



**MALMÖ HÖGSKOLA**



# **Ascophyllym Nodosum – påverkan på det orala placket och dess proteaser**

## **Experimentell studie**

**Nurda Schwech<sup>1</sup>, Sanja Krupic<sup>2</sup>,**

<sup>1</sup>Dental student, Faculty of Odontology, Malmö University, Malmö, Sweden

<sup>2</sup>Dental student, Faculty of Odontology, Malmö University, Malmö, Sweden

Supervisor: Bertil Kinnby Associate Professor Department of Oral Biology, Malmö University,  
Malmö, Sweden

Email addresses:

NS: otl08061@student.mah.se

SK: ott06021@student.mah.se

BK: bertil.kinnby@mah.se

Masterexamen (30 hp)

Tandläkarprogrammet

February, 2013

Malmö högskola

Odontologiska fakulteten

205 06 Malmö

## **Abstract**

**Aims:** The purpose of this study was to investigate if the alga *Ascophyllum Nodosum* (AN) exerts any effect on protease activity in plaque, if such an effect is present in the algae from the beginning or if it has to be taken orally to exert a systemic effect.

Increased protease activity has been associated with gingivitis and periodontitis. We expected a reduced protease activity, and thus a potentially reduced risk for gingivitis and periodontitis, after ingestion of AN for a month.

**Materials and methods:** One *in vitro* trial with a pilot study, and one *in vivo* trial was carried out. In the *in vitro* trial pulverized and dissolved AN was used to make a solution, tested for protease activity.

In the *in vitro* study 5 subjects, aged 20 to 30 years, participated. Plaque samples were taken before and after ingestion of the algae for 4 weeks. Subjects were instructed not to brush their teeth 12 h before sampling.

**Results:** When combining the results from the pilot and *in vitro* studies, no AN protease activity could be detected. Our *in vivo* results showed an increased protease activity in the plaque after a month of AN intake.

**Conclusion:** This study indicates a tendency to an increased protease activity caused by *Ascophyllum Nodosum*. However, the study did not examine which protease was affected. Because of the complexity in the oral environment and the many different types of protease, more studies need to be executed to study the exact effects of AN on the oral environment.

**Keywords:** *Ascophyllum Nodosum*, biofilm formation, dental calculus, dental pellicle, dental plaque, fluorometer, protease,

## Sammanfattning

**Syfte:** Syftet med denna studie var att studera huruvida algen *Ascophyllum Nodosum* (AN) utövar någon effekt på proteasaktivitet i oralt plack, samt om effekten finns i algen från början eller om man måste inta den oralt för att få en systemisk effekt.

En förhöjd proteasaktivitet har förknippats med gingivit och parodontit. Vi förväntar oss en minskad proteasaktivitet hos försökspersonerna, och därmed en minskad risk för gingivit och parodontit, efter intag av AN under en månads tid.

**Material och metod:** Ett *in vitro* med en pilotstudie, och ett *in vivo* försök utfördes. I *in vitro* försöket användes pulveriserat och upplöst *Ascophyllum Nodosum*. I *in vitro* studien deltog 5 personer i åldersgruppen 20 till 30 år. Plackprover på försökspersonerna togs före och efter intag av algen i 4 veckor. Under båda försökstillfällena fick försökspersonerna inte ha borstat tänderna på 12h innan försöket.

**Resultat:** Vid kombinerad av pilotstudien och *in vitro* studien ses ingen signifikant skillnad gällande *Ascophyllum Nodosums* proteasaktivitet i pulveriserad form.

Våra resultat erhållna från *in vivo* studien visar att det har skett en ökad proteasaktivitet i placket hos försökspersonerna efter en månads intag av *Ascophyllum Nodosum*.

**Konklusion:** Denna studie visar på en tendens till en ökad proteasaktivitet orsakad av *Ascophyllum nodosum*. Studien har inte undersökt vilka proteaser som påverkats. På grund av komplexiteten i den orala miljön och de många olika typerna av proteaser, behöver fler studier utföras för att studera de exakta effekterna på den orala miljön.

**Sökord:** *Ascophyllum Nodosum* biofilm formation, dental calculus, dental pellicle, dental plaque, fluorometer, protease,

# Introduktion

## Ascophyllum Nodosum

### Ursprung

Idén om algtabletten uppkom när en tandläkare observerade en av sina egna patienter som ständigt hade haft problem med tandsten. Vid ett besök observerade tandläkaren en stor förbättring vad gäller plack och tandstensmängden. Patientens munhygienvanor hade inte förändrats, och inte heller kvaliteten på hans tandvård. Hans diet däremot hade förändrats relativt kraftigt. Patienten hade börjat äta en sallad innehållande en särskild färsk tång: *Ascophyllum Nodosum* (AN) [1].

### Skörd och innehåll

Algen *Ascophyllum Nodosum* är en stor brunalgsart som tillhör familjen *Fucaceae*, och är den enda arten i släktet *Ascophyllum*. Denna tång som vanligtvis skördas i norra Atlanten, är främst vanlig på den nordvästra kusten av Europa (från Svalbard till Portugal) [1].

