: 10.1038/nrd1031
86. Juman S, Yasui N, Ikeda K et al. (2012) Caffeic acid phenethyl ester suppresses the production of pro-inflammatory cytokines in hypertrophic adipocytes through lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Biol Pharm Bull* 35(11): 1941–1946. doi: 10.1248/bpb.b12-00317
87. Kabala-Dzik A, Rzepecka-Stojko A, Kubina R et al. (2017) Comparison of Two Components of Propolis: Caffeic Acid (CA) and Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Induce Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Breast Cancer Cells MDA-MB-231. *Molecules* 22(9). doi: 10.3390/molecules22091554

88. Kandaswamy D, Venkateshbabu N, Gogulnath D et al. (2010) Dentinal tubule disinfection with 2% chlorhexidine gel, propolis, morinda citrifolia juice, 2% povidone iodine, and calcium hydroxide. *International endodontic journal* 43(5): 419–423. doi: 10.1111/j.1365-2591.2010.01696.x
89. Kasote D, Bankova V, Viljoen AM (2022) Propolis: chemical diversity and challenges in quality control. *Phytochem Rev* 21(6): 1887–1911. doi: 10.1007/s11101-022-09816-1
90. KEILIN D, HARTREE EF (1952) Specificity of glucose oxidase (notatin). *Biochem J* 50(3): 331–341. doi: 10.1042/bj0500331
91. Khurshid Z, Naseem M, Zafar MS et al. (2017) Propolis: A natural biomaterial for dental and oral healthcare. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* 11(4): 265–274. doi: 10.15171/jodddd.2017.046
92. KISHIMOTO N, KAKINO Y, IWAI K et al. (2005) In Vitro Antibacterial, Antimutagenic and Anti-Influenza Virus Activity of Caffeic Acid Phenethyl Esters. *Biocontrol Sci.* 10(4): 155–161. doi: 10.4265/bio.10.155
93. Klósek M, Sędek Ł, Lewandowska H et al. (2021) The effect of ethanolic extract of Brazilian green propolis and artemisinin C on aFGF-1, E-selectin, and CD40L secreted by human gingival fibroblasts. *Cent Eur J Immunol* 46(4): 438–445. doi: 10.5114/ceji.2021.111215
94. Kollesch J (ed) (1989) *Antike Heilkunst. Ausgewählte Texte aus dem medizinischen Schrifttum der Griechen und Römer ; [aus dem Griechischen und Lateinischen]*, 6. Aufl. Reclams Universal-Bibliothek, Bd. 771 : Philosophie, Geschichte, Kulturgeschichte. Reclam, Leipzig
95. Koo H, Cury JA, Rosalen PL et al. (2002) Effect of a mouthrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation. *Caries Research* 36(6): 445–448. doi: 10.1159/000066535
96. Koo H, Rosalen PL, Cury JA et al. (2000) Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans *Streptococci*. *Curr Microbiol* 41(3): 192–196. doi: 10.1007/s0028400101170
97. Koo H, Rosalen PL, Cury JA et al. (2002) Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46(5): 1302–1309. doi: 10.1128/aac.46.5.1302-1309.2002
98. Kujumgiev A, Bankova V, Ignatova A et al. (1993) Antibacterial activity of propolis, some of its components and their analogs. *Pharmazie* 48(10): 785–786
99. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y et al. (1999) Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* 64(3): 235–240. doi: 10.1016/S0378-8741(98)00131-7

