

Aus der Poliklinik für Präventive Zahnmedizin,  
Parodontologie und Kariologie  
(Komm. Direktor: Prof. Dr. med. dent. M. Hülsmann)  
im Zentrum Zahn -, Mund- und Kieferheilkunde  
der Medizinischen Fakultät der Universität  
Göttingen

**Wirkung von zwei verschiedenen konzentrierten alkohol-  
freien CHX-Mundspüllösungen auf die Regenerations-  
fähigkeit von humanen Gingivafibroblasten**

Eine *In-vitro*-Studie

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
für Zahnheilkunde  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von  
Natalja Schalaikin  
aus  
Ust-Talowka (Kasachstan)  
Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H.K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. dent. Rainer F. Mausberg

II. Berichterstatter/in: PD Dr. Holger Hänßle

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Elisabeth Zeisberg

Tag der mündlichen Prüfung: 25.02.2014



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
.....	IV
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht.....</b>	<b>4</b>
2.1 Mundhöhlenantiseptik .....	4
2.1.1 Indikationen.....	4
2.1.2 Therapie der Parodontalerkrankungen unter Berücksichtigung der adjuvanten Anwendung von oralen Antiseptika .....	5
2.1.3 Anforderungen an Antiseptika .....	7
2.2 Gebräuchliche Chemotherapeutika .....	8
2.2.1 Cetylpyridiniumchlorid .....	8
2.2.2 Ätherische Öle (Listerine®) .....	9
2.2.3 Triclosan .....	10
2.2.4 Octenidin.....	11
2.2.5 Aminfluorid/ Zinnfluorid (Meridol®) .....	13
2.2.6 Chlorhexidin .....	14
2.3 Zelluläre Nachweismethoden .....	20
2.3.1 Viabilitätsassays (Zytotoxizitätsbestimmungen).....	21
2.3.2 MTT-Test .....	22
2.3.3 Cellometer.....	23
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
3.1 Zellmaterial .....	25
3.2 Kulturbedingungen .....	25
3.3 Zellkulturgefäße .....	25
3.4 Zellmedium, Puffer und Trypsinlösung .....	26
3.5 CHX-Lösungen.....	26
3.6 Subkultivierung von Massenkulturen .....	27
3.6.1 Auftauen tiefgefrorener Zellen .....	27
3.6.2 Kryokonservierung von Zellen .....	31
3.7 Versuchsdurchführung .....	31
3.7.1 Versuchsaufbau .....	31
3.7.2 Behandlung der Zellen .....	32
3.8 Auswertungsmethoden.....	34
3.8.1 Auswertungsvorgehen mittels MTT ( Bestimmung der Viabilität) ....	34
3.8.2 Auswertungsvorgehen mittels Cellometer .....	35
3.9 Statistische Auswertungen .....	36
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>38</b>
4.1 Übersicht.....	38
4.2 Ergebnisse mittels MTT-Test.....	38
4.2.1 Ergebnisse nach Einwirkzeiten und nach Auswertungstagen.....	38

---

4.2.2	Vergleich der CHX-Konzentrationen untereinander .....	40
4.2.3	Vergleich der Auswertungstage untereinander .....	42
4.3	Ergebnisse der optischen Zellzählung .....	43
4.3.1	Ergebnisse nach Einwirkzeiten und nach Auswertungstagen .....	43
4.3.2	Vergleich der CHX-Konzentrationen untereinander .....	45
4.3.3	Vergleich der Auswertungstage untereinander .....	46
4.4	Ergebnisse der Viabilität.....	47
4.4.1	Ergebnisse nach Einwirkzeiten und Auswertungstagen.....	47
4.4.2	Vergleich der CHX-Konzentrationen untereinander .....	50
4.4.3	Vergleich der Auswertungstage untereinander .....	51
4.5	Vergleich von MTT-Test und optischer Zellcharakterisierung mittels Cellometer™ Auto T4.....	52
4.6	Zusammenfassungen der Ergebnisse .....	53
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>54</b>
5.1	Untersuchungsmaterial .....	54
5.2	Beurteilung der Untersuchungsbedingungen.....	57
5.3	Diskussion der Ergebnisse .....	59
5.4	Schlussfolgerung.....	65
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>66</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>68</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>96</b>
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	96
8.2	Tabellenverzeichnis .....	98
8.3	Lebenslauf .....	99
8.4	Danksagung.....	100

## Abkürzungsverzeichnis

ADS	Anti-Discoloration-System
°C	Si-Einheit für Temperatur Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
AmF/SnF <sub>2</sub>	Aminfluorid/Zinnfluorid
ANOVA	Analysis of Variance
ATPasen	Adenosintriphosphatasen
CHX	Chlorhexidin
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CPC	Cetylpyridiniumchlorid
CRP	C-reaktives Protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fa.	Firma
FCS	Fetal Calf Serum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
HGFIB	Humane Gingivafibroblasten
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
KbE	Kolonie- bildende- Einheiten
kg	Kilogramm
LDH	Lactat-Dehydrogenase
Lsg.	Lösung
log	Logarithmus
min	Minute
ml	Milliliter
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaDPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaF	Natriumfluorid
Na-K	Natrium-Kalium
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PVP-Jod	Povidon-Jod
p-Wert	Signifikanzwert; englisch <i>p-value</i>
r	Korrelationskoeffizient
s.o.	siehe oben
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i>
spp.	<i>species pluralis</i>

SPSS	Statistical Package of the Social Sciences
SRP	<i>scaling and rootplaning</i>
Tab.	Tabelle
WST-Test	<i>water soluble tetrazolium</i>

## 1. Einleitung

Die Basis der Therapie parodontaler Erkrankungen ist die Reduzierung und Kontrolle der supra- und subgingivalen Bakterien (Goltz 2010). Dies kann in der konventionellen Therapie allein durch die mechanische Therapie erfolgen (Plagmann 1998). Diese beinhaltet die geschlossene Kürettage, Wurzelglättung und Kontrolle der oralen Mundhygiene. Unklar ist dagegen, ob nach der Behandlung langfristig eine erkennbare Bakterienreduktion erzielt werden kann. Es konnte bereits 1986 von van der Velden et al. und später auch von anderen Studiengruppen dargelegt werden, dass sich parodontopathogene Keime nicht ausschließlich auf dem Sulkusepithel und der übrigen Gingiva etablieren können, sondern auch vermehrt auf dem Zungengrund und den Tonsillenkrypten (van der Velden et al. 1986, Asikainen et al. 1991, Danser et al. 1994, 1996, Swierkot 2008). Folglich sind Bakterien in der Lage, nach der parodontalen Behandlung wiederholt eine Reinfektion des Zahnfleischsulcus zu bewirken. Zudem konnte in zahlreichen Studien nachgewiesen werden, dass bereits behandelte Taschen von nicht behandelten Stellen oft kurzfristig innerhalb eines Behandlungsintervalls oder auch durch Speichelkontakte anderer Personen mit Parodontiden reinfiziert werden können (Christersson et al. 1985, Asikainen et al. 1991, Mombelli et al. 1995, Tinoco et al. 1998). Aus diesem Grunde sind adjuvante Mittel, wie antiseptische Mundspüllösungen, zur Eliminierung und Vermeidung von Reinfektion mit parodontopathogenen Bakterien notwendig. Die antiseptischen Mundspüllösungen werden in der Zahnmedizin vor allem protektiv vor und nach der Therapie von Parodontopathien eingesetzt (Kornman 1987). Eine der am häufigsten eingesetzten Mundspüllösungen in der Zahnmedizin zur Vorbeugung und Therapie von oralen Infektionen ist die Chlorhexidin-Mundspüllösung (Ruppert 2004). Dieses Antiseptikum hat in diversen Untersuchungen im Vergleich mit anderen Substanzen höchste Effektivität in der Plaque- und Gingivitisprophylaxe bewiesen und wird als „Goldstandard“ unter den Mundspüllösungen bezeichnet (Addy 1986, Jones 1997, Netuschil et al. 2002, Brex 2003, Arweiler et al. 2001). Viele Studien haben gezeigt, dass Chlorhexidin (CHX) als Mundspüllösung sehr effektiv in der Reduktion der supragingivalen Plaque und Gingivitis agiert (Gjerme & Rolla 1970, Loe & Schiott 1970, Loe & Schiott 1976, Addy & Moran 1983, Addy 1986, Grossmann et al. 1986, Lang & Brex 1986, Jenkins et al. 1988). Der Wirkstoff Chlorhexidin hat sich nicht nur als wichtiger Bestandteil der adjuvanten Parodontitistherapie etabliert (*one-stage full-mouth disinfection*; Quirynen et al. 1995), sondern wird auch intensiv bei der Therapie von Erkrankungen im Mund-, Kiefer-, Gesichtsbereich (Olsen 1975, Nash et al. 1979), bei Behandlungen vor und nach Operationen (Gjerme 1974, Macfarlane et al. 1984, Addy 1986) und zur täglichen Pflege