De näringsämnen som förekommer i de högsta koncentrationerna hos *Ascophyllum Nodosum* är alginsyra, fenol, fukoidan, mannitol, laminaran, sulfaterad fucoidan, D-vitamin och jod. *Ascophyllum Nodosum* innehåller också flera mineraler och spårämnen som är avgörande för enzymer eller hormoner, t.ex. magnesium, mangan, zink, kobolt, krom och selen [1].

### Biologiskt aktiva substanser

Det finns inte så mycket information gällande de biologiskt aktiva substanserna i algen. Det man för närvarande vet är att algen innehåller en hög halt av fukos-innehållande sulfaterade polysackarider (dvs. fucoidan). Dessa föreningar har visat sig interferera med bakteriell kolonisering och tandsten samt indirekt även plack-relaterad halitos [2-4].

### **Andra användningsområden**

Ascophyllum Nodosum används i stor utsträckning vid framställning av alginsyra och caregeenan, polysackarider som vanligen används som livsmedelstillsatser för förtjockning av glass och andra mejeriprodukter. Den används också som en fodertillsats hos nötkreatur och som jordförbättringsmedel och gödningsmedel [1].

### **Tidigare undersökningar**

Tidigare har flera försök och studier utförts för att förhindra bildning av dentalt plack och tandsten genom lokalt tillämpade kemiska produkter. Bland annat genom att integrera antiseptika i tandkrämer och munvatten. Emellertid finns det för närvarande begränsad kunskap om möjligheten att störa plack och tandsten genom medel via den systemiska vägen. Det har gjorts en studie som visar att ett kosttillskott som innehåller den bruna algen Ascophyllum Nodosum SW1313 (ProDen PlaqueOff, SweDenCare AB, Sverige), och intas dagligen, signifikant minskar etablerad supragingival plack och tandsten hos människor [1].

De vaxbelagda kapslarna, som för övrigt nu är kommersiellt tillgängliga, användes i deras studie. Då kapslarna intogs hela, drog författarna slutsatsen att effekterna som erhöles på plack och tandsten berodde på en systemisk absorption av algkomponenterna, och således inte på en ren lokal effekt.

### **Pellikeln**

Pellikeln bildas på tänderna och är en acellulär, bakteriefri organisk film som har en avgörande roll mellan den dentala biofilmen och emaljytan. Pellikeln bildas på tänder som blivit noggrant rengjorda och kommer i kontakt med saliv, samt på nyerumperade tänder [5,6,]. Pellikeln bildas framför allt av salivens glykoproteiner och andra proteinkällor, saliv, bakteriekomponenter och deras produkter, gingivalvätska, blod,

mat och emaljväska. Dessa komponenter i sin tur gör att bakterierna fäster till pellikeln och därmed koloniserar tandytan [5,7,8,9].

Pelliceln främsta uppgifter är att skydda mot demineralisering och att verka som ett smörjmedel vid tuggning [5]. Pellicelns acellulära lager av skyddande proteiner binder via staterin, prolinrika proteiner och mucinösa salivproteiner gärna till tandytan, som består av hydroxylapatit [6].

Pelliceln fungerar som ett smörjande lager i munhålan, samt fungerar som en buffert och erosionsbarriär. Dessutom verkar pellicelns salivkomponenter hämmande mot de skadliga bakteriernas produkter i biofilmen [6]. Å andra sidan underlättar pellicelns egenskaper bakteriell adhesion, då den i ett senare skede blir ett bindningsställe och därmed inbjuder till biofilmbildningen. Pelliceln innehåller amylas, PRPs, mucin MG2, fibrinogen och lysozym vilka verkar som receptorer för framtida bakteriefäste. Med andra ord är pelliceln gränslaget som reglerar relationerna mellan tand, saliv och syror [5,6,9,10].

**Pellicelbildningen sker i två steg:**

Nästan direkt efter rengöring av tandytan sker den första pellicelbildningen. Fosfoproteiner, som är de första som binder in till tandytan, har hög bindningstendens till hydroxylapatit. Tack vare elektrostatiske interaktioner adsorberas de små proteinerna till tandens hydrofoba ytor. Dessutom bidrar jonbindningar, hydrofoba bindningar och van der Waals krafter till pellicelns proteinrikedom. Det som sker är att proteinernas hydrofoba delar blottas på ytan. Proteinerna vecklar först ut sig och plattas ut, för att på så sätt öka sin tvärsnittsarea och skapa snabb yttäckning [5,6,9].

Därefter adsorberar proteinklumpar till tandens otäckta ytor. [5,9]. De inre mognadsprocesserna är därför beroende av enzymer i pelliceln [8]. Efter 30-90 minuter når pelliceln en plåt där proteinansamlingar har huvudrollen i pellicelns

snabbt växande tjocklek. Fastän pelliceln når sin fulla tjocklek vid detta moment så krävs det ytterligare tid för att den ska mogna, nästan ett helt dygn [5,6,9].

Enzymet transglutaminas tvärbinder pellicelproteiner som PRPs, histatiner och cystatiner. Under mognadsprocessen gynnar därför enzymaktivitet en strukturell pellicelremodellering och genom detta blir pelliceln syra-resistent. Transglutaminas ger också pelliceln stabilitet och möjliggör förändringarna som sker i pellicelkomponenterna efter absorption [5, 8].