100. Kumar A, Banerjee A, Singh D et al. (2018) Estradiol: A Steroid with Multiple Facets. *Horm Metab Res* 50(5): 359–374. doi: 10.1055/s-0044-100920
101. Kuo Y-Y, Lin H-P, Huo C et al. (2013) Caffeic acid phenethyl ester suppresses proliferation and survival of TW2.6 human oral cancer cells via inhibition of Akt signaling. *Int J Mol Sci* 14(5): 8801–8817. doi: 10.3390/ijms14058801
102. Kurek-Górecka A, Kłósek M, Pietsz G et al. (2023) The Phenolic Profile and Anti-Inflammatory Effect of Ethanolic Extract of Polish Propolis on Activated Human Gingival Fibroblasts-1 Cell Line. *Molecules* 28(22). doi: 10.3390/molecules28227477
103. Kurek-Górecka A, Rzepecka-Stojko A, Górecki M et al. (2013) Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules* 19(1): 78–101. doi: 10.3390/molecules19010078
104. Kurek-Górecka AM, Sobczak A, Rzepecka-Stojko A et al. (2012) Antioxidant Activity of Ethanolic Fractions of Polish Propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C* 67: 545. doi: 10.5560/ZNC.2012.67c0545
105. Kuropatnicki AK, Szliszka E, Krol W (2013) Historical aspects of propolis research in modern times. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 964149. doi: 10.1155/2013/964149
106. Lang G (2013) *Histotechnik. Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik*, Zweite, überarbeitete und aktualisierte Auflage. Springer, Vienna
107. Lee HS, Lee SY, Park SH et al. (2013) Antimicrobial medical sutures with caffeic acid phenethyl ester and their in vitro/in vivo biological assessment. *Med. Chem. Commun.* 4(5): 777. doi: 10.1039/c2md20289a
108. Lee KW, CHUN K-S, LEE J-S et al. (2004) Inhibition of cyclooxygenase-2 expression and restoration of gap junction intercellular communication in H-ras-transformed rat liver epithelial cells by caffeic acid phenethyl ester. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1030(1): 501–507. doi: 10.1196/annals.1329.062
109. Lee YJ, Liao PH, Chen WK et al. (2000) Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells. *Cancer Lett* 153(1-2): 51–56
110. Liao H-F, Chen Y-Y, Liu J-J et al. (2003) Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis. *J Agric Food Chem* 51(27): 7907–7912. doi: 10.1021/jf034729d
111. Lin W-L, Liang W-H, Lee Y-J et al. (2010) Antitumor progression potential of caffeic acid phenethyl ester involving p75(NTR) in C6 glioma cells. *Chem Biol Interact* 188(3): 607–615. doi: 10.1016/j.cbi.2010.09.002
112. Löffler G (2008) *Basiswissen Biochemie. Mit Pathobiochemie*, 7., komplett überarbeitete Auflage. Springer-Lehrbuch. Springer, Heidelberg

113. Machado Velho JC, França TA, Malagutti-Ferreira MJ et al. (2023) Use of propolis for skin wound healing: systematic review and meta-analysis. *Arch Dermatol Res* 315(4): 943–955. doi: 10.1007/s00403-022-02455-8
114. Machorowska-Pieniazek A, Skucha-Nowak M, Mertas A et al. (2016) Effects of Brazilian Propolis on Dental Plaque and Gingiva in Patients with Oral Cleft Malformation Treated with Multibracket and Removable Appliances: A Comparative Study. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016: 2038407. doi: 10.1155/2016/2038407
115. Madhavan S, Nayak M, Shenoy A et al. (2012) Dentinal hypersensitivity: A comparative clinical evaluation of CPP-ACP F, sodium fluoride, propolis, and placebo. *J Conserv Dent* 15(4): 315–318. doi: 10.4103/0972-0707.101882
116. Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LDd et al. (2013) Effect of *Zingiber officinale* and propolis on microorganisms and endotoxins in root canals. *J Appl Oral Sci* 21(1): 25–31
117. Magdon E (1965) Über die Wirkung von 5-Bromdesoxyuridin und Mercaptoäthylamin auf die Überlebensrate ganzkörperbestrahlter A-Jax-Mäuse (The effect of 5-Bromdesoxyuridin and of mercaptoethylamine on the survival rate of whole-body irradiated A-Jax mice). *Radiobiol Radiother (Berl)* 6(6): 671–675
118. Magro Filho O, Carvalho AC de (1990) Application of propolis to dental sockets and skin wounds. *The Journal of Nihon University School of Dentistry* 32(1): 4–13. doi: 10.2334/josnugd1959.32.4
119. Mahmoud AS, Almas K, Dahlan AA (1999) The effect of propolis on dentinal hypersensitivity and level of satisfaction among patients from a university hospital Riyadh, Saudi Arabia. *Indian J Dent Res* 10(4): 130–137
120. Marcucci MC (1995) Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26(2): 83–99. doi: 10.1051/apido:19950202
121. Markham KR, Mitchell KA, Wilkins AL et al. (1996) HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry* 42(1): 205–211. doi: 10.1016/0031-9422(96)83286-9
122. Martin MP, Pileggi R (2004) A quantitative analysis of Propolis: a promising new storage media following avulsion. *Dent Traumatol* 20(2): 85–89. doi: 10.1111/j.1600-4469.2004.00233.x
123. Matsushima K, de Yang, Oppenheim JJ (2022) Interleukin-8: An evolving chemokine. *Cytokine* 153: 155828. doi: 10.1016/j.cyto.2022.155828
124. Merlo S, Frasca G, Canonico PL et al. (2009) Differential involvement of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta in the healing promoting effect of estrogen in human keratinocytes. *J Endocrinol* 200(2): 189–197. doi: 10.1677/JOE-08-0442