manuell und geistig eingeschränkter Patienten eingesetzt (Francis et al. 1987, Kalaga et al. 1989). Aufgrund des breiten Anwendungsspektrums der Chlorhexidin-Mundspüllösung ist es sehr wichtig, die Wirkung dieser Substanz gut zu kennen. CHX wirkt bevorzugt auf Mikroorganismen. Diverse Autoren zeigten jedoch eine schädliche Wirkung des CHX auch auf spezifische humane Körperzellen, wie zum Beispiel Spermazellen (Louis et al. 1985), polymorphkernige Leukozyten (Kenney et al. 1972), Makrophagen (Knuutila & Soerederling 1981), Epithelzellen der Haut, Erythrozyten (Helgeland et al. 1971), Osteoblasten (Bhandari et al. 2001) und Gingivafibroblasten (Alleyn et al. 1991, Cline & Layman 1992, Pucher & Daniel 1992, Babich et al. 1995, Mariotti & Rumpf 1999, Wilken et al. 2001, Chen et al. 2003). Weiterhin ist bekannt, dass die direkte Applikation des Chlorhexidins auf offene Wunden während eines chirurgischen Eingriffes die Wundheilung verzögern beziehungsweise verändern kann (Basetti & Kallenberger 1980). Auf der anderen Seite sprachen Dragoo et al. (1984) eine Empfehlung über die Anwendung von Chlorhexidin speziell nach parodontalchirurgischen Eingriffen aus. Dadurch sollte die Heilung *post operationem* verbessert werden, indem die potenzielle Gefahr einer erneuten bakteriellen Besiedelung und somit die Möglichkeit einer Reinfektion unterbunden wird. Dies bestätigten die Autoren (Dragoo et al. 1984) in einer experimentellen, achtwöchigen Studie, in der sie postoperativ eruierten, dass histologisch eine positive Heilungstendenz der mit Chlorhexidin benetzten obersten Gewebsschichten bestand. Zudem war der klinische Heilungsverlauf sichtbar intensiviert. Auch die Studiengruppe von Brennan et al. (1986) kam zur Erkenntnis, dass die Wundbehandlung mit CHX zu keiner verzögerten Heilung führt. Pitten et al. (2003) konnten hingegen bei ihren klinischen Untersuchungen an leukopenischen Patienten zeigen, dass bei prophylaktischer Anwendung von CHX trotz des Nachweises einer signifikanten Reduzierung der anaeroben und aeroben Bakterienzahlen eine erhöhte Rate an Schleimhautentzündungen und CRP-Erhöhungen auftrat. Ferner wurde eine Hemmung des Gewebewachstums *in vitro* festgestellt (Schnuch et al. 1998), was in tierexperimentellen Versuchen partiell mit einer verzögerten Wundheilung einherging (Kramer et al. 1993).

Anhand der widersprüchlichen Ergebnisse dieser Studien im Bezug auf die Heilungstendenz der Wunden bei Kontakt mit CHX bleibt die Frage ungeklärt, was mit den Grundstrukturen des Parodontiums während und nach der Behandlung mit CHX passiert und ob ein uneingeschränkter Einsatz dieser Substanz bei jeder zahnärztlichen Therapie nicht fraglich ist. Untersuchungen mit klaren, reproduzierbaren Ergebnissen haben nicht nur einen erkenntnistheoretischen, sondern vor allem praktischen Nutzen. Während in Europa die *In-vitro*-Beurteilung der antiseptischen

Aktivität standardisiert ist (European Committee for Standardization 1997, 2002, Pitten et al. 2003), konnte bislang kein standardisiertes Modell für die *In-vitro*-Prüfung der Verträglichkeit von antiseptischen Mundspülungen für das Gewebe etabliert werden. Zwar weisen diverse Studien eine Verträglichkeit der Zellen des Gewebes auf CHX aus, es existieren jedoch nur wenige Studien, in der die Verträglichkeit auf die Gingivafibroblasten der im Handel zu erwerbenden alkoholfreien CHX-Konzentrationen (0,1 %, 0,2 %) mit realistischen Einwirkzeiten geprüft wurden. Des Weiteren bleibt bei allen vorliegenden Studien der mögliche Regenerierungsprozess der Zellen über fünf Tage unbeachtet. Dieses mögliche Regenerierungspotenzial der Zellen ist jedoch notwendig, um die Reversibilität der verursachten Zellschädigung feststellen zu können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, experimentell zu überprüfen, welche Wirkung zwei im Handel erhältliche alkoholfreie CHX-Antiseptika auf die humanen Gingivafibroblasten in Abhängigkeit von der Einwirkzeit haben. In einem zweiten Ansatz sollte das Proliferations- und Regenerationsverhalten von humanen Gingivafibroblasten im Verlauf von fünf Tagen sowohl mit einem Zytotoxizitätstest, basierend auf einer fotometrischen Messung (MTT-Test), als auch mit dem optischen Verfahren der Zellzählung und Vitalitätsbestimmung (Cellometer™) analysiert und vergleichend bewertet werden.

Folgende Arbeitshypothesen wurden formuliert:

- CHX-haltige Mundspüllösungen haben eine zytotoxische Wirkung auf die Gingivafibroblasten, welche konzentrations- und zeitabhängig ist.
- Die Wirkung der beiden Lösungen unterscheidet sich.
- Die Zellen können sich im Laufe von fünf Tagen regenerieren und ihren Stoffwechsel wiederaufnehmen.

## 2. Literaturübersicht

### Mundhöhlenantiseptik

Mundhöhlenantiseptika werden aus prophylaktischer oder therapeutischer Indikation nicht nur in verschiedenen medizinischen Fachbereichen, sondern auch bei Indikationen zur Unterstützung der häuslichen Mundhöhlenhygiene eingesetzt (Pitten et al. 2000, Pitten et al. 2001).

#### 2.1.1 Indikationen

Zahnärztliche Indikationen, in denen Mundhöhlenantiseptika eingesetzt werden können (Bansemir et al. 1993), wurden von Pitten et al. (2001) in einem Leitlinienentwurf der Fachkommission Klinische Antiseptik präzisiert:

- Reduktion der Bakteriämierate bei zahnärztlichen Eingriffen (Bender et al. 1989, Council on Dental Therapeutics AHA 1991, Yamalik et al. 1992)
- Reduktion postoperativer Komplikationen nach Mundhöhleneingriffen (Jokinen 1978, Exner et al. 1988, Tomás et al. 2007)
- Reduktion der Entstehung infektiöser Aerosole in der zahnärztlichen Praxis (Mohammed et al. 1964, Earnest & Loesche 1991, Vacher et al. 1996)
- Wurzelkanalantiseptik (Wennberg 1980, Pitten et al. 2000, Ferraz et al. 2007)
- Schleimhautantiseptik vor intraoraler Anästhesie (Pitten & Kramer 1999, 2001 b)
- Verbesserung der Mundhöhlenhygiene bei behinderten Menschen und älteren Menschen (Yanover 1988, Persson et al. 1991)
- Kariesprophylaxe (Zickert et al. 1982, Huizinga et al. 1990, Lynch & Brighton 1993, Bratthall et al. 1995, Rijkom et al. 1996, Emilson et al. 1999, Splinth et al. 1999, Autio-Gold 2008).

Bei den nächsten drei Punkten liegt der Nutzen einer Mundhöhlenantiseptik zwar nahe, jedoch sind diese Punkte nur schwach durch evidenzbasierte Studien gesichert oder es liegen widersprüchliche Ergebnisse vor:

- Verbesserte Mundhygiene bei immunsupprimierten Patienten (Sheperd 1978, Dreizen et al. 1979, Mc Elroy 1984)
- Prävention und Therapie der chemo- oder radiotherapieinduzierten Mukositis (Spijkervert et al. 1989, Feretti et al. 1990)
- Mundhöhlenpflege bei Beatmungspatienten (De Riso et al. 1996).

Das Ziel der Mundhöhlenantiseptik ist die Vernichtung, Inaktivierung und/oder Entfernung unerwünschter Mikroorganismen bei gleichzeitiger Verhinderung einer störenden mikrobiellen Kolonisation (Pitten & Kramer 2001 b); dabei sollen die oralen Antiseptika die Mundschleimhaut nicht angreifen und möglichst eine schützende bzw. die Wundheilung fördernde Wirkung entfalten. Die oben nicht erwähnte Hauptindikation der oralen Antiseptika findet Anwendung vor allem in der Parodontologie (Ruppert 2004).

### **2.1.2 Therapie der Parodontalerkrankungen unter Berücksichtigung der adjuvanten Anwendung von oralen Antiseptika**

Grundsätzlich wird derzeit zwischen konservativen, chirurgischen, adjuvanten und chemotherapeutischen Therapiemethoden in der Parodontalbehandlung unterschieden, die sowohl separat als auch kombiniert eingesetzt werden (Goltz 2010). Die Voraussetzung einer erfolgreichen Parodontaltherapie ist zunächst bei allen Therapieformen die Beseitigung der supra- und subgingivalen mikrobiellen Beläge, da diese zunächst die Ursache parodontaler Erkrankungen darstellen (Plagmann 1998). Durchgesetzt hat sich heute die konservative, nicht-chirurgische, mechanische Therapieform, die das *scaling und rootplaning* (SRP) beinhaltet (Cobb 1996). In Kombination mit der supragingivalen Plaquekontrolle wird sie heute als der „Goldstandard“ zur Therapie der chronischen Parodontitis angesehen (Van der Weijden & Timmerman 2002).

