

Aus der
Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Hinokitiol und Zink als Wirkkomplex einer Mundspüllösung
- in vitro Untersuchungen von zytotoxischen
sowie quantitativen und qualitativen ionophoren Eigenschaften
des Hinokitiol-Zink-Komplexes**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Nicola Julie Schrepf

aus
München

Jahr
2026

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstes Gutachten:	Prof. Dr. Dr. Matthias Folwaczny
Zweites Gutachten:	Prof. Dr. Jan-Frederik Güth
Drittes Gutachten:	PD Dr. Uwe Baumert
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	03.02.2026

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
1.1	Die Eukaryotische Zelle	6
1.1.1	Biologische Membranen	6
1.1.2	Überblick über eine Auswahl an Zellorganellen	6
1.2	Teilchenverschiebung an der biologischen Membran	7
1.2.1	Aktiver Transport	8
1.2.2	Passiver Transport	8
1.2.3	Ionophore	9
1.3	Hinokitiol	10
1.4	Zink	11
1.5	Wirkkomplex Hinokitiol und Zink	12
1.5.1	Antimykotische Aktivität von Hinokitiol	12
1.5.2	Antibakterielle Aktivität von Hinokitiol	13
1.5.3	Antivirale Aktivität von Hinokitiol und Zink	14
1.5.4	Hinokitiol in der Zahnheilkunde	15
2.	Zielsetzung	17
3.	Material und Methoden	18
3.1	Material	18
3.2	Methoden	23
3.2.1	Humane Gingivale Fibroblasten	23
3.2.2	Kultivierung der Humanen Gingivalen Fibroblasten	24
3.2.3	Herstellung von Stammlösungen	25
3.2.4	Zytotoxizitäts-Tests	26
3.2.5	Ionophor-Nachweis	28
3.3	Statistik	33
3.3.1	Zytotoxizitäts-Tests	33
3.3.2	Quantitativer Ionophor-Nachweis	33
4.	Ergebnisse	34
4.1	Zytotoxizitäts-Tests	35

4.2	Ionophor-Nachweis	38
4.2.1	Quantitativer Ionophor-Nachweis	38
4.2.2	Qualitativer Ionophor-Nachweis	41
5.	Diskussion	52
5.1	Zytotoxizitäts-Tests	53
5.1.1	Diskussion des experimentellen Aufbaus	53
5.1.2	Interpretation der Ergebnisse	54
5.2	Ionophor-Nachweis	57
5.2.1	Diskussion der Methodik des quantitativen Ionophor-Nachweises... ..	58
5.2.2	Ergebnisse des quantitativen Ionophor-Nachweises	58
5.2.3	Diskussion der Methodik des qualitativen Ionophor-Nachweises	60
5.2.4	Auswahl der Fluorophore und Fixierlösungen	61
5.2.5	Diskussion der Mitochondrien Morphologie	62
5.2.6	Potenzielle Lokalisation intrazellulärer Zink-Ionen	62
6.	Zusammenfassung	65
7.	Abstract	67
8.	Abkürzungsverzeichnis	68
9.	Abbildungsverzeichnis	69
10.	Tabellenverzeichnis	74
11.	Literaturverzeichnis	76
12.	Danksagung	85
13.	Affidavit	86

1. Einleitung

1.1 Die Eukaryotische Zelle

1.1.1 Biologische Membranen

Die Abgrenzung einer eukaryotischen Zelle wird durch eine biologische Membran sichergestellt. Eine biologische Membran ist aus einzelnen Phospholipiden, welche mit ihren hydrophoben Anteilen nach innen hin, einander gegenüber als Lipiddoppelschichten angeordnet sind, aufgebaut. Über Modifikationen, wie die Einlagerung von Proteinen oder das Anhängen von Kohlenhydraten, können Lipiddoppelschichten spezifische Funktionen erhalten.

Innerhalb der Zelle begrenzen zwei Lipiddoppelschichten den Zellkern und das Mitochondrium. Eine einfache Membran bzw. Lipiddoppelschicht hingegen umgibt Transport-Vesikel für die Endo- und Exozytose und dient zur Kompartimentierung von funktionell unterschiedlichen Räumen wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), Golgi-Apparat und Lysosom. Mizellen hingegen ergeben sich aus einer zirkulär angeordneten Lipidmonoschicht, deren hydrophile Anteile nach außen gerichtet sind und so den Transport lipophiler Moleküle in ihrem Inneren ermöglichen.

Die Anordnung der Phospholipide ist flexibel und ermöglicht den fluiden Austausch von Membranteilen zwischen Zellorganellen und der Zellmembran (sog. Endomembransystem).

1.1.2 Überblick über eine Auswahl an Zellorganellen

Der Zellkern beherbergt die doppelsträngige, helikal angeordnete spezifische Abfolge von Desoxyribonukleinsäuren (DNS), welche der Speicherort der Erbinformation ist. Die DNS bildet die Grundlage für die Erstellung einer funktionellen Kopie, die für die Zellteilung und die Synthese von Proteinen benötigt wird.

Je nach Energiebedarf verfügen Zellen über ein ganzes Netzwerk von Mitochondrien, sodass diese bis zu einem Viertel des zellulären Volumens einnehmen (Koolman und Röhm 2019). Die Energiegewinnung erfolgt im Rahmen der Atmungskette durch die Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) an der zur Oberflächenvergrößerung stark gefalteten inneren Mitochondrien-Membran.

Das aktive Ribosom besteht aus einer kleinen und einer großen Untereinheit, die bei Inaktivität getrennt voneinander im Zytosol vorliegen. Es haftet in funktioneller Einheit dem endoplasmatischen Retikulum an (ER; raues ER, rER) und ist in die Proteinbiosynthese involviert. Nach der Abschrift der DNS in Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) im Zellkern ermöglicht die direkte Assoziation des rERs mit der Hülle des Zellkerns eine Übersetzung der mRNA in Polypeptidketten mit Hilfe von Transport-Ribonukleinsäure (tRNA).

Die Gesamtheit aller Dictyosomen einer Zelle wird als Golgi-Apparat bezeichnet. Ein Dictyosom ist in der Regel nahe dem Zellkern zu finden und aus mehreren Membranstapeln aufgebaut. Im Bereich der meist konvexen, dem Zellkern zugewandten cis-Seite werden über das Cis-Golgi-Netzwerk die am rER synthetisierten Proteine empfangen, um diese bei der anterograden Passage über den medialen Teil mit Hilfe spezifischer Enzyme zu prozessieren. Finalisiert werden die Proteine dann von der trans-Seite aus über das Trans-Golgi-Netzwerk in Vesikeln verpackt zu ihren spezifischen Zielorten befördert. Daraus ergibt sich der Aufbau eines Dictyosoms aus mindestens drei geschlossenen Membranstapeln (cis-, medial- und trans-Stapel).

Aus einer vesikulären Abschnürung des Golgi-Apparats wiederum resultiert das Lysosom. Sein saurer pH-Wert im Inneren liegt im Bereich von 4 – 5 und stimmt mit dem pH-Optimum der lysosomalen Enzyme überein. Diese sind hauptsächlich Hydrolasen, die dem Abbau von Proteinen, Lipiden, Nukleinsäuren und Zuckern dienen. Das vom Golgi-Apparat abgeschnürte primäre Lysosom verschmilzt mit dem von einer einzelnen biologischen Membran umhüllten, abzubauenen Material zum sekundären, funktionell aktiven Lysosom. Die gebildeten Spaltprodukte wie Aminosäuren, Nukleoside, Fettsäuren, Phosphate oder Monosaccharide, gelangen in das Zytosol und stehen für anabole Stoffwechselprozesse zur Verfügung (Plattner und Hentschel 2017).

1.2 Teilchenverschiebung an der biologischen Membran

Die Hauptaufgabe einer Membran ist es, als Barriere zwischen funktionell unterschiedlichen Räumen zu fungieren. Dennoch kann auch Transport von Teilchen über eine Membran hinweg erforderlich sein. Dazu stehen verschiedene Wege zur Verfügung.

1.2.1 Aktiver Transport

Aktive Transportmechanismen ermöglichen unter einer direkten oder indirekten Beteiligung des Energieäquivalents ATP die Bewegung von Teilchen über eine Membran hinweg, wenn die Transportrichtung entgegen dem Konzentrationsgefälle der beteiligten Teilchen gerichtet ist. Ein Beispiel hierfür ist die Protonen-Pumpe (H^+ -ATPase, V-ATPase) in der lysosomalen Membran, die zur Aufrechterhaltung des sauren Lysosomen pH-Werts unter Energieverbrauch aktiv Protonen in das Lysosom transportiert.

Ein weiteres Beispiel ist die Natrium-Kalium-ATPase (Na^+ - K^+ -ATPase), die das Ruhepotenzial an einer Membran aufrechterhält bzw. dieses nach Abklingen des neuronalen Signals wieder herstellt. Unter Verbrauch von einem Molekül ATP werden dazu drei Na^+ -Ionen in den Extrazellulärraum und zwei K^+ -Ionen in den Intrazellulärraum gepumpt.

1.2.2 Passiver Transport

Mit Hilfe des Passiven Transports erfolgt eine energieunabhängige Teilchenverschiebung über eine Membran hinweg, dem natürlichen Bestreben folgend ein bestehendes Ionengefälle auszugleichen. Abhängig von Größe und Ladung des zu transportierenden Teilchens stehen hierfür verschiedene Mechanismen zur Verfügung.

Der Transport größerer geladener Teilchen beispielsweise erfolgt mittels Endo- oder Exozytose in Vesikeln und ist im Folgenden nicht weiter beschrieben.

Die einfache Diffusion beschreibt den ungehinderten transmembranösen Fluss von kleinen ungeladenen, hydrophoben Teilchen oder Gasen wie Sauerstoff (O_2), Stickstoff (N_2), CO_2 oder Stickstoffmonoxid (NO) einem bestehenden Konzentrationsgefälle folgend.

Für die Passage von kleinen geladenen Teilchen wiederum sind Hilfsmittel, also Transmembranproteine wie Kanäle, Porine oder Transporter von Nöten, die eine höhere Spezifität und Geschwindigkeit des Prozesses gewährleisten (erleichterte Diffusion).

Ionen-Kanäle können in verschiedenen Funktionszuständen vorliegen (offen, geschlossen oder inaktiv) und durch elektrische Signale, Hormone oder Liganden den Zustand wechseln. So sind beispielsweise in der Membran von Nervenzellen spannungsgesteuerte Na^+ - und K^+ -Kanäle an der Übertragung und Weiterleitung von elektrischen Signalen beteiligt. Ein ankommendes elektrisches Signal führt

durch die damit einhergehende Änderung des Membranpotenzials zur Öffnung von im Ruhezustand geschlossenen Na^+ -Kanälen. Es kommt durch einen dem Konzentrationsgefälle folgenden Na^+ -Ionen Einstrom zur Depolarisation, die ihrerseits die Öffnung von spannungsabhängigen K^+ -Kanälen induziert. Es folgt ein Ausstrom von K^+ -Ionen (Repolarisation) und schließlich die Wiederherstellung des Ruhepotenzials. Währenddessen sind die Na^+ - und K^+ -Kanäle inaktiviert und die Membran ist für die Dauer der Refraktärzeit (absolut und relativ) nicht bzw. weniger stark erregbar, während die oben beschriebene Na^+ - K^+ -ATPase unter Energieverbrauch das Ruhemembranpotenzial wiederherstellt. Porine erlauben als transmembranöse Poren die Passage von unspezifischen Molekülen in Abhängigkeit von deren Größe, sodass so zum Beispiel Wassermoleküle transportiert werden können (Rassow et al. 2022).

In Membranen eingebaute Transporter (Carrier), binden geladene Teilchen wie Aminosäuren oder Glukose auf der Seite mit der höheren Konzentration und setzen sie auf der Seite mit der geringeren Konzentration wieder frei.

1.2.3 Ionophore

Die erleichterte Diffusion kann auch durch Substanzen erfolgen, die nicht dauerhaft in eine Membran eingebaut sind und als Porenbildner oder Carrier fungieren, sogenannte ionophore Substanzen.

Das Ionophor Gramicidin A beispielsweise lagert sich in die Membran von eukaryotischen und prokaryotischen Zellen ein und bildet gemeinsam mit einem weiteren Gramicidin A Molekül eine Transmembranpore für einfach positiv geladene Ionen aus. Infolge von Ionenverschiebungen durch die Gramicidin A Pore kommt es zu einer Veränderung des Membranpotenzials, die zellschädigend oder gar bakterizid wirken kann. Da dieser Wirkmechanismus wenig spezifisch ist und sowohl an Membranen von eukaryotischen als auch prokaryotischen Zellen greift, beschränkt sich die Anwendung von Gramicidin A als Antibiotikum auf die topische äußerliche Applikation.

Carrier-Ionophore hingegen, sind organische makrozyklische Verbindungen mit amphiphilem Charakter. Über hydrophile Anteile können sie anorganische, positiv geladene Ionen reversibel chelieren und diese so dank hydrophober Anteile über biologische Membranen hinweg transportieren, wo sie wieder voneinander dissoziieren (Amelingmeier et al. 2014). Ein Vertreter der Carrier-Ionophore ist Hinokitiol (H).

1.3 Hinokitiol

Hinokitiol wurde vom japanischen Forscher *Tetsuo Nozoe* entdeckt, als dieser die chemischen Bestandteile einheimischer, besonders pilzresistenter Zypressenarten untersuchte. Im Rahmen seiner Studien gelang es ihm erstmals, Hinokitiol aus den Ölen der taiwanesischen Scheinzypresse, *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana*, zu extrahieren (Asao et al. 2004, Murata et al. 2012, Nozoe 1936). Interessanterweise veröffentlichte Nozoe seine Entdeckung „Über die Farbstoffe im Holzteile des „Hinoki“-Baumes. I. Hinokitin und Hinokitiol“ (1936) in deutscher Sprache, da viele der damals international bedeutenden Wegbereiter der organischen Chemie aus Deutschland stammten und deutsch demnach zur Verständigungssprache auf diesem Fachgebiet geworden war (Cotton 2024).

Im Jahr 1948 berichtete der schwedische Chemiker *Holger Erdtman* von seiner Entdeckung antibiotisch wirksamer Substanzen, den *Thujaplicinen*, die er aus dem Riesenlebensbaum, der *Thuja plicata*, gewonnen hatte (Erdtman und Gripenberg 1948). Sowohl *Nozoe* als auch *Erdtman* hatten die gleiche Substanz mit der Summenformel $C_{10}H_{12}O_2$ entdeckt (Nozoe et al. 1950).

Die Grundstruktur von Hinokitiol wird aufgrund ihres siebengliedrigen Kohlenstoffrings mit drei konjugierten Doppelbindungen, einer Carbonyl- und Hydroxylgruppe den Tropolonen zugeordnet. Überdies verfügt Hinokitiol über eine Isopropyl-Gruppe an vierter Position im Kohlenstoffring (Abb. 1).

Hinokitiol kann als Chelator Komplexe mit metallischen Kationen von Cadmium, Chrom, Kobalt, Eisen, Kupfer, Mangan, Magnesium, Nickel oder Zink eingehen (Nozoe 1936).

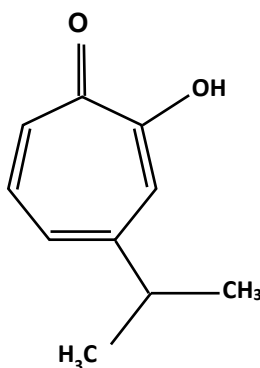


Abbildung 1: Chemische Struktur eines Hinokitiol-Moleküls

1.4 Zink

Zink ist ein unedles Metall und für den Menschen ein essenzielles Mineral und Spurenelement, das für diverse Stoffwechselprozesse benötigt wird. Im Darm werden 40 % des mit der Nahrung aufgenommenen Zinks resorbiert und von dort aus vorwiegend proteingebunden (66 % an Albumin, 30 % an α_2 - Makroglobulin und 2 % an die Aminosäuren Zystein und Histidin) über die Blutbahn an die Zielorte transportiert (Ternes 2013, Vallee und Falchuk 1993). Eine mangelhafte Zink-Aufnahme kann sich in Haarausfall, Schwäche, Blutbildungs-, Geruchs- und Geschmacksstörungen, weißlichen Flecken auf den Fingernägeln, in Wachstums- und Wundheilungsstörungen manifestieren. Dagegen kann die übermäßige Aufnahme zu gastrointestinalen Nebenwirkungen wie Durchfall und Erbrechen führen.

Die Zink-Homöostase des menschlichen Organismus ist wissenschaftlich nicht abschließend geklärt. Zink ist aber Kofaktor von Metalloenzymen wie Hydrolasen, Synthetasen, Ligasen oder Isomerasen , wobei es an Zystein und Histidin Reste in deren aktiven Zentren bindet (Ternes 2013). Es stabilisiert Membranen, spielt eine Rolle beim Kollagenstoffwechsel, unterstützt die Speicherung von Insulin in den β -Zellen des Pankreas und ist am Auf-, Ab- und Umbau und an der Stabilisierung der Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen beteiligt (Ternes 2013).

Auf zellulärer Ebene befinden sich 50 % des Zinks im Zytoplasma, 30 – 40 % im Zellkern und weitere 10 % in der Zellmembran und den Zellorganellen (Baltaci und Yuce 2018). Im Zellkern und dem Zytoplasma liegt es proteingebunden vor, insbesondere an Metallothionein, das intrazellulär als Zink-Speicher dient, wohingegen es in den Organellen wie dem Mitochondrium, dem ER und Golgi-Apparat ungebunden vorkommt (Baltaci et al. 2018, Lu et al. 2016). Bedingt durch den Zellzyklus kommt es zu picomolaren Schwankungen der intrazellulären Zinkmenge, die durch verschiedene membranassoziierte Proteine reguliert werden kann (Baltaci und Yuce 2018, Li und Maret 2009, Scavo und Oliveri 2022). Zink-Transporter (ZnT) können die intrazelluläre Zinkmenge durch eine Verschiebung in verschiedene Zellorganellen oder den Extrazellulärraum verringern, während Proteine der Zrt/Irt-like Familie (ZIP) die intrazellulären Zinklevel durch eine Freisetzung aus den Zellorganellen oder durch eine Aufnahme aus dem extrazellulären Raum erhöhen können (Bafaro et al. 2017, Baltaci und Yuce 2018, Kambe et al. 2014).

1.5 Wirkkomplex Hinokitiol und Zink

1.5.1 Antimykotische Aktivität von Hinokitiol

Die Resistenz Hinokitiol-haltiger Pflanzen gegenüber Pilzbefall besteht *in vitro* auch für Pilzarten, die den Menschen befallen können (Inamori et al. 2000, Morita et al. 2002).

Pilz-Infektionen der Mundhöhle werden vor allem durch Hefepilze der Gattung *Candida* hervorgerufen, wobei die Art *Candida albicans* besonders hervorzuheben ist, da sie fakultativ pathogen Haut und Schleimhäute des Menschen besiedelt (Groß 2013). Klinisch manifestiert sich eine Infektion mit *Candida albicans* meist nur unter bestimmten Umständen wie einem veränderten pH-Wert im befallenen Gebiet oder bei verminderter Immunkompetenz. Mit weißlichen abwischbaren Belägen auf den Schleimhäuten in der Mundhöhle ist das klinische Erscheinungsbild einer Candida-Infektion sehr charakteristisch. In ausgeprägten Fällen mit Organbeteiligung oder bei immunsupprimierten Patienten kann die systemische Einnahme eines Antimykotikums, wie Fluconazol, indiziert sein. Die Behandlung einer lokalen Candidose kann beispielsweise durch die topische Applikation eines Nystatin-haltigen Gels erfolgen. Nystatin ist ein porenbildendes Ionophor und bewirkt durch eine Verschiebung von K⁺-Ionen den Zelltod der Erreger.

In vitro zeigt auch Hinokitiol hemmende Effekte auf das Wachstum verschiedener Pilzarten (Inamori et al. 1999). Interessant ist dabei die antimykotische Wirkung gegenüber *Candida albicans* Biofilmen und insbesondere auch gegenüber Candida-Stämmen mit Fluconazol-Resistenz (Inamori et al. 2000, Inoue et al. 2020, Kim et al. 2017, Komaki et al. 2008). Diese Wirkung könnte einerseits durch den Einfluss von Hinokitiol auf das für die ATP-Produktion essenzielle Potenzial an der Mitochondrienmembran entstehen, andererseits könnten intrazelluläre Mechanismen der Signaltransduktion unterbrochen werden (Jin et al. 2021, Komaki et al. 2008).

Eine klinische Studie aus Japan kam zu dem Schluss, dass älteren, unter rekurrierenden Candida-Infektionen leidenden Patienten die Verwendung eines Hinokitiol-haltigen Produkts zur Prävention empfohlen werden kann, um eine häufige Anwendung von Antimykotika zu vermeiden (Sakaguchi 2017).

1.5.2 Antibakterielle Aktivität von Hinokitiol

Wegen der antimikrobiellen Eigenschaften wurde Hinokitiol auch hinsichtlich einer potenziellen Verwendung als Konservierungsstoff in der Lebensmittelindustrie untersucht (Tonari 1998).

Belegt ist sein breites antibakterielles Spektrum gegenüber diversen grampositiven wie auch gramnegativen Bakterienspezies (Inamori et al. 1999, Inoue et al. 2020, Morita et al. 2007, Osawa et al. 1990, Saeki et al. 1989, Trust und Coombs 1973). Dabei ist Hinokitiol *in vitro* wirksam gegenüber herkömmlichen *Staphylococcus aureus* Stämmen und fördert lokal appliziert die Wundheilung von Läsionen einer ektopischer Dermatitis, die mit *Staphylococcus aureus* infiziert war (Arima et al. 2003, Inamori et al. 1999). In Bezug auf bakterielle Resistenzen ist die minimale Hemmkonzentration (MHK) gegenüber Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) nur halb so groß wie für herkömmliche Stämme und auch gegenüber Tetracyclin-resistenten *Staphylococcus aureus* Stämmen erweist sich Hinokitiol als antibakteriell (Inamori et al. 1999, Le et al. 2023). Darüber hinaus reagieren auch Bakterien der Art *Staphylococcus epidermidis* sensibler auf Hinokitiol als auf das Antibiotikum Gentamycin (Inamori et al. 1999).

Interessant ist zudem der Einfluss von Hinokitiol auf verschiedene oralpathogene Bakterien, wie die kariogenen Erreger, *Streptococcus mutans* (MHK = 1,83 µM) und *Streptococcus sobrinus* (MHK = 6,09 µM) (Domon et al. 2019). Darüber hinaus zeigen die Vertreter des sogenannten orangenen Komplexes *Prevotella intermedia* und *Fusobacterium nucleatum* (MHK = 180 µM – 300 µM) als Übergangskeime zwischen der Gingivitis und Parodontitis und die besonders aggressiven, parodontal pathogenen Anaerobier *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (MHK = 3,05 µM) und *Porphyromonas gingivalis* (MHK = 6,09 µM) reduziertes Wachstum durch einen Kontakt mit Hinokitiol (Domon et al. 2019, Socransky et al. 1998).

Für die genannten Oralpathogene resultieren, mit Ausnahme von bakteriostatischen Effekten auf *Porphyromonas gingivalis*, bakterizide Effekte (Domon et al. 2019). Kulturen von *Porphyromonas gingivalis* werden außerdem durch niedrigere als die bakteriostatischen Konzentrationen in ihrer Kommunikation und der Produktion des Virulenzfaktors *Gingipain* behindert, was die Ausbildung des charakteristisch schützenden Biofilms stark beeinträchtigt und in der Prävention parodontaler Erkrankungen Bedeutung erlangen könnte

(Hamada et al. 2021).

Die antibakterielle Wirkung von Hinokitiol zeichnet sich durch den sogenannten paradoxen Hemmeffekt aus (Arima et al. 2003). Diese, auch als Eagle Effekt bekannte Wirkung, beschreibt ursprünglich eine Hemmung des bakteriellen Wachstums im Bereich von niedrigen Konzentrationen, bei unbehindertem Wachstum im höheren Konzentrationsbereich (Eagle 1948). So zeigt Hinokitiol je zwei MHK für *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (60,9 – 182,7 μM und 548 μM) und *Streptococcus mutans* (60,9 – 244 μM und 487 μM) (Shih et al. 2013). Bisher konnte die spezifische antibakterielle Wirkweise von Hinokitiol nicht vollständig aufgeklärt werden. Sie scheint aber mit einer Reduktion der Stoffwechselaktivität und des Sauerstoffverbrauchs in Verbindung zu stehen (Morita et al. 2007). Trust und Coombs (1973) beobachteten stärkere antibakterielle Effekte gegenüber gramnegativen als gegenüber grampositiven Bakterienspezies und postulierten daraus einen Zusammenhang zwischen dem antibakteriellen Mechanismus und der Gram-Klassifikation. Im Gegensatz dazu beschrieben Shih et al. (2013) explizit keine Kausalität im Hinblick auf den Aufbau der prokaryotischen Membran.

Trotz des breiten antibakteriellen Spektrums von Hinokitiol, kann dessen Aktivität limitiert sein, da Lichtexposition zu dessen Zersetzung und Umwandlung in bislang unbekannte unwirksame Komponenten führen kann (Coombs und Trust 1973).

1.5.3 Antivirale Aktivität von Hinokitiol und Zink

Hinokitiol ist in der Lage, Komplexe mit den Ionen unterschiedlicher Metalle einzugehen, darunter Kupfer. Diese Kombination konnte die Proliferation von Influenza-Viren hemmen und reduzierte dabei auch die schädigenden Effekte an den infizierten Zellen *in vitro* (Miyamoto et al. 1998). Hinokitiol in Kombination mit Zink-Ionen hemmte *in vitro* nachweislich das Wachstum verschiedener Pico-RNA-Viren (Rhino-, Coxsackie- und Mengo-Viren), möglicherweise durch eine direkte Wirkung auf die spezifischen Enzyme oder durch Beeinträchtigung der Polyprotein Faltung (Krenn et al. 2009). Zink wirkt außerdem nicht nur direkt hemmend auf Rhino- oder Polio-Viren, sondern spielt auch so eine wichtige Rolle für eine kompetente Immunfunktion (Ishida 2019, Korant et al. 1974, Read et al. 2019, Skalny et al. 2020, Suara und Crowe 2004, Wessels et al. 2020).

Replikations-hemmende Effekte zeigten auch Zink-Ionen und das Ionophor Pyrithion, indem die Zink-Ionen entweder kompetitiv an das katalytische oder an ein Zink spezifisches Zentrum spezieller viraler Enzyme banden (te Velthuis et al. 2010). So kam es je nach Virus zur Hemmung der Replikation entweder zum Zeitpunkt der Initiation oder im weiteren Verlauf der Elongation (Ferrari et al. 1999, Hung et al. 2002, te Velthuis et al. 2010).

In Bezug auf die COVID-19-Pandemie rückten antiviral wirksame Stoffe in den Fokus der Wissenschaft. Zum Einsatz kommen könnten ionophor wirksame Substanzen, da diese in Kombination mit Zink virale Proliferationsmechanismen hemmen könnten. In diesem Zusammenhang scheint auch die Forschung zum möglichen präventiven oder therapeutischen Einsatz des Antimalariamittels Hydroxychloroquin vielversprechend, welches auch ionophore Eigenschaften für Zink aufweist (Hoang und Han 2020, Xue et al. 2014).

Darüber hinaus wurde in verschiedenen wissenschaftlichen Arbeiten auch eine Anwendung von Hinokitiol in Kombination mit Metall-Ionen, darunter Kupfer, als vielversprechender Ansatz in Betracht gezogen (Anandan et al. 2022, Miyamoto et al. 1998). Hoang et al. (2020) beschrieben Hinokitiol und Zink als möglicherweise geeignete Wirkstoffkombination für die Prävention und Therapie einer SARS-CoV-2-Infektion der Atemwege.