125. Michaluart P, Masferrer JL, Carothers AM et al. (1999) Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. *Cancer research* 59(10): 2347–2352
 126. Mirzoeva OK, Calder PC (1996) The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 55(6): 441–449. doi: 10.1016/S0952-3278(96)90129-5
 127. Mirzoeva OK, Grishanin RN, Calder PC (1997) Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological Research* 152(3): 239–246. doi: 10.1016/S0944-5013(97)80034-1
 128. Montoro A, Soriano JM, Barquinero JF et al. (2012) Assessment in vitro of cytogenetic and genotoxic effects of propolis on human lymphocytes. *Food Chem Toxicol* 50(2): 216–221. doi: 10.1016/j.fct.2011.10.053
 129. Münstedt K, Hellner M, Hackethal A et al. (2007) Contact allergy to propolis in beekeepers. *Allergol Immunopathol (Madr)* 35(3): 95–100. doi: 10.1157/13106776
 130. Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K et al. (2000) Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship. *Jpn J Cancer Res* 91(7): 686–691. doi: 10.1111/j.1349-7006.2000.tb01000.x
 131. Nagaoka T, Banskota AH, Tezuka Y et al. (2002) Selective antiproliferative activity of caffeic acid phenethyl ester analogues on highly liver-metastatic murine colon 26-L5 carcinoma cell line. *Bioorg Med Chem* 10(10): 3351–3359. doi: 10.1016/s0968-0896(02)00138-4
 132. Nagaoka T, Banskota AH, Tezuka Y et al. (2003) Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) analogues: potent nitric oxide inhibitors from the Netherlands propolis. *Biol Pharm Bull* 26(4): 487–491
 133. Neumann D Klinische Studie zur Untersuchung der Plaque- und Gingivitis-Hemmung durch Propolis. Halle, Univ., Diss. A, 1983
 134. Nowottnick K (2019) Propolis. Gewinnung, Rezepte, Anwendung ; Heilkraft aus dem Bienenvolk, 3. Aufl. Praxisbuch. Stocker, Graz
 135. Oktem F, Yilmaz HR, Ozguner F et al. (2006) Methotrexate-induced renal oxidative stress in rats: the role of a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Toxicol Ind Health* 22(6): 241–247. doi: 10.1191/0748233706th265oa
 136. Olczyk P, Ramos P, Bernas M et al. (2013) Application of electron paramagnetic resonance spectroscopy to comparative examination of different groups of free radicals in thermal injuries treated with propolis and silver sulphadiazine. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 851940. doi: 10.1155/2013/851940
-