Die mechanische Therapie erfolgt heute mittels handelsüblicher Küretten und mit rotierenden oder ultraschallbetriebenen Instrumenten (Plagmann 1998). Jedoch hat die Studiengruppe von Bollen und Quirynen (1996) festgestellt, dass eine vollständige Entfernung aller subgingivalen Bakterien oder der Konkremente weder mit Handinstrumenten noch mit ultraschallbetriebenen Instrumenten erreicht wird, die teilweise Entfernung jedoch dazu beitragen kann, die klinischen Zeichen der Infektion wie die Blutung, die Taschentiefen sowie die Zahnbeweglichkeit zu reduzieren (Lindhe et al. 1984, Badersten 1987). Nach der Zusammenfassung vieler Studien lässt sich schlussfolgern, dass zwar direkt nach dem SRP eine Reduktion der totalen Bakterienzahl um 90 % zu erzielen ist (Magnusson et al. 1984), eine vollständige Bakterieneliminierung hingegen nicht zu verwirklichen ist, da die Mikroorganismen tiefer in das Weichgewebe eindringen (Haffajee et al. 1997, Flemmig et al. 1998, Takamatsu et al. 1999, Cugini et al. 2000). Die mechanische Kürettage geht unselektiv gegen Plaquebakterien vor. Zwar entsteht durch die Behandlung eine zerstörte ökologische Nische, die aber anschließend wiederbesiedelt wird. Die behandelte Tasche erreicht drei bis sieben Tage nach dem SRP ihren Ausgangs-

zustand (Harper et al. 1987), jedoch mit einer anderen Zusammensetzung. Dennoch zeigen viele Studien auf, wie wichtig das *Deepscaling* in der Parodontaltherapie ist. Im Schnitt wurden bei Taschen mit einer Sondierungstiefe von 4 - 6 mm und > 6 mm mittlere Reduktionen der Sondierungstiefe von 1,29 mm und 2,16 mm und Attachmentgewinn von 0,55 mm festgestellt, ausgenommen die Furkationen der Molaren (Nordland et al. 1987, Loos et al. 1988, Swierkot 2008). Insgesamt konnte eruiert werden, dass sich parodontopathogene Keime nicht nur auf dem Sulcusepithel und dem Rest der Gingiva etablieren können, sondern auch im gesamten Mundracherraum. Deshalb können Bakterien nach der parodontalen Behandlung eine erneute Infektion des Zahnfleischsulcus herbeiführen (Van der Velden et al. 1986, Asikainen et al. 1991, Danser et al. 1994, 1996). Als weitere Möglichkeit zur Minimierung der soeben genannten bakteriellen Translokation wird das Konzept der *One Stage Full-Mouth Disinfection* (FMD) bzw. des *One Stage Full-Mouth Scaling/Rootplaning* (FM-SRP) diskutiert (Quirynen et al. 1995). Hierbei soll die Durchführung des SRPs aller Quadranten innerhalb von 24 Stunden erfolgen und durch Desinfektion aller oralen Flächen mit Chlorhexidin (FMD) unterstützt werden (Seydenschwanz 2010). Verschiedene Studiengruppen haben überprüft, ob das einzeitige Vorgehen mit oder ohne adjuvante Antiseptika (Chlorhexidin) gegenüber dem mehrzeitigen konventionellen SRP Vorteile bringt. Die ersten Studien zum Thema FMD publizierte die Arbeitsgruppe der Universität Leuven (Belgien). Im Vergleich zur klassischen Therapie zeigten sie für dieses Behandlungsschema, dass die klinischen und mikrobiologischen Werte bei Patienten mit fortgeschrittener chronischer Parodontitis signifikant verbessert waren (Quirynen et al. 1995, Bollen et al. 1996, Vandekerckhove et al. 1996, Mongardini et al. 1999, De Soete et al. 2001, Faveri et al. 2006). Aber auch bei Patienten mit einer früh beginnenden Parodontitis konnten bessere klinische und mikrobiologische Ergebnisse als beim traditionellen quadrantenweise erfolgenden Vorgehen erzielt werden (Mongardini et al. 1999, Quirynen et al. 1999). Die Ergebnisse wurden durch eine neuere Untersuchung derselben Autoren bestätigt (Quirynen et al. 2006). Auch eine Untersuchung von Cosyn et al. (2006) über den zusätzlichen Effekt der Anwendung eines Chlorhexidinpräparats zum FM-SRP bekräftigte die Bedeutung der Antiseptika. Greensteins und Tonettis Kritik (2000) an diesem Studienprotokoll sowie Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die die Unterschiede in den klinischen und mikrobiologischen Ergebnissen nicht bestätigen konnten (Apatzidou & Kinane 2004, Apatzidou et al. 2004, Koshy et al. 2005, Wennström et al. 2005, Jervoe-Storm et al. 2006, Kinane & Papageorgakopoulos 2008, Latronico et al. 2008, Swierkot et al. 2009), ermöglichen zurzeit noch keine abschließende Wertung dieses Therapiekonzeptes. Weiterhin muss bei der Beurtei-

lung der unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich Quirynens Studienprotokoll beachtet werden, dass die Kritiker dieses Protokolls bei der Überprüfung der Ergebnisse sich nicht exakt an das Studienprotokoll von Quirynen hielten und somit die Diskrepanzen aus wissenschaftlicher Sicht kritisch zu beurteilen sind.

Ob sich insgesamt eine chirurgische Therapie als notwendig erweist, ist abhängig vom Parodontitistyp (gemäß der Klassifikation der AAP 1999, Wiebe 2000), der Schwere, Ausdehnung und Pathomorphologie der Erkrankung (Rateitschak & Wolf 2004) und vor allem in solchen Fällen indiziert, in denen eine vorausgegangene konservative Therapie nicht zu Erfolg versprechenden Resultaten geführt hat (Ziada et al. 2007, Goltz 2010).

Zur Unterstützung der Keimzahlreduzierung werden schon seit vielen Jahren Antibiotika eingesetzt. Jedoch ist ihre Anwendung nur in Kombination mit der mechanischen Therapie sinnvoll, denn ohne diese wird auch der Antibiotikaeinsatz keine vollständige Beseitigung der Infektion bewirken. Insbesondere sind Amoxicilin, Metronidazol, Doxycyclin und Clindamycin wirksam gegenüber parodontopathogenen Bakterien (Eick und Pfister 2004, Walter und Weiger 2006, Goltz 2010). Die Indikation für die Verschreibung dieser Präparate ist allerdings aufgrund der hohen Gefahr der Resistenzentwicklung exakt zu stellen (Gordon and Walker 1993).

Die Anwendung anderer chemischer Verbindungen als Mundspüllösungen ist als Ergänzung der täglichen Mundhygiene oder als Bestandteil einer Parodontitistherapie ebenfalls entscheidend. Unterstützend wird sie sowohl in der Vorbehandlungsphase als auch präoperativ zur Minimierung von infektionssverursachenden Keimen sowie intra- und postoperativ, im Recall zur Infektionsreduzierung bzw. – prophylaxe eingesetzt (Gjermeo 1974, Addy 1986, Killooy 1999, Barnett 2003, Netuschil et al. 2003, Goltz 2010).

### **2.1.3 Anforderungen an Antiseptika**

Bei der Wahl antimikrobieller Substanzen für die Prävention und Therapie parodontaler Erkrankungen fassen Lang und Brex (1986) folgende Forderungen an die Wirkung eines oralen Chemotherapeutikums zusammen:

- Spezifität gegenüber der Mikroorganismen
- Effektivität in ihrer antibakteriellen Wirkung (Hickel 1997; Keimreduktion  $> 5 \log_{10}$  - Stufen; Kramer 2001)
- Substantivität, d.h. remante Wirkung durch Adsorption an oralen Flächen
- Sicherheit hinsichtlich einer möglichst geringen toxischen Wirkung für die Mundschleimhaut und den Körper allgemein

- Keine Veränderung des ökologischen Gleichgewichts (Brecx 2003)
- Stabilität intra -und extraoral.

Die Wirksamkeit eines Antiseptikums ist abhängig von dessen Art, der applizierten Menge, Konzentration und der Kontaktzeit mit dem Zielort (Rahn et al. 1994). Der Begriff „Substantivität“ impliziert die Retention der Substanz in der Mundhöhle sowie eine ausreichende Adhäsion der Wirksubstanz an Zahnhart- und Weichgeweben mit der Folge einer längeren Verweildauer des Wirkstoffes in antibakteriell wirksamer Konzentration in der Mundhöhle (Netuschil et al. 1997).

## **Gebräuchliche Chemotherapeutika**

Zu den antibakteriellen plaque- und entzündungshemmenden chemischen Verbindungen gehören neben Chlorhexidin, Triclosan und ätherischen Ölen auch Verbindungen von Fluoriden mit Metallionen oder Aminen, Jod und Octenidinlösungen (Schiffner 2000). In Bezug auf das antimikrobielle Potenzial sowie die Antiplaque- und Antigingivitis-Effekte ist Chlorhexidin sämtlichen Mundspüllösungen deutlich überlegen (Brecx et al. 1992, Renton et al. 1996, Goltz 2010).