Es gibt Hinweise, dass die Kombination von Hinokitiol und Zinkgluconat ($C_{12}H_{22}O_{14}Zn$), einem handelsüblichen Präparat zur Supplementierung von Zink, effektiv sein könnte (Tao et al. 2022). Nach einem durch Hinokitiol vermittelten Import, soll Zinkgluconat an Zystein- oder Histidin-Reste im katalytischen Zentrum der für die Replikation essenziellen viralen Enzyme 3C-ähnliche Protease und Papain ähnliche Protease binden und so deren Funktionsweise maßgeblich einschränken (Tao et al. 2022).

1.5.4 Hinokitiol in der Zahnheilkunde

Inzwischen ist die Synthese von Hinokitiol möglich, die sich einfacher und effizienter gestaltet als die chemische Extraktion aus Zedernhölzern, sodass Hinokitiol zur industriellen Herstellung von Mundhygiene- und Kosmetikprodukten genutzt werden kann (Astivita Limited 2020). Zahlreiche Publikationen belegen den klinischen Nutzen von Hinokitiol-haltigen Produkten, berichten jedoch über Studien mit überwiegend kleinen Stichproben (Iha et al. 2013, Nagao et al. 2017, Nagao und Sata 2011). Die regelmäßige Verwendung

eines Hinokitiol-haltigen Gels (0,2 %) linderte das Beschwerdebild von Patienten mit Lichen ruber oder *burning mouth* Syndrom, reduzierte die Bildung der für schlechten Mundgeruch verantwortlichen Volatilen Schwefelverbindungen und zeigte eine Verbesserung der parodontalen Entzündungsparameter Plaque Index nach Loe und Silles, Sondierungsbluten und durchschnittliche Sondierungstiefe (Iha et al. 2013, Nagao et al. 2017, Nagao und Sata 2011).

Darüber hinaus findet Hinokitiol als Inhaltsstoff von Materialien in der konservierenden Zahnheilkunde größeres Interesse, da es beispielsweise *in vitro* und *in vivo* Pulpazellen zur vermehrten Angiogenese stimuliert und insbesondere für die Entwicklung konservierend regenerativer Therapieansätze bedeutend werden könnte (Kim et al. 2014). Als antiinflammatorisches Mittel zur Kavitätendesinfektion mit Anregung der Regeneration der Pulpa scheint ein Einsatz von Hinokitiol zum aktuellen Zeitpunkt jedoch wenig erfolgversprechend, da es nicht Dentin gängig ist (Lin et al. 2019).

Weiterhin könnte Hinokitiol aufgrund seiner vielfältigen antibakteriellen und entzündungshemmenden Eigenschaften vermehrt Einsatz in der Prävention von Parodontalerkrankungen erlangen und in der Endodontie wegen seiner desinfizierenden aber wenig zytotoxischen Eigenschaften als Bestandteil von Wurzelkanal-Sealern (Domon et al. 2019, Huang et al. 2016, Shih et al. 2014).

2. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden *in vitro* Studie ist es, die antimikrobiellen Eigenschaften des Hinokitiol-Zink-Komplexes näher zu charakterisieren und dessen biologische Verträglichkeit und Wirksamkeit zu untersuchen. Insbesondere soll geklärt werden, ob eine gebrauchsfertige Hinokitiol-haltige Mundspüllösung sowie der enthaltene Wirkkomplex aus Hinokitiol und Zink zytotoxische Effekte entfalten. In einem weiteren experimentellen Ansatz sollen die ionophoren Eigenschaften von Hinokitiol für Zink quantitativ und qualitativ charakterisiert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Die für die Experimente benötigten Geräte und Materialien sind unter Nennung von Hersteller und Artikelnummer in den Tab. 1 bis 6 thematisch zusammengestellt, die Hinokitiol-haltige Mundspüllösung (H-MS) wurde vom Hersteller zur Verfügung gestellt (Tab. 7).

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Hersteller
Frosty Freezing Container	Nalgene, Thermo Scientific, USA
Inkubator HERA cell 150i	Thermo Fisher Scientific, USA
Laser Scanning Mikroskop LSM 510	Carl Zeiss, Deutschland
Mikrobiologische Werkbank Holten Laminar Airflow	Thermo Electron, Deutschland
Mikroskop Axiovert 40 C	Carl Zeiss, Deutschland
Pipetten Research plus, 1 Kanal 10 µl, 20 ml, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Deutschland
Pipettierhilfe elektronisch Easypet 3 Multipipette plus	Eppendorf, Deutschland
Plattenlesegerät ELISA Reader Tecan Infinite M200	Tecan Group LTd., Schweiz
Waage AEA 100A	Adam Equipment, Deutschland
Zentrifuge Allegra X-15R	Beckmann Coulter, Deutschland

Tabelle 2: Zelllinie

Verwendete Zellen	Hersteller
Humane Gingivale Fibroblasten	ATCC CRL 2014, USA

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller und Artikelnummer
Deckgläser 24 x 60 mm	Carl-Roth, Deutschland H878.2
Glas Pasteur Pipetten 225 mm	Brand, Deutschland 7477 20
Menzel Gläser Superfrost Plus 75 x 25 mm	Menzel, Deutschland J1800AMNZ
Multiwellplatten mit klarem Boden (96 Well) transparent schwarz	Greiner Bio-One, Deutschland 655 180, 655 087
Pipettenspitzen 10 µl 20 µM 100µL 1000 µl	Biozym, Deutschland 770200 VT0220 VT0230 VT0260
Pipettenspitzen für Multipipette 5 ml	Eppendorf, Deutschland VB-0260
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Deutschland 72.690.550
Serologische Pipetten für Easypet3 2 ml 5 ml 10mL 25 ml	Sarstedt, Deutschland 86.1252.001 86.1253.001 86.1254.001 86.1685.001
Silikonkammern (12 Well), entfernbar	Ibidi, Deutschland 81201
Tritest L pH Indikatorpapier 1-11	Macherey-Nagel, Deutschland 90510
Zählkammer nach Neubauer	Brand, Deutschland 717805
Zellkulturflaschen T-75	Greiner Bio-One, Deutschland 658 175
Zentrifugenröhrchen 15 ml 50 ml	Greiner Bio-One, Deutschland 188 271 227 261

Tabelle 4: Reagenzien und Kits

Reagenz	Hersteller und Artikelnummer
Accutase	Sigma-Aldrich, USA A6964
Aqua ad iniectabilia 50 ml	Braun, Deutschland 3820076
Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit Phenolrot ohne Phenolrot	Gibco/ Life Technologies, USA 41965-039 21063-029
Dimethylsulfoxid, ≥99,5 %	Carl Roth, Deutschland A994.2
Ethanol, ≥99,5 %	Carl Roth, Deutschland 5054.
Fetales Bovines Serum Superior, hitzeinaktiviert	Sigma-Aldrich, USA S0615
Hanks' Balanced Salt Solution	Gibco/ Life Technologies, USA 14175095
Immersol TM 518 F	Carl Zeiss, Deutschland 444960-0000-000
Methanol ≥99 %	Carl Roth, Deutschland 8388.1
Paraformaldehyd 95 %	Sigma-Aldrich, USA 158127
Penicillin/ Streptomycin	Sigma-Aldrich, USA P4333
Phosphate Buffered Saline	Gibco/ Life Technologies, USA 10010056
ProLong Gold Antifade reagent	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, USA P36930
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich, USA T8154
Water Soluble Tetrazolium Salt	Roche Diagnostics, Deutschland 11644807001

Tabelle 5: Fluorophore

<i>Fluorophor</i>	<i>Exzitations-/ Emissions- maximum</i>	<i>Hersteller und Artikelnummer</i>
BODIPY TR Ceramide	589/ 616 nm	Abcam, Vereinigtes Königreich ab269449
4',6-Diamidin-2-phenylindol	358/ 461 nm	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, USA 62248
FluoZin-3, AM	494/ 516 nm	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, USA F24195
LysoTracker Deep Red	647/ 668 nm	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, USA L12492
MitoTracker Deep Red	644/ 665 nm	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, USA M22426

Tabelle 6: Chemikalien

<i>Salz</i>	<i>Molekular- gewicht</i>	<i>Hersteller und Artikelnummer</i>
Hinokitiol/ β -Thujaplicin; Reinheit: >98 %	164,20 g/mol	Abcam, Vereinigtes Königreich ab144606
2-Mercapto-pyridine N-oxide sodium salt / Sodium Pyrithion; Reinheit: $\geq$ 96 %	149,15 g/mol	Sigma-Aldrich, USA H3261-1G
Zinkchlorid; Reinheit: >98 %	136,29 g/mol	TCI Chemicals, Deutschland Z0014

Tabelle 7: Inhaltsstoffe der Hinokitiol-haltigen Mundspüllösung *Dr. ZinX* laut Hersteller AstiVita Limited (Australien)

<i>Inhaltsstoff</i>	<i>Anteil in Gewichtsprozent [Gew.-%]</i>
Aqua	> 50 bis 75
Sorbitol	> 5 bis 10
Peg-40 Hydrogenated Castor Oil	> 1 bis 5
Xylitol	> 1 bis 5
Glycerin	> 1 bis 5
Aroma	> 0,1 bis 1
Poloxamer 407	> 0,0 bis 0,1
Eucalyptus Globulus Leaf Oil	> 0,1 bis 1
Mentha Piperita Oil	> 0,1 bis 1
Sodium Citrate	> 0,0 bis 0,1
Inositol	> 0,0 bis 0,1
Zinc Chloride	> 0,1 bis 1
Sodium Saccharin	> 0,0 bis 0,1
O-Camen-5-Ol	> 0,0 bis 0,1
Hexetidine	> 0,0 bis 0,1
Sodium Benzoate	> 0,1 bis 1
Citric Acid	> 0,1 bis 1
Hinokitiol	> 0,1 bis 1

3.2 Methoden

Das Protokoll der vorliegenden *in vitro* Studie wurde von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München beraten und als ethisch rechtlich unbedenklich eingestuft (Projektnummer 20-987).

Die Zytotoxizitäts-Tests und die Ionophor-Nachweise wurden unter der Mikrobiologischen Werkbank in den Laboratorien der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie an der LMU München durchgeführt.

3.2.1 Humane Gingivale Fibroblasten

Die Untersuchungen wurden aufgrund der anatomischen Nähe mit dem Anwendungsbereich der gebrauchsfertigen Mundspüllösung an Humanen Gingivalen Fibroblasten (HGF-1) durchgeführt.

Neben den bindegewebigen Fasern, Proteoglykanen und Blutgefäßen machen die HGF-1 mit 65 % den überwiegenden zellulären Anteil der bindegewebigen Gingiva aus (Hellwig et al. 2018). Als aktive Produzenten von extrazellulärer Matrix synthetisieren die HGF-1 Kollagenfasern, die dentogingival, dentoperiostal, alveologingival, zirkulär und transseptal verlaufend das straffe Anliegen der Gingiva an den Zähnen und dem Knochen ermöglichen (Hellwig et al. 2018).

In der Zellkultur wachsen HGF-1 adhärent als Monolayer in charakteristischer kopfsteinpflasterähnlicher Anordnung (Abb. 2).

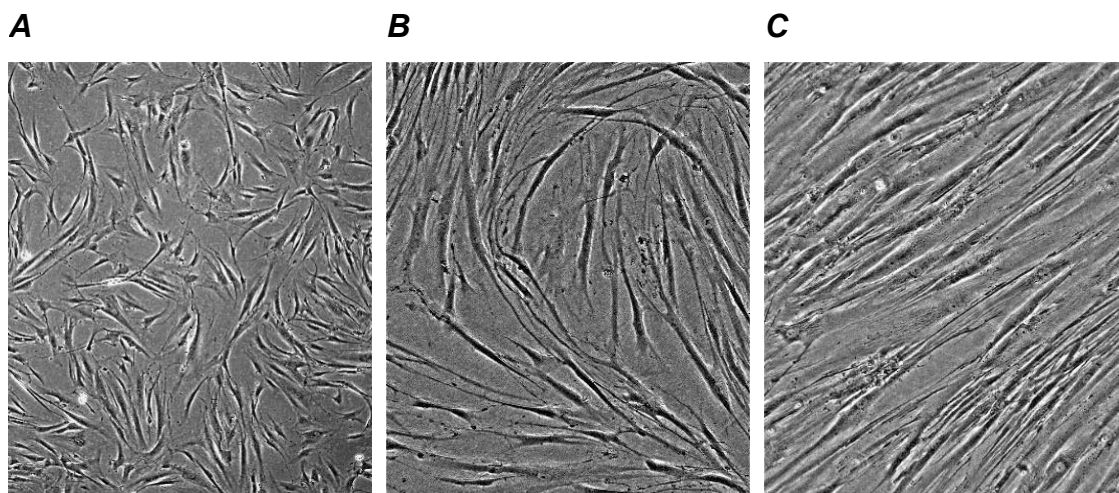


Abbildung 2: Aufnahmen der spindelförmigen HGF-1 mit dem Durchlichtmikroskop Axiovert.

A: etwa 50 % konfluente Kultur in 5-facher Vergrößerung

B: charakteristisch kopfsteinpflasterartiges Wachstumsmuster in 10-facher Vergrößerung

C: 100 % konfluente Kultur in 10-facher Vergrößerung

3.2.2 Kultivierung der Humanen Gingivalen Fibroblasten

Die Kultivierung der HGF-1 erfolgte in T75 Kulturflaschen auf einer Wachstumsfläche von 75 cm² in 10 ml Kulturmedium. Die Flaschen wurden in einem Inkubator bei 37 °C mit einem Kohlenstoffdioxid-Gehalt (CO₂) von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 80 % gelagert. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit einem Glukoseanteil von 4,5 g/l wurde mit 10 % Fetalem Bovinen Serum (FBS) und 1 % Penicillin/ Streptomycin (P/S) versetzt und zwei bis dreimal pro Woche unter der sterilen Werkbank gewechselt.

Konfluente Kulturen wurden regelmäßig geteilt (gesplittet) und subkultiviert. Dazu wurde zunächst das alte DMEM aus einer T75 Flasche entfernt. Mit einer Pipette wurden 3 ml sterile Phosphate Buffered Saline (PBS) zugegeben. Die Flasche wurde zum Waschen sanft geschwenkt und das PBS anschließend abgesaugt. Zum Ablösen der adhärent wachsenden HGF-1 vom Kulturflaschenboden wurden 3 ml Accutase hinzugegeben. Nach 5-minütiger Inkubation wurde der Vorgang mikroskopisch kontrolliert und nötigenfalls durch ein sanftes Abklopfen des Kulturflaschenbodens unterstützt. Weitere 7 ml frisches DMEM wurden hinzugegeben und die Zellsuspension wurde für die Zentrifugation (5 Minuten bei 20 °C und 300 x g) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Im Anschluss wurde das überstehende Medium abgesaugt und das verbleibende Zellpellet in einer definierten Menge von frischem DMEM resuspendiert. Davon wurden 50 µl mit 50 µl Trypanblau verdünnt und die Anzahl vitaler Zellen pro Milliliter in einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt.

Die so bestimmte Zellkonzentration wurde anschließend auf die gewünschte Anzahl an Zellen pro Milliliter in frischem DMEM verdünnt, bevor die Zellen in neuen Kulturgefäßen weiterkultiviert oder zur Versuchsdurchführung auf Multiwellplatten oder Objektträgern ausgesät wurden.

Die Langzeitlagerung von HGF-1 erfolgte bei -196 °C im Stickstofftank. Die Zellen wurden dazu wie oben beschrieben aus konfluenten Kulturen in T75 Flaschen abgelöst und zentrifugiert, das Zellpellet wurde in Kryomedium resuspendiert, ausgezählt und anschließend auf 500 000 Z/mL in Kryomedium verdünnt, sodass in ein Kryoröhrchen 1 ml Zellsuspension gegeben werden konnten. Zunächst wurden die Kryoröhrchen auf Isopropylalkohol bei -80 °C um 1 °C pro Stunde heruntergekühlt und nach 24 Stunden in den Stickstofftank umgesetzt.

Das Kryomedium zur Langzeitlagerung wurde hergestellt, indem das mit 10 % FBS und 1 % P/S angereicherte DMEM mit 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt wurde.

Zur Kultivierung von eingefrorenen HGF-1 wurde ein Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Zellsuspension wurde in ein mit 10 ml frischem DMEM gefülltes 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 20 °C für 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde mit einer Pipette abgenommen, das Zellpellet in frischem DMEM suspendiert und in T75 Kulturflaschen im Brutschrank inkubiert.

3.2.3 Herstellung von Stammlösungen

Für die Experimente wurden 50 µg Hinokitiol in 2,03 ml DMSO gelöst (150 mM) und bei – 20 °C für maximal vier Wochen gelagert bzw. verwendet; 1 g Zinkchlorid (ZnCl_2) wurde abgewogen und in 29,35 ml reinem Ethanol (EtOH, 99,9%) zu 250 mM und 1 g Sodium Pyrrithion (Pyrrithion, P) in 67,05 ml sterilem Wasser zu 100 mM gelöst. Beim Arbeiten mit Hinokitiol wurde auf eine separate Beleuchtung der sterilen Werkbank verzichtet.

3.2.4 Zytotoxizitäts-Tests

Die Zytotoxizität der H-MS und des Hinokitiol-Zink-Komplexes wurde unter Berücksichtigung des Internationalen Standards zur biologischen Beurteilung von Medizinprodukten (ISO 10993-5:2009) evaluiert. Unter Einbeziehung einer Positiv- und Negativkontrollgruppe wurden vier Replikate pro Gruppe analysiert. Zur Negativkontrolle (N.K.) wurde phenolfreies DMEM und zur Positivkontrolle (P.K.) als zytotoxische Substanz unverdünntes DMSO eingesetzt. Untersucht wurden die fertige Zubereitung der H-MS und als weitere Testgruppen (T.G.) Hinokitiol und ZnCl_2 in unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen (Tab. 8):

Hinokitiol:

- [H1] = 50 μM
- [H2] = 200 μM
- [H3] = 800 μM
- [H4] = 3,2 mM

ZnCl_2 :

- [Z1] = 50 μM
- [Z2] = 200 μM
- [Z3] = 800 μM
- [Z4] = 3,2 mM

Tabelle 8: Untersuchte Gruppen zu Ermittlung der Zytotoxizität

Kontrollgruppen	T.G. Zink	T.G. Hinokitiol	kombinierte T.G.
N.K. +	Z1	H1	Z1 H1
N.K. -	Z2	H2	Z4 H1
P.K.	Z3	H3	Z1 H4
H-MS	Z4	H4	Z4 H4

Die Analyse der Zytotoxizität erfolgte mithilfe des *Water Soluble Tetrazolium Salt* (WST-1) Assays, welches durch die mitochondriale Dehydrogenase zum roten Farbstoff Formazan abgebaut wird. Die Menge gebildeten Formazans ist hierbei proportional zur Vitalität der Zellen und kann mit Hilfe der Bestimmung der Absorption (optische Dichte, OD) quantifiziert werden.

Auf eine transparente 96-Well-Platte wurden an Tag 0 mit Hilfe einer Multipipette jeweils 10 000 Zellen (HGF-1) pro Well in 200 μl DMEM ausgesät und kultiviert (Abb. 3).

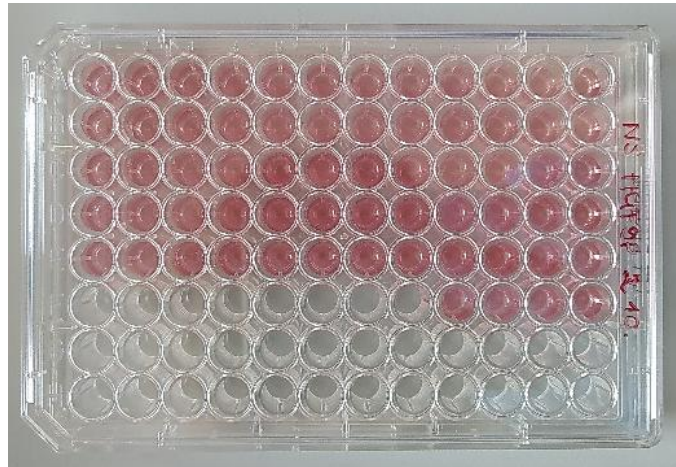


Abbildung 3: Transparente 96-Well-Platte nach dem Aussäen der HGF-1

Am Tag der Versuchsdurchführung wurden aus den H- und Z-Stammlösungen in Phenolfreiem DMEM doppelt konzentrierte Lösungen hergestellt und jeweils 1:1 mit phenolfreiem DMEM, Z- oder H-Lösungen auf die gewünschten verschiedenen kombinierten Konzentrationen verdünnt.

Jeder H oder Z enthaltenden Lösung wurde entsprechend DMSO oder EtOH zugegeben, sodass alle T.G. 1,28 Volumenprozent (Vol.-%) EtOH oder 2,13 Vol.-% DMSO enthielten. Zudem wurde die Gruppe N.K. + in die Untersuchungen einbezogen, welche mit 2,13 Vol.-% DMSO und 1,28 Vol.-% EtOH angereichertes DMEM enthielt. Die N.K. – enthielt ausschließlich DMEM.

Vor Beginn der Versuchsdurchführung wurde die Morphologie der Zellen mikroskopisch kontrolliert und die Versuchsdurchführung bei einer Konfluenz von mindestens 80 % begonnen. Dazu wurde das alte DMEM aus den Wells entfernt und durch 200 µl der zu untersuchenden Lösungen ersetzt. Die 96- Well Platte wurde für 1 Stunde im Inkubator gelagert.

Anschließend wurden die Lösungen abgesaugt und die Wells dreimal mit 200 µl sterilem PBS gewaschen, um etwaige Lösungsrückstände zu entfernen. Es wurden 100 µl phenolfreies DMEM und 10 µl WST-1 Assay in jedes Well gegeben und zur Bestimmung des Blanks, zur Ermittlung der OD des Assays, vier leere Wells ebenso befüllt.

Die Platten wurden so für 2,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Absorptionsmessung zur Quantifizierung der Zellvitalität mit dem Mikroplatten-Reader von Tecan bei 450 nm, von oben und ohne Deckel. Der Plattenleerwert wurde bei 690 nm bestimmt. Im Rahmen der Erarbeitung der Methodik wurde zudem der pH-Wert für die H-MS mit Indikatorpapier bestimmt.

3.2.5 Ionophor-Nachweis

Zur Untersuchung der quantitativen und qualitativen ionophoren Eigenschaften von Hinokitiol für Zink wurde der Fluorophor FluoZin-3, AM (FZ-3) eingesetzt. Es ist als lipophiles Acetoxymethyl-Molekül zellgängig und bindet nach der Diffusion über die Zellmembran intrazellulär selektiv an freie Zink-Ionen. Dadurch verliert der Farbstoff seine lipophilen Eigenschaften und verbleibt als hydrophiles Molekül im Zellinneren. Zur Herstellung der 5 mM Stammlösung wurden 100 µg FZ-3 in 20,3 µl DMSO gelöst.

Als Positivkontrolle wurde das Zink-Ionophor Pyrithion (2-Mercapto-pyridin-1-oxid Natriumsalz, C_5H_4NNaOS) eingesetzt.

3.2.5.1 Quantitativer Ionophor-Nachweis

Auf eine schwarze 96-Well-Platte mit klarem Boden wurden an Tag 0 pro Well mit einer Multipipette jeweils 10 000 Zellen (HGF-1) in 200 µl DMEM ausgesät (Abb. 6). Die Zellen wurden bis zur Versuchsdurchführung an Tag 5 bei 37 °C im Inkubator vorkultiviert. An Tag 3 erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem DMEM.

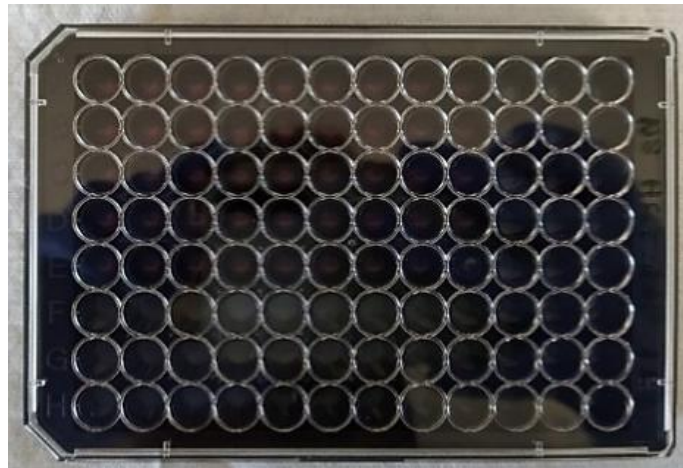


Abbildung 4: für Fluoreszenzmessungen optimierte schwarze 96-Well-Platte mit transparentem Boden

Am Tag der Versuchsdurchführung wurden die Untersuchungslösungen hergestellt. Dazu wurden die Stammlösungen von ZnCl_2 (250 mM), Hinokitiol (150 mM) und Pyrithion (100 mM) jeweils in phenolfreiem DMEM auf das Doppelte der gewünschten Endkonzentrationen verdünnt und anschließend durch weitere 1:1 Verdünnung (Z + phenolfreies DMEM, Z + H oder Z + P) auf die unterschiedlich kombinierten finalen Konzentrationen eingestellt (Tab. 9).

ZnCl₂:

- [Z0] = 0 μM
- [Z1] = 50 μM
- [Z2] = 100 μM
- [Z3] = 200 μM

Hinokitiol:

- [H1] = 50 μM
- [H2] = 100 μM
- [H3] = 200 μM

Pyrithion:

- [P] = 10 μM

Tabelle 9: Konzentrationskombinationen zum quantitativen Ionophor-Nachweis

<i>N.K.</i>	<i>T.G. Hinokitiol</i>	<i>T.G. Pyrithion</i>
Z0	Z0 H2	Z0 P
Z1	Z1 H2	Z1 P
Z2	Z2 H1 // Z2 H2 // Z2 H3	Z2 P
Z3	Z3 H2	Z3 P

Das alte Medium wurde aus den Wells entfernt. Von den zu untersuchenden Lösungen wurden zur Stimulation je 100 μl in die Wells gegeben und die Zellen für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die FZ-3 Stammlösung (5 mM) wurde in phenolfreiem DMEM auf 6 μM verdünnt, bevor davon 50 μl pro Well hinzugegeben wurden, was in einer FZ-3- Konzentration von 2 μM resultierte. Die Zellen wurden für weitere 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Lösungen abgesaugt und die Wells mit je 200 μl steriler Hanks' Balanced Salt Solution ohne Calcium, Magnesium und Phenolrot (HBSS) gewaschen. Zuletzt wurden 200 μl frisches HBSS pro Well hinzugegeben und zur Ermittlung des Blanks vier weitere Wells befüllt.

Die Zellen wurden für weitere 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, bevor zur Quantifizierung die Fluoreszenzmessung mit dem Plattenlesegerät von Tecan bei 37 °C, von oben und ohne Deckel erfolgte. Das FZ-3 wurde mit Licht der Wellenlänge 490 nm angeregt und die Emission (Em) bei 516 nm detektiert.

3.2.5.2 Qualitativer Ionophor-Nachweis

Die Aufnahmen wurden mit dem Laser Scanning Mikroskop (LSM) 510 der Firma Zeiss (Software AIM, Release Version 4.2 SP1) erstellt. Verwendet wurde für die 63-fache Vergrößerung das Ölimmersionsobjektiv (Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil) unter Nutzung von Immersol TM 518 F (ISO 8036).

Tabelle 10 zeigt die spezifische Einstellung für die Darstellung des FZ-3, des Lysosomen-Markers LysoTracker DeepRed (LTDR), des Mitochondrien-Markers MitoTracker DeepRed (MTDR) und des Markers für den Golgi-Apparat der Zellen BODIPY TR Ceramide (BODIPY).