### **Biofilmen**

Biofilmen är ett mångsidigt samhälle på tandytan nedbäddat i en matris av salivkomponenter och bakterieprodukter. Dentalt plack uppstår genom successiv tillväxt:

1. Uppkomst av en smörjande film (pelliceln) på tandens yta.
2. Samspel mellan pelliceln och salivbakterier
3. Adhesion av de senare kolonisatorerna till de tidigare.
4. Skiktbildning i vertikal- och horisontalled.
5. Progressionstillväxt och bildning tills samhället når sin höjdpunkt [10].

### **Fas I**

Man antar att krafter som inverkar på långt håll tvärsigenom pelliceln attraherar de första mikroorganismerna. Detta gör att pelliceln utgör en bas för utvecklingen av den dentala biofilmen [5,9].

Förhållandevis få arter kan kolonisera en ren tandyta genom att adherera till pellicelns glykoproteiner [11]. Tidiga bakteriekolonisatorer från saliven fäster i pelliceln via den

aktiva rollen hos alfa-amylas, staterin och PRPs, då de tillåter mikrober att kraftigt binda till sina ytor genom hydrofoba, elektrostatiska och van der Waals krafter[5,6,7].

## **Fas II**

När de primära kolonisatorerna har fäst till tandytan och börjat fortplanta sig så kan andra arter co-aggregera med dem [11]. Via receptorer kan bakterieceller binda till tidiga bakteriers cellytor som är bundna till ytan. Co-aggregation är en av de viktigaste mekanismerna gällande oral bakteriekolonisation och är en specifik cell-till-cellreaktion som sker mellan bakterier. Genom adhesiner binder tidiga kolonisatorer till pellicelreceptorer längst in i biofilmen. Sekundära kolonisatorer binder till bakterier som redan tidigare fäst till hydroxylapatiten. Denna nästkommande bindning medför en yta som utvecklar en brygga med de angränsande bakteriecellerna [9].

I den sekundära kolonisationen är det fusobacterium som innehar huvudrollen. De har egenskapen att samspela med flera olika bakteriearter och har således en ledande roll i plackbildning. Tack vare fusobacterium kan de senare kolonisatorerna binda in till biofilmen som annars inte hade kunnat binda in då de inte har de vidhäftande egenskaperna som krävs. Därför är denna bakterieart en väsentlig komponent vid den orala biofilmbildningen [7,11]. Biofilmens egenskaper ändras då flera bakterier binder in till den, syre utnyttjas av de fakultativt anaeroba i det tidiga placket vilket gör att biofilmen blir anaerob och möjliggör kolonisation av obligata anaerober, speciellt veillonella, prevotella och fusobacterium [11]. Då biofilmen blir fullt utvecklad bildas det en bakteriell mångfald i placket med aeroba, fakultativt anaeroba och anaeroba bakterier som lever i ett samspel [6].



## **Tandsten**

Tandsten är enkelt beskrivet ett mineraliserat plack som i huvudsak består av kristallinformiga salter, främst kalciumfosfatsalter som täcks av ett omineraliserat bakterielager [12, 13]. Bildningen av tandsten föregås alltid av utveckling av en bakteriell biofilm. Denna biofilm utgör i sin tur grunden för efterföljande placks förkalkning, dvs placket på tandytorna förkalkas först efter att pelliceln under den bakteriella plackskiktet också genomgått förkalkning [14]. Laktatdehydrogenas, alkaliskt fosfatas och surt fosfatas aktiviteter som upptäckts i plack, pekar på att förkalkning av dentalt plack inte bara är ett passivt mineraliseringsförlopp av icke-viåbla mikroorganismer, utan även en aktiv process som stöds av enzymer bildade från det bakteriella lagret [15].

Saliv är mineralkällan för förkalkning av supragingival tandsten, medan gingivalvätska ger mineraler för mineralisering av subgingival tandsten. Mineralisering kännetecknas av bindning av kalciumjoner till kolhydrat-protein-komplex i det organiska matrixet och leder till utfällning av kristallina kalciumfosfatsalter [14]. Kristallerna utvecklas inledningsvis i det intercellulära matrixet och på bakteriella ytor, därefter inom bakterierna [16].

Utveckling, mängd och sammansättning av tandsten varierar från person till person och även från plats till plats och över tiden [16]. Mängden tandsten påverkas av många variabler, såsom ålder, kön, etnisk bakgrund, kost, plats, munhygien, bakteriell sammansättning, värdsvarsskillnader, tillgång till professionell rengöring, psykiska eller fysiska handikapp, systemiska sjukdomar och läkemedel [17]. Man har även hittat i undersökningar ett signifikant samband mellan rökning och subgingival tandsten [13-18]. Även parodontit är starkt förknippat med närvaron av tandsten på rotytor.

För avlägsnande av tandsten har man i studier funnit att subgingival scaling med kyretter på enrotiga tänder är ett relativt effektivt tillvägagångsätt för borttagning av de bakteriella beläggningarna från rotytan, rester av tandsten beräknades till ca 5-30% av alla de behandlade ytorna [19]. Dessa resultat indikerar att fullständig borttagning av tandsten kan vara omöjlig. I andra studier har man kommit fram till att det är mycket svårt att rengöra flerrotiga tänders rotytor samt approximalytor [20]. 68% av molarytor som hade blivit behandlade med kyrettagage visade kvarvarande rester av tandsten [21]. Utöver detta kan vid mekaniskt avlägsnande av rotytefast tandsten och bakteriella beläggningar avsevärda mängder cement och dentin också avlägsnas [22-24].