Im Folgenden werden die wichtigsten antibakteriellen Wirkstoffe vorgestellt, die in evidenzbasierten Studien ihre Wirkung bewiesen haben. Es wird jedoch kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben.

### **2.1.4 Cetylpyridiniumchlorid**

Das Cetylpyridiniumchlorid (CPC)-Molekül besitzt hydrophile und hydrophobe Gruppen, die Interaktionen mit anderen Ionen-Gruppen ermöglichen. Scheie (2003) vermutet, dass diese Interaktionen via kationischer Bindung mit Mikroorganismen in Analogie zu CHX stehen könnten. CPC erhöht als quarternäre Ammoniumverbindung die Bakterienzellwandpermeabilität, begünstigt die Lyse, vermindert den Zellmetabolismus und die Fähigkeit der Bakterien, an Zahnoberflächen zu haften (Plischke 2001). Es verfügt über ein breites antimikrobielles Spektrum. Es werden vorwiegend grampositive Bakterien gehemmt (Renton-Harper et al. 1996, Pitten & Kramer 2001 a). Diese Hemmung kann durch zahlreiche Einflüsse - wie einen niedrigeren pH-Wert oder Kalziumionen des Speichels - blockiert werden (Cummins & Creeth 1992). Seine schwächere Wirkung im Vergleich zum CHX wird auch der niedrigeren Substantivität von lediglich fünf Stunden zugeschrieben (Elworthy et al. 1996). In Kombination mit dem CHX-Wirkstoff ist es sehr wirksam gegen fungale und orale Erkrankungen (Fathilah et al. 2012). Zahlreiche Autoren untersuchten den

klinischen Effekt von CPC und beurteilten die Wirkung widersprüchlich (Ashley et al. 1984, Renton-Harper et al. 1996, Blenman et al. 2005, Garcia-Godoy 2005, Herrera et al. 2005, White 2005, Witt et al. 2005a, 2005b). Die Studien wurden sehr unterschiedlich aufgebaut und dauerten bis zu sechs Monate an. Zum Teil wurde die Lösung mit anderen Präparaten kombiniert sowie in ihrer Dosierung variiert. Als Nebenwirkungen werden gelegentlich Zahnverfärbungen und selten Auftreten von Mundbrennen oder Schleimhautulzerationen verzeichnet (Newbrun 1989).

### 2.1.5 Ätherische Öle (Listerine®)

„Listerine“® ist eine kombinierte Mundspüllösung aus ätherischen Ölen wie Thymol, Menthol, Eucalyptus und Methylsalicylat, Benzoesäure und ca. 27 % Ethanolanteil (Ciancio 1992, Swierkot 2008). Die Mundspüllösung wird heutzutage in der Gingivitisprophylaxe angewendet. Die Wirkung dieses Antiseptikums beruht auf der Denaturierung von Proteinen in der Bakterienwand. Es vermindert die Plaquetoxizität durch Extraktion der Lipopolysaccharide (Fine 1985, Teucher et al. 1990). Weiterhin kommt es zur Beeinflussung der Plaqueproliferation. Durch die Hemmung der Prostaglandin-Synthese, Verminderung der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten und Unterdrückung der Sauerstoff-Radikal-Bildung hat es unter anderem einen entscheidenden Einfluss auf die Hemmung von Entzündungsabläufen (Wagner & Wiener 1988; Bernimoulin & Deschner 1995, Sonnenschein 2009). Auch bei dieser Mundspüllösung wurde ihr additiver Effekt in Kombination mit mechanischer Plaquekontrolle bestätigt (Fine et al. 1985, Charles et al. 2001, Sharma et al. 2004). Allerdings gibt es widersprüchliche Studien bezüglich der Biofilmreduktion mit Listerine. Eley (1999) beschrieb die Plaque- und Gingivitis-Hemmung als moderat, was auf die geringe Substantivität zurückgeführt wird. Studien, in denen Listerine® ergänzend zur täglichen Zahnpflege verwendet wurden, konnten im Vergleich zu einem Placebo-Präparat ebenso nur eine mäßige Biofilmreduktion aufzeigen (Brex et al. 1992, Ramberg et al. 1992). Axelsson und Kollegen machten (1991) einen Vergleich zwischen Listerine® und den beiden Chlorhexidin-Gruppen. Dieser Vergleich ergab, dass die chlorhexidinhaltigen Mundspülungen in Bezug auf die Plaquereduktion gleich oder stärker wirksam waren als Listerine® (Axelsson et al. 1991). Brex et al. (1992) und Pizzo et al. (2008) konnten in ihren Studien zeigen, dass Listerine® bei der Biofilmreduktion vergleichbare Werte wie eine Mundspüllösung mit einer Aminfluorid-Zinnfluorid-Verbindung (Meridol®) erzielen konnte, jedoch blieb seine Wirkung auch hier gegenüber Chlorhexidin deutlich zurück (Sekino & Ramberg 2005). Pizzo et al. (2008) fanden in ihren Studien heraus, dass sich ätherische Öle und Aminfluorid-Zinnfluorid-Verbindungen in der Effektivität der Plaquehemmung nicht



unterscheiden. Es konnte entweder kein oder nur ein geringer antibakterieller Effekt, noch eine Gingivitisreduktion aufgezeigt werden (Brecx et al. 1990, Maruniak et al. 1992, Swierkot 2008). Diese geringe Wirkung wurde in einer sechsmonatigen Langzeitstudie bestätigt (Grossmann et al. 1989). Pan et al. (1999) konnten zeigen, dass Listerine® *in vitro* eine effektivere Plaquehemmung im Vergleich zur Aminfluorid-Zinnfluorid-Verbindung (Meridol®) bewirken. Ebenso konnten diverse sechsmonatige Langzeitstudien durch mikrobiologische und klinische Untersuchungen den signifikanten plaque- und gingivitis-inhibierenden Effekt der Listerine®-Lösung aufzeigen (Lamster et al. 1983, Gordon et al. 1985, DePaola et al. 1989, Overholser et al. 1999, Charles et al. 2001, 2004, Sharma et al. 2004). Auch Fine et al. (2005) zeigten klinisch an 78 Probanden bei Nutzung von Listerine® über einen Zeitraum von neun Monaten eine deutliche Plaquereduktion von 59 %. Listerine® präsentiert eine bessere bakterielle Reduktion *in vitro* und *in vivo* im Vergleich mit anderen Mundspülungen, die für die tägliche Anwendung bestimmt sind (Ciancio 2003, Pan et al. 2010).

Schiffner (1999) gab an, dass Nebenwirkungen wie Zahnverfärbungen und Geschmacksirritationen auftreten können. Weiterhin warfen Siegrist et al. (1986) die Frage auf, ob nicht der hohe Alkoholgehalt von 27 % und Nebenwirkungen wie Geschmacksveränderungen und Zahnfleischbrennen gegen eine tägliche Anwendung sprechen würden (Siegrist et al. 1986, Bolanowsky et al. 1995, Swierkot 2008). Flemingson et al. (2008) zeigten in ihrer *In-vitro*-Studie die Wirkung einer Listerine®-Mundspüllösung auf die humanen Gingiva-Fibroblasten auf. Sie testeten in dieser Studie die Toxizität der drei Antiseptika Chlorhexidin, PVP-Jod und Listerine® in Abhängigkeit von der Konzentration und Einwirkzeit der Mundspüllösungen auf die Fibroblasten der Mundschleimhaut. Die stark verdünnte Listerine®-Lösung (1 % und 2 %) wirkte bei gleicher Verdünnung toxischer als die CHX- und PVP-Jod-Lösungen.

### 2.1.6 Triclosan

Triclosan ist ein Phenolderivat und wird aufgrund seiner antibakteriellen Eigenschaften als Wirkstoff in Zahnpasten und Mundspüllösungen eingesetzt (Bhargava & Leonard 1996, Jones et al. 2000, Swierkot 2008). Triclosan® übt eine hemmende Wirkung auf Enzyme des Arachidonsäurestoffwechsels aus und hat somit einen antiinflammatorischen Effekt auf Haut und Schleimhaut zur Folge (Barkvoll & Rolla 1995, Kjaerheim et al. 1995). Zudem konnten Modéer et al. (1996), Skaare et al. (1997) und Mustafa et al. (2000) in ihren *In-vitro*-Studien zeigen, dass Triclosan® die interleukininduzierte Prostaglandinbiosynthese hemmen kann und somit einen

antiphlogistischen Effekt besitzt. Aufgrund seiner neutralen Ladung bindet Triclosan® jedoch nur für wenige Stunden an oralen Oberflächen und weist demzufolge keine langanhaltende Antiplaquewirkung auf (Davies 2007, Swierkot 2008). Die Lösung dieses Problems lag in der Kombination des Triclosans® mit einem Copolymer oder Zink, um die Substantivität in Mundspüllösungen und Zahnpasten zu steigern (Volpe et al. 1993, Swierkot 2008). In klinischen Langzeitstudien konnte ein Biofilm- und Gingivitisrückgang (Bhargava & Leonard 1996; Bruhn et al. 2002) und eine reduzierte Zahnsteinbildung festgestellt werden (Svatun et al. 1990). Die wesentlichen klinischen Studien halten fest, dass Antiseptika mit dem Wirkstoff Triclosan® in ihrer Effektivität hinter denen mit Chlorhexidin einzuordnen sind (Ciancio 1992, Moran et al. 1992, Renton-Harper et al. 1996, Pitten et al. 2001 b). Eine Kurzzeitstudie konnte indessen eine vergleichbare Biofilmmhemmung bei der triclosan®- und chlorhexidinhaltigen Mundspüllösung feststellen (Ramberg et al. 1992). Neben diesen positiven Eigenschaften von Triclosan® sind diverse Nebenwirkungen bekannt. So beanstandeten die Patienten nach Gebrauch von Triclosan® Geschmacksirritationen, Schleimhauterosionen und Schleimhautbrennen (Jenkins et al. 1993, Swierkot 2008). Schweizer warnte (2001) vor einer geförderten Resistenzentwicklung insbesondere gegen Antibiotika beim weiten Gebrauch von Triclosan®. Diese Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant, sondern wiesen nur einen Trend auf. Nichtsdestotrotz hat das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR; 2006) angeraten, Triclosan® nur im ärztlichen Bereich anzuwenden, um potenziellen Resistenzbildungen vorzubeugen (Swierkot 2008).