Tabelle 10: Laser zur Exzitation (Ex) und entsprechende Filter der Emission (Em) der eingesetzten Fluorophore mit dem LSM 510; Bandpass (BP), Langpass (LP)

	FZ-3	LTDR und MTDR	BODIPY
Laser	<i>Argon 2</i>	<i>HeNe 633</i>	<i>HeNe 543</i>
Ex	458 nm, 477 nm, 488 nm, 514 nm	633 nm	543 nm
Em	BP 505-530	LP 560	LP 615

Der LTDR diffundiert als hydrophobes Molekül über die Zellmembran und reichert sich intrazellulär über das leicht basische Amin, an das es gebunden ist, selektiv in den sauren Lysosomen an.

Der MTDR gelangt ebenfalls über Diffusion ins Zellinnere, wo er sich in metabolisch aktiven Mitochondrien einlagert.

BODIPY TR Ceramide ist ein fluoreszierender Marker, der aufgrund seiner Größe mittels Endozytose in die Zellen aufgenommen wird und sich im Golgi-Apparat lebendiger Zellen anreichert.

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) ist ein standardmäßig eingesetzter Fluorophor zur Färbung der Zellkerne avitaler Zellen.

3.2.5.3 Markierung von Lysosomen und Mitochondrien

HGF-1 wurden in einer Dichte von 20 000 Zellen (HGF-1) pro Well in einem Volumen von 200 µl DMEM mit Hilfe einer Multipipette auf einem mit einer 12-Well-Silikonkammer versehenen Objektträger ausgesät und inkubiert, bevor die Versuchsdurchführung am Folgetag begonnen wurde (Abb. 5).



Abbildung 5: Objektträger mit entfernbarer 12-Well-Silikonkammer nach Aussäen der HGF-1

Zur Stimulation der Zellen wurden die folgenden Lösungen hergestellt. Die ZnCl_2 -Stammlösung (150 mM) wurde in phenolfreiem DMEM zu einer 60 µM Lösung verdünnt. Die Stammlösung von Hinokitiol bzw. Pyrithion wurde in phenolfreiem DMEM zu einer 200 µM bzw. 20 µM Lösung verdünnt. Im Anschluss wurden durch 1:1 Verdünnung die finalen Lösungen hergestellt (Abb. 6).

Fluorophore: 3 µM FZ-3 + 50 nM LTDR			Fluorophore: 3 µM FZ-3 + 500 nM MTDR	
20 000 HGF-1	20 000 HGF-1	N.K.	20 000 HGF-1	20 000 HGF-1
30 µM Z	30 µM Z		30 µM Z	30 µM Z
-	-		-	-
20 000 HGF-1	20 000 HGF-1	N.K.	20 000 HGF-1	20 000 HGF-1
30 µM Z	30 µM Z		30 µM Z	30 µM Z
-	-		-	-
20 000 HGF-1	20 000 HGF-1	T.G.	20 000 HGF-1	20 000 HGF-1
30 µM Z	30 µM Z		30 µM Z	30 µM Z
100 µM H	100 µM H		100 µM H	100 µM H
20 000 HGF-1	20 000 HGF-1	T.G.	20 000 HGF-1	20 000 HGF-1
30 µM Z	30 µM Z		30 µM Z	30 µM Z
100 µM H	100 µM H		100 µM H	100 µM H
20 000 HGF-1	20 000 HGF-1	P.K.	20 000 HGF-1	20 000 HGF-1
30 µM Z	30 µM Z		30 µM Z	30 µM Z
10 µM P	10 µM P		10 µM P	10 µM P
20 000 HGF-1	20 000 HGF-1	P.K.	20 000 HGF-1	20 000 HGF-1
30 µM Z	30 µM Z		30 µM Z	30 µM Z
10 µM P	10 µM P		10 µM P	10 µM P

Abbildung 6: Layout der Objektträger zum qualitativen Ionophor-Nachweis

Davon wurden je nach Gruppenzuordnung 100 µl zu den Zellen gegeben und die Objektträger für 1 Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Es folgte die Färbung der HGF-1-Zellen mit den Fluorophoren. Die MTDR-Probe wurde in 91,98 µl DMSO als 1 mM Stammlösung gelöst, der LTDR lag bereits als 1 mM Lösung vor. Beide wurden in phenolfreiem DMEM auf das Vierfache der gewünschten Endkonzentration verdünnt und 1:1 mit einer FZ-3 Lösung (12 µM) versetzt. In jedes Well wurden 100 µl der Fluorophor-Lösungen gegeben und die Objektträger für 30 Minuten inkubiert.

Die Farbstoffe wurden mit einer Pipette entfernt und die Wells nachfolgend dreimal mit 200 µl frischem HBSS gewaschen. Die mit LTDR gefärbten Zellen wurden mit 100 µl Paraformaldehyd (PFA; 4 %) für 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) und die mit MTDR gefärbten Zellen mit 100 µl Methanol (MetOH; ≥99 %) für 15 Minuten bei -20 °C im Eisschrank fixiert.

Im Anschluss wurden die Fixierlösungen (PFA oder MetOH) unter dem Abzug abpipettiert und die Wells weitere dreimal mit 200 µl sterilem HBSS gewaschen. Die Kerne der Zellen wurden mit je 200 µl DAPI-Lösung nach zweifacher 1:100 Verdünnung in sterilem Wasser für 5 Minuten bei RT gefärbt. Danach wurden die Wells erneut dreimal mit je 200 µl sterilem HBSS gewaschen, bevor die Silikonkammern entfernt, das ProLong Antifade Gold Mounting Medium aufgetragen und ein Deckglas aufgelegt wurde. Das Mounting Medium härtete vor der Betrachtung der Objektträger unter dem LSM 510 für mindestens 24 Stunden aus.

3.2.5.4 Markierung des Golgi-Apparats

Auf einen mit einer 12-Well Silikon-Kammer behafteten Objektträger wurden mit Hilfe einer Multipipette je Well 20 000 HGF-1 in je 200 µl DMEM ausgesät. Am folgenden Tag wurde das alte Medium entfernt und zur Färbung des Golgi-Apparats der HGF-1 durch 100 µl phenolfreies DMEM und 5 µl BODIPY Lösung ersetzt. Die Objektträger wurden für 8 Stunden inkubiert, bevor sie vor dem Eindecken wie die mit FZ-3 und LTDR gefärbten Objektträger mit PFA fixiert und mit DAPI gefärbt wurden.

3.3 Statistik

Die Erfassung und Sortierung der Daten erfolgte in Microsoft Excel, die statistische Auswertung in IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

3.3.1 Zytotoxizitäts-Tests

Ausgewertet wurden die Ergebnisse von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Jede der Versuchsdurchführungen lieferte pro Gruppe vier Messwerte, was in einer Gesamtgruppengröße von $n=12$ resultierte. Die Normalverteilung (NV) der Daten wurde mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests ($p<0,05$) untersucht. Aufgrund der mehrheitlich normalverteilten Daten wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (Analysis of Variances, ANOVA) herangezogen, um die Unterschiede zwischen den Gruppen ($p<0,05$) zu analysieren. Für Mehrfachvergleiche zwischen den Untersuchungsgruppen wurde der Bonferroni-post-hoc-Test angewandt ($p<0,05$).

Entsprechend des ISO-Standards zur biologischen Beurteilung von Medizinprodukten (ISO 10993-5:2009), wurden ab einer Verminderung der Zellvitalität von ≥ 30 % toxische Effekte angenommen.

3.3.2 Quantitativer Ionophor-Nachweis

Die Messwerte von drei unabhängigen Versuchsreihen mit jeweils 4 Proben ergaben eine Gesamtgruppengröße von $n=12$. Die Werte aus den Untersuchungsgruppen wurden gegen den Mittelwert der Kontrollproben normalisiert. Die Normalverteilung der Daten innerhalb der Versuchsgruppen wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test geprüft. Die univariate Analyse der Daten erfolgte mit der ANOVA ergänzt durch Mehrfachvergleiche mit Hilfe des Bonferroni-post-hoc-Tests. Das Signifikanzniveau wurde mit $p<0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

Im Rahmen von Vorversuchen gelang es nicht, homogene Stammlösungen von Zinkchlorid und Hinokitiol in sterilem Wasser anzufertigen. Stets resultierte eine trübe Lösung oder eine teilweise Entmischung und Absetzen am Boden des Probengefäßes (Abb. 7).

Die Herstellung einer homogenen Lösung von 1 g ZnCl_2 in 29,35 ml sterilem Wasser gelang durch Auftitration mit 2 M Salzsäure (HCl), was zu einer pH-Wert Absenkung auf etwa 3 führte.

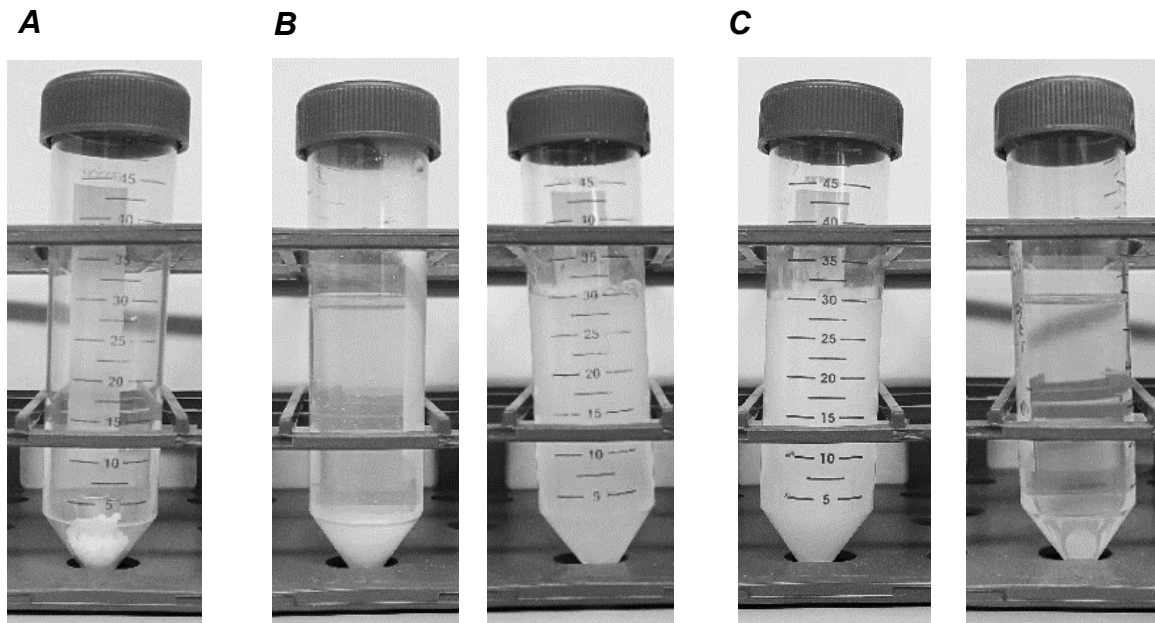


Abbildung 7: Dokumentation der Vorversuche zur Herstellung einer homogenen ZnCl_2 -Stammlösung von 1g ZnCl_2 in 29,35 ml Lösungsmittel (250 mM)

A: 1g ZnCl_2 in einem 50 ml Falcon;

B: links: trübe Lösung von 1g ZnCl_2 in 29,35 ml aqua ad iniectabilia bei Raumtemperatur; rechts: ZnCl_2 Bodensatz nach Shaken und Erwärmen der wässrigen Suspension auf 37 °C;

C: links: 1 g ZnCl_2 in 29,35 ml Ethanol (EtOH) bei Raumtemperatur; rechts: klare Lösung nach Erwärmen der Lösung auf 37 °C

4.1 Zytotoxizitäts-Tests

Die Untersuchungen zeigten, dass die fertig zubereitete Hinokitiol-haltige Mundspüllösung die Vitalität der HGF-1 nach einer Kontaktzeit von einer Stunde fast vollständig reduzierte (Abb. 8). Damit hatte sie ebenso starke zytotoxische Eigenschaften wie unverdünntes DMSO, welches zur Positivkontrolle eingesetzt wurde.

Der Vergleich der Gruppen N.K.-, welche ausschließlich DMEM enthielt, und N.K.+, welche zusätzlich mit 2,13 Vol.-% DMSO und 1,28 Vol.-% EtOH versetzt war, konnte zeigen, dass sich der Einsatz der Lösungsmittel für Hinokitiol und ZnCl_2 nicht signifikant auf die Zellvitalität auswirkte.

Durch Einwirkung von Hinokitiol kam es bei Konzentrationen zwischen 50 μM bis 800 μM zu einer konzentrationsabhängigen, nicht proportionalen, nicht signifikanten Reduktion der Vitalität. Der absteigende Trend wurde durch einen Anstieg der Vitalität bei Kontakt mit 3,2 mM Hinokitiol unterbrochen.

Die Behandlung der HGF-1 mit ZnCl_2 resultierte bei Vervielfachung der Konzentration in einer Reduktion der Viabilität um 20 %. Signifikant reduziert wurde die Vitalität durch 3,2 mM ZnCl_2 auf 56 % der Kontrollgruppe (N.K.+).

Bei einer kombinierten Behandlung der Zellen mit 50 μM Hinokitiol und 50 μM oder 3,2 mM ZnCl_2 beziehungsweise mit 3,2 mM Hinokitiol und 3,2 mM ZnCl_2 wurde eine signifikante Verringerung der Vitalität beobachtet, wohingegen sich diese durch 3,2 mM Hinokitiol und 50 μM ZnCl_2 nicht abzeichnete. Die Vitalität der Zellen blieb durch 50 μM Hinokitiol weitgehend unbeeinträchtigt, wobei jede zusätzliche Stimulation mit ZnCl_2 (50 μM oder 3,2 mM) in einer signifikanten Reduktion der Vitalität resultierte. Auch durch 3,2 mM Hinokitiol blieb die Zellvitalität nahe 100 % und durch weitere Zugabe von 50 μM ZnCl_2 ebenfalls unverändert. Erst die Kombination von 3,2 mM Hinokitiol mit 3,2 mM ZnCl_2 induzierte ein vollständiges Absterben der Zellen wie die Hinokitiol-haltige Mundspüllösung oder das unverdünnte DMSO.

Für die Gruppen 50 μM und 3,2mM Hinokitiol, 50 μM ZnCl_2 und 3,2 mM Hinokitiol mit 50 μM ZnCl_2 konnten sogar geringfügig höhere Vitalitätswerte als für die Referenzgruppe gemessen werden.

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung (Tab. 13), welche für die Hinokitiol-haltige Mundspüllösung, die Positivkontrolle (DMSO), 3,2 mM ZnCl_2 , 50 μM Hinokitiol mit 50 μM ZnCl_2 oder mit 3,2 mM ZnCl_2 und 3,2 mM Hinokitiol mit 3,2 mM ZnCl_2 eine signifikante Verringerung der Vitalität und damit toxische Effekte

Ergebnisse

beschrieb, deckte sich mit der Vorgabe der ISO-Norm, ab einer Beeinträchtigung auf unter 70 % von zytotoxischen Effekten der untersuchten Substanz auszugehen.

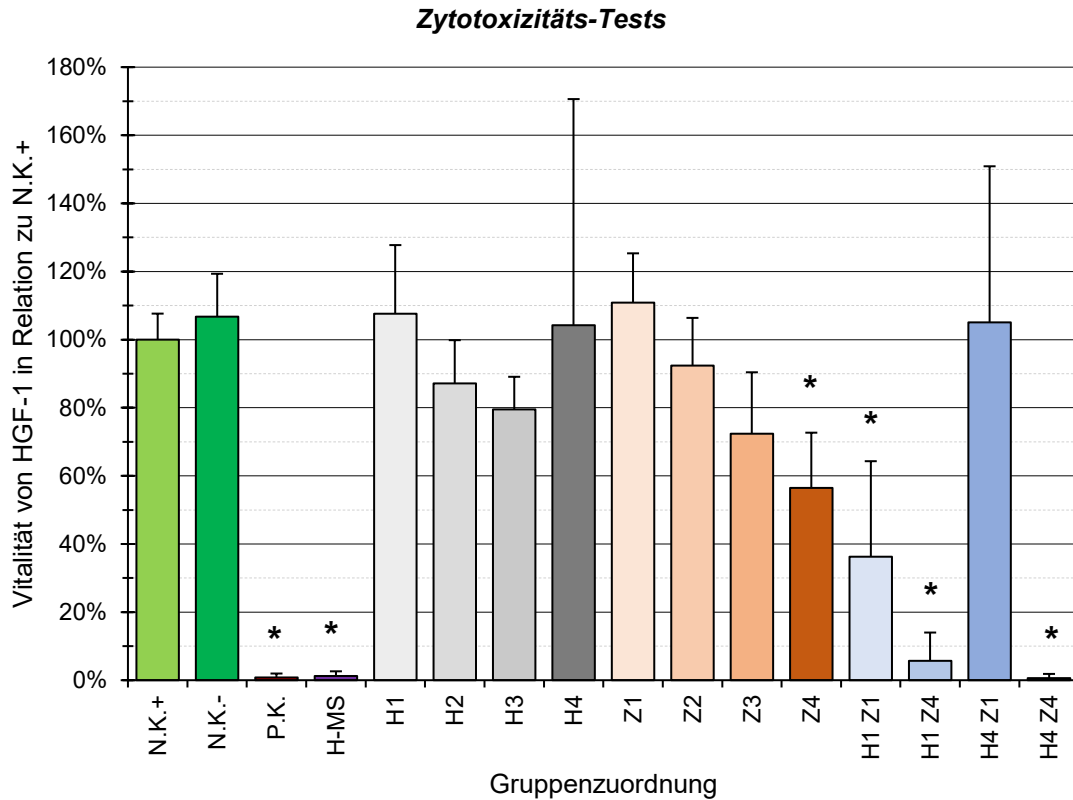


Abbildung 8: Analyse der Vitalität der HGF-1 mittels WST-1

Behandlung der HGF1 für die Dauer 1 Stunde mit unterschiedlichen Substanzen: Negativkontrollgruppe + (N.K.+; DMEM + 2,13 Vol.-% DMSO + 1,28 Vol.-% Ethanol), N.K.- (DMEM), Positivkontrollgruppe (P.K., DMSO), Hinokitiol-haltige Mundspüllösung (H-MS) und unterschiedliche Hinokitiol (H) und ZnCl₂ (Z) Konzentrationen (1 - 4=50 µM, 200 µM, 800 µM und 3,2 mM) und deren Kombinationen für die Dauer einer Stunde; Absorptionsmessung des WST-1 bei 450 nm; Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) in Relation zur N.K.+ , signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zu N.K.+ mit * markiert. DMSO, H-MS, 3,2 mM Z, 50 µM H + 50 µM Z, 50 µM H + 3,2 mM Z und 3,2 mM H + 3,2 mM Z reduzierten die Vitalität signifikant.

Tabelle 11: Statistische Auswertung der Vitalitätsbestimmung mittels WST-1
Deskriptive Statistik (M, MW und SD), p -Wert bei Anwendung des Shapiro-Wilk-Tests zur Untersuchung auf Normalverteilung ($p < 0,05$; mit * markiert; keine Normalverteilung gegeben in H4, H1 Z1, H1 Z4) und bei Anwendung von post hoc Bonferroni-Mehrfachvergleichen ($p < 0,05$; mit * markiert) nach ANOVA ($p < 0,05$; ANOVA signifikant mit $p < 0,01$).

Gruppe	M	MW	SD	Shapiro-Wilk-Test p-Wert	Bonferroni zu N.K. + p-Wert
N.K. +	1,01	1,00	0,076	0,089	
N.K. -	1,10	1,07	0,126	0,172	> 0,999
P.K.	0,01	0,01	0,012	0,075	< 0,001 *
H-MS	0,01	0,01	0,015	0,137	< 0,001 *
H1	1,10	1,08	0,202	0,549	> 0,999
H2	0,90	0,87	0,127	0,318	> 0,999
H3	0,79	0,80	0,096	0,494	> 0,999
H4	0,76	1,04	0,664	0,016 *	> 0,999
Z1	1,07	1,11	0,145	0,498	> 0,999
Z2	0,91	0,92	0,140	0,999	> 0,999
Z3	0,65	0,72	0,180	0,308	0,651
Z4	0,50	0,56	0,162	0,063	0,002 *
H1 Z1	0,45	0,36	0,281	0,011 *	< 0,001 *
H1 Z4	0,01	0,06	0,083	0,005 *	< 0,001 *
H4 Z1	0,89	1,05	0,458	0,067	> 0,999
H4 Z4	0,01	0,01	0,013	0,105	< 0,001 *

Phenolrot als Zusatz im Kulturmedium dient als pH-Indikator. Es zeigt eine Veränderung des Milieus ins Saure in orange bis gelb und ins Basische in pink bis violett an. Im Rahmen von Vorversuchen wurde bei der Zugabe der gleichen Menge der H-MS zu Phenol-haltigem DMEM ein Farbumschlag erkennbar. Infolgedessen wurde der pH-Wert der Lösung mit Indikatorpapier bestimmt und ergab einen Wert von etwa 4 (Abb. 9B).

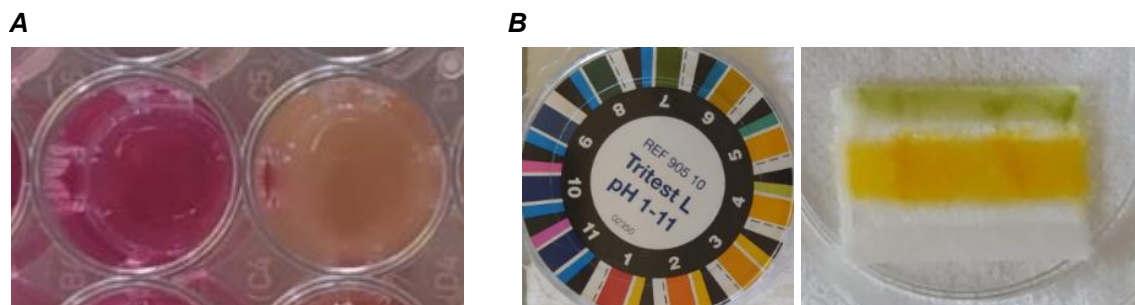


Abbildung 9: Untersuchungen zum pH-Wert der Hinokitiol-haltigen Mundspüllösung (H-MS)

A: links: 200 μ l DMEM, rechts: Farbumschlag bei Zugabe von 100 μ l H-MS zu 100 μ l DMEM;
B: pH-Wert Bestimmung der H-MS mit Indikatorpapier, Ergebnis: pH-Wert von etwa 4

4.2 Ionophor-Nachweis

4.2.1 Quantitativer Ionophor-Nachweis

Die Experimente belegten ionophore Eigenschaften von Hinokitiol für Zink (Abb. 10 und Tab. 12). Bei gleichbleibender Hinokitiol-Konzentration (100 μM) stieg mit der Erhöhung der ZnCl_2 -Konzentration auch das intrazellulär gemessene Zinklevel an. Die alleinige Zugabe von Hinokitiol zeigte hingegen keine signifikant vermehrte intrazelluläre Anreicherung von Zink, was darauf hindeutete, dass eine Voraussetzung für die ionophore Aktivität von Hinokitiol die separate Zugabe von ZnCl_2 war (Abb. 10A). Wurde hingegen die ZnCl_2 -Konzentration konstant gehalten (100 μM) und die Konzentration von Hinokitiol variiert (50 μM , 100 μM oder 200 μM), hatte dies keinen signifikant unterschiedlich starken Einfluss auf die Erhöhung der intrazellulären Zinklevel (Abb. 10C).

Das als Positivkontrolle eingesetzte Pyrithion entwickelte verglichen zur Negativkontrollgruppe unabhängig von der zugegebenen ZnCl_2 Konzentration (0 μM , 50 μM , 100 μM und 200 μM) signifikante ionophore Effekte.

Abbildung 10C und 10D zeigen darüber hinaus, dass Hinokitiol bei steigender ZnCl_2 -Konzentration eine Tendenz zur höheren Zinkaufnahme hatte als das zur Positivkontrolle eingesetzte Pyrithion.

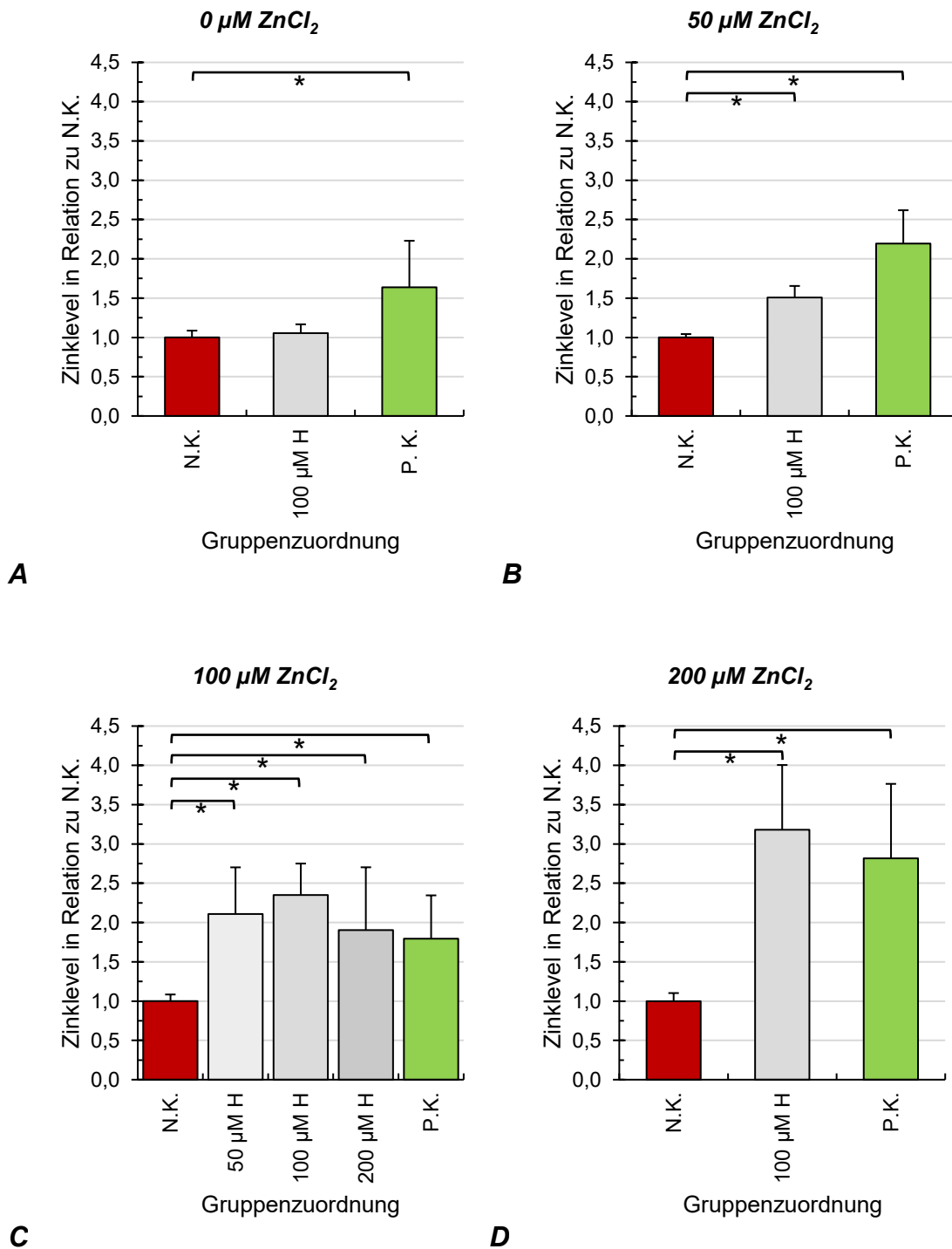


Abbildung 10: Quantitativer Ionophor-Nachweis mittels Fluoreszenzmessung
 Behandlung der HGF-1 mit ZnCl_2 (A: 0 μM , B: 50 μM , C: 100 μM und D: 200 μM), Gruppenzuordnung: Negativkontrollgruppe (N.K., ausschließlich ZnCl_2), Testgruppen zusätzlich mit Hinokitiol (H; 50 μM , 100 μM oder 200 μM) und Positivkontrollgruppe (P.K., zusätzlich mit 10 μM Pyrithion); Färbung mit FZ-3 für 30 Minuten; Messung: Exzitation mit 490 nm, Emission bei 516 nm; Darstellung von MW und SD aus drei unabhängigen Versuchsdurchführungen in Relation zur jeweiligen N.K., mit * markierte signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den gekennzeichneten Gruppen. Pyrithion zeigt eine gesteigerte Zinkaufnahme für alle untersuchten ZnCl_2 -Konzentrationen (A-D). Hinokitiol steigert die intrazelluläre Zink-Menge ab einer Behandlung von 50 μM ZnCl_2 signifikant (B-D); bei unveränderter ZnCl_2 -Konzentration (100 μM) zeigt eine Variation der H-Konzentration keinen zusätzlichen signifikanten Unterschied für die Zink-Aufnahme zwischen den Hinokitiol-Konzentrationen (C).