### **Proteaser**

Proteaser är en grupp av essentiella enzymer som katalyserar nedbrytningen av bindningarna mellan aminosyror i proteiner, genom en reaktion kallad hydrolys. Denna reaktion, addition av en vattenmolekyl, är termodynamiskt fördelaktig, och sker därför spontant. Utan ett proteas som hjälper till kommer dock reaktionen att ske extremt långsamt. Okatalyserad beräknas reaktionstiden för en typisk peptid vid neutralt pH ta mellan 10 och 1000 år [25].

Proteaser kan delas in i endopeptidaser, om klyvningen sker inne i en peptidkedja, eller exopeptidaser, om de klyver loss aminosyror vid ändarna. Proteaser har en viktig uppgift i organismen genom att de bryter ner proteiner som har uppfyllt sitt syfte till enskilda aminosyror för att sedan kunna syntetisera nya proteiner cellen behöver [26]. Plack är den huvudsakliga etiologiska faktorn för parodontala sjukdomar och innehåller flera proteolytiska enzymer [26]. Ursprunget för dessa proteinaser och

vilka mekanismer som inducerar den parodontala sjukdomen är ej fullständigt undersökta.

Ett centralt inslag i parodontala sjukdomar som slutligen leder till tandlossning är förstörelsen av extracellulär matrix (ECM) proteiner i den parodontala vävnaderna. De proteinaser som ansvarar för denna vävnadsförstörelse kan härledas både från plack-bakterier och värdens egna celler [27]. Enkelt kan det beskrivas som att den parodontala vävnadsdestruktionen återspeglas i den intilliggande GCF (gingival crevicular fluid) och saliv och deras förhöjda proteinasaktiviteter. I det mogna tandplacket är de mest dominerande typerna av kollagenas/gelatinas, PMN collagenase (MMP-8) och gelatinas (MMP-9). Andra proteaser som finns i dentalt plack, antingen från PMNs (katepsin G) eller från plackbakterier, kan fungera som *in vivo* aktivatörer av proMMP-8 och proMMP-9. Alltså har plack även en potential att tjäna som en reservoar för PMN-producerade proMMP i samband med parodontal inflammation [28].

### **Syfte**

Tidigare studier tyder på att *AN* har en positiv, sannolikt endogen effekt genom att hämma utvecklingen av dentalt plack och tandsten. Orsakerna till den positiva effekten är inte kända, men författarna för fram teorin att en aktiv komponent i *AN* har en inhiberande effekt på kolonisering och tillväxt av bakterier i placket.

För att utreda hur *AN* kan tänkas påverka den gingivala hälsan var syftet med våra studier att undersöka

1. om *AN* har en direkt förmåga att påverka proteasaktiviteten *in vitro*
2. om *AN in vivo*, genom intag av kapslar, påverkar proteasaktiviteten i bakterieplacket för försökspersoner

## Material och metod

### Fluorometern

En fluorometer (Figur 1) används för att mäta fluorescens-parametrar. För att kunna göra detta behöver man använda sig av ett fluorescerande indikatorämne. I många fall använder man sig av en syntetisk organisk förening i pulverform kallad FITC (Fluoresceinisotiocyanat). FITC som ofta är löst i vatten eller alkohol används för att fästa en fluorescerande etikett på proteiners aminogrunder, d.v.s. isotiocyanatgruppen reagerar med aminer i proteinerna. Det har använts för märkning av proteiner, inklusive antikroppar och lectiner [30-32].

Fluorometern kan användas för att studera reaktioner i biologiska system genom att mäta interaktioner med fluorescerande molekyler, såsom proteasaktiviteten i vårt fall. Dessa interaktioner kan övervakas genom att skillnader i fluorescerande egenskaper hos olika biologiska system mäts. Fluorescens är fotonemissionsprocesser som sker då molekylerna hamnar i vila efter att de har gått från ett elektroniskt laddat tillstånd [33].

En ljuskälla belyser provet med en specifik våglängd och exciterar den fluorescerande substansen; en ljusdetektor mäter det ljus som emitteras från provet. Mängden av det emitterade ljuset beror på molekylkoncentrationen [34].

### Studieupplägg

Först utfördes en pilotstudie med bakteriesuspension samt trypsin som testproteas. En fluorescerande markör, FITC-märkt casein, användes som substrat för proteasaktivitet. I första brunnen lades som negativ kontroll endast PBS (buffertlösning) samt FITC-casein, detta för att läsa av fluorescensen i baslösningen som vi använde i alla brunnar.

Därefter gjordes en *in vitro* studie med avsikten att studera proteasaktiviteten hos AN, genom att jämföra fluorescensen hos AN med fluorescensen i baslösningen kan man studera huruvida AN har en proteasaktivitet eller inte. För att studera den endogena effekten av AN gjordes även en *in vivo* studie.