### 2.1.7 Octenidin

Octenidin(-dihydrochlorid) ist ein Breitband-Antiseptikum (kationaktives Bispyridin), das zusammen mit 2 %igem Phenoxyethanol eingesetzt wird. Octenidindihydrochlorid wurde am Sterling Winthrop Research Institute als potenzieller antimikrobieller Wirkstoff entwickelt (Bailey et al. 1984). Sowohl *In-vivo*- (Tietz et al. 2005, Sopata et al. 2008) als auch *In-vitro*-Studien (Sedlock & Bailey 1985, Tandjung et al. 2007) konnten die antimikrobielle Wirksamkeit octenidin-basierter Antiseptika gegen eine große Anzahl an gramnegativen und grampositiven Keimen (Sedlock & Bailey 1985, Goroncy-Bermes & Harke 1990) und bedingt durch den Wirkmechanismus auch gegenüber Bakterien wie MRSA (Sloot et al. 1999, Rohr et al. 2003) zeigen. Des Weiteren wirkt Octenidin fungizid (Harke 1989, Ng et al. 2007) sowie gegen lipophile Viren wie HSV, die bei Verbrennungswunden relevant sein können (Chen et al. 2005), jedoch nicht gegen Sporen und Protozoen (Harke & Streek 1989).

Untersuchungen von Kramer und Müller (2007) weisen auf eine starke Adhärenz von Octenidin an Lipidkomponenten in Zellmembranen, wie z.B. Cardiolipin, hin. Dies könnte eine Erklärung für die optimale antimikrobielle Wirksamkeit bei ebenso guter Verträglichkeit für Epithel und Wundgewebe sein.

In zahlreichen Studien wurden gute Ergebnisse bei der Plaquehemmung erzielt (Shern et al. 1980, Emilson et al. 1981, Patters et al. 1983). Die Studiengruppe von Beiswanger (1990) zeigte, dass 0,1 % Octenidin-Mundspüllösung signifikante Reduktionen von Plaque um 39 %, Gingivitis um 50 % und gingivaler Blutung um 60 % erreichte.

Ein großer Vorteil von Octenisept® ist die schmerzfreie Anwendung und Wirksamkeit auf Schleimhäuten und offenen Wunden (Harke et al. 1989, 1991).

Mutters und sein Team zeigten (2007), dass Octenidol®, die Mundspüllösung, die seit 2008 erhältlich ist, eine sehr gute *In-vitro*-Wirkung gegenüber geprüften gramnegativen und grampositiven anaeroben und microaerophilen Erregerarten hat, die bei einer aggressiven oder chronischen Form der Parodontitis gehäuft auftreten.

Goroncy-Bermes (2007) konnte in einem Suspensionsversuch gegen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Micromonas micros* bei einer Ausgangskeimzahl von  $10^8$  KbE/ml eine vollständige Abtötung der Testorganismen bereits nach 30 Sekunden Einwirkzeit feststellen (Goroncy-Bermes 2007, Langhoff 2007).

Goroncy-Bermes (1999) konnte bei einer Einwirkzeit von 10 Sekunden eine hinreichende Wirkung gegen alle eingesetzten MRSA-Isolate erzielen. Al-Doori et al. (2007) postulierten auf der Basis dieser Ergebnisse, dass die Octenidol®-Mundspüllösung zur Sanierung von MRSA-erkrankten Patienten im Mund-Rachen-Raum verwendbar sein.

Die Wirkung von Octenidol® auf die Zellen der Mundschleimhaut ist bisher nur wenig untersucht worden. Es gibt keinen Anhalt für toxischresorptive Risiken von Octenidin (Kramer 2001). Im Gegenteil, Müller und Kramer postulierten (2006), dass Octenidin aufgrund seines hohen Biokompatibilitätsindex die Wundheilung nicht negativ, sondern nur positiv beeinflussen könnte. Auch karzinogene, mutagene, embryotoxische oder fertilitätsbeeinträchtigende Eigenschaften konnten bislang nicht nachgewiesen werden (Harke & Streek 1989, Kramer et al. 2004). Von Kalteis et al. (2003) wurde Octenidin in einer *In-vivo*-Studie ebenfalls eine geringe Toxizität bestätigt (Langhoff 2007).

### 2.1.8 Aminfluorid/ Zinnfluorid (Meridol®)

Fluoridhaltige Mundspüllösungen werden etwa seit 50 Jahren angewendet und erzielen eine Kariesreduktion zwischen 20 und 59 % (Fure et al. 1998, Marthaler 1990, FDI Commission 2002). In der Wurzelkaries-Prävention hat sich das tägliche zwei- bis dreimalige Spülen mit einer Amin-Zinnfluorid-Kombination als besonders effektiv erwiesen (Banoczy & Nemes 1991, Überschär et al. 1991). Aminfluoride wirken schwach plaquehemmend, weisen aber einen deutlichen Einfluss auf die gingivale Entzündung und wirken sich positiv auf die Remineralisierung des Zahnschmelzes auf (Mühlemann und Rudolf 1975). Zinnfluorid wirkt dagegen bakterio- statisch und bakterizid. Der Wirkmechanismus des metallischen Kations beruht auf der Verminderung des Stoffwechsels, Hemmung der Bakterienaggregation sowie der Bakterienagglomeration (Bay & Roella 1980, Ogaard et al. 1980, Tinanoff et al. 1980, Leverett et al. 1981, Wieder et al. 1983, Tinanoff 1995). Sie hemmen verschiedene Enzyme. So gehen sie Bindungen mit Enzymen ein, die für den Transport und Abbau von Zuckern in Bakterienzellen verantwortlich sind (Oppermann et al. 1980, Bowen 1990). Die Ionen konkurrieren ferner mit Kalzium um Bindungsstellen an Hydroxylapatit. Dadurch ist die teils über Kalziumbrücken vermittelte Anlagerung von Bakterien an die Zahnoberflächen gehemmt (Edgar 1990). Metallionen haben eine gute Substantivität. Obwohl die Komplexbildung mit oralen Proteinen *in vivo* die Effektivität einschränkt (Marsh 1992), sind sie bis zu sechs Stunden plaquehemmend wirksam (Bowen 1990). Von hohem praktischen Nachteil ist die geringe chemische Stabilität von ionischen Zinnzubereitungen. Daher kombinierte Mühlemann (1981) die beiden Komponenten, um die jeweiligen positiven Eigenschaften nutzen zu können (Saxer 1980). Durch diese Kombination entsteht ein stabilisierender Effekt auf Zinnfluorid (Saxer 1981, Schmid 1981). Problematisch war jedoch anfangs die Langzeitstabilität der Verbindung und infolgedessen deren eingeschränkte Lagerungsfähigkeit. Erstmals konnte die GABA International AG (Therwil, Schweiz) eine auf lange Sicht stabile Aminfluorid-Zinnfluorid-Verbindung (Meridol®) herstellen. Mit dieser Kombination wurden in der ersten *In-vivo*-Kurzzeitstudien zufriedenstellende Ergebnisse bei der Biofilm- und Gingivitisreduktion erfasst (Mühlemann & Duhamel 1981, Siwerkot 2008). Dies konnte in diversen Kurz- und Langzeitstudien bestätigt werden (Schneider & Mühlemann 1974, Banoczy et al. 1989, Banoczy & Nemes 1991, Bley & Gülzow 1991, Zimmermann et al. 1993, Mengel et al. 1996). Weiterhin belegten Madlena et al. (2005) an 42 Probanden nach 30-sekündiger Verabreichung einer AmF/SnF<sub>2</sub>-haltigen Zahnpaste über vier Wochen eine signifikante Plaquerreduktion, die in einer zweiten Gruppe bei Kombination mit einer AmF/SnF<sub>2</sub>-haltigen Mundspüllösung sogar noch höher ausfiel (50%). In einer neun-