Tabelle 12: Statistische Auswertung der Fluoreszenzmessungen zum quantitativen Ionophornachweis.

Deskriptive Statistik (n, MW und SD) für die jeweilige untersuchte ZnCl_2 -Konzentration separat, p -Wert für Normalverteilung (NV) mittels Shapiro-Wilk-Test ($p < 0,05$; Normalverteilung in allen Gruppen gegeben) und post hoc durchgeführte Bonferroni-Mehrfachvergleiche ($p < 0,05$) nach ANOVA ($p < 0,05$; ANOVA signifikant auf $p < 0,01$), * markiert statistisch signifikante Ergebnisse. In der Gruppe 100 μM ZnCl_2 und 200 μM Hinokitiol wurden 4 Werte wegen starker Abweichung von MW und Median (M) nicht in die statistische Auswertung miteinbezogen, sodass sich für diese Gruppe $n=8$ ergab.

[ZnCl₂] in μM	Gruppe	n	MW	SD	Shapiro-Wilk- Test p-Wert	Bonferroni zur jeweiligen N.K. p-Wert	
0	N.K.	12	1,00	0,086	0,992		
	100 μM H	12	1,05	0,113	0,409	>0,999	
	P.K.	12	1,64	0,592	0,115	<0,001	*
50	N.K.	12	1,00	0,042	0,121		
	100 μM H	12	1,51	0,147	0,401	<0,001	*
	P.K.	12	2,19	0,424	0,484	<0,001	*
100	N.K.	12	1,00	0,084	0,971		
	50 μM H	12	2,11	0,594	0,979	<0,001	* zu 100 μM H $p > .999$
	100 μM H	12	2,35	0,401	0,081	<0,001	* zu 200 μM H $p = .634$
	200 μM H	8	1,90	0,800	0,420	0,003	* zu 50 μM H $p > .999$
	P.K.	12	1,79	0,552	0,273	0,004	*
200	N.K.	12	1,00	0,102	0,446		
	100 μM H	12	3,18	0,824	0,481	<0,001	*
	P.K.	12	2,82	0,948	0,110	<0,001	*

4.2.2 Qualitativer Ionophor-Nachweis

4.2.2.1 FluoZin-3 mit LysoTracker DeepRed

In allen Aufnahmen (Abb. 11-13) fand sich jeweils ein ungefärbter rundlich ovaler Bereich, der mit Hilfe von DAPI über die Fluoreszenzmikroskopie als Zellkern identifiziert wurde (nicht gezeigt).

Die Lysosomen wurden mit dem LTDR als homogen über das Zytosol verteilte kleine rundliche Organellen markiert (Abb. 11 - 13, *LTDR, rot*).

Das FZ-3 stellte das Zink in der N.K. als homogenen, grünlichen Schatten dar, der gleichmäßig über das Zytosol verteilt war (Abb. 11, *FZ-3*). Neben dem homogenen grünlichen Schatten des FZ-3, fand sich im Zytosol der zusätzlich mit 100 μ M Hinokitiol oder 10 μ M Pyrithion behandelten HGF-1, zusätzlich eine deutlich größere runde Formation (Abb. 12 und Abb. 13, *FZ-3*).

Die Überlagerung (gelb) deutete in allen der Gruppen eine geringfügige Kolokalisation des Zinks mit den Lysosomen an (Abb. 11 - 13, *Überlagerung*). Das grüne, rundliche Zink Signal der T.G. und P.K. zeigte sich hingegen insbesondere bei der Überlagerung, sodass speziell für diesen Bereich keine Kolokalisation mit den Lysosomen angenommen werden konnte (Abb. 12 und 13, *Überlagerung*).

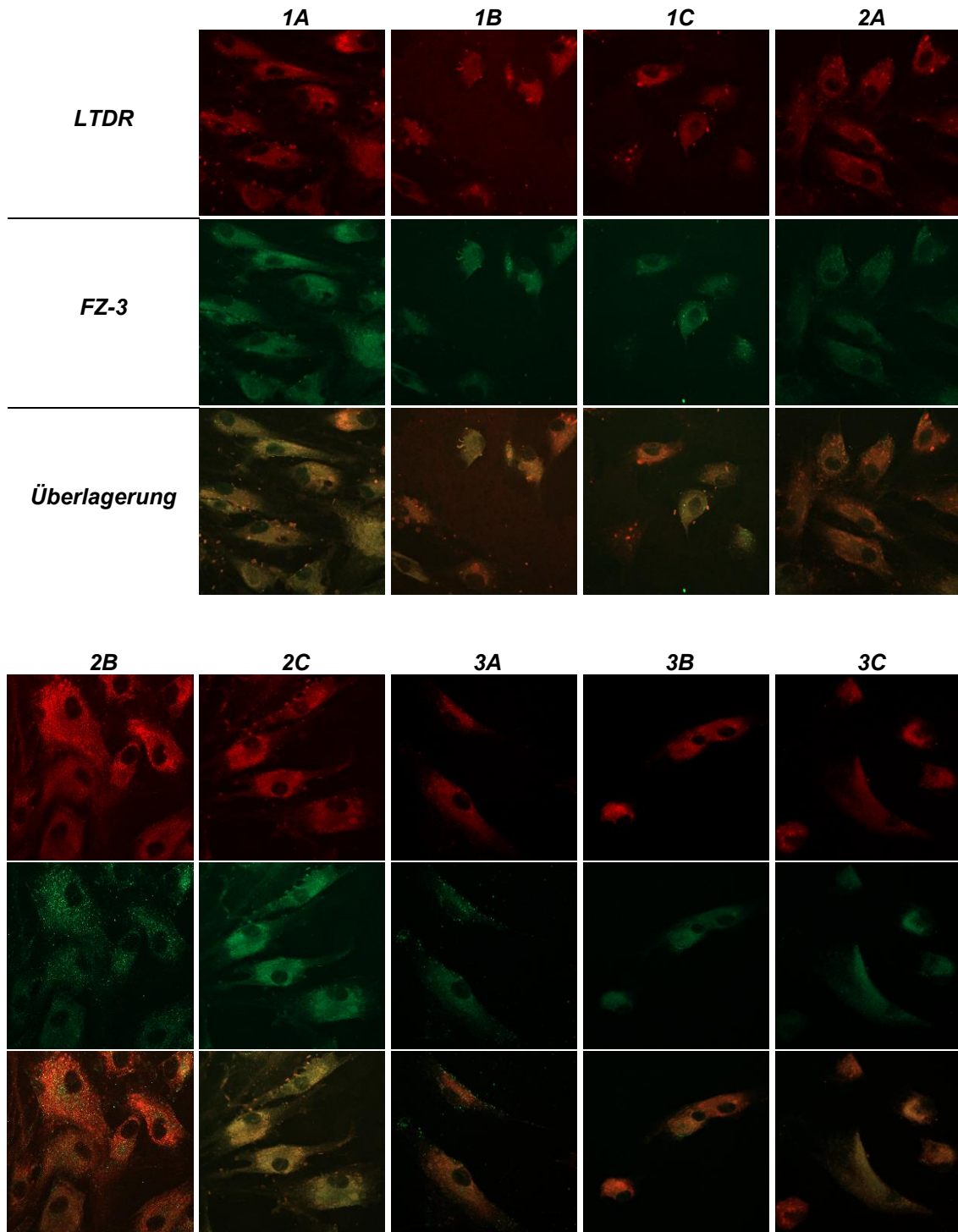


Abbildung 11: Darstellung von Lysosomen und Zink der HGF-1 der Negativkontrollgruppe mittels Laser Scanning Mikroskopie (Objektiv 63x/1.4 Oil) Drei repräsentative Aufnahmen (A-C) aus drei unabhängigen Versuchswiederholungen (1-3); Behandlung: 30 μM ZnCl_2 für eine Stunde; Färbung: 50 nM LysoTracker DeepRed (LTDR, rot) und 3 μM FluoZin-3 (FZ-3, grün) für 30 Minuten; Fixierung: Paraformaldehyd (4 %) für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Überlagerung (gelb) zeigt kolokalisierende Areale. Intrazelluläres Zink und die Lysosomen zeigen ein homogen über das Zytosol verteiltes Bild in Form feiner Pünktchen mit Aussparung um den ovalen, nicht gefärbten Zellkern.

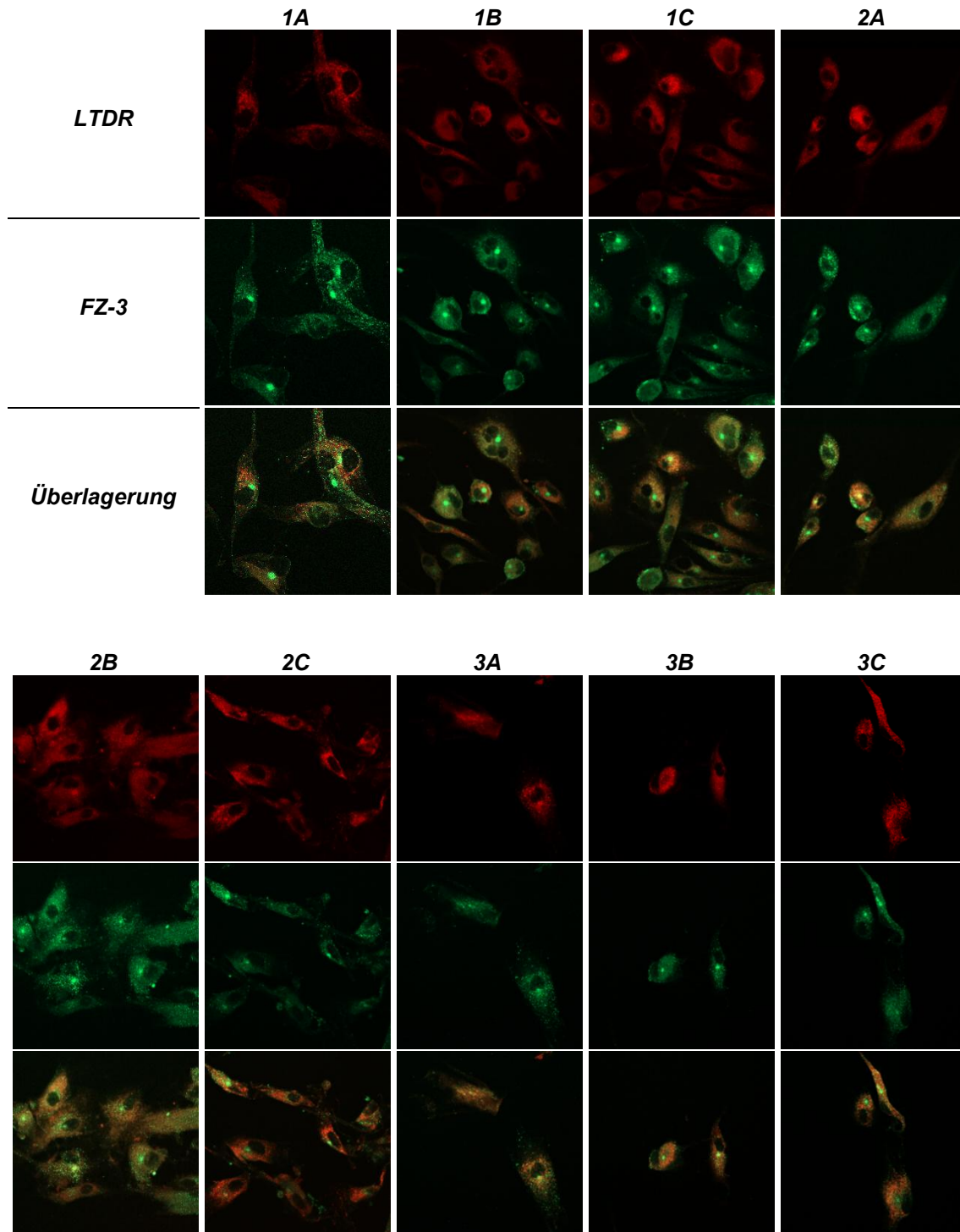


Abbildung 12: Darstellung von Lysosomen und Zink der HGF-1 der Testgruppe mittels Laser Scanning Mikroskopie (Objektiv 63x/1.4 Oil)

Drei repräsentative Aufnahmen (A-C) aus drei unabhängigen Versuchswiederholungen (1-3); Behandlung: 30 μM ZnCl_2 + 100 μM Hinokitiol für eine Stunde; Färbung: 50 nM LysoTracker DeepRed (LTDR) und 3 μM FluoZin-3 (FZ-3) für 30 Minuten; Fixierung: PFA (4 %) 20 Minuten bei Raumtemperatur. Die Lysosomen zeigen sich als feine Pünktchen im Zytoplasma mit Aussparung um den ovalen ungefärbten Zellkern. Das intrazelluläre Zink zeigt einen homogen über das Zytoplasma verteilten Schatten und ein hervorstechendes größeres rundes Konglomerat in der Nähe des Zellkerns, welches bei der Überlagerung keine Überschneidung mit den Lysosomen zeigt

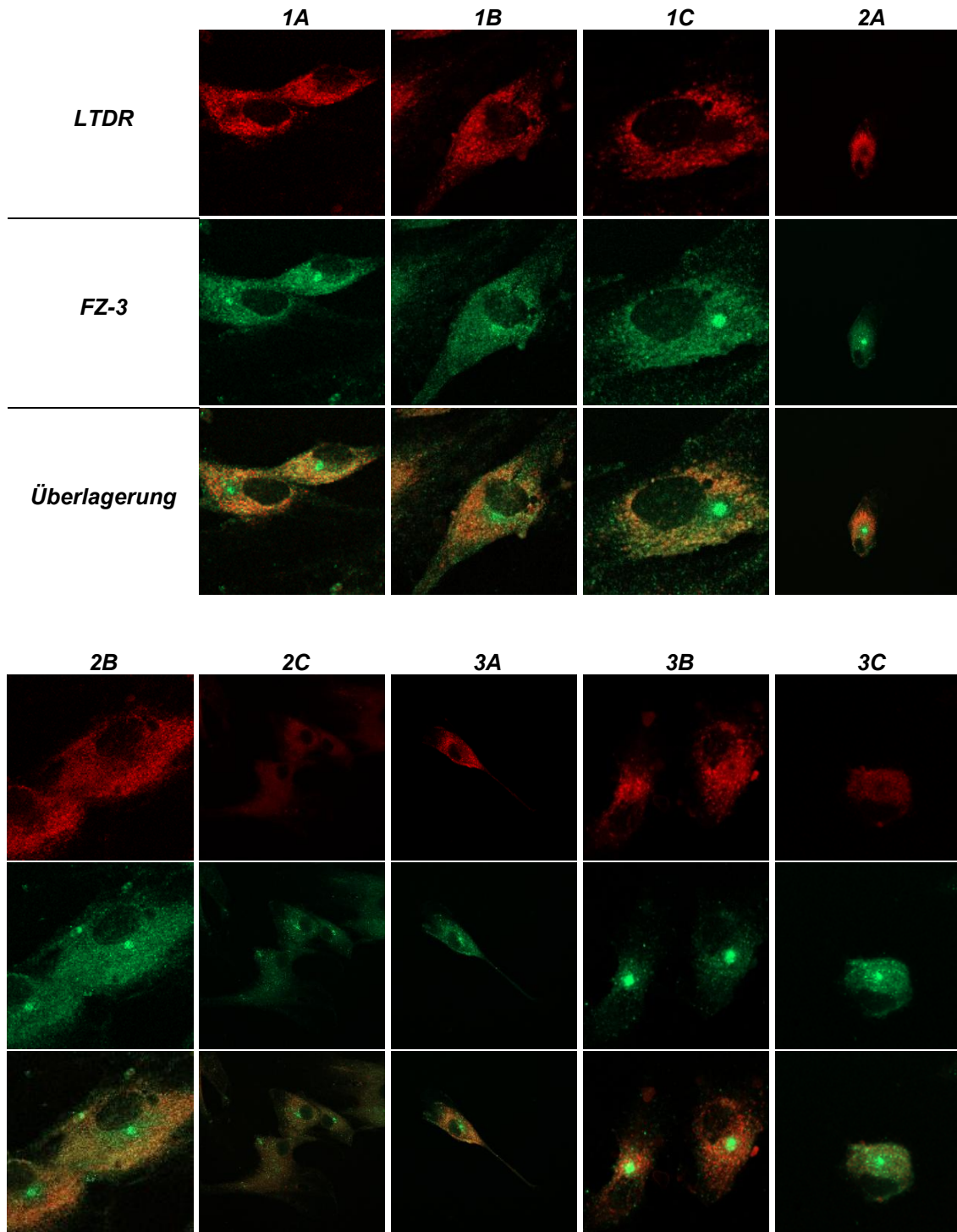


Abbildung 13: Darstellung von Lysosomen und Zink der HGF-1 der Positivkontrollgruppe mittels Laser Scanning Mikroskopie (Objektiv 63x/1.4 Oil). Drei repräsentative Aufnahmen (A-C) aus drei unabhängigen Versuchswiederholungen (1-3); Behandlung: 30 μM ZnCl_2 + 10 μM Pyrithion für eine Stunde; Färbung: 50 nM LysoTracker DeepRed (LTDR) und 3 μM FluoZin-3 (FZ-3) für 30 Minuten; Fixierung: PFA (4 %) für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Die Lysosomen zeigen sich als feine Pünktchen im Zytoplasma mit Aussparung um den ovalen ungefärbten Zellkern. Das intrazelluläre Zink zeigt einen homogen über das Zytoplasma verteilten Schatten und wie auch in der Testgruppe ein hervorstechendes größeres rundes Konglomerat in der Nähe des Zellkerns, welches bei der Überlagerung keine Überschneidung mit den Lysosomen zeigt.

4.2.2.2 FluoZin-3 mit MitoTracker DeepRed

Abbildung 14 zeigt repräsentative Darstellungen von Proben jeder Gruppe (N.K., T.G. und P.K.) aus drei voneinander unabhängigen Versuchswiederholungen (1 – 3), welche zeitgleich mit den Experimenten mit dem LTDR durchgeführt wurden. Das intrazelluläre Zink verursachte in den drei unterschiedlichen Gruppen ein homogenes, aber schwaches Signal ohne wesentliche Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 14, FZ-3). Anders als in den Experimenten mit dem LTDR hob sich verglichen zur N.K. weder die T.G. noch die P.K. durch ein deutliches Zinksignal hervor.

Es fand sich bei der Überlagerung keine relevante Kolo-kalisation einer intrazellulären Zink-Ansammlung mit den Mitochondrien.

Ersichtlich waren jedoch erhebliche Unterschiede der Mitochondrien-Morphologie zwischen den unterschiedlich stimulierten Gruppen. So verfügten die HGF-1, die ausschließlich mit ZnCl_2 versetzt waren, über ein im Zytosol fein verästeltes Netz aus Mitochondrien, das den ungefärbten Bereich des Zellkerns aussparte (Abb. 15). Die zusätzlich mit Hinokitiol oder Pyrithion versetzten Zellen der T.G. und P.K. hingegen zeigten lediglich punktartige, vielfach durchbrochene mitochondriale Strukturen (Abb. 16 und 17).

Abbildung 18 zeigt verschiedene Aufnahmen von unbehandelten Zellen, welche ausschließlich mit MTDR gefärbt und mit unterschiedlichen PFA-Konzentrationen für verschiedene Einwirkzeiten fixiert wurden. Diese Aufnahmen wiesen unabhängig von Konzentration und Dauer der PFA-Fixierung eine deutlich schlechtere Qualität auf verglichen zu den Abbildungen 15 -17, welche den MTDR nach EtOH-Fixierung zeigen.

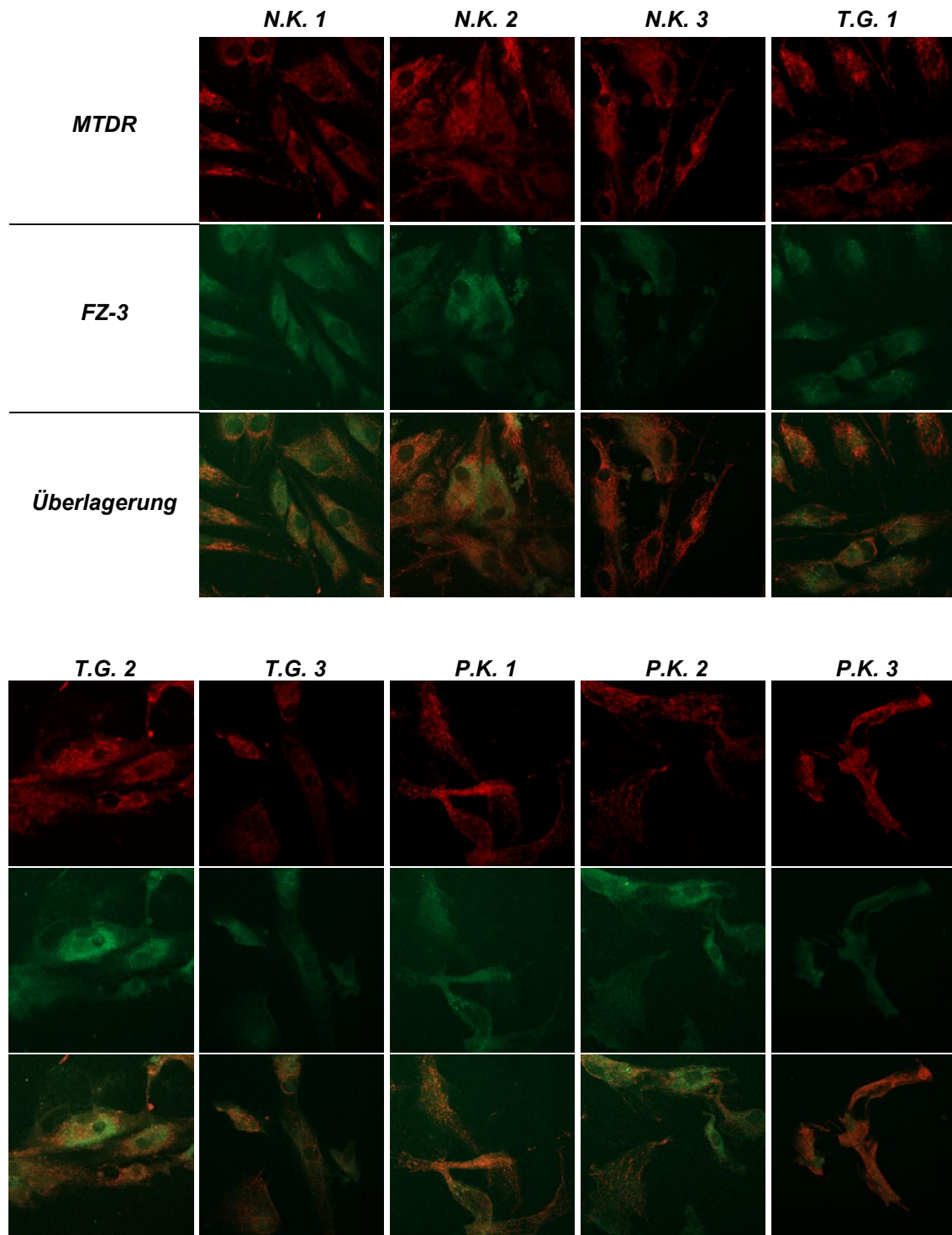


Abbildung 14: Darstellung von Mitochondrien und Zink der HGF-1 mittels Laser Scanning Mikroskopie (Objektiv 63x/1.4 Oil)

Ein repräsentatives Bild je Gruppe (Negativkontrollgruppe (N.K.), Testgruppe (T.G.) und Positivkontrollgruppe (P.K.)) aus drei unabhängigen Versuchswiederholungen (1-3). Behandlung: N.K. (30 μ M ZnCl₂), T.G. (30 μ M ZnCl₂ + 100 μ M Hinokitiol) und P.K. (30 μ M ZnCl₂ + 10 μ M Pyrithion) für eine Stunde, Färbung: 500 nM MitoTracker DeepRed (MTDR) und 3 μ M FluoZin-3 (FZ-3) für 30 Minuten; Fixierung: MetOH (≥ 99 %) für 15 Minuten bei -20 °C. Kein erkennbarer Unterschied zwischen N.K., T.G. und P.K. als Hinweis auf verminderte Kompatibilität von FZ-3 und MetOH.