#### **Pilotstudie**

- 1) PBS 100  $\mu$ l + 1  $\mu$ l FITC
- 2) PBS 100  $\mu$ l + 1  $\mu$ l FITC + 30  $\mu$ l bakteriesuspension gjord på *S. gordonii*
- 3) PBS 100  $\mu$ l + 1  $\mu$ l FITC + 15  $\mu$ l bakteriesuspension gjord på *S. gordonii*
- 4) PBS 100  $\mu$ l + 1  $\mu$ l FITC + 30  $\mu$ l trypsin

Man ser en ökning i alla brunnar efter 24 timmar utom i brunn 1 som kvarstår relativt stabilt (Tabell 1). Orsaken till detta kan man tänka sig beror på att vid de tidiga avläsningarna så flyter merparten av bakterierna runt och orsakar en störning i avläsningen. Efter 24 timmar har dock den större delen av bakterierna sjunkit och mer korrekta värden erhålls.

#### ***In vitro*-studie**

I experimentet användes kommersiellt tillgängliga alginnehållande kapslar (ProDen PlaqueOff, SweDenCare AB, Sverige). Kapselinnehållet löstes upp i 1 ml ultrafiltrerat H<sub>2</sub>O (Figur 2) För att blandningen skulle lösas upp mixades den i en Vortex-mixer och därefter centrifugerades med 2000 varv/min i 2 minuter. Efteråt späddes lösningen 10 gånger dvs till 0,1 ml lösning tillsattes 0,9 ml ultrafiltrerat vatten. Lösningen mixades därefter ytterligare en gång i Vortex-mixern för att sedan centrifugeras återigen, i 2000 varv/minut. Detta gjordes för att det skulle gå att avläsa proteasaktiviteten med hjälp av fluorometern. Lösningen hälldes i tre olika brunnar i en 96-håls platta (Nunclon, Nunc, Figur 4).

I de två första brunnarna mättes 200  $\mu$ l av alglösningen upp, dvs dubbelt så mycket som användes i pilotstudien, detta för att erhålla en optimal koncentration avseende

AN. I en brunn för positiv kontroll sattes 150 µl PBS samt 50 µl trypsin och i en brunn för negativ kontroll sattes enbart 200 µl av alglösningen. Nästa steg var att tillsätta 1 µl FITC-casein i de tre första brunnarna. Proven lästes därefter av med jämna mellanrum i fluorometern (Tabell 2). Mellan avläsningarna placerades 96-hålsplattan i ett 37-gradigt värmeskåp.

- 1) 200 µl *Ascophyllum Nodosum* lösning + 1 µl FITC-casein
- 2) 200 µl *Ascophyllum Nodosum* lösning + 1 µl FITC-casein
- 3) PBS 150 µl + 50 µl trypsin + 1 µl FITC-casein
- 4) 200 µl *Ascophyllum Nodosum* lösning

#### ***In vivo* studie**

Studien utfördes på Odontologiska fakulteten, Malmö högskola. 5 patienter mellan 20 och 30 år ingick i studien, varav 2 var män och 3 var kvinnor. Dessa personer bestod av frivilliga studenter från skolan. Försökspersonerna var friska och hade inga allmänsjukdomar som hade försvårat intag av alginnehållande kapslar. Plack insamlades vid två tillfällen. Inför båda plackprovtagningstillfällen instruerades försökspersonerna att inte borsta tänderna 12 h innan provtagningen, detta för att få erforderliga mängder plack som kan vara mätbara. De fick inte heller använda några orala hjälpmedel, såsom tungskrapa, fluor skölj, sockerfria tuggummi osv. Försökspersonerna blev tydligt instruerade att svälja 100 % alginnehållande kapslar hela, en tablett två gånger om dagen. Deltagarna ombads även att behålla sina normala munhygienrutiner under de 4 veckorna försöket skulle pågå. Plackprov samlades från försökspersonernas buckala del på tanden 26, med hjälp av en quickstick (Figur 3). Proteasaktiviteten mättes i plack pga. av dess komplexa bakteriemiljö; placket är en av kroppens biofilmer och innehåller karies- och parodontitrelaterade bakterier. Det är också vedertaget att proteasaktiviteten är större i placket än i saliven [1], därför togs plackprov på patienterna.

Analysen utfördes i 96-håls plattor (Nunclon, Nunc, Figur 4). Buffrad saltlösning (PBS, 100 µl) sattes till sju brunnar. En för vardera försöksperson och två som kontroll. Plackproverna lades direkt i fem av de PBS-fyllda brunnarna och rördes om. I nästa steg sattes 1 mikroliter FITC-casein till samtliga 7 brunnar. I den sjunde tillsattes även 30µl trypsin (ett aktivt proteas som används som positiv kontroll). Därefter sattes plattan i ett 37 gradigt värmeskåp med fuktig atmosfär för att hindra avdunstning mellan avläsningarna.

96-hålsplattan sattes i fluorometern och programmet som valdes var proteastest. Första läsningen gjordes precis efter att plackproverna var tagna, sedan gjordes samma avläsning efter 1h, efter 2h, efter 3h och efter 24h (Tabell 3).

Försöket utfördes på identiskt sätt efter fyra veckors användning av alginnehållande kapslarna. Vid bägge avläsningarna användes trypsin som positiv kontroll och patientproverna uttrycktes i procent av denna (Tabell 3 och 4).