137. Olczyk P, Wisowski G, Komosinska-Vassev K et al. (2013) Propolis Modifies Collagen Types I and III Accumulation in the Matrix of Burnt Tissue. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 423809. doi: 10.1155/2013/423809
138. Omene C, Kalac M, Wu J et al. (2013) Propolis and its Active Component, Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE), Modulate Breast Cancer Therapeutic Targets via an Epigenetically Mediated Mechanism of Action. *J Cancer Sci Ther* 5(10): 334–342
139. Oncag O, Cogulu D, Uzel A et al. (2006) Efficacy of propolis as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*. *Gen Dent* 54(5): 319–322
140. Orban Z, Mitsiades N, Burke TR et al. (2000) Caffeic acid phenethyl ester induces leukocyte apoptosis, modulates nuclear factor-kappa B and suppresses acute inflammation. *Neuroimmunomodulation* 7(2): 99–105. doi: 10.1159/000026427
141. Ordóñez RM, Zampini IC, Moreno MIN et al. (2011) Potential application of Northern Argentine propolis to control some phytopathogenic bacteria. *Microbiological Research* 166(7): 578–584. doi: 10.1016/j.micres.2010.11.006
142. Ozan F, Sümer Z, Polat ZA et al. (2007) Effect of mouthrinse containing propolis on oral microorganisms and human gingival fibroblasts. *Eur J Dent* 1(4): 195–201
143. Ozturk G, Ginis Z, Akyol S et al. (2012) The anticancer mechanism of caffeic acid phenethyl ester (CAPE): review of melanomas, lung and prostate cancers. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16(15): 2064–2068
144. P. W. Philipp (1928) Propolis, its use and origin in the hive. *Biologisches Zentralblatt*(Vol. 48, pp. 705–714)
145. Paeng SH, Jung W-K, Park WS et al. (2015) Caffeic acid phenethyl ester reduces the secretion of vascular endothelial growth factor through the inhibition of the ROS, PI3K and HIF-1 α signaling pathways in human retinal pigment epithelial cells under hypoxic conditions. *Int J Mol Med* 35(5): 1419–1426. doi: 10.3892/ijmm.2015.2116
146. Park YK, Alencar SM, Aguiar CL (2002) Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agric Food Chem* 50(9): 2502–2506. doi: 10.1021/jf011432b
147. Park YK, Ikegaki M (1998) Preparation of Water and Ethanolic Extracts of Propolis and Evaluation of the Preparations. *Biosci Biotechnol Biochem* 62(11): 2230–2232. doi: 10.1271/bbb.62.2230
148. Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N et al. (2017) Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxid Med Cell Longev* 2017: 1259510. doi: 10.1155/2017/1259510
149. Pellati F, Orlandini G, Pinetti D et al. (2011) HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. *J Pharm Biomed Anal* 55(5): 934–948. doi: 10.1016/j.jpba.2011.03.024

150. Pereira EMR, Da Silva JLDC, Silva FF et al. (2011) Clinical Evidence of the Efficacy of a Mouthwash Containing Propolis for the Control of Plaque and Gingivitis: A Phase II Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011: 750249. doi: 10.1155/2011/750249
 151. Perkins ND (2007) Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(1): 49–62. doi: 10.1038/nrm2083
 152. Piccinelli AL, Lotti C, Campone L et al. (2011) Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 59(12): 6484–6491. doi: 10.1021/jf201280z
 153. Pietta PG (2000) Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63(7): 1035–1042. doi: 10.1021/np9904509
 154. Popova M, Trusheva B, Antonova D et al. (2011) The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. *Food Chemistry* 126(3): 1431–1435. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.130
 155. Popova MP, Graikou K, Chinou I et al. (2010) GC-MS profiling of diterpene compounds in Mediterranean propolis from Greece. *J Agric Food Chem* 58(5): 3167–3176. doi: 10.1021/jf903841k
 156. Promega Corporation (2019) Caspase-Glo® 3/7 Assay Technical Bulletin. <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/caspase-glo-3-7-assay-protocol.pdf>, Accessed 30 Jan 2025
 157. Przybyłek I, Karpiński TM (2019) Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules* 24(11). doi: 10.3390/molecules24112047
 158. Rahayu RP, Pribadi N, Widjastuti I et al. (2020) Combinations of propolis and Ca(OH)₂ in dental pulp capping treatment for the stimulation of reparative dentin formation in a rat model. *F1000Research* 9: 308. doi: 10.12688/f1000research.22409.1
 159. Rao CV, Desai D, Kaul B et al. (1992) Effect of caffeic acid esters on carcinogen-induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. *Chem Biol Interact* 84(3): 277–290. doi: 10.1016/0009-2797(92)90129-9
 160. Raso GM, Meli R, Di Carlo G et al. (2001) Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sciences* 68(8): 921–931. doi: 10.1016/S0024-3205(00)00999-1
 161. Ren C, Zhou P, Zhang M et al. (2023) Molecular Mechanisms of Oxidative Stress Relief by CAPE in ARPE-19 Cells. *Int J Mol Sci* 24(4). doi: 10.3390/ijms24043565
 162. Riedel F, Goessler UR, Hormann K (2005) Alcohol-related diseases of the mouth and throat. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)* 23(3-4): 195–203. doi: 10.1159/000090166
-