monatigen Doppelblindstudie wurden Probanden untersucht, die entweder NaF-Zahnpasta und -Spüllösung, Aminfluorid/Zinnfluorid-Zahnpasta und -Spüllösung oder Aminfluorid/Zinnfluorid-Zahnpasta und Natriumfluorid-Spüllösung zur täglichen Mundhygiene anwendeten (Mengel et al. 1996, Swierkot 2008). Bei allen Formationen war eine Reduktion der gingivalen Entzündungszeichen, Verminderung der Biofilmmakkumulation und eine günstige Veränderung der supragingivalen Bakterienflora zu verzeichnen. Am effektivsten zeigte sich mikrobiologisch durch eine deutliche Reduzierung von beweglichen Bakterien die alleinige Anwendung von Aminfluorid/Zinnfluorid-Zahnpasta und -Spüllösung und mit Einschränkungen der kombinierte Gebrauch von Aminfluorid/Zinnfluorid-Zahnpasta und Natriumfluorid-Spüllösung (Swierkot 2008). Ein *In-vitro* Vergleich der Amin-Zinnfluorid-Lösung mit Listerinen® ergab ähnliche Ergebnisse (Netuschil et al. 1995, 1997, Weiger et al. 1997). Brex et al. (1990) fanden durch einen Vergleich von Meridol® und CHX in *In-vivo*-Studien heraus, dass Meridol® zwar eine hohe Wirksamkeit in der Plaquehemmung und Gingivitisreduktion zeigt, die Wirkung jedoch geringer ist als bei CHX. Als bekannte Nebenwirkung treten gehäuft Zahnverfärbungen auf, die allerdings geringer als bei CHX sind (Brex et al. 1993, Laine et al. 1993). Schreil postulierte (1991), dass die quantitativen und qualitativen Nebenwirkungen bei Aminfluorid-Zinnfluorid-Lösungen nur gering ausfallen. Außerdem lassen die Ergebnisse diverser Studien eine positive Langzeitwirkung der Aminfluorid/Zinnfluorid-Verbindung hinsichtlich der gingivalen Gesundheit erkennen (Swierkot 2008), sodass sie additiv zur täglichen mechanischen Zahnreinigung eingesetzt werden können (Banoczy et al. 1989, Brex et al. 1992, 1993).

### 2.1.9 Chlorhexidin

Wie oben bereits erwähnt, wird Chlorhexidin in der Zahnmedizin derzeit für eine Vielzahl verschiedener Anwendungen eingesetzt, primär als Mittel zur chemischen Plaquekontrolle (Ruppert et al. 2004, Goltz 2010). Es kommt gleichermaßen der Karies- (Emilson 1994, van Rijkom et al. 1996) und der Parodontitisprävention zugute (Löe 1973, Brex et al. 2003).

Chlorhexidin gehört zur Gruppe der Bisbiguanide (1,6-bis-4-Chlorphenoldiguanidohexan) mit der Summenformel  $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$ . Das Chlorhexidin-Molekül ist stark basisch und besitzt lipophile und hydrophile Gruppen. Als Diglukonatsalz ist es in Wasser und Alkohol gut löslich (Fardal & Turnbull 1986, Ruppert et al. 2004).

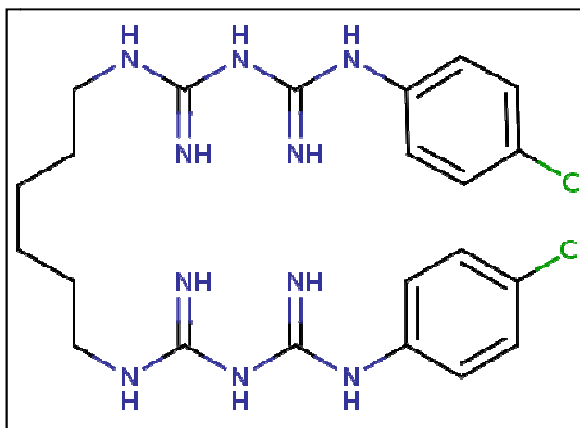


Abbildung 1: Strukturformel Chlorhexidingluconat  
(<http://www.drugbank.ca/drugs/APRD00545>)

Davies et al. beschrieben bereits 1954 den Wirkstoff Chlorhexidin, dennoch wurde diesem Agens erst nach den ersten systematisch durchgeführten klinischen Studien zum plaquehemmenden Effekt von Loe und Schiött (1970) Bedeutung beigemessen. Chlorhexidin hebt sich durch sein breites antibakterielles Wirkungsspektrum, seine Plaquehemmung und vor allem die hohe Substantivität in der Mundhöhle von anderen Agenzien ab (Heasman & Seymour 1994, Goltz 2010). Es wirkt hemmend auf grampositive und in höheren Konzentrationen (ab 0,2 %) auch auf gramnegative Spezies (Gjermeo 1989, Marsh 1992). Darüberhinaus ist es auch gegen Pilze wie *Candida albicans* (Tobgi et al. 1987, MacNeill et al. 1997) und einzelne Viren in der Mundhöhle wirksam (Park and Park 1989, Bernstein et al. 1990) aktiv. Zu den besonders empfindlichen Mikroorganismen gegenüber Chlorhexidin zählen *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus mutans* (Hefti & Huber 1987, Ciancio 1995), *Streptococcus Salivarius*, *E.coli* und *Candida albicans*. Weniger sensibel reagieren *Streptococcus sanguis*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas* und *Klebsiella spp.* (Ciancio 1995). Des Weiteren verhindert Chlorhexidin die Bindung von *Porphyromonas gingivalis*, einer der Leitkeime der Parodontitis, an die Epithelzellen. Dadurch kann der Abbau von Kollagen Typ I, der zu 90 Prozent durch *Porphyromonas gingivalis* verursacht wird, inhibiert werden (Gendron et al. 1999; Houle et al. 2003).

Zusammenfassend lässt sich die schädigende Wirkung des Chlorhexidins auf die Bakterienzelle durch folgende Mechanismen beschreiben: eine Absorption an die Zellwand mit Störungen des Elektronentransports (Hugo et al. 1966), die Zerstörung der Permeabilitätsschranke (Gjermeo 1975; Kuyyakanond & Quesnel 1992) und in höheren Konzentrationen durch Eindringen in die Zelle und eine Ausfällung des Zytoplasmas mit der Folge des Zelltodes (Hennessey 1973, Rolla & Melsen 1975). Außerdem wurde in der Literatur über die Beeinflussung des bakteriellen Glu-

kosstoffwechsels durch Chlorhexidin infolge einer Hemmung membrangebundener ATPasen diskutiert (Hellwig et al. 2003, Goltz 2010). Die beschriebene Wirkungsweise des Chlorhexidins liegt seinem ausgeprägt kationischen Charakter zugrunde. Das Bisguanid ist durch seine elektrostatische Anziehung in der Lage, an die negativ geladenen Oberflächen der oralen Hart- und Weichgewebe (Zähne, Gingiva, Mukosa) und bakteriellen Biofilme zu binden (Davies 1973, Hjeljord et al. 1973, Denton 1991) und steht so als Reservoir für einen *slow release* bis zu zwölf Stunden in der Mundhöhle zur Verfügung und wird nach und nach abgegeben (Rolla et al. 1971, Schiott 1973, Mandel 1994, Goltz 2010). Bonesvoll (1977) postulierte, dass die CHX Konzentration im Speichel 4 bis 8 Stunden nach dem Spülen logarithmisch schnell abfalle, während im darauffolgenden Zeitabschnitt (8 – 24 Stunden) eine beständigere niedrigere Konzentration im Speichel vorherrsche. Rolla et al. (1971) zeigten ebenfalls in ihren Studien auf, dass die Langzeitwirkung des Chlorhexidins vor allem in der Adsorption des Chlorhexidins an den oralen Oberflächen zugrunde liegt. Nach einminütigem Spülen des Mundes mit 0,2 % CHX konnten ca. 30 % CHX der verabreichten Dosis zurückgehalten werden (Bonesvoll et al. 1974). Dabei wird es vorwiegend an die anionischen Sulfat-, Phosphat-, und Carboxylat- Gruppen gebunden und tritt so in Wechselwirkung mit den anionischen Glyko- und Phosphatproteinen der oralen Schleimhäute und des Pellikel (Rolla et al. 1971, Bonesvoll 1977, Swierkot 2008). Darüberhinaus bindet das Chlorhexidin an das Hydroxylapatit der Zähne (Sodhi et al. 1992). Bonesvoll et al. berichteten (1974), dass ein dreimaliges Nachspülen für 10 Sekunden mit Wasser nach dem Chlorhexidineinsatz ein Verbleiben von 70 Prozent des anfänglich gebundenen CHXs im Mund trotzdem garantiert. Diese Affinität ist pH- abhängig (Gjeramo, Rolla et al. 1974). Gjeramo et al. (1974) zeigten, dass die Wirkung des Chlorhexidins bei einem pH-Wert unter 3,0 reduziert ist. Gjeramo et al. (1970) konnten dies in einem *in-vivo* Versuch unter Beweis stellen indem sie Studenten zunächst mit 0,2 prozentigem CHX spülen ließen um daraufhin mit einer verdünnten Essigsäure (pH-Wert=3,0) nachzuspülen. Etwa 65% des zurückgehaltenen Chlorhexidins konnten in den Essignachspülungen festgestellt werden. Sie vermuteten, dass die reduzierte Anzahl der Bindungsstellen für das Chlorhexidin im sauren Mileu verantwortlich sei (Bonesvoll et al. 1974 a, Bonesvoll et al. 1974 b, Gjeramo et al. 1974 ).