Fluorescensmätningar utfördes enligt nedanstående:

1. Kontroll PBS 75 µl + 1µl FITC-casein
2. Plack från försöksperson 1 + PBS 75 µl + 1µl FITC-casein
3. Plack från försöksperson 2 + PBS 75 µl + 1µl FITC-casein
4. Plack från försöksperson 3 + PBS 75 µl + 1µl FITC-casein
5. Plack från försöksperson 4 + PBS 75 µl + 1µl FITC-casein
6. Plack från försöksperson 5 + PBS 75 µl + 1µl FITC-casein
7. PBS 75µl + 1µl FITC-casein + 25µl trypsin (som positiv kontroll grupp)
8. Medelvärde baserat på punkt 2-6

## Resultat

### **In vitro**

Vid jämförelse av pilotstudien (Tabell 1) och *in vitro*-studien (Tabell 2) sågs ingen större skillnad mellan brunn 1, som uttrycker basfluorescensen hos FITC-caseinlösningen och fluorescensen i brunnarna med tillsatt AN i *in vitro* studien. AN visade sålunda ingen egen proteasaktivitet i pulveriserad (naturlig) form.

### **In vivo**

Resultaten av proteasmätningarna från *in vivo* försöken visas i Tabellerna 3 och 4 samt i Figur 5. Försöket visar att det förekommer en procentuell ökning på ungefär 20 procent proteasaktivitet i plack hos försökspersonerna efter en månads intag av *Ascophyllum Nodosum* (Tabell 5).

## Diskussion

*In vitro*-försöket visar att det inte förekommer någon proteasaktivitet hos *Ascophyllum Nodosum*, varken vid 0 h eller vid avläsningar gjorda efteråt. I pilotstudien har fluorescens erhållits från brunn 1, vilket motsvarar bakgrundsfluorescensen från FITC-caseinlösningen. Ungefärligt lika högt värde ser man i *in vitro* försöket från brunn 1 och 2 (Tabell 2). Därför kan man dra slutsatsen att *Ascophyllum Nodosum* inte är orsaken till fluorescensvärdena utan att det beror på FITC-caseinlösningen och därmed kan man dra slutsatsen att *Ascophyllum Nodosum* inte har någon proteasaktivitet i sig. Detta i sin tur behöver dock inte hindra att det kan förekomma en systemisk påverkan varför vi gick vidare med ett *in vivo* försök.



Den ökade proteasaktiviteten som sågs i *in vivo* studien kan bero på antingen en ökad bakterieaktivitet eller en ökad bakteriemängd, alternativt en ökning av värdproducerade proteaser. Det har setts en högre proteasaktivitet i djupa fickor hos parodontalt sjuka patienter, jämfört med mindre parodontitdrabbade tandköttsfickor hos samma patienter. Proteasaktiviteten har även visats vara lägre hos gingivitpatienter jämfört med gravt skadade parodontitdrabbade patienter [35]; denna studie visade alltså en högre proteasaktivitet i mer inflammerad stödjevävnad som genomgått en destruktion än vävnad som endast hade varit inflammerad. Fler studier har visat ökad proteasaktivitet, bland annat i form av ökad elastasnivå i munhålan, har setts i samband med parodontit också i andra studier [36].

I en tidigare studie har PlaqueOff visats reducera mängden plack [1]. I vår studie har vi inte gjort några kvantitativa mätningar av plack, utan fokuserat på en kvalitativ parameter som är av betydelse för inflammationsutveckling. Plackmängden kan variera stort mellan olika provtagningstillfällen hos samma person, medan sammansättningen av placket och därmed dess egenskaper förändras långsammare.

I den orala miljön är jämvikt mellan virulensen hos bakteriesammansättningen samt patientens eget försvar mot infektion av stor betydelse. Det anses vara avgörande för huruvida en kolonisation av bakterier kommer att ge upphov till gingivit och vid senare stadie utveckling av parodontit. Vår studie inriktades på att studera proteasaktiviteten i plack, en betydelsefull parameter för inflammationsutvecklingen, och resultaten från vårt *in vivo* försök visade inte att *Ascophyllum Nodosum* har någon fördelaktig påverkan i detta avseende, snarare kunde vi konstatera en ökning av proteasaktiviteten på i medeltal 20 %. Ur studien framgår inte vilka proteaser som har

fått en ökad aktivitet i det orala placket, vilket hade varit önskvärt, däremot vet vi idag att en ökad proteasaktivitet innebär en ökad inflammation och alltså risk för vävnadsdestruktion och sjukdomsutveckling.

Det hade det varit önskvärt att ha med flera försökspersoner i *in vivo* försöket, samt att utföra det under en längre tid för att kunna sammanställa mer data och därmed säkerställa fynden ytterligare. Dessutom har munhålan en komplex miljö pga bland annat biofilm och konstant salivtillförsel och därför kan framför allt inte vårt *in vitro* försök återspegla alla funktioner i munhålan.

## Konklusion

Vår studie tyder på att denna algen *Ascophyllum Nodosum*, intagen i kapselform tycks ha en ökande effekt på proteaser, vilket inte borde förknippas med en positiv effekt för utvecklingen av gingivit och parodontit. Den högre uppmätta proteasaktiviteten skulle kunna bero på att algen påverkar bakteriefloras sammansättning, men det krävs andra försök för att studera detta. Det behövs också fler försök för att undersöka om algen har någon ytterligare påverkan på den orala miljön samt om den är fördelaktig eller ej. Andra verkningsmekanismer skulle kunna påverkas indirekt av proteasaktiviteten i bakterieplacket.