163. Roche Diagnostics GmbH (Version 17, 2017) Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric). <https://elabdoc-prod.roche.com/LifeScience/Document/fa1576b4-96ed-e311-98a1-00215a9b0ba8>, Accessed 30 Jan 2025
164. Rossi A, Ligresti A, Longo R et al. (2002) The inhibitory effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester on cyclooxygenase activity in J774 macrophages. *Phytomedicine* 9(6): 530–535. doi: 10.1078/09447110260573164
165. Rouhani A, Erfanzadeh M, Jafarzadeh H et al. (2018) Comparison of Residual Triple Antibiotic Paste, Propolis and Calcium Hydroxide on Root Canal Walls in Natural Open Apex Teeth: An In Vitro Study. *Iran Endod J* 13(1): 25–29. doi: 10.22037/iej.v13i1.15807
166. Rzepecka-Stojko A, Kabala-Dzik A, Mozdierz A et al. (2015) Caffeic Acid phenethyl ester and ethanol extract of propolis induce the complementary cytotoxic effect on triple-negative breast cancer cell lines. *Molecules* 20(5): 9242–9262. doi: 10.3390/molecules20059242
167. S VKL (2014) Propolis in dentistry and oral cancer management. *North Am J Med Sci* 6(6): 250–259. doi: 10.4103/1947-2714.134369
168. Santiago KB (2018) Microbiological control and antibacterial action of a propolis-containing mouthwash and control of dental plaque in humans. *Natural Product Research* 32(12): 1441–1445. doi: 10.1080/14786419.2017.1344664
169. Santos IF, Moraes RM, Medeiros SF et al. (2021) Enhanced ligand-free attachment of osteoblast to poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) nanoparticles. *Int J Biol Macromol* 189: 528–536. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.08.120
170. Santos LM, Fonseca MS, Sokolonski AR et al. (2020) Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100(4): 1369–1382. doi: 10.1002/jsfa.10024
171. Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M (2005) Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81(1 Suppl): 215S–217S. doi: 10.1093/ajcn/81.1.215S
172. Scazzocchio F, D'Auria FD, Alessandrini D et al. (2006) Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological Research* 161(4): 327–333. doi: 10.1016/j.micres.2005.12.003
173. Seeley TD, Morse RA (1976) The nest of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Ins. Soc* 23(4): 495–512. doi: 10.1007/BF02223477
174. Serarslan G, Altuğ E, Kontas T et al. (2007) Caffeic acid phenethyl ester accelerates cutaneous wound healing in a rat model and decreases oxidative stress. *Clin Exp Dermatol* 32(6): 709–715. doi: 10.1111/j.1365-2230.2007.02470.x
175. Sforcin JM (2016) Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytother Res* 30(6): 894–905. doi: 10.1002/ptr.5605
-