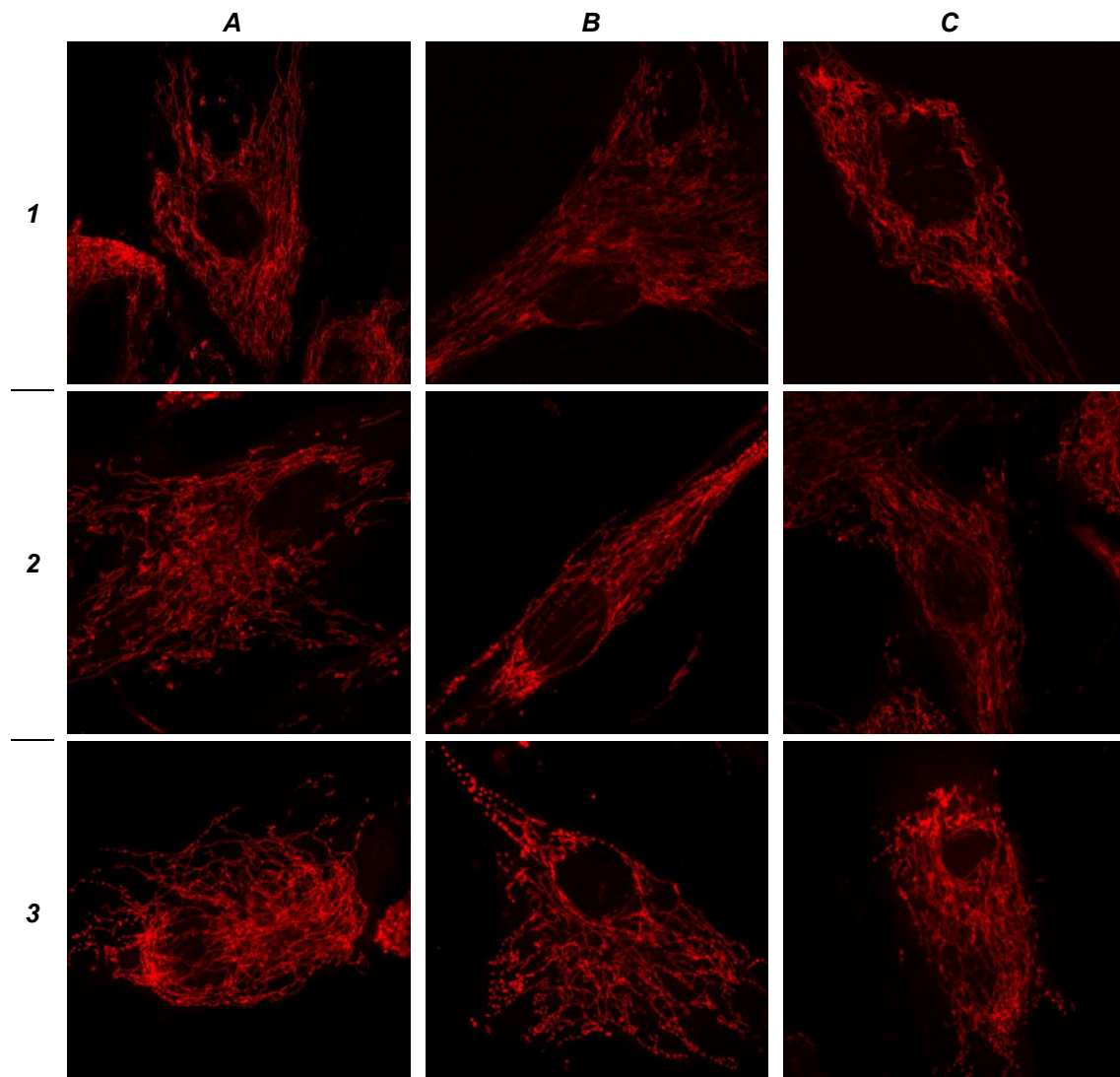


Abbildung 15: Darstellung der netzwerkartig verästelten Mitochondrien-Morphologie in der Negativkontrollgruppe mittels Laser Scanning Mikroskopie
Drei repräsentative Aufnahmen (A-C) des MitoTracker DeepRed (MTDR) aus drei unabhängigen Versuchswiederholungen; Behandlung: 30 μM ZnCl_2 für eine Stunde; Färbung: 500 nM MTDR und 3 μM FluoZin-3 (FZ-3; nicht gezeigt) für 30 Minuten; Fixierung: MetOH ($\geq 99\%$) für 15 Minuten bei -20°C ; Objektiv 63x/1.4 Oil.

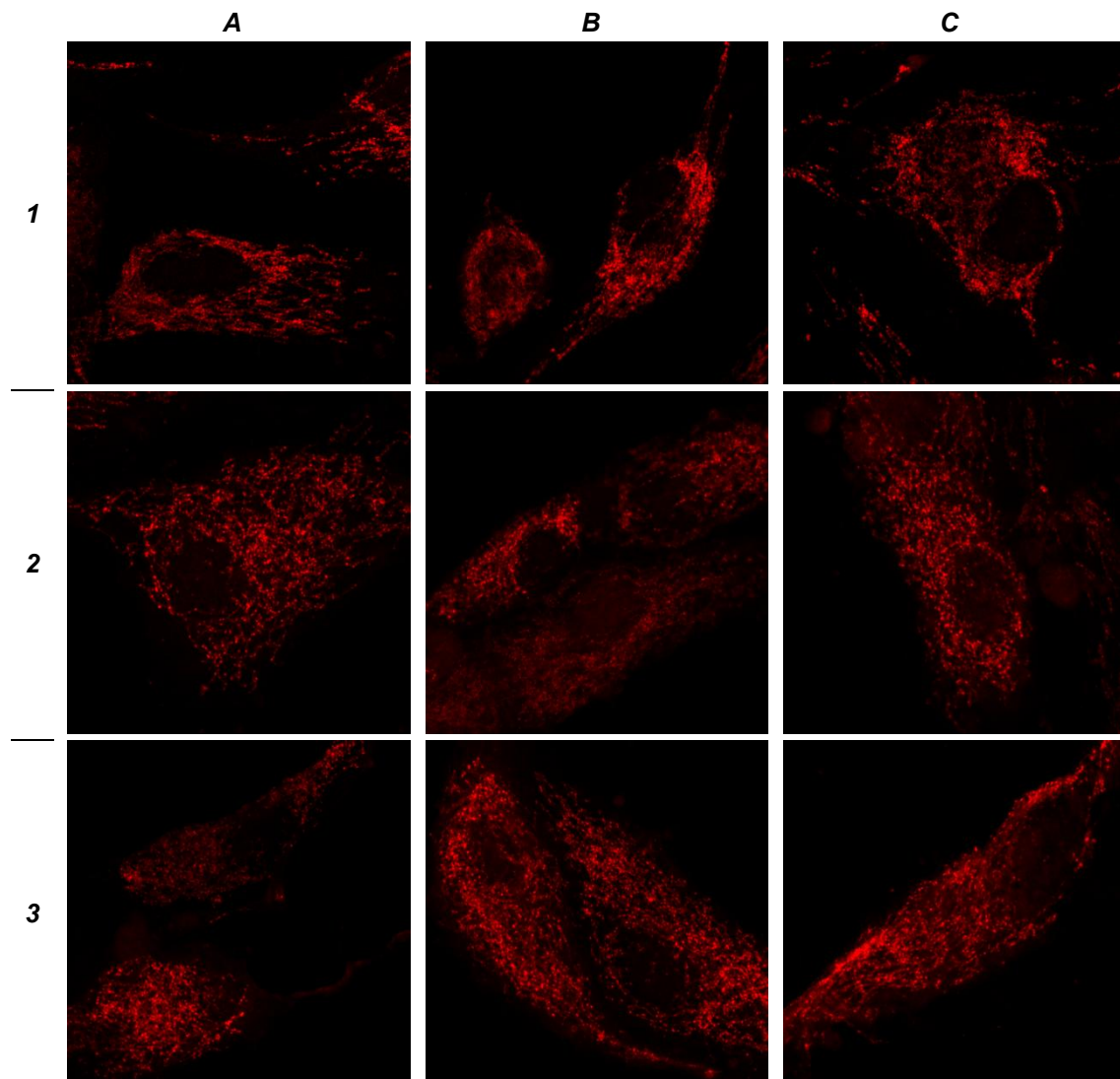


Abbildung 16: Darstellung der punktierten Mitochondrien-Morphologie der HGF-1 in der Testgruppe mittels Laser Scanning Mikroskopie

Drei repräsentative Aufnahmen (A-C) des MitoTracker DeepRed (MTDR) aus drei unabhängigen Versuchswiederholungen; Behandlung: 30 μM ZnCl_2 + 100 μM Hinokitiol für eine Stunde; Färbung: 500 nM MTDR und 3 μM FluoZin-3 (FZ-3; nicht gezeigt) für 30 Minuten; Fixierung: MetOH ($\geq 99\%$) für 15 Minuten bei -20°C ; Objektiv 63x/1.4 Oil.

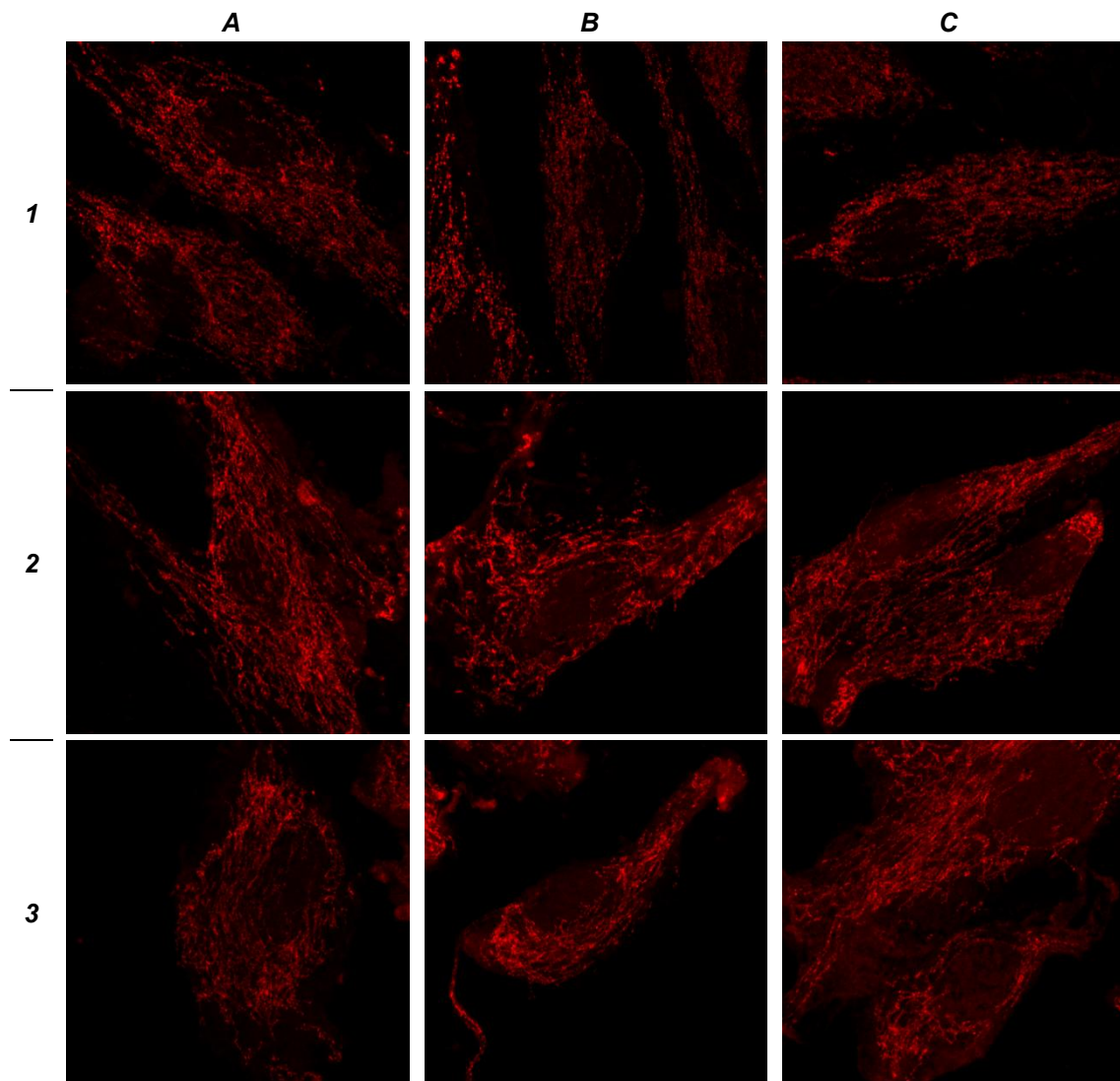


Abbildung 17: Darstellung der punktierten Mitochondrien-Morphologie der HGF-1 in der Positivkontrollgruppe mittels Laser Scanning Mikroskopie
Drei repräsentative Aufnahmen (A-C) des MitoTracker DeepRed (MTDR) aus drei unabhängigen Versuchswiederholungen. Behandlung: 30 μM ZnCl_2 + 10 μM Pyrithion für eine Stunde; Färbung: 500 nM MTDR und 3 μM FluoZin-3 (FZ-3; nicht gezeigt) für 30 Minuten; Fixierung: MetOH ($\geq 99\%$) für 15 Minuten bei -20°C ; Objektiv 63x/1.4 Oil.

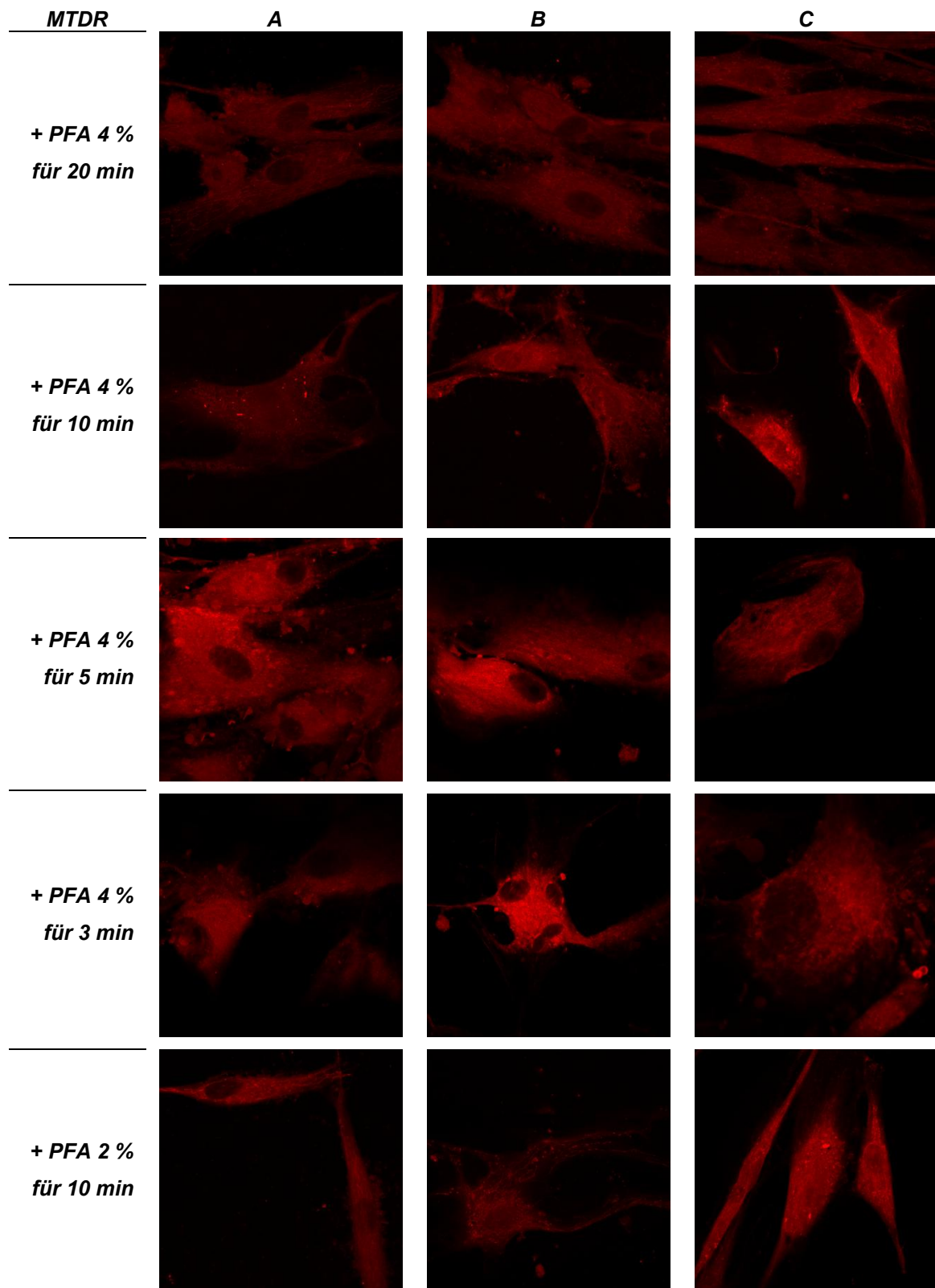


Abbildung 18: Darstellung des MitoTracker DeepRed (MTDR) nach PFA-Fixierung mittels Laser Scanning Mikroskopie

Behandlung von HGF-1 mit 500 nM MTDR für 30 Minuten; PFA-Fixierung mit unterschiedlichen Konzentrationen Einwirkzeiten; je drei repräsentative Aufnahmen (A-C), Darstellung mit dem LSM510 (Objektiv 63x/1.4 Oil). Unabhängig von Einwirkdauer und Konzentration des PFA zeigt sich ein diffuses unscharfes Bild des MTDR, was den Aufnahmen nach MetOH Fixierung (15 Minuten bei – 20 °C) unterlegen ist.

4.2.2.3 BODIPY TR Ceramide

Der BODIPY zeigte in Rot den Golgi-Apparat der HGF-1, welcher mehrheitlich nahe dem Zellkern lokalisiert war (Abb. 19). Das Signal ähnelte in Form, Größe und Lokalisation dem FZ-3 Signal der T.G. und P.K. aus den Experimenten mit dem LTDR (Abb. 12 und 13 FZ-3).

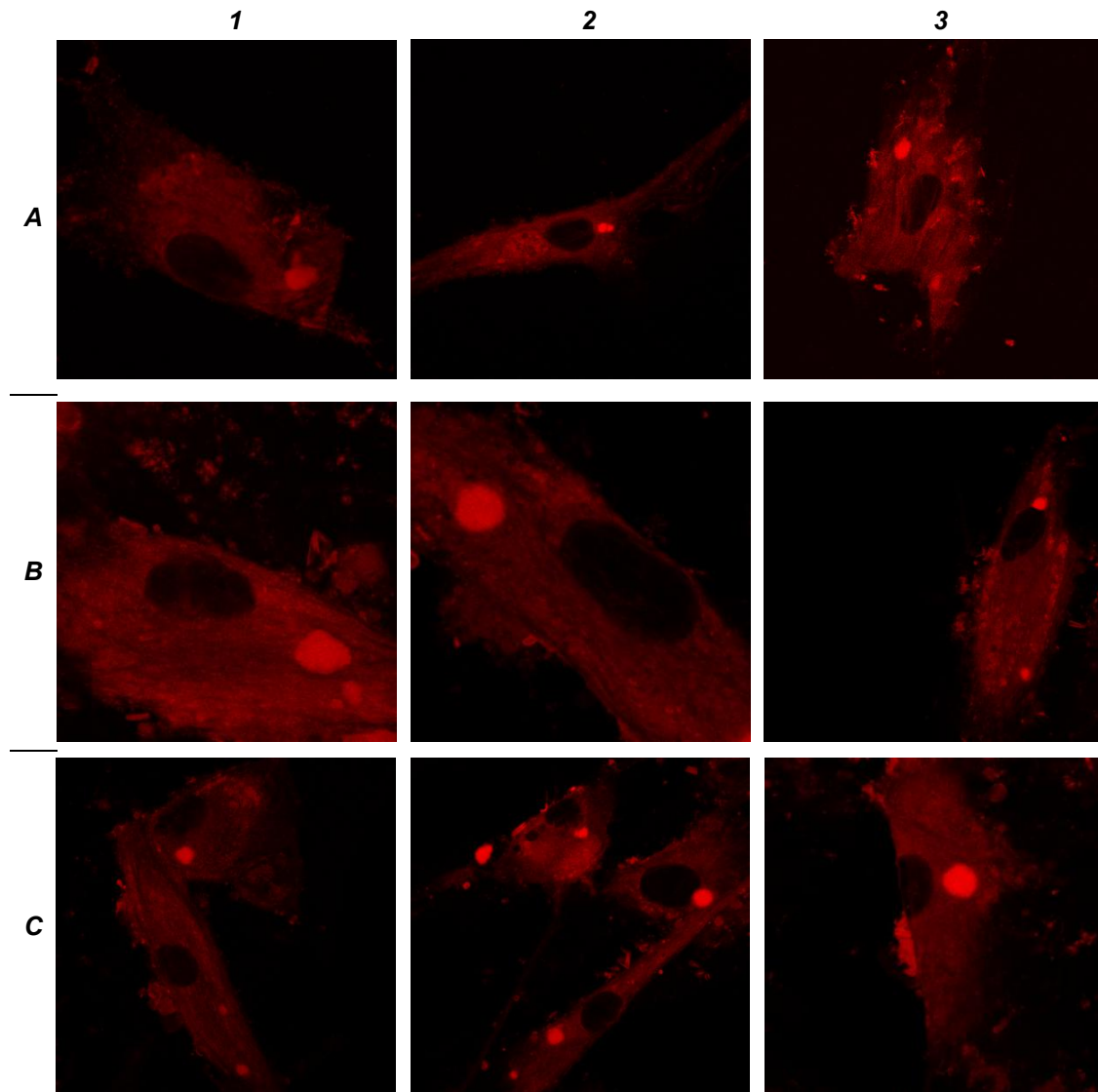


Abbildung 19: Darstellung des Golgi-Apparats der HGF-1 mittels Laser Scanning Mikroskopie

Färbung: BODIPY TR Ceramide für 8 Stunden; Fixierung: PFA (4 %) für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Der Golgi-Apparat zeigt sich als rundes hervortretendes Signal in der Nähe des Zellkerns.

5. Diskussion

Im Rahmen der Versuchsvorbereitungen fiel auf, dass in der Literatur vielfältige Angaben für geeignete Lösungsmittel zur Herstellung von Lösungen von Hinokitiol und ZnCl_2 gemacht werden. Diese Angaben sind exemplarisch in Tabelle 13 und 14 dargestellt. Da die Herstellung einer homogenen Hinokitiol- oder ZnCl_2 -Stammlösung in Wasser unter den vorherrschenden Laborbedingungen nicht möglich war, kam DMSO für Hinokitiol bzw. EtOH für ZnCl_2 zum Einsatz. Die Stammlösungen wurden möglichst hoch konzentriert, um in den Untersuchungslösungen eine starke Verdünnung der Lösungsmittel zu erhalten. Darüber hinaus wurde das Versuchsdesign durch Einbeziehung entsprechender zusätzlicher Kontrollgruppen so angepasst, dass ein potenzieller Einfluss auf die Ergebnisse Berücksichtigung fand.

Tabelle 13: Lösungsmittel für Hinokitiol

Lösungsmittel für Hinokitiol	Molarität	Quelle
Wasser	7,31 mM	(Lin et al. 2019, the Human Metabolome Database 2023)
	150 mM	(AG Scientific 2023)
DMSO	Keine Angabe.	(Kim et al. 2017, Krenn et al. 2009, Li et al. 2014)
	25 mM	(Huang et al. 2016)
	40 mM	(Miyamoto et al. 1998)
	100 mM	(Abcam 2023, Shih et al. 2013)
	152,3 mM	(Inamori et al. 1993, Santa Cruz Biotechnology 2023)
EtOH	Keine Angabe.	(Arima et al. 2003, Tao et al. 2022)
	100 mM	(Abcam 2023)
	305 mM	(Coombs und Trust 1973)

Tabelle 14: Lösungsmittel für ZnCl_2

Lösungsmittel für ZnCl_2	Molarität	Quelle
EtOH 50 % /	1 M	(Dabbagh-Bazarbachi et al. 2014)
PBS 50 %		
Wasser	6,24 M	(GESTIS-Stoffdatenbank 2023)
Keine Angabe.	Keine Angabe	(Ding et al. 2005, Krenn et al. 2009, Pan et al. 2017, Yu et al. 2009)

5.1 Zytotoxizitäts-Tests

5.1.1 Diskussion des experimentellen Aufbaus

Zur Erarbeitung der Methodik wurde der Internationale Standard zur biologischen Beurteilung von Medizinprodukten (ISO 10993-5:2009) herangezogen und modifiziert (ISO 2009). Die Einwirkdauer wurde im Vergleich zum ISO-Standard, der 24 Stunden dafür vorsieht, auf eine Stunde reduziert. Dieses Vorgehen wurde gewählt, da im Rahmen von Vorversuchen zu diesem Zeitpunkt bereits Veränderungen der Zellvitalität zu erkennen waren und die Verweildauer einer Spüllösung über 24 Stunden in der Mundhöhle ohne jegliche Verdünnung nicht der klinischen Realität entspricht. Beispielsweise ist die Substantivität von Chlorhexidin, welches als zweifach positiv geladenes Molekül elektrochemisch mit den negativ geladenen Ionen der Zahnoberfläche interagiert, mit 12 Stunden als eine der höchsten anzunehmen (Jones 1997). Ziel war neben einer praxisnahen Gestaltung der Experimente, entsprechend der Herstellerempfehlung, die eine Applikation der Hinokitiol-haltigen Mundspüllösung alle 2 Stunden vorsieht, die Vereinheitlichung der Methoden zur Untersuchung der Zytotoxizität und des ionophoren Verhaltens.

Die für die Untersuchungen gewählten HGF-1 haben als primäre Zelllinie zwar eine limitierte Lebensdauer, eignen sich jedoch besonders, da ihre physiologischen Eigenschaften *in vitro* denen *in vivo* nahekommen. Die zu untersuchenden Substanzen, wurden entgegen der Empfehlung der ISO-Norm nicht vorab sterilisiert, um eine Veränderung der Substanzen und ihrer Eigenschaften durch einen Erhitzungs- oder Filtrationsprozess auszuschließen. Auch vergleichbare Studien verzichteten auf ein solches Vorgehen (Domon et al. 2019, Emri et al. 2015, Pan et al. 2017, Salesa et al. 2021, Shih et al. 2013, Ye et al. 2015).

Zur Analyse der Experimente wurde das WST-1 Assay verwendet, da es sensitiv Unterschiede in der Zellvitalität detektiert und somit eines der standardmäßig eingesetzten Assays zur Bestimmung der Vitalität ist (Cook und Mitchell 1989). In weiteren experimentellen *in vitro* Studien könnte die Methodik auf Basis der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dahingehend erweitert werden, dass zusätzliche Einwirkzeiten untersucht werden, um darzustellen, in welchem zeitlichen Verlauf zytotoxische Effekte auftreten.

5.1.2 Interpretation der Ergebnisse

Die Untersuchungen sollten zeigen, ob eine gebrauchsfertige Hinokitiol-haltige Mundspüllösung zytotoxische Effekte auf die Vitalität von humanen gingivalen Fibroblasten (HGF) hat. Neben der gebrauchsfertigen Mundspüllösung wurde der enthaltene Wirkkomplex aus Hinokitiol und Zink isoliert untersucht.

Der Kontakt der Hinokitiol-haltigen Mundspüllösung mit den untersuchten Zellen bewirkte ein vollständiges Absterben der HGF-1, in dem Maße wie es durch unverdünntes DMSO im Sinne der Positivkontrolle bewirkt wurde. Demgegenüber waren die einzelnen aktiven Inhaltsstoffe Hinokitiol und Zink für die Zellen verträglicher. Während es zwar durch Hinokitiol konzentrationsabhängig zwischen 50 μM bis 800 μM zu einer konstant abnehmenden Tendenz der Zellvitalität kam, fiel diese nicht signifikant zytotoxisch aus. ZnCl_2 zeigte zwischen 50 μM bis 800 μM ebenfalls konzentrationsabhängig keine signifikante Beeinträchtigung der Vitalität, wobei 3,2 mM ZnCl_2 signifikant zytotoxische Effekte hatte. Die Gruppen 50 μM und 3,2 mM Hinokitiol, 50 μM ZnCl_2 und 3,2 mM Hinokitiol mit 50 μM ZnCl_2 könnten sogar Hinweise auf einen geringfügig positiven Einfluss auf die Vitalität der Zellen zeigen.

Hervorzuheben sind auch die hohen Vitalitätswerte der Zellen, die mit 3,2 mM Hinokitiol behandelt wurden, zumal die Werte für die darunterliegenden Konzentrationen (50 μM bis 800 μM Hinokitiol) einem abfallenden Trend folgten. Dabei wurde durch Zugabe von 50 μM ZnCl_2 das Niveau der Vitalität bei der höchsten untersuchten Hinokitiol Konzentration nicht beeinträchtigt. Dieses Phänomen erinnert an den für Hinokitiol an Prokaryoten beschriebenen Eagle Effekt (1948) im Sinne eines paradoxen Hemmeffektes. Allerdings weisen die betreffenden Gruppen eine hohe Standardabweichung auf, sodass keine Rückschlüsse auf die Ursache getroffen werden sollten. Somit wäre es zur weiteren Klärung dieser Beobachtung sinnvoll, weitere Studien mit ähnlichem Untersuchungsaufbau und höheren Konzentrationen der Wirkstoffe anzusetzen. Als Referenzwert zur Einordnung aller Gruppen wurde das zur Negativkontrolle eingesetzte DMEM-Kulturmedium, das mit 1,28 Vol.-% EtOH und 2,13 Vol.-% DMSO angereichert war, festgelegt. Prinzipiell können sowohl DMSO als auch EtOH zytotoxische Effekte haben. Während 0,01 – 0,001 % DMSO sogar einen positiven Effekt auf Fibroblasten Kulturen zeigten, führten höhere Konzentrationen zur dosisabhängigen Vitalitätsreduktion bis hin zum

vollständigen Absterben von Zellen bei >3 % DMSO (Crawford und Braunwald 1991, Singh 2017). In geringen Konzentrationen rief Ethanol reversible morphologische Veränderungen von Mitochondrien hervor, schädigte Zellen jedoch erst ab 22 % irreversibel (Kar et al. 2021, Wyganowska-Swiatkowska et al. 2018). Anhand des Vergleichs des Referenzwerts mit der Gruppe, welche ausschließlich mit DMEM behandelt wurde, konnte gezeigt werden, dass die benötigten Lösungsmittel in den genannten geringen Konzentrationen einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Vitalität der Zellen hatten.