Die Substantivität des Chlorhexidins ist entscheidend für dessen plaquehemmenden Erfolg gegenüber anderen Mundspüllösungen (Gjeramo 1974, Bonesvoll & Gjeramo 1978). In diversen klinischen Studien wurde festgestellt, dass Mundspüllösungen mit Chlorhexidin vergleichend mit anderen Wirkstoffen (wie oben bereits erwähnt) einen stärkeren Biofilm- und Gingivitisrückgang verzeichnen können (Brecx et al. 1992,

1993, Swierkot 2008) und somit ein additives Therapiemittel bei der Prävention der parodontaler Erkrankungen darstellen. Aus diversen Studien geht hervor, dass CHX den Plaquebefall und die Entstehung von Gingivitiden um ca. 50 % verringert (Löe 1973, Axelsson & Lindhe 1987, Grossmann 1989, Cummins & Creeth 1992). Außerdem spielt CHX bei der Hemmung des Kariesbefalls eine entscheidende Rolle (Emilson 1994, van Rijkom et al. 1996). Löe & Schiott zeigten bereits 1970, dass ein einminütiges Spülen mit 10 ml 0,2 % CHX zweimal am Tag ohne weitere Mundhygiene komplett die Entstehung von Plaque und Gingivitis verhindere. Auch Lang et al. (1982) konnten mit ihrer Studie feststellen, dass ein tägliches Spülen mit 0,1 % oder 0,2% CHX signifikant die Plaque –und Gingivitisentstehung reduziere. Des Weiteren stellten Brex et al. (1989) unter Beweis, dass ein Spülen mit 0,12 –prozentigem CHX drei Mal am Tag über den Zeitraum von drei Wochen den Ergebnissen einer optimalen mechanischen Mundhygiene entspricht und somit ebenfalls vollständig die Entwicklung einer Gingivitis verhindert.

Chlorhexidin gilt derzeit als therapeutischer Standard bei den oralen Antiseptika (Jones 1997). Die handelsüblichen Produkte, die mit CHX als Wirkstoff werben, zeigen jedoch erhebliche Effektivitätsunterschiede. Die Kombination mit anderen Substanzen ist hierbei von erheblicher Bedeutung, da diese die reaktive Verfügbarkeit des CHX beeinflussen können (Mendieta et al. 1994). Natriumlaurylsulfat beispielsweise, das als Detergens häufig in Zahnpasten verwendet wird, neutralisiert das CHX und schmälert so dessen Wirkung. Dies ist der Grund, aus dem die Empfehlung zur halbstündigen Pause zwischen dem Zähneputzen und der Chlorhexidin-Spülung hervorging (Kolahi and Soolari 2006). Fluoride und Alkohol sind ebenso fähig, die CHX-Wirkung zu beeinflussen; hier wurde von einem wirkungssteigernden Effekt berichtet (Herrera et al. 2003). Entsprechend bedeutsam ist die Komposition des CHX-Präparates (Galenik).

Bei Langzeitanwendung von Chlorhexidin können verschiedene Nebenwirkungen auftreten. Am häufigsten wird von schwarzbraunen Verfärbungen der Zähne, der Kunststofffüllungen und des Zungenrückens (Löe & Schiott 1976, Greenstein & Berman 1986) berichtet, bedingt durch die Bindung der zweiten kationischen Gruppe an Farbstoffe, beispielsweise aus Tee, Kaffee und Wein. Die Stärke der Farbablagerungen zeigt eine Korrelation einerseits zur Häufigkeit des Konsums der verursachenden Genussmittel und andererseits zur Chlorhexidinkonzentration in den angewendeten Spüllösungen (Eley 1999). Die Verfärbungen treten gehäuft an Restaurationen und Wurzeloberflächen auf, sowie in den Approximalbereichen und dem Zungenrücken auf (Löe & Schiott 1970). Es wurde auch über verstärkte Zahnsteinbildung berichtet (Grossmann et al. 1986, Löe et al. 1976, Mandel 1988). Chlorhexi-



din bindet auch an die Geschmacksknospen der Zunge. Infolgedessen kommt es zur reversiblen Geschmacksirritation durch eine Blockade spezifischer Rezeptoren (Lorenz 2008). Vor allem werden die Geschmacksempfindungen *sauer* und *bitter* beeinträchtigt (Lang et al. 1988, Gjermo 1989). Die Stärke der Irritation ist auch hier mengen- und konzentrationsabhängig (Gent et al. 2002). Schleimhauterosionen konnten in klinischen Untersuchungen nur bei zugleich erfolgtem intensiven Zähneputzen festgestellt werden und wurden infolgedessen als chlorhexidinunabhängige, putzbedingte Traumatisierungen eingestuft (Almqvist & Luthman 1988). Weiterhin wurden Wundheilungsstörungen postoperativ nach sofortiger Applikation beschrieben (Bassetti & Kallenberger 1980).

Bezüglich der Zytotoxizität des Wirkstoffs Chlorhexidin ergaben *In-vitro*-Untersuchungen von Mariotti & Rumpf (1999), dass CHX für eine dosisabhängige Reduktion der zellulären Proliferation von humanen Gingivafibroblasten verantwortlich ist. Des Weiteren konnten sie demonstrieren, dass Konzentrationen von Chlorhexidin 1  $\mu\text{M}$  (0,00009 %), die nur einen sehr geringen Einfluss auf die Proliferation haben, dennoch signifikant die Produktion sowohl von Kollagen-Proteinen (Reduktion um 65 %) als auch von Nicht-Kollagen-Proteinen (Reduktion um 57 %) der humanen Gingivafibroblasten reduzieren können. Eine 0,12 % CHX-Lösung bei einer Einwirkzeit von 1 Minute hatte eine signifikante Reduktion von 98,8 % bzw. 98,2 % der Produktion sowohl von Kollagen-Proteinen als auch von Nicht-Kollagen-Proteinen zur Folge. Das Fazit dieser Studie war, dass kommerziell erhältliche Konzentrationen von CHX respektive 0,12 % bzw. verdünnt mit einer Konzentration geringer als 0,009 % Gingivafibroblasten toxisch belasten können und daher womöglich die Wundheilung negativ beeinflussen. Weiterhin wurde berichtet, dass Chlorhexidin *in vitro* in höchstem Maße zytotoxisch gegenüber oralen humanen Fibroblasten sowie Fibroblasten der Haut ist, deren Funktionen, wie Proliferation und Proteinsynthese, je nach Konzentration der verwendeten Lösung unterschiedlich beeinflusst wurden. So zeigte eine 0,002 %-ige CHX-Lösung zwar minimale Zytotoxizität, unterdrückte die Zellteilung aber beinahe vollständig. Auch die Kollagen-Gel-Kontraktion als ein Modell für die Wundkontraktion wurde von allen verwendeten Konzentrationen (0,002 %, 0,005 %, 0,12 %) vielseitig beeinflusst. Die Proteinsynthese z. B. wurde von 0,005 %- und 0,12 %-igem CHX um 30 bis 50 % reduziert, von 0,002 %-igem CHX hingegen nicht signifikant (Pucher & Daniel 1992). In einer weiteren Studie wurde der *In-vitro*-Effekt niedriger CHX-Konzentrationen auf die Proliferation von primären humanen Gingivafibroblasten untersucht. Die Zellen wurden 24 Stunden bei 37°C Konzentrationen zwischen 0,07 und 40  $\mu\text{M}$  ausgesetzt. Bei Konzentrationen bis zu 5  $\mu\text{M}$  (0,00025 %) wurden keine signifikanten Effekte auf das Wachstum fest-