176. Sforcin JM, Bankova V (2011) Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol* 133(2): 253–260. doi: 10.1016/j.jep.2010.10.032
177. Shingare P, Chaugule V (2011) Comparative evaluation of antimicrobial activity of miswak, propolis, sodium hypochlorite and saline as root canal irrigants by microbial culturing and quantification in chronically exposed primary teeth. *Germes* 1(1): 12–21. doi: 10.11599/germes.2012.1004
178. Silici S, Ünlü M, Vardar-Ünlü G (2007) Antibacterial activity and phytochemical evidence for the plant origin of Turkish propolis from different regions. *World J Microbiol Biotechnol* 23(12): 1797–1803. doi: 10.1007/s11274-007-9430-7
179. Silva BB, Rosalen PL, Cury JA et al. (2008) Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med* 5(3): 313–316. doi: 10.1093/ecam/nem059
180. Silva JC, Rodrigues S, Feás X et al. (2012) Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food Chem Toxicol* 50(5): 1790–1795. doi: 10.1016/j.fct.2012.02.097
181. Silva-Carvalho R, Baltazar F, Almeida-Aguiar C (2015) Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015: 206439. doi: 10.1155/2015/206439
182. Somsanith N, Kim Y-K, Jang Y-S et al. (2018) Enhancing of Osseointegration with Propolis-Loaded TiO₂ Nanotubes in Rat Mandible for Dental Implants. *Materials (Basel)* 11(1). doi: 10.3390/ma11010061
183. Stolzing A, Jones E, McGonagle D et al. (2008) Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev* 129(3): 163–173. doi: 10.1016/j.mad.2007.12.002
184. Sud'ina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA et al. (1993) Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett* 329(1-2): 21–24. doi: 10.1016/0014-5793(93)80184-v
185. Sun C, Wu Z, Wang Z et al. (2015) Effect of Ethanol/Water Solvents on Phenolic Profiles and Antioxidant Properties of Beijing Propolis Extracts. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015: 595393. doi: 10.1155/2015/595393
186. Sun S, Liu M, He J et al. (2019) Identification and Determination of Seven Phenolic Acids in Brazilian Green Propolis by UPLC-ESI-QTOF-MS and HPLC. *Molecules* 24(9). doi: 10.3390/molecules24091791
187. Szpalski C, Wetterau M, Barr J et al. (2012) Bone tissue engineering: current strategies and techniques--part I: Scaffolds. *Tissue Eng Part B Rev* 18(4): 246–257. doi: 10.1089/ten.TEB.2011.0427
-

188. Topcuoglu N, Ozan F, Ozyurt M et al. (2012) In vitro antibacterial effects of glass-ionomer cement containing ethanolic extract of propolis on *Streptococcus mutans*. *Eur J Dent* 6(4): 428–433
189. Tsai Y-C, Hsu C-C, El-Shazly M et al. (2015) Phytochemicals and Estrogen-Receptor Agonists from the Aerial Parts of *Liriope platyphylla*. *Molecules* 20(4): 6844–6855. doi: 10.3390/molecules20046844
190. Tyszkiewicz-Czochara M, Paśko P, Reczyński W et al. (2014) Zinc and propolis reduces cytotoxicity and proliferation in skin fibroblast cell culture: total polyphenol content and antioxidant capacity of propolis. *Biol Trace Elem Res* 160(1): 123–131. doi: 10.1007/s12011-014-0019-3
191. Uçan MC, Koparal M, Ağaçayak S et al. (2013) Influence of caffeic acid phenethyl ester on bone healing in a rat model. *J Int Med Res* 41(5): 1648–1654. doi: 10.1177/0300060513490613
192. Ugur A, Arslan T (2004) An in vitro study on antimicrobial activity of propolis from Mugla province of Turkey. *Journal of medicinal food* 7(1): 90–94. doi: 10.1089/109662004322984761
193. Uğur Aydın Z, Akpınar KE, Hepokur C et al. (2018) Assessment of toxicity and oxidative DNA damage of sodium hypochlorite, chitosan and propolis on fibroblast cells. *Braz Oral Res* 32: e119. doi: 10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0119
194. Unger KK (1995) Leitfaden für Anfänger und Praktiker, 2., überarb. Aufl. Handbuch der HPLC, Teil 1. GIT Verl., Darmstadt
195. Vasigara Singh W, Subramaniam S, Shyama S et al. (1996) Changes in erythrocyte membrane lipids in breast cancer after radiotherapy and chemotherapy. *Chemotherapy* 42(1): 65–70. doi: 10.1159/000239423
196. Velazquez C, Navarro M, Acosta A et al. (2007) Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal of applied microbiology* 103(5): 1747–1756. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03409.x
197. Velikova M, Bankova V, Sorkun K et al. (2000) Propolis from the Mediterranean region: chemical composition and antimicrobial activity. *Zeitschrift für Naturforschung C* 55(9-10): 790–793. doi: 10.1515/znc-2000-9-1019
198. Verma MK, Pandey RK, Khanna R et al. (2014) The antimicrobial effectiveness of 25% propolis extract in root canal irrigation of primary teeth. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 32(2): 120–124. doi: 10.4103/0970-4388.130786
199. Volpi N, Bergonzini G (2006) Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 42(3): 354–361. doi: 10.1016/j.jpba.2006.04.017
-