## Referenser

1. Sune Wikner, Christina Timander, Jan Bergström, The systemic effect of a food additive on dental plaque and calculus. [http://www.international-dental.com/id/proden\\_plaqueoff\\_human\\_clinical\\_trials.htm](http://www.international-dental.com/id/proden_plaqueoff_human_clinical_trials.htm)

2. Saeki Y, Kato T, Okuda K. Inhibitory effects of funoran on the adherence and colonisation of oral bacteria. *Bull Tokyo Dent Coll.* 1996; 37: 77-92.
3. Saeki Y, Kato T, Naito Y, Takozoe I, Okuda K. Inhibitory effects of funoran on the adherence and colonisation of mutans streptococci. *Caries Res.* 1996; 30: 119-125.
4. Saeki Y. Effect of seaweed extracts on streptococcus sobrinus adsorption to saliva-coated hydroxyapatite. *Bull Tokyo Dent Coll.* 1994; 35: 9-15.
5. Hara AT, Zero DT. The caries environment: saliva, pellicle, diet, and hard tissue ultrastructure. *Dent Clin North Am.* 2010; 54: 455-67.
6. Franklin García-Godoy and M. John Hicks. Maintaining the integrity of the enamel surface: The role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *J Am Dent Assoc* 2008; 139: 25S-34.
7. K. Hojo, S. Nagaoka, T. Ohshima and N. Maeda. Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development. *J Dent Res.* 2009; 88: 982-990.
8. C. Hannig, B. Spitzmüller, M. Miller, E. Hellwig, M. Hannig. Intrinsic enzymatic crosslinking and maturation of the in situ pellicle. *Archives Of Oral Biology.* 2008; 53: 416-422.
9. Christian Hannig & Matthias Hannig. The oral cavity – a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Invest.* 2009; 13: 123-139.
10. Mark Steven Wolff and Charlie Larson. The cariogenic dental biofilm: good, bad or just something to control? *Braz Oral Res.* 2009; 23: 31-8.
11. W.G. Wade. New aspects and new concepts of maintaining “microbiological” health. *Journal Of Dentistry.* 2010; 38: 21-25.

12. Roberts-Harry EA, Clerehugh V. Subgingival calculus: where are we now? A comparative review. *J Dent.* 2000; 28: 93–102.
13. Bergström J. Tobacco smoking and subgingival dental calculus. *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 81–88.
14. Mandel I. Calculus formation: the role of bacteria and mucoprotein. *Dent Clin North Am.* 1960; 4: 731–738.
15. Friskopp J, Hammarström L. An enzyme histochemical study of dental plaque and calculus. *Acta Odontol Scand.* 1982; 40: 459–466.
16. Hinrichs JE. The role of dental calculus and other predisposing factors. In: Newman MG, Takei H, Klokkevold P, Caranza FA, eds. *Carranzas Clinical Periodontology.* St Louis, MO: WB Saunders. 2006: 170–192.
17. White DJ. Dental calculus: recent insights into occurrence, formation, prevention, removal and oral health effects of supragingival and subgingival deposits. *Eur J Oral Sci.* 1997; 105: 508–522.
18. Pindborg JJ. Tobacco and gingivitis II. Correlation between consumption of tobacco, ulceromembranous gingivitis and calculus. *J Dent Res.* 1949; 28: 460–463.
19. Breininger DR, O’Leary TJ, Blumenshine RV. Comparative effectiveness of ultrasonic and hand scaling for the removal of subgingival plaque and calculus. *J Periodontol.* 1987; 58: 9–18.
20. Gellin RG, Miller MC, Javed T, Engler WO, Mishkin DJ. The effectiveness of the Titan-S sonic scaler versus curettes in the removal of subgingival calculus. A human surgical evaluation. *J Periodontol.* 1986; 57: 672–680.
21. Fleischer HC, Mellonig JT, Brayer WK, Gray JL, Barnett JD. Scaling and root planing efficacy in multicroot teeth. *J Periodontol.* 1989; 60: 402–409.

22. Casarin RC, Ribeiro FV, Sallum AW, Sallum EA, Nociti FH Jr, Casati MZ.  
Root surface defect produced by hand instruments and ultrasonic scaler with different power settings: an in vitro study. *Braz Dent J.* 2009; 20: 58–63.
23. Busslinger A, Lampe K, Beuchat M, Lehmann B. A comparative in vitro study of a magnetostrictive and a piezoelectric ultrasonic scaling instrument. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 642–649.
24. Petersilka GJ, Draenert M, Mehl A, Hickel R, Flemmig TF. Safety and efficiency of novel sonic scaler tips in vitro. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 551–555.
25. Berg, Jeremy M. et al.. *Biochemistry.* 2006; 6: ISBN 978-0-7167-6766-4.
26. Theilade, J. Dental plaque and dental calculus. *Textbook of clinical periodontology.* Copenhagen Munksgaard;1989; 2: 92-128.
27. Sorsa T, Ding Y-L, Salo X, Lauhio A, Teronen O, Ingman X et al. Effects of tetracyclines on neutrophil, gingival and salivary collagenases. A functional and Western-blot assessment with special reference to their cellular sources in periodontal diseases. *Annals of New York Academy of Sciences* 1994; 732: 112- 130.
28. Timo Sorsa, Yan-Li Ding, Tuula Ingman, Tuula Saio, Ulla Westerlund, Markus Haapasalo et al. Cellular source, activation and inhibition of dental plaque collagenase. *J Clin Periodontol.* 1995; 22: 709-717.
29. Schreiber, A.B., and Haimovich, J. *Methods Enzymol.*, 1983; 93: 147-155.
30. Harlow, E. and Lane, D. *Antibodies a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. 1988; 353-355.
31. Bridges, C.D. and Fong, S.L. *Methods Enzymol.* 1982; 81: 65 -77.
32. Costerton J.W, Stewart PS. Battling biofilms. *Sci Am.* 2001; 285: 74-81.