Die untersuchte Hinokitiol-haltige Mundspüllösung enthielt neben Hinokitiol und ZnCl_2 eine Reihe von weiteren Wirkstoffen und Substanzen (Tab. 7), die zellschädigend wirken können, darunter auch das nachgewiesene zytotoxische Antiseptikum Hexetidin (Rueda-Fernandez et al. 2022). Wie im Methodenteil beschrieben lag der pH-Wert der untersuchten Hinokitiol-haltigen Mundspüllösung im Bereich von etwa 4 (Abb. 9B). Da die in-vitro Kultivierung von HGF-1 üblicherweise bei einem konstanten pH-Wert von 7,0 bis 7,4 (pH-Wert von DMEM) erfolgt, wäre allein durch die enthaltene Zitronensäure und den niedrigen pH-Wert eine Beeinträchtigung der Zellvitalität möglich (Chan et al. 1999, Giardino et al. 2022, Lan et al. 1999, Marins et al. 2012). Interessanterweise weisen laut Herstellerangaben auch Chlorhexidingluconat-Präparate einen sauren pH-Wert im Bereich zwischen 5,1 - 5,3 auf, ähnlich wie die untersuchte Hinokitiol-haltige Mundspüllösung.

In der Literatur findet sich bislang keine Studie, die den Einfluss von ZnCl_2 und oder Hinokitiol bei einer Einwirkdauer von einer Stunde auf HGF-1 untersuchte. Für andere Zellmodelle und Kontaktzeiten finden sich uneinheitliche Beschreibungen der Zytotoxizität von Hinokitiol und oder Zink, wobei sich zytotoxische Effekte jedoch in aller Regel bereits kurz nach dem Kontakt mit den untersuchten Substanzen etablieren. Offenbar wird dabei das Wachstum epithelialer Zellen durch Hinokitiol weniger stark beeinflusst als das von Tumorzellen (Domon et al. 2019, Li et al. 2014, Salazar-García et al. 2020, Salesa et al. 2021, Shih et al. 2013). Hinokitiol führte nach 24-stündiger Exposition zu einer 2-3-fach stärkeren Vitalitätsreduktion von Zellen eines oralen Plattenepithelkarzinoms verglichen mit Keratinozyten (Shih et al. 2013). Weiterhin konnte auch nach einer 3-stündigen Kontaktdauer mit Hinokitiol keine signifikante Reduktion der Zellviabilität von Humanen Gingivalen Epithelzellen oder Fibroblasten festgestellt werden (Domon et al. 2019).

Während niedrige Konzentrationen von ZnCl_2 keinen nachteiligen Effekt auf die Vitalität von Keratinozyten haben, scheinen sich diese nach längerer Kontaktzeit sogar positiv auf die Stoffwechsel- und Proliferationsaktivität und die Genexpression und Produktion von Antioxidantien auswirken zu können (Emri et al. 2015, Salesa et al. 2021).

Anhand weiterer Zink-Ionophore wie Clioquinol oder Chloroquin, konnte jedoch - ähnlich wie in der vorliegenden Studie- gezeigt werden, dass die Exposition von Zellen gegenüber den Ionophoren kombiniert mit Zink die Toxizität der einzelnen Komponenten steigert (Xue et al. 2014, Yu et al. 2009).

Trotz der Ergebnisse, die auf erhebliche zytotoxische Eigenschaften der Hinokitiol-haltigen Mundspüllösung hindeuten, ist zu berücksichtigen, dass auch handelsübliche, gebrauchsfertige Zubereitungen von Chlorhexidingluconat, *in vitro* ausgeprägte zytotoxische Effekte entfalten (John et al. 2014, Liu et al. 2018, Mariotti und Rumpf 1999, Muller et al. 2017, Rueda-Fernandez et al. 2022).

Insgesamt sollte bezüglich der Anwendung der Hinokitiol-haltigen Mundspüllösung wie in allen Bereichen der Medizin das Prinzip der Risiko-Nutzen-Abwägung Anwendung finden, die einem möglichen Nutzen durch die Verwendung die potenziell erwartbaren, gesundheitsschädlichen Risiken gegenüberstellt.

5.2 Ionophor-Nachweis

Aus heutiger Sicht besteht von vielen Seiten der Wissenschaft wie der Zellbiologie, Medizin und Landwirtschaft Interesse an ionophoren Verbindungen. Die Besonderheit der Ionophore liegt darin begründet, dass sie Membranen für Ionen überwindbar machen und so deren Barrierefunktion aufheben. Damit stellen sie entscheidende Hilfsmittel zur Manipulation des zellulären Ionenhaushalts dar.

Verschiedene Ionophore finden daher vielfältig praktische Verwendung.

Pyrithion in Kombination mit Zink ist gängiger Inhaltsstoff in kosmetischen Produkten gegen Schuppen oder in Präparaten zur topischen Behandlung der Psoriasis, kann dank seiner antimikrobiellen Eigenschaften jedoch auch beispielweise Anwendung als Farbbestandteil finden. Clioquinol ist bekannt als antiseptische Komponente in Produkten für die äußere Anwendung bei Ekzemen, Dermatitis, Haut- oder Wundinfektionen (Heber und Imming 2017). Der pflanzliche Farbstoff Quercetin ist ein Antioxidans, das in Lebensmitteln wie Zwiebeln, Spargel, grünem Tee und Brokkoli enthalten ist, und wegen seiner antiinflammatorischen Eigenschaften auch als Nahrungsergänzungsmittel supplementiert werden kann (Nishimuro et al. 2015)

Die Zink-Ionophore scheinen zudem *in vitro* neben antitumoralen auch breite antivirale Eigenschaften aufzuweisen (Abian et al. 2020, Di Petrillo et al. 2022, Ding et al. 2005, Jeong et al. 2009, Krenn et al. 2009, Mandal et al. 2021, Olaleye et al. 2021, Perez et al. 2019, Qiu et al. 2013, Saakre et al. 2021, Zhao et al. 2017a). Zusätzlich sind sie antimikrobiell aktiv, was insbesondere vor der steten Zunahme von Resistenzentwicklungen gegenüber herkömmlichen Antimykotika und Antibiotika weitreichende Bedeutung erlangt (Gao et al. 2016, Majumdar und Mandal 2024, Nguyen und Bhattacharya 2022, Reeder et al. 2011, Schwartz 2016, Tan et al. 2023, Wang et al. 2018, Wykowski et al. 2022).

5.2.1 Diskussion der Methodik des quantitativen Ionophor-Nachweises

Zur Untersuchung von Substanzen auf ionophore Eigenschaften für Zink-Ionen sind unterschiedliche Vorgehensweisen in der Literatur beschrieben.

Einerseits ist es möglich, die Testsubstanzen (ionophores Molekül und zu transportierendes Ion) im ersten Schritt direkt in das Kulturmedium der Zellen zu geben und anschließend die Markierung des transportierten Ions durchzuführen (Dabbagh-Bazarbachi et al. 2014, Ding et al. 2005, Yu et al. 2009). Erstmals nachgewiesen wurde die ionophore Eigenschaft von Hinokitiol für Zink hingegen, indem im ersten Schritt die fluoreszierende Markersubstanz in das Kulturmedium gegeben wurde und nachfolgend die Testsubstanzen (Krenn et al. 2009).

Die Einwirkzeiten variieren von Minuten bis Stunden, wobei die Geschwindigkeit der intrazellulären Anreicherung in Zusammenhang mit dem ionophoren Potenzial der untersuchten Substanzen zu stehen schien (Dabbagh-Bazarbachi et al. 2014, Krenn et al. 2009). Die gewählte Spanne von einer Stunde bei der quantitativen und qualitativen Analyse gewährleistete demnach eine ausreichende Kontaktzeit, um einen Hinokitiol vermittelten ionophoren Effekt zuverlässig messen zu können.

5.2.2 Ergebnisse des quantitativen Ionophor-Nachweises

Die Untersuchungen konnten zeigen, dass Hinokitiol als Ionophor für Zink agiert. Der Transport von Zink in die Zellen schien dabei abhängig von der herrschenden ZnCl_2 -Konzentration zu sein und der Steigerungsfaktor der Zinkaufnahme lag für Konzentrationen zwischen 50 μM - 200 μM im Bereich zwischen 1,5 und 3,2. Bei einer konstanten Konzentration von ZnCl_2 in Höhe von 100 μM und einer Variation der Hinokitiol-Konzentration, hatte dies hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die Stärke der zellulären Zinkaufnahme.

Das zur Positivkontrolle eingesetzte Pyrithion förderte die Aufnahme von Zink nach intrazellulär bereits aus dem DMEM-Kulturmedium um das 1,6-Fache und steigerte die Zinklevel auf das bis zu 2,8-Fache.

Die eingesetzten Lösungsmittel DMSO und EtOH können die Barrierefunktion biologischer Membranen beeinflussen. DMSO hat als amphiphiles Molekül zellgängige Eigenschaften und EtOH kann in Konzentrationen von bis zu 40 % die mechanischen Eigenschaften von Doppelmembranen in Bezug auf deren Dicke und Festigkeit beeinträchtigen (Brayton 1986, Stetter und Hugel 2013).

Zur Herstellung der finalen Hinokitiol-Untersuchungslösungen war jeweils ein DMSO-Anteil von 0,03, 0,07 bzw. 0,14 Vol.-% unvermeidbar. Für 0 μM ZnCl_2 unterschieden sich die unbehandelte Kontrollgruppe und die mit Hinokitiol behandelte Gruppe (DMSO-Anteil von 0,07 Vol.-%) nicht signifikant, sodass ein Effekt durch DMSO als unwahrscheinlich angenommen werden kann. Bekräftigt wird dies dadurch, dass bei konstanten 100 μM ZnCl_2 und einem erhöhten DMSO-Anteil bei 200 μM Hinokitiol (0,14 Vol.-% DMSO) keine signifikante Steigerung der Zinkaufnahme im Vergleich zu 50 μM Hinokitiol (0,03 Vol.-% DMSO) induziert wurde. Der EtOH-Anteil, der sich wiederum aus der Herstellung der ZnCl_2 -Lösungen ergab, war für die einzelnen ZnCl_2 -Konzentrationen identisch und konnte vernachlässigt werden.

Interessant war, die signifikant höhere Zink-Anreicherung durch Pyrithion ohne eine separate Zugabe von ZnCl_2 .

Krenn et al. (2009) beobachteten erhöhte Zinklevel in Abwesenheit von Zink sowohl durch Pyrithion als auch durch Hinokitiol und legten dar, dass das verwendete Kulturmedium bereits ausreichend Zink enthielt, um den ionophoren Effekt zu erzielen. Allerdings zeigten auch sie, dass bei einer konstanten Zink-Konzentration der Pyrithion vermittelte Einstrom von Zink-Ionen zu einem bestimmten Zeitpunkt höher war als der durch Hinokitiol. Untersuchungen zu weiteren Zink-Ionophoren wie Clioquinol und Quercitin ergaben ebenfalls Unterschiede hinsichtlich der benötigten Zink-Konzentration und der Kinetik des Vorgangs. So fungiert Clioquinol auch in Abwesenheit von Zink-Ionen als Ionophor für im Medium enthaltenes Zink und induziert bei Zink-Zugabe eine stärkere und schnellere zelluläre Aufnahme als Quercitin (Dabbagh-Bazarbachi et al. 2014)

Prinzipiell wird das Verhalten eines Ionophors als Carrier durch mehrere Faktoren beeinflusst. Von Bedeutung ist die Selektivität des Ionophors für ein bestimmtes Ion, was die Geschwindigkeit des Transportprozesses begünstigt. Außerdem besteht eine Abhängigkeit von der Verfügbarkeit der zu transportierenden Ionen, wobei eine höhere Konzentration mit einer höheren Transportrate einhergeht. Diese Transportrate erreicht bei Sättigung des Ionophor-Moleküls mit den Ionen jedoch ein Plateau und kann nur durch eine Erhöhung der Ionophor-Konzentration weiter gesteigert werden (Christ et al. 2011). Neben physikalischen und chemischen Bedingungen wie Umgebungstemperatur und pH-Wert kann auch die Zusammensetzung und

Dicke der zu passierenden Membran eine Rolle spielen. Zusätzlich relevant ist die so genannte Bindungskinetik, da sie die Dauer der Bindung und Dissoziation von Ionophor und dem zu transportierenden Ion nach dem Transport definiert. Insofern konnte die vorliegende Arbeit zeigen, dass sich Hinokitiol und Pyrithion in Bezug auf ihr ionophores Potential unterscheiden.

Interessant wären zur weiteren Charakterisierung des ionophoren Verhaltens von Hinokitiol und Zink weitere Untersuchungen unter Einbeziehung weiterer Konzentrationen und unter Variation weiterer Parameter. Da die unterschiedlichen Hinokitiol Konzentrationen bei gleichbleibender Zink-Konzentration keinen Einfluss auf die Zink Aufnahme hatten, wäre es interessant zu untersuchen, ob sich bei kürzeren Untersuchungszeiträumen dahingehend Unterschiede abzeichnen.

5.2.3 Diskussion der Methodik des qualitativen Ionophor-Nachweises

Die einstündige Inkubationszeit der Testsubstanzen, ZnCl_2 und Hinokitiol oder Pyrithion, vor der Zugabe der Fluorophore wurde gewählt, um zuverlässig eine Ionophor vermittelte Zink-Aufnahme in die Zellen zu gewährleisten.

Der wichtigste Unterschied zur Methodik der Studien von Yu et al. (2009) und Krenn et al. (2009) lag in der Notwendigkeit zur Fixierung der Zellen vor einer Inspektion mit dem Laser Scanning Mikroskop, was bedingte, dass die intrazelluläre Zink-Anreicherung nur zu einem bestimmten Zeitpunkt dargestellt werden konnte. Der notwendige Fixierungsprozess umfasste neben zusätzlichen Waschschritten, die aufgrund des Auftretens von Scherkräften das Ablösen von Zellen vom Objektträger begünstigen können, die Verwendung einer Fixierlösung, die ihrerseits die Morphologie von Zellen beeinträchtigen kann (Li et al. 2017). Durch die Verwendung eines LSM konnten die untersuchten Präparate optisch geschichtet dargestellt werden, was das Auftreten von Überlagerungseffekten, die bei der Erstellung von Summationsaufnahmen mittels Fluoreszenzmikroskopie auftreten können, vermied.

Anhand der Aufnahmen mit dem LSM könnte zusätzlich eine quantitative Auswertung mit Hilfe eines Streudiagramms erfolgen, das die Intensität der gefärbten Pixel aus beiden Kanälen in einem Diagramm gegeneinander aufträgt. Eine solche Analyse kann durch die Berechnung des Kolokalisations-Koeffizienten weiter spezifiziert werden. Dieser setzt die Anzahl doppelt gefärbter Pixel in Relation zu allen gefärbten Pixeln eines Kanals (Manders et al. 1993).

Allerdings berichtet keine der zitierten Arbeiten über ein solches Vorgehen, zumal dessen Aussagekraft etwa durch das Auftreten von Hintergrundsignalen oder Photobleiche beeinträchtigt werden kann (Dabbagh-Bazarbachi et al. 2014, Krenn et al. 2009, Xue et al. 2014, Yu et al. 2009).

5.2.4 Auswahl der Fluorophore und Fixierlösungen

Die Auswahl der fluoreszierenden Marker (FluoZin-3, LysoTracker Deep Red, MitoTracker Deep Red und BODIPY TR Ceramide) wurde auf die Ausstattung des eigenen LSM-Systems mit spezifischen fluoreszenzanregenden Lasern und Filtern und nach der Möglichkeit zur Fixierung der Proben abgestimmt. FluoZin-3 gilt als sensibler Marker, der bereits geringe Zink Konzentrationen zuverlässig detektiert und für quantitative sowie qualitative Analysen geeignet ist. Für den gewählten LysoTracker sowie den MitoTracker gibt der Hersteller die Eignung zur Fixierung mit PFA, alternativ mit Alkohol an. Eine qualitativ zufriedenstellende PFA-Fixierung des MitoTrackers war trotz der Variation von Konzentration und Einwirkdauer nicht möglich; die resultierenden Aufnahmen waren stets von minderwertiger Qualität. Daher wurde in den Untersuchungen mit dem MitoTracker auf eine MetOH-Fixierung (15 min bei – 20 °C) zurückgegriffen, obwohl in einer jüngeren Studie zur Darstellung des MitoTrackers die Fixierung mit PFA einer Alkoholfixierung vorgezogen wurde (Qin et al. 2021).

Die Notwendigkeit der MetOH-Fixierung des MitoTrackers führte wiederum zur mangelhaften Darstellbarkeit von Zink mit FluoZin-3. Die drei unabhängigen Versuchswiederholungen mit dem LysoTracker und MitoTracker erfolgten jeweils zeitgleich und unter denselben Laborbedingungen. Während in der Hinokitiol- und Pyrithion-Gruppe in den Versuchen mit dem LysoTracker jeweils reproduzierbar ein rundliches Zinkkonglomerat auftrat, war dieses in den Versuchen mit dem MitoTracker nicht nachweisbar. Der einzige methodische Unterschied der zeitgleich ausgeführten Experimente lag in der verwendeten Fixierlösung (PFA für LysoTracker; EtOH für MitoTracker). Von Seiten des Herstellers lag bezüglich der Fixierung von FluoZin-3 keine Empfehlung vor, wobei ein Einsatz von PFA zur Fixierung von mit FluoZin-3 markierten Zellen in der Literatur beschrieben ist (Guantario et al. 2018, Jayaraman 2008).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie könnten darauf hindeuten, dass für FluoZin-3 keine Fixierbarkeit mit MetOH gegeben. Vorteil des verwendeten BODIPY TR Ceramide war im Gegensatz zu BODIPY-Proben anderer Hersteller,

neben einer Stabilität unter den für die Zellen optimalen Wachstumsbedingungen einer Fixierbarkeit mit PFA.

5.2.5 Diskussion der Mitochondrien Morphologie

Die Zellen der unterschiedlich behandelten Gruppen unterschieden sich hinsichtlich des Erscheinungsbilds ihrer Mitochondrien. Die Zellen, die ausschließlich mit ZnCl_2 behandelt wurden, verfügten über ein tubulär verteiltes, feines Mitochondrien-Netz. Die Zellen der Hinokitiol-Testgruppe und Pyrithion-Positivkontrollgruppe hingegen wiesen punktartige, vielfach durchbrochene Mitochondrien-Strukturen auf. Ähnliche Beobachtungen liegen für Kombinationen von Zink und Pyrithion vor (Knies und Li 2021).

Da die Funktionsweise der Mitochondrien als Maß für die Zellvitalität genutzt werden kann, ist diese Beobachtung ein Indikator dafür, dass ZnCl_2 und Hinokitiol oder Pyrithion die Energiegewinnung der HGF-1 beeinträchtigten. Dieses Erkenntnis deckt sich mit den Ergebnissen der Zytotoxizitäts-Tests der vorliegenden Arbeit, die durch die geringste Zink-Konzentration allein keine Vitalitätsreduktion belegten, jedoch durch Kombination mit der geringsten Hinokitiol-Konzentration signifikant zytotoxische Effekte nachwiesen.

5.2.6 Potenzielle Lokalisation intrazellulärer Zink-Ionen

Die mit dem LSM erstellten Aufnahmen (LysoTracker und FluoZin-3) unterstrichen die Ergebnisse der vorangegangenen quantitativen Analyse zum Ionophornachweis, indem die mit Hinokitiol oder Pyrithion behandelten HGF-1 im Vergleich zu den ausschließlich mit ZnCl_2 behandelten Zellen, neben einem zytosolischen Zink-Schatten, eine rundliche Zinkansammlung zeigten.

Keine der Aufnahmen bestätigte eine Überlagerung des mit FluoZin-3 dargestellten Zinks mit dem Zellkern, was darauf zurückzuführen ist, dass es ungebundene Zink-Ionen detektiert und das im Zellkern befindliche Zink vorwiegend proteingebunden vorliegt (Lu et al. 2016).

Yu et al. (2009) und Xue et al. (2014) beschrieben im Rahmen von Untersuchungen zum Ionophor-Nachweis für Clioquinol bzw. Chloroquin die Anreicherung von Zink-Ionen in Lysosomen, nicht aber in Mitochondrien, wohingegen Krenn et al. (2009) die mitochondriale Aufnahme beobachteten.

Die Aussagekraft der Aufnahmen der vorliegenden Arbeit mit dem MitoTracker war aufgrund der beschriebenen Problematik hinsichtlich der Fixierung

beschränkt. Inwieweit eine gewisse Überschneidung des homogen verteilten Zinks mit den Mitochondrien vorlag, konnte aus diesem Grund nicht geklärt werden. Da aber der MitoTracker die Morphologie der Mitochondrien als feines Netzwerk darstellte, war keine bedeutsame Kollokalisierung der rundlichen Zinkkonglomerate aus der Hinokitiol- und Pyrithion-Gruppe mit den Mitochondrien anzunehmen.

Strukturell sind der Zellkern und die Mitochondrien von einer doppelten Membran, der Golgi-Apparat und die davon vesikulär abgeschnürten Lysosomen hingegen nur von einer einfachen Phospholipid-Schicht zur Abgrenzung gegenüber dem Zytosol umgeben.

Eine fluoreszenzmikroskopische Studie von Fibroblasten zeigte deren ER als diffus über das Zytosol verteiltes Organell, sodass eine Kollokalisierung des Zink-Konglomerats der Hinokitiol-Gruppe und Pyrithion-Gruppe mit dem ER unwahrscheinlich erschien (Weidner et al. 2018). Der Golgi-Apparat imponierte als rundliches und in der Nähe des Zellkerns befindliches Organell (Weidner et al. 2018). Dabei besteht eine Korrelation der Größe und Anzahl der Dictyosomen des Golgi-Apparats mit der zellulären Aufgabe hinsichtlich der Produktion und Sekretion von Stoffen, weswegen beispielsweise die sekretorisch bedeutsamen β -Zellen des Pankreas über einen stark ausgeprägten Golgi-Apparat verfügen (Vazquez-Lopez 1940). Zudem wiesen diese Zellen erhöhte Zink-Konzentrationen auf, die unter anderem zur Überführung von Proinsulin zu Insulin benötigt werden, bevor die Sekretion über das Trans-Golgi-Netzwerk erfolgen kann (Li 2014, Lu et al. 2016). HGF-1 als ortsständige Zellen des gingivalen Bindegewebes sind die Hauptproduzenten der Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Kollagen, sodass sich daraus die Notwendigkeit für eine starke Ausprägung ihres Golgi-Apparats ergeben könnte. Aufgrund der Größe und Lokalisation des Golgi-Apparats wie sie mit dem BODIPY TR Ceramide dargestellt werden konnten, könnte dieser mit dem starken, nahe dem Zellkern befindlichen Zinksignal in der Hinokitiol- und Pyrithion-Gruppe (LysoTracker und FluoZin-3) kollokalisieren.

Zink ist von besonderer Bedeutung für die Funktionsweise des Golgi-Apparats, da es die Verbindung von speziellen stabilisierenden Proteinen zwischen den Zisternen und so den transmembranösen Transport gewährleistet, darüber hinaus aber auch Kofaktor für viele der Golgi-spezifischen Enzyme ist (Li und Wang 2022, Rabouille und Linstedt 2016, Wu und Zhao 2019, Zhao et al. 2017b).

Während die Zinklevel im ER und im Golgi-Apparat in Ruhe deutlich unter den zytosolischen lagen, stiegen sie bei einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration an, jedoch vorrangig im ER und nur nachrangig im Golgi-Apparat (Hara et al. 2017, Qin et al. 2011).

Wahrscheinlicher erscheint der folgende intrazelluläre Mechanismus: nach der Membranpassage und Dissoziation von Ionophor und den transportierten Zink-Ionen könnten diese im Sinne einer Pufferfunktion zur Zellprotektion in Zink-speichernde Lysosomen (Zinkosomen oder „zinc-sinc“, Zink-Speicherbecken) transportiert werden (Ballestin et al. 2011, Barisch et al. 2018, Falcon-Perez und Dell'Angelica 2007, Kim et al. 2022, Kukic et al. 2014, Lee und Koh 2021, Palmiter et al. 1996, Rivera et al. 2018). Die lysosomale Speicherung erfolgt unter anderem über den Antiporter ZnT2, der passiv zytosolische Zink-Ionen als schwache Lewis-Säuren im Austausch gegen Protonen in die Lysosomen befördert (Lee und Koh 2021). Durch eine vermehrte Aufnahme von Zink-Ionen mit schwach sauren Eigenschaften kommt es so dennoch zur Erhöhung des lysosomalen pH-Werts (Kukic et al. 2014). Gleichzeitig stimuliert eine erhöhte lysosomale Zink-Konzentrationen die Bildung der V-ATPase (Protonenpumpe), die unter Energieverbrauch den sauren pH-Wert der Lysosomen aufrecht erhält und damit die Kapazität zur lysosomalen Zink-Aufnahme mittels ZnT2 gewährleistet (Finbow und Harrison 1997, Kim et al. 2022, Kukic et al. 2014, Lee et al. 2017). Bei Überschreitung der lysosomalen Pufferkapazität durch zu hohe Zink Mengen, kann es zur Disruption der Lysosomen und infolge der Freisetzung der lysosomalen Enzyme ins Zytosol zum Zelltod kommen.

Kukic et al. (2014) zeigten, dass durch eine vermehrte lysosomale Zink-Aufnahme das Signal von FluoZin-3 stärker wurde, während das Signal des LysoTrackers fast vollständig verschwand. Dies führten die Autoren auf die Anhebung des lysosomalen pH-Werts durch die Zink-Aufnahme mittels ZnT2 zurück, da der LysoTracker die Lysosomen über Bindung an saure Bestandteile im Inneren markiert.

Die Aufnahmen dieser Arbeit der Hinokitiol-Gruppe und Pyrithion-Gruppe zeigten in der Überlagerung keine Überschneidung des Zink-Konglomerats mit den Lysosomen. Vielmehr schien genau dieser Bereich vom LysoTracker ausgespart zu sein. Falls das Zink-Konglomerat im lysosomalen Speicherbecken lokalisiert war, wäre es demnach möglich, dass infolge der Zink-Aufnahme und pH-Absenkung die Anfärbung des lysosomalen Speicherbeckens nicht mehr gelang.

6. Zusammenfassung

Frühere Studien belegten vielfältige antimikrobielle Eigenschaften von Hinokitiol und Zink, insbesondere auch im Zusammenhang mit zahnmedizinischen Fragestellungen.

Ziel der Arbeit war die Untersuchung des Hinokitiol-Zink-Komplexes hinsichtlich zytotoxischer, quantitativer und qualitativer ionophorer Eigenschaften.