200. Wang C-C, Wang Y-X, Yu N-Q et al. (2017) Brazilian Green Propolis Extract Synergizes with Protoporphyrin IX-mediated Photodynamic Therapy via Enhancement of Intracellular Accumulation of Protoporphyrin IX and Attenuation of NF- κ B and COX-2. *Molecules* 22(5): 732. doi: 10.3390/molecules22050732
201. Wang D, Xiang D-B, He Y-J et al. (2005) Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol* 11(26): 4008–4012. doi: 10.3748/wjg.v11.i26.4008
202. Wang L-C, Lin Y-L, Liang Y-C et al. (2009) The effect of caffeic acid phenethyl ester on the functions of human monocyte-derived dendritic cells. *BMC Immunol* 10(1): 39. doi: 10.1186/1471-2172-10-39
203. Wang X, Stavchansky S, Bowman PD et al. (2006) Cytoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and catechol ring-fluorinated CAPE derivatives against menadione-induced oxidative stress in human endothelial cells. *Bioorg Med Chem* 14(14): 4879–4887. doi: 10.1016/j.bmc.2006.03.015
204. Welsch U, Kummer W, Deller T (eds) (2018) *Histologie. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie : das Lehrbuch*, 5. Auflage. Elsevier, München
205. Wijaya J, Sari R, Suryono (2024) THE BENEFICIAL EFFECTS OF PROPOLIS ON OSTEOBLAST DIFFERENTIATION: A LITERATURE REVIEW. *interdental* 20(1): 96–102. doi: 10.46862/interdental.v20i1.8622
206. Wu J, Omene C, Karkoszka J et al. (2011) Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer. *Cancer Lett* 308(1): 43–53. doi: 10.1016/j.canlet.2011.04.012
207. Xiang D, Wang D, He Y et al. (2006) Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the beta-catenin/T-cell factor signaling. *Anticancer Drugs* 17(7): 753–762. doi: 10.1097/01.cad.0000224441.01082.bb
208. Xu X, Pu R, Li Y et al. (2019) Chemical Compositions of Propolis from China and the United States and their Antimicrobial Activities Against *Penicillium notatum*. *Molecules* 24(19). doi: 10.3390/molecules24193576
209. Yang G, Newsheer S, Aziz K et al. (2013) Toxicity and adverse effects of Tamoxifen and other anti-estrogen drugs. *Pharmacology & Therapeutics* 139(3): 392–404. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.05.005
210. Yao LH, Jiang YM, Shi J et al. (2004) Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Hum Nutr* 59(3): 113–122. doi: 10.1007/s11130-004-0049-7
211. Yasui N, Nishiyama E, Juman S et al. (2013) Caffeic acid phenethyl ester suppresses oxidative stress in 3T3-L1 adipocytes. *J Asian Nat Prod Res* 15(11): 1189–1196. doi: 10.1080/10286020.2013.825609
-