33. Peter TC So, Chen Y Dong. Fluorescence Spectrophotometry. Enc of Life Sciences. 2002; 1-4.
34. Peter TC So, Chen Y Dong. Fluorescence Spectrophotometry. Enc of Life Sciences. 2002; 1-4.
35. Figuerredo CM, Gustafsson A. Protease activity in gingival crevicular fluid: presence of free protease. J Clin Periodontol. 1998; 4: 306-310.
36. P.K. Shetty, T.N. Pattabiraman. Salivary proteolytic activities in periodontitis, gingivitis and diabetes mellitus. Indian J Clin Biochem. 1998; 1: 46-51.

## Tabeller och Figurer

Tabell 1. Pilotstudie för test av proteasaktivitet. För innehåll i respektive brunn - se sidan 13.

Brunn	1	2	3	4
0 h	2472	1860	2080	8657
1 h	2989	2030	2200	9729
2 h	2255	1408	1563	8501
3 h	1986	1215	1456	8367
24 h	2380	4938	5325	8992

Tabell 2. Test av proteasaktivitet hos *Ascophyllum Nodosum in vitro*. För innehåll i respektive brunn - se sidan 14.

Brunn	1	2	3	4
0 h	2630	2653	40650	139
1 h	1853	1522	57317	198
2 h	1684	1316	56568	184
3 h	1701	1395	56051	186
24 h	2676	1926	54239	157

Tabell 3. *In vivo* test av proteasaktiviteten i försökspersonernas bakterieplack i % före intag av *Ascophyllum Nodosum*. För innehåll i respektive brunn - se sidan 15.

	Brunn 1	Brunn 2	Brunn 3	Brunn 4	Brunn 5	Medel
0 h	0,4716	0,349	0,4068	0,4445	0,3542	0,4051
1 h	0,8068	0,2444	0,5867	0,514	0,2627	0,4828
2 h	0,8779	0,2702	0,6101	0,5145	0,2923	0,5133
3 h	0,9271	0,2843	0,6368	0,5215	0,3083	0,5356
24 h	1,485	0,5371	1,12	0,9232	0,636	0,9400
Medel	0,9137	0,337	0,6719	0,5835	0,3706	0,5754

Tabell 4. *In vivo* test av proteasaktiviteten i försökspersonernas bakterieplack i % efter intag av *Ascophyllum Nodosum*. För innehåll i respektive brunn - se sidan 15.

	Brunn 1	Brunn 2	Brunn 3	Brunn 4	Brunn 5	Medel
0 h	0,5336	0,3270	0,3501	0,4304	0,3205	0,3923
1 h	0,9553	0,3012	0,3415	0,7496	0,5374	0,5770
2 h	1,143	0,3326	0,3365	0,8653	0,6479	0,6651
3 h	1,226	0,3319	0,4012	0,9198	0,7117	0,718
24 h	1,601	0,4754	0,9638	1,337	1,173	1,110
Medel	1,092	0,3536	0,4786	0,8604	0,6782	0,6925

Tabell 5. Kvot mellan medelvärden före och efter intag av *Ascophyllum Nodosum*.

	Före/Efter
0 h	0,9683
1 h	1,1950
2 h	1,2957
3 h	1,3409
24 h	1,1810
Medel	1,1962





Figur 1. Fluorometern Fluostar som användes i studien.



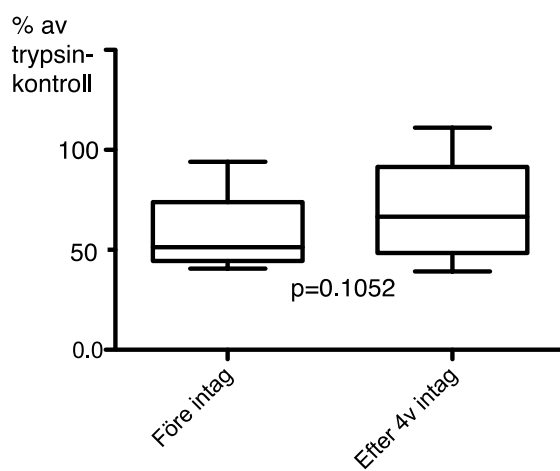
Figur 2. Pipett som användes för att mäta upp lösningarna vid samtliga försök



Figur 3. Tand 26 som plack samlades ifrån



Figur 4. Nunclon (lev Nunc) 96-håls plattan sattes in i fluorometern Fluostar.



Figur 5. In vivo: Jämförelse av försökspersonernas proteasaktivitet före och efter en månads tid av *AN* intag.