Anhand von Kulturen humaner gingivaler Fibroblasten wurde die Verträglichkeit von Hinokitiol und Zink und einer Hinokitiol-haltigen Mundspüllösung analysiert. Die Zellen wurden für die Dauer von einer Stunde mit den Untersuchungslösungen behandelt, bevor deren Effekte auf die Zellvitalität bestimmt wurden.

Um nachzuweisen, ob Hinokitiol als Ionophor für Zink agiert, wurden HGF-1 für eine Stunde mit verschiedenen Hinokitiol- und Zink-haltigen Lösungen behandelt. Im Anschluss wurde mit einem für Zink-Ionen selektiven Fluorophor intrazelluläres freies Zink markiert und mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen quantifiziert. Darüber hinaus wurden verschiedene Zellorganellen mit spezifischen Fluorophoren gefärbt, sodass mittels Laser Scanning Mikroskopie eine Lagebestimmung von freiem Zink erfolgen konnte.

Die untersuchte Hinokitiol-haltige Mundspüllösung zeigte starke toxische Effekte, die einzelnen Stoffe waren dagegen verträglicher, auch wenn sich konzentrationsabhängig eine Reduktion der Vitalität abzeichnete. Signifikant toxisch war keine der untersuchten Hinokitiol-Lösungen, allerdings 3,2 mM ZnCl_2 und verschiedene Kombinationen von Hinokitiol und ZnCl_2 . Für einen Teil der Gruppen zeichnete sich aber eine Tendenz zu verbesserten Vitalitätswerten ab. Die Fluoreszenzmessungen zeigten, unter der Voraussetzung einer separaten Zugabe von Zink, signifikant höhere Zink-Level durch Hinokitiol und belegten so, dass es als Ionophor für Zink agiert. Auch die Aufnahmen mit dem Laser Scanning Mikroskop verdeutlichten dieses Ergebnis, indem die Hinokitiol-Gruppe eine Zinkansammlung aufwies, die bei alleiniger Behandlung mit Zink nicht auftrat. Für dieses rundliche Zink-Konglomerat konnte keine besondere Kolokalisation mit dem feinen Mitochondrien-Netz angenommen werden. Überdies war das Mitochondrien-Netzwerk der mit Hinokitiol behandelten HGF-1 vielfach durchbrochen, was auf eine beeinträchtigte Stoffwechselaktivität hindeuten könnte. Möglich wäre eine Kolokalisation des Zink Konglomerats mit dem Golgi-Apparat, der ebenfalls in der Nähe des Zellkerns angesiedelt ist, oder

Zusammenfassung

in Form einer Ansammlung in einem lysosomalen Speicherbecken mit Pufferfunktion für den zellulären Zink-Haushalt.

7. Abstract

Previous studies have demonstrated a variety of antimicrobial properties of hinokitiol and zinc, particularly with regard to dental issues. This work aimed to investigate the hinokitiol-zinc complex with special emphasis on cytotoxic, quantitative and qualitative ionophoric properties.

Using human gingival fibroblasts, cytotoxic effects of hinokitiol and zinc and a hinokitiol-containing mouth rinse solution were determined. The cells were treated with the test solutions for one hour before and their effects on cell viability were determined.

To delineate whether hinokitiol acts as an ionophore for zinc, HGF-1 was treated with different hinokitiol- and zinc-containing solutions for one hour. Subsequently, intracellular free zinc was labelled with a fluorophore selective for zinc ions and quantified by fluorescence measurements. In addition, various cell organelles were stained with specific fluorophores so that the location of free zinc could be determined using laser scanning microscopy.

The investigated hinokitiol-containing mouth rinse solution showed strong toxic effects, whereas the individual substances were more tolerable, even if a reduction in vitality was observed depending on the concentration. Although none of the hinokitiol solutions tested were significantly toxic, 3.2 mM ZnCl_2 and various combinations of hinokitiol and ZnCl_2 were. There was a tendency towards improved vitality values for a few of the groups.

The fluorescence measurements showed significantly higher zinc levels due to hinokitiol, provided that zinc was added separately, thus proving that hinokitiol acts as an ionophore for zinc. The images taken with the laser scanning microscope also corroborated this result, as the hinokitiol group showed a zinc accumulation that did not occur when treated with zinc alone. No colocalisation with the fine mitochondrial network could be assumed for this roundish zinc conglomerate. Moreover, the mitochondrial network of the hinokitiol-treated HGF-1 was often disrupted, which could indicate impaired metabolic activity. A colocalisation of the zinc conglomerate with the Golgi apparatus, which is also located near the cell nucleus, or in the form of an accumulation in a lysosomal storage basin with a buffer function for the cellular zinc balance would be possible.

8. Abkürzungsverzeichnis

<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung</i>
ANOVA	Analysis of Variances	μM	mikromolar
ATP	Adenosintriphosphat	mM	millimolar
BP	Bandpass	MTDR	MitoTracker Deep Red
Blank	Leerwert	MW	Mittelwert
BODIPY	BODIPY TR Ceramide	N.K.	Negativkontrollgruppe
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	Na⁺-K⁺-	Natrium-Kalium-ATPase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium	ATPase	
DMSO	Dimethylsulfoxid	nM	nanomolar
Em	Emission	P	(Sodium) Pyrithion
ER	Endoplasmatisches Retikulum	P.K.	Positivkontrolle
EtOH	Ethanol	P/S	Penicillin/Streptomycin
Ex	Exzitation	PBS	Phosphate Buffered Saline
FBS	Fetales Bovines Serum	PFA	Paraformaldehyd
FZ-3	Fluo-Zin-3	RT	Raumtemperatur
H	Hinokitiol	rER	Raues ER
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution	SD	Standarddeviation
HGF-1.	Humane Gingivale Fibroblasten	T.G.	Testgruppe
LP	Langpass	P.K.	Positivkontrolle
LSM	Laser Scanning Mikroskop	WST-1	Water Soluble Tetrazolium Salt
LTDR	LysoTracker Deep Red	ZIP	Zrt/Irt-like Proteine
M	molar (Mol/Liter)	ZnCl₂ / Z	Zinkchlorid
M.	Median	ZnT	Zink Transporter
MetOH	Methanol		
MHK	Minimale Hemmkonzentration		

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur eines Hinokitiol-Moleküls.....	10
Abbildung 2: Aufnahmen der spindelförmigen HGF-1 mit dem Durchlicht- mikroskop Axiovert. A : etwa 50 % konfluente Kultur in 5-facher Vergrößerung B : charakteristisch kopfsteinpflasterartiges Wachstumsmuster in 10-facher Vergrößerung C : 100 % konfluente Kultur in 10-facher Vergrößerung	23
Abbildung 3: Transparente 96-Well-Platte nach dem Aussäen der HGF-1	27
Abbildung 4: für Fluoreszenzmessungen optimierte schwarze 96-Well-Platte mit transparentem Boden.....	28
Abbildung 5: Objektträger mit entfernbare 12-Well-Silikonkammer nach Aussäen der HGF-1	31
Abbildung 6: Layout der Objektträger zum qualitativen Ionophor-Nachweis	31
Abbildung 7: Dokumentation der Vorversuche zur Herstellung einer homogenen ZnCl_2 -Stammlösung von 1g ZnCl_2 in 29,35 ml Lösungsmittel (250 mM) A : 1g ZnCl_2 in einem 50 ml Falcon; B : links: trübe Lösung von 1g ZnCl_2 in 29,35 ml aqua ad iniectionem bei Raumtemperatur; rechts: ZnCl_2 Bodensatz nach Shaken und Erwärmen der wässrigen Suspension auf 37 °C; C : links: 1 g ZnCl_2 in 29,35 ml Ethanol (EtOH) bei Raumtemperatur; rechts: klare Lösung nach Erwärmen der Lösung auf 37 °C	34
Abbildung 8: Analyse der Vitalität der HGF-1 mittels WST-1 Behandlung der HGF1 für die Dauer 1 Stunde mit unterschiedlichen Substanzen: Negativkontrollgruppe + (N.K.+; DMEM + 2,13 Vol.-% DMSO + 1,28 Vol.-% Ethanol), N.K.- (DMEM), Positivkontrollgruppe (P.K., DMSO), Hinokitiol-haltige Mundspüllösung (H-MS) und unterschiedliche Hinokitiol (H) und ZnCl_2 (Z) Konzentrationen (1 - 4=50 μM , 200 μM , 800 μM und 3,2 mM) und deren Kombinationen für die Dauer einer	

Stunde; Absorptionsmessung des WST-1 bei 450 nm; Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) in Relation zur N.K., signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zu N.K. mit * markiert. DMSO, H-MS, 3,2 mM Z, 50 μ M H + 50 μ M Z, 50 μ M H + 3,2 mM Z und 3,2 mM H + 3,2 mM Z reduzierten die Vitalität signifikant	36
Abbildung 9: Untersuchungen zum pH-Wert der Hinokitiol-haltigen Mundspüllösung (H-MS) A : links: 200 μ l DMEM, rechts: Farbumschlag bei Zugabe von 100 μ l H-MS zu 100 μ l DMEM; B : pH-Wert Bestimmung der H-MS mit Indikatorpapier, Ergebnis: pH-Wert von etwa 4	37
Abbildung 10: Quantitativer Ionophor-Nachweis mittels Fluoreszenzmessung Behandlung der HGF-1 mit ZnCl_2 (A: 0 μ M, B: 50 μ M, C: 100 μ M und D: 200 μ M), Gruppenzuordnung: Negativkontrollgruppe (N.K., ausschließlich ZnCl_2), Testgruppen zusätzlich mit Hinokitiol (H; 50 μ M, 100 μ M oder 200 μ M) und Positivkontrollgruppe (P.K., zusätzlich mit 10 μ M Pyrithion); Färbung mit FZ-3 für 30 Minuten; Messung: Exzitation mit 490 nm, Emission bei 516 nm; Darstellung von MW und SD aus drei unabhängigen Versuchsdurchführungen in Relation zur jeweiligen N.K., mit * markierte signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den gekennzeichneten Gruppen. Pyrithion zeigt eine gesteigerte Zinkaufnahme für alle untersuchten ZnCl_2 -Konzentrationen (A-D). Hinokitiol steigert die intrazelluläre Zink-Menge ab einer Behandlung von 50 μ M ZnCl_2 signifikant (B-D); bei unveränderter ZnCl_2 -Konzentration (100 μ M) zeigt eine Variation der H-Konzentration keinen zusätzlichen signifikanten Unterschied für die Zink-Aufnahme zwischen den Hinokitiol-Konzentrationen (C).	39
Abbildung 11: Darstellung von Lysosomen und Zink der HGF-1 der Negativkontrollgruppe mittels Laser Scanning Mikroskopie (Objektiv 63x/1.4 Oil) Drei repräsentative Aufnahmen (A-C) aus drei unabhängigen Versuchswiederholungen (1-3); Behandlung: 30 μ M ZnCl_2 für eine Stunde; Färbung: 50 nM LysoTracker DeepRed (LTDR, rot) und 3 μ M FluoZin-3 (FZ-3, grün) für 30 Minuten; Fixierung: Paraformaldehyd (4 %) für 20 Minuten bei Raumtemperatur.	

Überlagerung (gelb) zeigt kolokalisierende Areale. Intrazelluläres Zink und die Lysosomen zeigen ein homogen über das Zytosol verteiltes Bild in Form feiner Pünktchen mit Aussparung um den ovalen, nicht gefärbten Zellkern. 42

Abbildung 12: Darstellung von Lysosomen und Zink der HGF-1 der Testgruppe mittels Laser Scanning Mikroskopie (Objektiv 63x/1.4 Oil) Drei repräsentative Aufnahmen (A-C) aus drei unabhängigen Versuchswiederholungen (1-3); Behandlung: 30 μM ZnCl_2 + 100 μM Hinokitiol für eine Stunde; Färbung: 50 nM LysoTracker DeepRed (LTDR) und 3 μM FluoZin-3 (FZ-3) für 30 Minuten; Fixierung: PFA (4 %) 20 Minuten bei Raumtemperatur. Die Lysosomen zeigen sich als feine Pünktchen im Zytosol mit Aussparung um den ovalen ungefärbten Zellkern. Das intrazelluläre Zink zeigt einen homogen über das Zytosol verteilten Schatten und ein hervorstechendes größeres rundes Konglomerat in der Nähe des Zellkerns, welches bei der Überlagerung keine Überschneidung mit den Lysosomen zeigt 43

Abbildung 13: Darstellung von Lysosomen und Zink der HGF-1 der Positivkontrollgruppe mittels Laser Scanning Mikroskopie (Objektiv 63x/1.4 Oil) Drei repräsentative Aufnahmen (A-C) aus drei unabhängigen Versuchswiederholungen (1-3); Behandlung: 30 μM ZnCl_2 + 10 μM Pyrithion für eine Stunde; Färbung: 50 nM LysoTracker DeepRed (LTDR) und 3 μM FluoZin-3 (FZ-3) für 30 Minuten; Fixierung: PFA (4 %) für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Die Lysosomen zeigen sich als feine Pünktchen im Zytosol mit Aussparung um den ovalen ungefärbten Zellkern. Das intrazelluläre Zink zeigt einen homogen über das Zytosol verteilten Schatten und wie auch in der Testgruppe ein hervorstechendes größeres rundes Konglomerat in der Nähe des Zellkerns, welches bei der Überlagerung keine Überschneidung mit den Lysosomen zeigt..... 44

Abbildung 14: Darstellung von Mitochondrien und Zink der HGF-1 mittels Laser Scanning Mikroskopie (Objektiv 63x/1.4 Oil)..... Ein repräsentatives Bild je Gruppe (Negativkontrollgruppe (N.K.), Testgruppe (T.G.) und Positivkontrollgruppe (P.K.)) aus drei

unabhängigen Versuchswiederholungen (1-3). Behandlung: N.K. (30 μM ZnCl_2), T.G. (30 μM ZnCl_2 + 100 μM Hinokitiol) und P.K. (30 μM ZnCl_2 + 10 μM Pyrithion) für eine Stunde, Färbung: 500 nM MitoTracker DeepRed (MTDR) und 3 μM FluoZin-3 (FZ-3) für 30 Minuten; Fixierung: MetOH ($\geq 99\%$) für 15 Minuten bei -20°C . Kein erkennbarer Unterschied zwischen N.K., T.G. und P.K. als Hinweis auf verminderte Kompatibilität von FZ-3 und MetOH..... 46

Abbildung 15: Darstellung der netzwerkartig verästelten Mitochondrien-Morphologie in der Negativkontrollgruppe mittels Laser Scanning Mikroskopie Drei repräsentative Aufnahmen (A-C) des MitoTracker DeepRed (MTDR) aus drei unabhängigen Versuchswiederholungen; Behandlung: 30 μM ZnCl_2 für eine Stunde; Färbung: 500 nM MTDR und 3 μM FluoZin-3 (FZ-3; nicht gezeigt) für 30 Minuten; Fixierung: MetOH ($\geq 99\%$) für 15 Minuten bei -20°C ; Objektiv 63x/1.4 Oil. 47

Abbildung 16: Darstellung der punktförmigen Mitochondrien-Morphologie der HGF-1 in der Testgruppe mittels Laser Scanning Mikroskopie... Drei repräsentative Aufnahmen (A-C) des MitoTracker DeepRed (MTDR) aus drei unabhängigen Versuchswiederholungen; Behandlung: 30 μM ZnCl_2 + 100 μM Hinokitiol für eine Stunde; Färbung: 500 nM MTDR und 3 μM FluoZin-3 (FZ-3; nicht gezeigt) für 30 Minuten; Fixierung: MetOH ($\geq 99\%$) für 15 Minuten bei -20°C ; Objektiv 63x/1.4 Oil. 48

Abbildung 17: Darstellung der punktförmigen Mitochondrien-Morphologie der HGF-1 in der Positivkontrollgruppe mittels Laser Scanning Mikroskopie Drei repräsentative Aufnahmen (A-C) des MitoTracker DeepRed (MTDR) aus drei unabhängigen Versuchswiederholungen. Behandlung: 30 μM ZnCl_2 + 10 μM Pyrithion für eine Stunde; Färbung: 500 nM MTDR und 3 μM FluoZin-3 (FZ-3; nicht gezeigt) für 30 Minuten; Fixierung: MetOH ($\geq 99\%$) für 15 Minuten bei -20°C ; Objektiv 63x/1.4 Oil..... 49

Abbildung 18: Darstellung des MitoTracker DeepRed (MTDR) nach PFA-Fixierung mittels Laser Scanning Mikroskopie Behandlung von HGF-1 mit 500 nM MTDR für 30 Minuten; PFA-Fixierung mit

unterschiedlichen Konzentrationen Einwirkzeiten; je drei repräsentative Aufnahmen (A-C), Darstellung mit dem LSM510 (Objektiv 63x/1.4 Oil). Unabhängig von Einwirkdauer und Konzentration des PFA zeigt sich ein diffuses unscharfes Bild des MTDR, was den Aufnahmen nach MetOH Fixierung (15 Minuten bei – 20 °C) unterlegen ist. 50

Abbildung 19: Darstellung des Golgi-Apparats der HGF-1 mittels Laser Scanning Mikroskopie Färbung: BODIPY TR Ceramide für 8 Stunden; Fixierung: PFA (4 %) für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Der Golgi-Apparat zeigt sich als rundes hervortretendes Signal in der Nähe des Zellkerns. 51

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	18
Tabelle 2: Zelllinie	18
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien.....	19
Tabelle 4: Reagenzien und Kits.....	20
Tabelle 5: Fluorophore	21
Tabelle 6: Chemikalien.....	21
Tabelle 7: Inhaltsstoffe der Hinokitiol-haltigen Mundspüllösung laut Hersteller	22
Tabelle 8: Untersuchte Gruppen zu Ermittlung der Zytotoxizität	26
Tabelle 9: Konzentrationskombinationen zum quantitativen Ionophor- Nachweis	29
Tabelle 10: Laser zur Exzitation (Ex) und entsprechende Filter der Emission (Em) der eingesetzten Fluorophore mit dem LSM 510; Bandpass (BP), Langpass (LP)	30
Tabelle 11: Statistische Auswertung der Vitalitätsbestimmung mittels WST-1 Deskriptive Statistik (M, MW und SD), p -Wert bei Anwendung des Shapiro-Wilk-Tests zur Untersuchung auf Normalverteilung ($p < 0,05$; mit * markiert; keine Normalverteilung gegeben in H4, H1 Z1, H1 Z4) und bei Anwendung von post hoc Bonferroni-Mehrfachvergleichen ($p < 0,05$; mit * markiert) nach ANOVA ($p < 0,05$; ANOVA signifikant mit $p < 0,01$).	37
Tabelle 12: Statistische Auswertung der Fluoreszenzmessungen zum quantitativen Ionophornachweis. Deskriptive Statistik (n, MW und SD) für die jeweilige untersuchte ZnCl_2 -Konzentration separat, p -Wert für Normalverteilung (NV) mittels Shapiro-Wilk-Test ($p < 0,05$; Normalverteilung in allen Gruppen gegeben) und post hoc	

durchgeführte Bonferroni-Mehrfachvergleiche ($p < 0,05$) nach ANOVA ($p < 0,05$; ANOVA signifikant auf $p < 0,01$), * markiert statistisch signifikante Ergebnisse. In der Gruppe 100 μM ZnCl_2 und 200 μM Hinokitiol wurden 4 Werte wegen starker Abweichung von MW und Median (M) nicht in die statistische Auswertung miteinbezogen, sodass sich für diese Gruppe $n=8$ ergab.	40
Tabelle 13: Lösungsmittel für Hinokitiol	52
Tabelle 14: Lösungsmittel für ZnCl_2	52

11. Literaturverzeichnis

- ABCAM PLC. 2023. *Hinokitiol, Iron chelator antioxidant (ab144606)*. verfügbar unter: <https://www.abcam.com/products/biochemicals/hinokitiol-iron-chelator-antioxidant-ab144606.html>, aufgerufen 27.08.2023.
- ABIAN O., ORTEGA-ALARCON D., JIMENEZ-ALESANCO A., CEBALLOS-LAITA L., VEGA S., REYBURN H. T., RIZZUTI B. & VELAZQUEZ-CAMPOY A. Structural stability of SARS-CoV-2 3CLpro and identification of quercetin as an inhibitor by experimental screening. *Int J Biol Macromol.* 2020; 164:1693-1703.
- AG SCIENTIFIC HOLDINGS LLC. 2023. *Hinokitiol, 250 MG* verfügbar unter: https://agscientific.com/products/biochemicals/antioxidants/hinokitiol-250-mg.html?search_query=hinokitiol&ga_list_name=Search%20%28Grid%20View%29, aufgerufen 27.08.2023.
- AMELINGMEIER E., BERGER M., BERGSTRÄßER U., BOCKHORN H. & BOTSCHWINA P. (2014). *RÖMPP Lexikon Chemie, 10. Auflage, 1996-1999: Band 3: H - L*, Thieme:1979.
- ANANDAN R., JHANJHI N. Z. & DEEPAK B. S. (2022). Treatment of Novel Coronavirus (2019-nCoV) Using Hinokitiol (β -thujaplicin) Copper Chelate. In: ANANDAN, R., SUSEENDRAN, G., CHATTERJEE, P., JHANJHI, N. Z. & GHOSH, U. (eds.) *How COVID-19 is Accelerating the Digital Revolution: Challenges and Opportunities*. Cham: Springer International Publishing.
- ARIMA Y., NAKAI Y., HAYAKAWA R. & NISHINO T. Antibacterial effect of beta-thujaplicin on staphylococci isolated from atopic dermatitis: relationship between changes in the number of viable bacterial cells and clinical improvement in an eczematous lesion of atopic dermatitis. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51(1):113-22.
- ASAO T., ITO S. & MURATA I. Tetsuo Nozoe (1902-1996). *European Journal of Organic Chemistry.* 2004; (4):899–928.
- ASTIVITA LIMITED. 2020. *The Science I Dr. ZinX*. verfügbar unter: <https://www.drzinx.com/ingredients>, aufgerufen December 21, 2021.
- BAFARO E., LIU Y., XU Y. & DEMPSKI R. E. The emerging role of zinc transporters in cellular homeostasis and cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2017; 2:17029.
- BALLESTIN R., MOLOWNY A., MARIN M. P., ESTEBAN-PRETEL G., ROMERO A. M., LOPEZ-GARCIA C., RENAUP-PIQUERAS J. & PONSODA X. Ethanol reduces zincosome formation in cultured astrocytes. *Alcohol Alcohol.* 2011; 46(1):17-25.
- BALTACI A. K. & YUCE K. Zinc Transporter Proteins. *Neurochem Res.* 2018; 43(3):517-530.
- BALTACI A. K., YUCE K. & MOGULKOC R. Zinc Metabolism and Metallothioneins. *Biol Trace Elem Res.* 2018; 183(1):22-31.
- BARISCH C., KALININA V., LEFRANCOIS L. H., APPIAH J., LOPEZ-JIMENEZ A. T. & SOLDATI T. Localization of all four ZnT zinc transporters in Dictyostelium and impact of ZntA and ZntB knockout on bacteria killing. *J Cell Sci.* 2018; 131(23):jcs222000.
- BRAYTON C. F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet.* 1986; 76(1):61-90.
- CHAN C. P., JENG J. H., HSIEH C. C., LIN C. L., LEI D. & CHANG M. C. Morphological alterations associated with the cytotoxic and cytostatic

- effects of citric acid on cultured human dental pulp cells. *J Endod.* 1999; 25(5):354-8.
- CHRIST B., DOENECKE D., HÖHNE W., KIETZMANN T., KOOLMAN J., KÜHN H. & PÜSCHEL G. (2011). *Taschenlehrbuch Biochemie*, Stuttgart, Thieme:513-539.
- COOK J. A. & MITCHELL J. B. Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal Biochem.* 1989; 179(1):1-7.
- COOMBS R. W. & TRUST T. J. The effect of light on the antibacterial activity of beta-thujaplicin. *Can J Microbiol.* 1973; 19(9):1177-80.
- COTTON S. 2024. *Hinokitiol- Molecule of the Month March 2024*. verfügbar unter: <https://www.chm.bris.ac.uk/motm/hinokitiol/hinokitioljs.htm>, aufgerufen 09.03.2024.
- CRAWFORD J. M. & BRAUNWALD N. S. Toxicity in vital fluorescence microscopy: effect of dimethylsulfoxide, rhodamine-123, and Dil-low density lipoprotein on fibroblast growth in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1991; 27A(8):633-8.
- DABBAGH-BAZARBACHI H., CLERGEAUD G., QUESADA I. M., ORTIZ M., O'SULLIVAN C.K. & FERNÁNDEZ-LARREA J. B. Zinc Ionophore Activity of Quercetin and Epigallocatechin-gallate: From Hepa 1-6 Cells to a Liposome Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2014; 62(32):8085-8093.
- DI PETRILLO A., ORRÙ G., FAIS A. & FANTINI M. C. Quercetin and its derivatives as antiviral potentials: A comprehensive review. *Phytother Res.* 2022; 36(1):266-278.
- DING W. Q., LIU B., VAUGHT J. L., YAMAUCHI H. & LIND S. E. Anticancer activity of the antibiotic clioquinol. *Cancer Res.* 2005; 65(8):3389-95.
- DOMON H., HIYOSHI T., MAEKAWA T., YONEZAWA D., TAMURA H., KAWABATA S., YANAGIHARA K., KIMURA O., KUNITOMO E. & TERAOKA Y. Antibacterial activity of hinokitiol against both antibiotic-resistant and -susceptible pathogenic bacteria that predominate in the oral cavity and upper airways. *Microbiol Immunol.* 2019; 63(6):213-222.
- EAGLE H. A Paradoxical Zone Phenomenon in the Bactericidal Action of Penicillin in Vitro. *Science.* 1948; 107(2767):44-5.
- EMRI E., MIKO E., BAI P., BOROS G., NAGY G., ROZSA D., JUHASZ T., HEGEDUS C., HORKAY I., REMENYIK E. & EMRI G. Effects of non-toxic zinc exposure on human epidermal keratinocytes. *Metallomics.* 2015; 7(3):499-507.
- ERDTMAN H. & GRIPENBERG J. Antibiotic substances from the heart wood of Thuja plicata Don. *Nature.* 1948; 161(4097):719.
- FALCON-PEREZ J. M. & DELL'ANGELICA E. C. Zinc transporter 2 (SLC30A2) can suppress the vesicular zinc defect of adaptor protein 3-depleted fibroblasts by promoting zinc accumulation in lysosomes. *Exp Cell Res.* 2007; 313(7):1473-83.
- FERRARI E., WRIGHT-MINOUE J., FANG J. W., BAROUDY B. M., LAU J. Y. & HONG Z. Characterization of soluble hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase expressed in Escherichia coli. *J Virol.* 1999; 73(2):1649-54.
- FINBOW M. E. & HARRISON M. A. The vacuolar H⁺-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. *Biochem J.* 1997; 324 (Pt 3)(Pt 3):697-712.
- GAO M., WANG H. & ZHU L. Quercetin Assists Fluconazole to Inhibit Biofilm Formations of Fluconazole-Resistant Candida Albicans in In Vitro and In