212. Zare Jahromi M, Toubayani H, Rezaei M (2012) Propolis: a new alternative for root canal disinfection. *Iran Endod J* 7(3): 127–133
213. Zech HB, Busch C-J (2020) Moderne Therapiekonzepte bei Kopf-Hals-Tumoren. *TumorDiagnostik & Therapie* 41(08): 521–526. doi: 10.1055/a-1211-0859
214. Zhang W, Margarita GE, Di Wu et al. (2022) Antibacterial Activity of Chinese Red Propolis against *Staphylococcus aureus* and MRSA. *Molecules* 27(5). doi: 10.3390/molecules27051693
215. Zhao W-X, Zhao J, Liang C-L et al. (2003) Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells in vitro. *World J Gastroenterol* 9(6): 1278–1281. doi: 10.3748/wjg.v9.i6.1278
216. Žižić JB, Vuković NL, Jadranin MB et al. (2013) Chemical composition, cytotoxic and antioxidative activities of ethanolic extracts of propolis on HCT-116 cell line. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93(12): 3001–3009. doi: 10.1002/jsfa.6132
217. Zulhendri F, Felitti R, Fearnley J et al. (2021) The use of propolis in dentistry, oral health, and medicine: A review. *J Oral Biosci* 63(1): 23–34. doi: 10.1016/j.job.2021.01.001

IX. ANHANG

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand mit Unterstützung zahlreicher Menschen und Institutionen, denen ich an dieser Stelle meinen besonderen Dank aussprechen möchte.

Mein tief empfundener Dank gilt Frau Prof. Dr. med. dent. habil. Franka Stahl, die mir als Doktormutter das Thema dieser Arbeit anvertraute, mich mit großem Vertrauen durch die Promotionszeit begleitete und mir stets mit wertvollen Anregungen, wissenschaftlicher Expertise und persönlicher Unterstützung zur Seite stand.

Ich danke Frau PD Dr. rer. nat. habil. Dagmar-Ulrike Richter herzlich für die umfassende Bereitstellung der experimentellen Arbeitsumgebung im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik und Poliklinik Rostock. Ihre Unterstützung bildete die Grundlage für die erfolgreiche Durchführung der Experimente.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Kathrin Duske, die mich im Verlauf der Arbeit mit großer Sorgfalt, viel Geduld und einem stets offenen Ohr bei allen fachlichen und formalen Fragen begleitet hat. Ihre kritische Durchsicht und konstruktiven Hinweise waren für die Fertigstellung dieser Arbeit von unschätzbarem Wert.

Weiterhin danke ich Frau Bianca Gosch für ihre zuverlässige Unterstützung und ihre stets hilfsbereite Art bei allen Fragen rund um den Laboralltag.

Mein aufrichtiger Dank gilt ebenso der Mecklenburg-Vorpommerschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde an den Universitäten Greifswald und Rostock e. V., die durch ihre finanzielle Förderung einen entscheidenden Beitrag zur Durchführung der Experimente geleistet hat. Diese Unterstützung ermöglichte es mir zudem, mein Promotionsthema im Rahmen wissenschaftlicher Tagungen zu präsentieren, unter anderem beim 28. Zahnärztetag der Zahnärztekammer M-V in Warnemünde, der 95. Jahrestagung der European Orthodontic Society in Nizza sowie der 91. Wissenschaftlichen Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kieferorthopädie in Bremen.

Ein besonders großes Dankeschön geht an meinen Mann Tobias Bahlcke, der mich nicht nur bei technischen Fragen mit Rat und Tat unterstützt hat, sondern mir in jeder Phase dieser Arbeit emotional zur Seite stand. Seine Geduld, sein Verständnis und seine unerschütterliche Motivation waren eine wertvolle Stütze während des gesamten Promotionsprozesses.

Abschließend danke ich von Herzen meinen Eltern, Heike Müller und Karl-Heinz Meus, für ihre bedingungslose Unterstützung auf allen Ebenen. Ihr Vertrauen, ihre Zuversicht und ihr Rückhalt haben mir ermöglicht, diesen Weg zu gehen.