- Vivo Antifungal Managements of Vulvovaginal Candidiasis. *Cell Physiol Biochem.* 2016; 40(3-4):727-742.
- GESTIS-STOFFDATENBANK IFA. 2023. *Zinkchlorid* verfügbar unter: <https://gestis.dguv.de/data?name=001450>, aufgerufen 27.08.2023.
- GIARDINO L., GENERALI L., SAVADORI P., BARROS M. C., DE MELO SIMAS L. L., PYTKO-POLONCZYK J., WILKOŃSKI W., BALLAL V. & ANDRADE F. B. Can the Concentration of Citric Acid Affect Its Cytotoxicity and Antimicrobial Activity? *Dent J (Basel).* 2022; 10(8).
- GROß U. (2013). Kandidose (Candidose). In: GROß, U. (ed.) *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 3. Auflage ed.: Georg Thieme Verlag KG.
- GUANTARIO B., CAPOLUPO A., MONTI M. C., LEONI G., RANALDI G., TOSCO A., MARZULLO L., MURGIA C. & PEROZZI G. Proteomic Analysis of Zn Depletion/Repletion in the Hormone-Secreting Thyroid Follicular Cell Line FRTL-5. *Nutrients.* 2018; 10(12):1981.
- HAMADA S., GOMI M. & YOSHIDA A. Hinokitiol acts against *Porphyromonas gingivalis* by inhibiting Autoinducer-2. *Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi (Journal of the Japanese Society of Periodontology)*. 2021; 14:274.
- HARA T., TAKEDA T. A., TAKAGISHI T., FUKUE K., KAMBE T. & FUKADA T. Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *J Physiol Sci.* 2017; 67(2):283-301.
- HEBER D. & IMMING C. (2017). Clotrimol. *RÖMPP*. Thieme Gruppe.
- HELLWIG E., SCHÄFER E., KLIMEK J. & ATTIN T. (2018). *Einführung in die Zahnerhaltung: Prüfungswissen Kariologie und Parodontologie*, Köln, Deutscher Zahnärzte Verlag:489-501.
- HOANG B. X. & HAN B. A possible application of hinokitiol as a natural zinc ionophore and anti-infective agent for the prevention and treatment of COVID-19 and viral infections. *Med Hypotheses.* 2020; 145:110333.
- HUANG M. H., SHEN Y. F., HSU T. T., HUANG T. H. & SHIE M. Y. Physical characteristics, antimicrobial and odontogenesis potentials of calcium silicate cement containing hinokitiol. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016; 65:1-8.
- HUNG M., GIBBS C. S. & TSIANG M. Biochemical characterization of rhinovirus RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Res.* 2002; 56(2):99-114.
- IHA K., SUZUKI N., YONEDA M., TAKESHITA T. & HIROFUJI T. Effect of mouth cleaning with hinokitiol-containing gel on oral malodor: a randomized, open-label pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013; 116(4):433-9.
- INAMORI Y., SAKAGAMI Y., MORITA Y., SHIBATA M., SUGIURA M., KUMEDA Y., OKABE T., TSUJIBO H. & ISHIDA N. Antifungal activity of Hinokitiol-related compounds on wood-rotting fungi and their insecticidal activities. *Biol Pharm Bull.* 2000; 23(8):995-7.
- INAMORI Y., SHINOHARA S., TSUJIBO H., OKABE T., MORITA Y., SAKAGAMI Y., KUMEDA Y. & ISHIDA N. Antimicrobial activity and metalloprotease inhibition of hinokitiol-related compounds, the constituents of *Thujopsis dolabrata* S. and Z. hondai MAK. *Biol Pharm Bull.* 1999; 22(9):990-3.
- INAMORI Y., TSUJIBO H., OHISHI H., ISHII F., MIZUGAKI M., ASO H. & ISHIDA N. Cytotoxic effect of hinokitiol and tropolone on the growth of mammalian cells and on blastogenesis of mouse splenic T cells. *Biol Pharm Bull.* 1993; 16(5):521-3.
- INOUE Y., SUZUKI R., MURATA I., NOMURA H., ISSHIKI Y. & KANAMOTO I. Evaluation of Antibacterial Activity Expression of the

- Hinokitiol/Cyclodextrin Complex Against Bacteria. *ACS Omega*. 2020; 5(42):27180-27187.
- ISHIDA T. Review on The Role of Zn²⁺ Ions in Viral Pathogenesis and the Effect of Zn²⁺ Ions for Host Cell-Virus Growth Inhibition. *American Journal of Biomedical Science & Research*. 2019; 2(1):28-37.
- ISO (HRSG.) 2009. Biologische Beurteilung von Medizinprodukten (ISO 10993-5:2009). *Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität* Berlin: Beuth Verlag.
- JAYARAMAN S. A novel method for the detection of viable human pancreatic beta cells by flow cytometry using fluorophores that selectively detect labile zinc, mitochondrial membrane potential and protein thiols. *Cytometry A*. 2008; 73(7):615-25.
- JEONG J. H., AN J. Y., KWON Y. T., RHEE J. G. & LEE Y. J. Effects of low dose quercetin: cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *J Cell Biochem*. 2009; 106(1):73-82.
- JIN X., ZHANG M., LU J., DUAN X., CHEN J., LIU Y., CHANG W. & LOU H. Hinokitiol chelates intracellular iron to retard fungal growth by disturbing mitochondrial respiration. *J Adv Res*. 2021; 34:65-77.
- JOHN GORDON, BECKER JÜRGEN & SCHWARZ FRANK. Effects of Taurolidine and Chlorhexidine on SaOS-2 Cells and Human Gingival Fibroblasts Grown on Implant Surfaces. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 2014; 29:728-34.
- JONES C. G. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol 2000*. 1997; 15:55-62.
- KAMBE T., HASHIMOTO A. & FUJIMOTO S. Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014; 71(17):3281-3295.
- KAR N., GUPTA D. & BELLARE J. Ethanol affects fibroblast behavior differentially at low and high doses: A comprehensive, dose-response evaluation. *Toxicol Rep*. 2021; 8:1054-1066.
- KIM D. J., LEE M. W., CHOI J. S., LEE S. G., PARK J. Y. & KIM S. W. Inhibitory activity of hinokitiol against biofilm formation in fluconazole-resistant *Candida* species. *PLoS One*. 2017; 12(2):e0171244.
- KIM K. R., PARK S. E., HONG J. Y., KOH J. Y., CHO D. H., HWANG J. J. & KIM Y. H. Zinc enhances autophagic flux and lysosomal function through transcription factor EB activation and V-ATPase assembly. *Front Cell Neurosci*. 2022; 16:895750.
- KIM M. K., PARK H. J., KIM Y. D., RYU M. H., TAKATA T., BAE S. K. & BAE M. K. Hinokitiol increases the angiogenic potential of dental pulp cells through ERK and p38MAPK activation and hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) upregulation. *Arch Oral Biol*. 2014; 59(2):102-10.
- KNIES K. A. & LI Y. V. Zinc cytotoxicity induces mitochondrial morphology changes in hela cell line. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2021; 13(2):43-51.
- KOMAKI N., WATANABE T., OGASAWARA A., SATO N., MIKAMI T. & MATSUMOTO T. Antifungal mechanism of hinokitiol against *Candida albicans*. *Biol Pharm Bull*. 2008; 31(4):735-7.
- KOOLMAN J. & RÖHM K. H. (2019). *Taschenatlas Biochemie des Menschen*, Stuttgart, Thieme:226.
- KORANT B. D., KAUER J. C. & BUTTERWORTH B. E. Zinc ions inhibit replication of rhinoviruses. *Nature*. 1974; 248(449):588-90.

- KRENN B. M., GAUDERNAK E., HOLZER B., LANKE K., VAN KUPPEVELD F. J. & SEIPELT J. Antiviral activity of the zinc ionophores pyrithione and hinokitiol against picornavirus infections. *J Virol.* 2009; 83(1):58-64.
- KUKIC I., KELLEHER S. L. & KISELYOV K. Zn²⁺ efflux through lysosomal exocytosis prevents Zn²⁺-induced toxicity. *J Cell Sci.* 2014; 127(Pt 14):3094-103.
- LAN W. C., LAN W. H., CHAN C. P., HSIEH C. C., CHANG M. C. & JENG J. H. The effects of extracellular citric acid acidosis on the viability, cellular adhesion capacity and protein synthesis of cultured human gingival fibroblasts. *Aust Dent J.* 1999; 44(2):123-30.
- LE C. Y., YE Y. J., XU J., LI L., FENG X. Q., CHEN N. P., ZHU B. Q., DING Z. S. & QIAN C. D. Hinokitiol Selectively Enhances the Antibacterial Activity of Tetracyclines against *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Spectr.* 2023; 11(2):e0320522.
- LEE H. & KOH J. Y. Roles for H⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase and zinc transporter 3 in cAMP-mediated lysosomal acidification in bafilomycin A1-treated astrocytes. *Glia.* 2021; 69(5):1110-1125.
- LEE S., RIVERA O. C. & KELLEHER S. L. Zinc transporter 2 interacts with vacuolar ATPase and is required for polarization, vesicle acidification, and secretion in mammary epithelial cells. *J Biol Chem.* 2017; 292(52):21598-21613.
- LI J. & WANG Y. Golgi Metal Ion Homeostasis in Human Health and Diseases. *Cells.* 2022; 11(2):289.
- LI L. H., WU P., LEE J. Y., LI P. R., HSIEH W. Y., HO C. C., HO C. L., CHEN W. J., WANG C. C., YEN M. Y., YANG S. M. & CHEN H. W. Hinokitiol induces DNA damage and autophagy followed by cell cycle arrest and senescence in gefitinib-resistant lung adenocarcinoma cells. *PLoS One.* 2014; 9(8):e104203.
- LI Y., ALMASSALHA L. M., CHANDLER J. E., ZHOU X., STYPULA-CYRUS Y. E., HUJSAK K. A., ROTH E. W., BLEHER R., SUBRAMANIAN H., SZLEIFER I., DRAVID V. P. & BACKMAN V. The effects of chemical fixation on the cellular nanostructure. *Exp Cell Res.* 2017; 358(2):253-259.
- LI Y. & MARET W. Transient fluctuations of intracellular zinc ions in cell proliferation. *Exp Cell Res.* 2009; 315(14):2463-70.
- LI Y. V. Zinc and insulin in pancreatic beta-cells. *Endocrine.* 2014; 45(2):178-89.
- LIN C. P., WANG Y. L., SHEN L. J. & LIN C. P. The dentin permeability of anti-inflammatory and antibacterial drugs: In vitro study. *J Formos Med Assoc.* 2019; 118(4):828-832.
- LIU J. X., WERNER J., KIRSCH T., ZUCKERMAN J. D. & VIRK M. S. Cytotoxicity evaluation of chlorhexidine gluconate on human fibroblasts, myoblasts, and osteoblasts. *J Bone Jt Infect.* 2018; 3(4):165-172.
- LU Q., HARAGOPAL H., SLEPCHENKO K. G., STORK C. & LI Y. V. Intracellular zinc distribution in mitochondria, ER and the Golgi apparatus. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2016; 8(1):35-43.
- MAJUMDAR G. & MANDAL S. Evaluation of broad-spectrum antibacterial efficacy of quercetin by molecular docking, molecular dynamics simulation and in vitro studies. *Chemical Physics Impact.* 2024; 8:100501.
- MANDAL A., JHA A. K. & HAZRA B. Plant Products as Inhibitors of Coronavirus 3CL Protease. *Front Pharmacol.* 2021; 12:583387.
- MANDERS E. M. M., VERBEEK F. J. & ATEN J. A. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J Microsc.* 1993; 169(3):375-382.

- MARINS J. S., SASSONE L. M., FIDEL S. R. & RIBEIRO D. A. In vitro genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to EDTA, NaOCl, MTAD and citric acid. *Braz Dent J.* 2012; 23(5):527-33.
- MARIOTTI A. J. & RUMPF D. A. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. *J Periodontol.* 1999; 70(12):1443-8.
- MIYAMOTO D., KUSAGAYA Y., ENDO N., SOMETANI A., TAKEO S., SUZUKI T., ARIMA Y., NAKAJIMA K. & SUZUKI Y. Thujaplicin-copper chelates inhibit replication of human influenza viruses. *Antiviral Res.* 1998; 39(2):89-100.
- MORITA Y., MATSUMURA E., TSUJIBO H., YASUDA M., OKABE T., SAKAGAMI Y., KUMEDA Y., ISHIDA N. & INAMORI Y. Biological activity of 4-acetyltropolone, the minor component of *Thujopsis dolabrata* Sieb. et Zucc. *hondai Mak. Biol Pharm Bull.* 2002; 25(8):981-5.
- MORITA Y., SAKAGAMI Y., OKABE T., OHE T., INAMORI Y. & ISHIDA N. The mechanism of the bactericidal activity of hinokitiol. *Biocontrol Sci.* 2007; 12(3):101-10.
- MULLER H. D., EICK S., MORITZ A., LUSSI A. & GRUBER R. Cytotoxicity and Antimicrobial Activity of Oral Rinses In Vitro. *Biomed Res Int.* 2017; 2017:4019723.
- MURATA I., ITO S. & ASAO T. Tetsuo Nozoe: chemistry and life. *Chem Rec.* 2012; 12(6):599-607.
- NAGAO Y., KAWAHIGASHI Y., KIMURA K. & SATA M. Effect of Oral Care Gel for Burning Mouth Syndrome in a Patient with Hepatitis C: A Case Report. *Case Rep Gastroenterol.* 2017; 11(2):480-487.
- NAGAO Y. & SATA M. Effect of oral care gel on the quality of life for oral lichen planus in patients with chronic HCV infection. *Virol J.* 2011; 8:348.
- NGUYEN T. L. A. & BHATTACHARYA D. Antimicrobial Activity of Quercetin: An Approach to Its Mechanistic Principle. *Molecules.* 2022; 27(8).
- NISHIMURO H., OHNISHI H., SATO M., OHNISHI-KAMEYAMA M., MATSUNAGA I., NAITO S., IPPOUSHI K., OIKE H., NAGATA T., AKASAKA H., SAITOH S., SHIMAMOTO K. & KOBORI M. Estimated Daily Intake and Seasonal Food Sources of Quercetin in Japan. *Nutrients.* 2015; 7(4):2345-2358.
- NOZOE T. ÜBER DIE FARBSTOFFE IM HOLZTEILE DES "HINOKI"-BAUMES. I. HINOKITIN UND HINOKITIOL (Vorläufige Mitteilung). *Bulletin of the Chemical Society of Japan.* 1936; 11(3):295-298.
- NOZOE T., SETO S., KIKUCHI K., MUKAI T., MATSUMOTO S. & MURASE M. On the Synthesis of Hinokitiol (m-Isopropyltropolone). *Proceedings of the Japan Academy.* 1950; 26(7):43-46.
- OLALEYE O. A., KAUR M., ONYENAKA C. & ADEBUSUYI T. Discovery of Clioquinol and analogues as novel inhibitors of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 infection, ACE2 and ACE2 - Spike protein interaction in vitro. *Heliyon.* 2021; 7(3):e06426.
- OSAWA K., MATSUMOTO T., MARUYAMA T., TAKIGUCHI T., OKUDA K. & TAKAZOE I. Studies of the antibacterial activity of plant extracts and their constituents against periodontopathic bacteria. *Bull Tokyo Dent Coll.* 1990; 31(1):17-21.
- PALMITER R. D., COLE T. B. & FINDLEY S. D. ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration. *Embo j.* 1996; 15(8):1784-91.

- PAN S., AN L., MENG X., LI L., REN F. & GUAN Y. MgCl(2) and ZnCl(2) promote human umbilical vein endothelial cell migration and invasion and stimulate epithelial-mesenchymal transition via the Wnt/beta-catenin pathway. *Exp Ther Med*. 2017; 14(5):4663-4670.
- PEREZ D. R., SKLAR L. A. & CHIGAIEV A. Clioquinol: To harm or heal. *Pharmacology & Therapeutics*. 2019; 199:155-163.
- PLATTNER H. & HENTSCHEL J. (2017). *Zellbiologie*, Thieme:267-282.
- QIN Y., DITTMER P. J., PARK J. G., JANSEN K. B. & PALMER A. E. Measuring steady-state and dynamic endoplasmic reticulum and Golgi Zn²⁺ with genetically encoded sensors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(18):7351-6.
- QIN Y., JIANG W., LI A., GAO M., LIU H., GAO Y., TIAN X. & GONG G. The Combination of Paraformaldehyde and Glutaraldehyde Is a Potential Fixative for Mitochondria. *Biomolecules*. 2021; 11(5):711.
- QIU M., CHEN Y., CHU Y., SONG S., YANG N., GAO J. & WU Z. Zinc ionophores pyrithione inhibits herpes simplex virus replication through interfering with proteasome function and NF-κB activation. *Antiviral Research*. 2013; 100(1):44-53.
- RABOUILLE C. & LINSTEDT A. D. GRASP: A Multitasking Tether. *Front Cell Dev Biol*. 2016; 4:1.
- RASSOW J., NETZKER R. & HAUSER K. (2022). *Duale Reihe Biochemie*, Stuttgart, Thieme:385-392.
- READ S. A., OBEID S., AHLENSTIEL C. & AHLENSTIEL G. The Role of Zinc in Antiviral Immunity. *Adv Nutr*. 2019; 10(4):696-710.
- REEDER N. L., XU J., YOUNGQUIST R. S., SCHWARTZ J. R., RUST R. C. & SAUNDERS C. W. The antifungal mechanism of action of zinc pyrithione. *Br J Dermatol*. 2011; 165 Suppl 2:9-12.
- RIVERA O. C., HENNIGAR S. R. & KELLEHER S. L. ZnT2 is critical for lysosome acidification and biogenesis during mammary gland involution. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2018; 315(2):R323-r335.
- RUEDA-FERNANDEZ M., MELGUIZO-RODRIGUEZ L., COSTELA-RUIZ V. J., DE LUNA-BERTOS E., RUIZ C., RAMOS-TORRECILLAS J. & ILLESCAS-MONTES R. Effect of the most common wound antiseptics on human skin fibroblasts. *Clin Exp Dermatol*. 2022; 47(8):1543-1549.
- SAAKRE M., MATHEW D. & RAVISANKAR V. Perspectives on plant flavonoid quercetin-based drugs for novel SARS-CoV-2. *Beni Suf Univ J Basic Appl Sci*. 2021; 10(1):21.
- SAEKI Y., ITO Y., SHIBATA M., SATO Y., OKUDA K. & TAKAZOE I. Antimicrobial action of natural substances on oral bacteria. *Bull Tokyo Dent Coll*. 1989; 30(3):129-35.
- SAKAGUCHI H. [Treatment and Prevention of Oral Candidiasis in Elderly Patients]. *Med Mycol J*. 2017; 58(2):J43-J49.
- SALAZAR-GARCÍA S., GARCÍA-RODRIGO J. F., MARTÍNEZ-CASTAÑÓN G. A., RUIZ-RODRÍGUEZ V. M., PORTALES-PÉREZ D. P. & GONZALEZ C. Silver nanoparticles (AgNPs) and zinc chloride (ZnCl₂) exposure order determines the toxicity in C6 rat glioma cells. *Journal of Nanoparticle Research*. 2020; 22(9):253.
- SALESA B., SABATER I. SERRA R. & SERRANO-AROCA A. Zinc Chloride: Time-Dependent Cytotoxicity, Proliferation and Promotion of Glycoprotein Synthesis and Antioxidant Gene Expression in Human Keratinocytes. *Biology (Basel)*. 2021; 10(11):1072.

- SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC. 2023. *Hinokitiol* (CAS 499-44-5) verfügbar unter: <https://www.scbt.com/de/p/hinokitiol-499-44-5>, aufgerufen 27.08.2023.
- SCAVO S. & OLIVERI V. Zinc ionophores: chemistry and biological applications. *J Inorg Biochem.* 2022; 228:111691.
- SCHWARTZ J. R. Zinc Pyrithione: A Topical Antimicrobial With Complex Pharmaceuticals. *J Drugs Dermatol.* 2016; 15(2):140-4.
- SHIH Y. H., CHANG K. W., HSIA S. M., YU C. C., FUH L. J., CHI T. Y. & SHIEH T. M. In vitro antimicrobial and anticancer potential of hinokitiol against oral pathogens and oral cancer cell lines. *Microbiol Res.* 2013; 168(5):254-62.
- SHIH Y. H., LIN D. J., CHANG K. W., HSIA S. M., KO S. Y., LEE S. Y., HSUE S. S., WANG T. H., CHEN Y. L. & SHIEH T. M. Evaluation Physical Characteristics and Comparison Antimicrobial and Anti-Inflammation Potentials of Dental Root Canal Sealers Containing Hinokitiol In Vitro. *PLOS ONE.* 2014; 9(6):e94941.
- SINGH M. Effect of dimethyl sulfoxide on in vitro proliferation of skin fibroblast cells. 2017; 8:78-82.
- SKALNY A., RINK L., AJSUVAKOVA O., ASCHNER M., GRITSENKO V. , ALEKSEENKO S., SVISTUNOV A., PETRAKIS D., SPANDIDOS D., AASETH J., TSATSAKIS A. & TINKOV A. Zinc and respiratory tract infections: Perspectives for COVID-19 (Review). *International Journal of Molecular Medicine.* 2020; 46(1):17-26.
- SOCRANSKY S. S., HAFFAJEE A. D., CUGINI M. A., SMITH C. & KENT R. L., JR. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998; 25(2):134-44.
- STETTER F. W. & HUGEL T. The nanomechanical properties of lipid membranes are significantly influenced by the presence of ethanol. *Biophys J.* 2013; 104(5):1049-55.
- SUARA R. O. & CROWE J. E., JR. Effect of zinc salts on respiratory syncytial virus replication. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(3):783-90.
- TAN Y., LIN Q., YAO J., ZHANG G., PENG X. & TIAN J. In vitro outcomes of quercetin on *Candida albicans* planktonic and biofilm cells and in vivo effects on vulvovaginal candidiasis. Evidences of its mechanisms of action. *Phytomedicine.* 2023; 114:154800.
- TAO X., ZHANG L., DU L., LU K., ZHAO Z., XIE Y., LI X., HUANG S., WANG P. H., PAN J. A., XIA W., DAI J. & MAO Z. W. Inhibition of SARS-CoV-2 replication by zinc gluconate in combination with hinokitiol. *J Inorg Biochem.* 2022; 231:111777.
- TE VELTHUIS A. J., VAN DEN WORM S. H., SIMS A. C., BARIC R. S., SNIJDER E. J. & VAN HEMERT M. J. Zn(2+) inhibits coronavirus and arterivirus RNA polymerase activity in vitro and zinc ionophores block the replication of these viruses in cell culture. *PLoS Pathog.* 2010; 6(11):e1001176.
- TERNES W. (2013). *Biochemie der Elemente*, Springer-Verlag Berlin
- THE HUMAN METABOLOME DATABASE HMDB. 2023. *beta-Thujaplicin* (HMDB0035213). verfügbar unter: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0035213>, aufgerufen 27.08.2023.
- TONARI K. Antibacterial Activities of Hinokitiol and Related Compounds. *SEIKATSU EISEI (Journal of Urban Living and Health Association).* 1998; 42(5):187-189.
- TRUST T. J. & COOMBS R. W. Antibacterial activity of beta-thujaplicin. *Can J Microbiol.* 1973; 19(11):1341-6.

- VALLEE B. L. & FALCHUK K. H. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological Reviews*. 1993; 73(1):79-118.
- VAZQUEZ-LOPEZ E. Golgi Apparatus as an Indicator of Secretory Activity in Pancreatic Islet Cells. *Nature*. 1940; 146(3705):589-590.
- WANG S., YAO J., ZHOU B., YANG J., CHAUDRY M. T., WANG M., XIAO F., LI Y. & YIN W. Bacteriostatic Effect of Quercetin as an Antibiotic Alternative In Vivo and Its Antibacterial Mechanism In Vitro. *J Food Prot*. 2018; 81(1):68-78.
- WEIDNER J., JARENBACK L., ABERG I., WESTERGREN-THORSSON G., ANKERST J., BJERMER L. & TUFVESSON E. Endoplasmic reticulum, Golgi, and lysosomes are disorganized in lung fibroblasts from chronic obstructive pulmonary disease patients. *Physiol Rep*. 2018; 6(5):e13584.
- WESSELS I., ROLLES B. & RINK L. The Potential Impact of Zinc Supplementation on COVID-19 Pathogenesis. *Front Immunol*. 2020; 11:1712.
- WU H. & ZHAO J. Disruption of the Golgi apparatus mediates zinc deficiency-induced impairment of cognitive function in mice. *Metallomics*. 2019; 11(12):1984-1987.
- WYGANOWSKA-SWIATKOWSKA M., NOWAK A., PASZYNSKA E. & GRZECH-LESNIAK K. Ethanol influence on gingival fibroblasts - a real-time in vitro study. *Ann Agric Environ Med*. 2018; 25(4):647-650.
- WYKOWSKI R., FUENTEFRÍA A. M. & DE ANDRADE S. F. Antimicrobial activity of clioquinol and nitroxoline: a scoping review. *Arch Microbiol*. 2022; 204(8):535.
- XUE J., MOYER A., PENG B., WU J., HANNAFON B. N. & DING W. Q. Chloroquine is a zinc ionophore. *PLoS One*. 2014; 9(10):e109180.
- YE J., XU Y. F., LOU L. X., JIN K., MIAO Q., YE X. & XI Y. Anti-inflammatory effects of hinokitiol on human corneal epithelial cells: an in vitro study. *Eye (Lond)*. 2015; 29(7):964-71.
- YU H., ZHOU Y., LIND S. E. & DING W. Q. Clioquinol targets zinc to lysosomes in human cancer cells. *Biochem J*. 2009; 417(1):133-9.
- ZHAO C., CHEN X., YANG C., ZANG D., LAN X., LIAO S., ZHANG P., WU J., LI X., LIU N., LIAO Y., HUANG H., SHI X., JIANG L., LIU X., DOU Q. P., WANG X. & LIU J. Repurposing an antidandruff agent to treating cancer: zinc pyrithione inhibits tumor growth via targeting proteasome-associated deubiquitinases. *Oncotarget*. 2017a; 8(8):13942-13956.
- ZHAO J., LI B., HUANG X., MORELLI X. & SHI N. Structural Basis for the Interaction between Golgi Reassembly-stacking Protein GRASP55 and Golgin45. *J Biol Chem*. 2017b; 292(7):2956-2965.

12. Danksagung

Mit einem ehrlichen Gefühl der Wertschätzung möchte ich an dieser Stelle all den wunderbaren Menschen danken, die mich auf meinem Weg zur Promotion begleitet haben.

Zunächst gilt mein besonderer Dank Ihnen, Herr Prof. Matthias Folwaczny, als mein Doktorvater. Ihre wertvollen Ratschläge, die stets konstruktiven Anregungen und Ihre außergewöhnliche Aufmerksamkeit haben maßgeblich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Ein herzliches Dankeschön geht an Dich, Thomas Spinell, für Deine Zuverlässigkeit als Betreuer und Deine stete Erreichbarkeit. Dein offenes Ohr für die Besprechung methodischer Ansätze und neuer Erkenntnisse sowie Ergebnisse war mir eine große Hilfe.

Ganz besonderen Dank möchte ich Brigitte Hackl und Dr. Julia Diegelmann aussprechen. Eure Einführung in die Kunst der Zellkultur, Eure Geduld, Offenheit und das Interesse, jederzeit Ergebnisse zu besprechen und Methoden zu optimieren, waren für mich von unschätzbarem Wert.

Danke, Paola. Als Doktorandin zur gleichen Zeit konntest Du die stressigen und herausfordernden Situationen im Labor besonders gut nachempfinden und hast mit Deinen aufmunternden Worten stets neue Motivation schenken können.

Zuletzt möchte ich diese Arbeit aus tiefstem Herzen und voller Dankbarkeit und Liebe Euch widmen, Claudia und Rainer, da Worte nicht ausreichen, Euch gebührend zu würdigen.

13. Affidavit



Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Eidesstattliche Versicherung

Schrepf, Nicola Julie

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**Hinokitiol und Zink als Wirkkomplex einer Mundspüllösung - in vitro Untersuchungen
von zytotoxischen sowie quantitativen und qualitativen ionophoren
Eigenschaften des Hinokitiol-Zink-Komplexes**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 19.02.2026

Ort, Datum

Nicola Julie Schrepf

Unterschrift Nicola Julie Schrepf