gestellt. Bei Konzentrationen von 10 und 20  $\mu\text{M}$  (0,0005 und 0,001 %) wurde das Zellwachstum im Vergleich zu den Kontrollzellen ohne Behandlung um 75 % reduziert (Dogan et al. 2003). Die Auswirkung einer Behandlung von Wurzeloberflächen mit Chlorhexidin auf die Haftung humaner gingivaler Fibroblasten wurde im Rahmen einer parodontalen Therapie in einer weiteren *In-vitro*-Studie überprüft. Hier wurden impaktierte Weisheitszähne in vier Scheiben geteilt, für drei Minuten mit 0,12 %igem CHX in Kontakt gebracht, mit destilliertem Wasser abgewaschen und anschließend mit humanen gingivalen Fibroblasten unter Verwendung gängiger Zellkulturverfahren inkubiert. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen gab es einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Anzahl der anhaftenden Zellen. Der Kontakt der Wurzeloberflächen mit Chlorhexidin verhindert eine spätere Anhaftung der Fibroblasten, was eine Regeneration des Parodontiums verzögern oder sogar ganz verhindern kann. So postulieren die Autoren dieser Studie, dass ein Kontakt von CHX mit den Wurzeloberflächen durch physikalische Barrieren zu vermeiden ist (Alleyn et al. 1991). Szep et al. (2003) wiesen die toxikologische Wirkung der CHX-enhaltenden Guttaperchapoints bei Kontakt zum Medium von humanen Gingivafibroblasten nach. Bei Kontakt war eine verringerte Zellzahl, eine höhere Anzahl an abgerundeten Zellen, eine geringere Zelldichte und eine verringerte Mitoserate im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen (Szep et al. 2003). Ebenfalls ist die zellschädigende Wirkung des Chlorhexidins auf andere Zellen bekannt. Aktuelle Untersuchungen zeigten gravierende zytotoxische Effekte chlorhexidinhaltiger Mundspüllösungen auf humane Osteoblasten (Patel et al. 2006, Cabral & Fernandes 2007) und Keratinozyten (Fabreguette et al. 1994) auf. In einem weiteren Experiment wurden die zytotoxischen Effekte von Chlorhexidin, Wasserstoffperoxid und Natriumhypochlorid auf kultivierte humane Fibroblasten sowie basale Keratinozyten getestet. Konzentrationen, in denen diese Antiseptika für gewöhnlich eingesetzt werden, erzeugten alle eine Zellsterblichkeit von 100%. Dieses Ergebnis zeigte, dass sowohl Fibroblasten als auch Keratinozyten als Zellen, die maßgeblich an der Wundheilung beteiligt sind, gleichermaßen empfindlich gegenüber diesen Antiseptika reagieren. Chlorhexidin ist das Agens mit der geringsten und Natriumhypochlorid das mit der höchsten Toxizität (Tatnall et al. 1990). Auch Damour et al. (1992) bestätigten einen zytotoxischen Effekt u.a. von CHX bei therapeutischen Konzentrationen gegenüber humanen Fibroblasten und Keratinozyten.

Die systemische Toxizität des Chlorhexidins ist sehr gering, da nur 0,3 % des in einer üblichen Spüllösung enthaltenen Chlorhexidins durch die oralen Schleimhäute resorbiert werden. CHX wird nur in sehr geringem Umfang im Gastrointestinaltrakt resorbiert und praktisch fast unverändert über Galle und Faeces wieder aus-

geschieden, weshalb ein Verschlucken ohne Folgen bleibt (Ruppert et al. 2004). In Tierversuchen konnte Chlorhexidin bei oralem Gebrauch zu keinem Zeitpunkt im Serum nachgewiesen werden (Winrow 1973). Obwohl die systemische Toxizität größtenteils als gering beschrieben wird, sollte doch auf eine enge Indikationsstellung geachtet werden und von einer dauerhaften, täglichen Anwendung abgeraten werden (Gjeremo 1989). Aufgrund der beschriebenen Nebenwirkungen sollte Chlorhexidin nicht länger als 14 Tage angewendet werden; eine Nutzung als Prophylaktikum ist ebenso wenig empfehlenswert (Schmidt 1988, Splieth & Kramer 2000).

### **Zelluläre Nachweismethoden**

Untersuchungen bioaktiver Substanzen an Zellkultursystemen gehören zu den Standardmethoden der biologisch-medizinischen Forschung. Es wird geprüft, welchen Einfluss diese Substanzen auf Struktur, Viabilität und Vitalität von Zellen haben und gestatten damit die Eruierung von Wirksamkeit und Nebenwirkungen der Substanzen auf isolierter zellulärer Ebene. Die verschiedenen Nachweismethoden zielen auf die Analyse von Proliferation, Wachstum, Differenzierung sowie Apoptose- und Nekroseereignisse ab. Zellkultursysteme sind Untersuchungen am lebendigen Organismus, Tierversuchen und klinischen Studien vorzuziehen, denn sie schützen die Organismen und gestatten ergebnisbasierte Prognosen zu deren Verlauf (Burkhardt 2011).

Die Zellkulturtechniken können grundlegend an zwei unterschiedlichen Ausgangsmaterialien durchgeführt werden (Kahl 2003):

1. Primärzellen – hierbei handelt es sich um Zellen, die aus einem Organ oder Organismus isoliert, nur wenig vermehrt und sofort verwendet werden. Der Vorteil liegt in der nah an der tatsächlichen Physiologie des entsprechenden Individuums gelegenen Reaktionsweise auf die Substanzen. Nachteilig zeigen sich jedoch die interindividuellen Reaktionen von Zellen, die grundlegende Mechanismen überlagern können. Eine Chargengleichheit kann nicht gewährleistet werden und die Ergebnisse können dementsprechend ambivalent ausfallen, was deren Auswertbarkeit beeinträchtigen würde. Zudem besteht die Gefahr von Differenzierung und Dedifferenzierung der Zellen mit steigender Anzahl der Passagen.
2. Zelllinien – hierbei handelt es sich um Zellen, die aus einem Tumor gewonnen oder mit tumorstimulierenden Agenzien behandelt wurden, um eine nahezu unbegrenzte Teilungsfähigkeit zu erreichen. Die möglicherweise am weitesten verbreitete Zelllinie sind beispielsweise die sogenannten HeLa-Zellen, die dem Muttermundkarzinom einer afroamerikanischen Frau bereits 1951 entnommen

und isoliert wurden. Deren Teilungsfähigkeit gestattet bis zum heutigen Tag den Einsatz dieser Zellen in Zellkultursystemen. Aktuell existieren jedoch eine Vielzahl derartiger Zelllinien aus unterschiedlichen Organismen und Geweben. Die Vorteile der Nutzung von Zelllinien liegen neben ihrer unbegrenzten Vermehrbarkeit in der Vergleichbarkeit von Ergebnissen aus unterschiedlichen Passagen durch die Verwendung dieses nahezu standardisierten Ausgangsmaterials sowie einer höheren Robustheit gegenüber den Primärzellen. Nachteilig zeigt sich jedoch auch hier die, wenn auch marginal, so dennoch stattfindende Veränderung dieser Zellen über die Zeit, die dazu führt, dass diese Zellen Änderungen in ihren Eigenschaften und ihrem Reaktionsverhalten zeigen, die aus der erheblichen Entfernung von der physiologischen Umgebung resultieren.

In der vorliegenden Studie wurden Primärzellen (nähere Beschreibung unter Punkt 3.1) gewonnen und verwendet, um eine möglichst hohe Nähe zur physiologischen Reaktion der Zellen auf die zu testenden Substanzen zu gewährleisten.

#### **2.1.10 Viabilitätsassays (Zytotoxizitätsbestimmungen)**

Die Untersuchung der Toxizität von Substanzen auf gesunde humane Zellen steht im Fokus der Betrachtungen bei Viabilitätstests (Burkhardt 2011). Die zugrundeliegenden Mechanismen - wie Apoptose oder Nekrose- werden hierbei zunächst noch nicht eruiert; es geht vielmehr um die Ermittlung möglicher Nebenwirkungen eines Präparates (Hartmann et al. 2000).

Zellschädigende Einflüsse von Substanzen zeigen sich in einer funktionsbeeinträchtigenden Einwirkung auf diverse Stoffwechselforgänge, wie Informationsübertragung, Atmung oder Proteinbiosynthese, oder die partielle bis vollständige Zerstörung zellulärer Strukturen, wie Membran oder Nukleus (Woolf 1999). Nicht reversible Auswirkungen führen häufig zum Zelltod, der apoptotischer oder nekrotischer Natur sein kann (Hartmann et al. 2000). In viablen Zellen sind verschiedene Mechanismen, wie Proliferation, Wachstum oder diverse Stoffwechselforgänge, intakt (Löffler & Petrides 1997, Rehner & Daniel 1999).

Einige Zytotoxizitätsanalysen zielen auf den Nachweis lebender Zellen ab, wie beispielsweise die quantitative Bestimmung von Proteinen, die ausschließlich in lebenden Zellen produziert werden. Andere Assays zeigen die Aufnahme bestimmter Substanzen in lebende Zellen, wie beispielsweise Ethidiumbromid, das in die DNA interkaliert. Weitere Testverfahren fokussieren auf die Versehrtheit der Membran durch die Bestimmung von Substanzen in einer Zellkulturlösung, die sich im Inneren einer Zelle befinden, bei intakter Zellmembran zurückgehalten werden und damit

nicht detektierbar sind. Andere Assays verfolgen das Ziel, tote oder absterbende Zellen anzuzeigen, indem die Mechanismen der Apoptose und Nekrose, die ebenfalls mit der Ausschüttung bestimmter Substanzen verbunden sind, genutzt werden (Burkhardt 2011).

Zur Bestimmung der Zytotoxizität steht demnach eine Reihe an Methoden zur Verfügung, die je nach Fragestellung angewendet werden können (Babich et al. 1991, Martin & Clynes 1991, Kaiser 1999, Berridge & Tan 2000).

Wie bereits erläutert (Kapitel 2.2.7), zeigten diverse Studien anhand von unterschiedlichen Zytotoxizitäts- (Viabilitäts)-bestimmungen die Zytotoxizität der Mundspüllösung Chlorhexidin. Die im Rahmen der vorliegenden Studie gewählten Verfahren zur Zytotoxizitätsbestimmung, MTT- und Cellometer-Test, werden nachfolgend kurz erläutert.

### **2.1.11 MTT-Test**

Es handelt sich dabei um einen Assay zur Bestimmung der Lebensfähigkeit und Proliferationsfähigkeit von Zellen bzw. zur Ermittlung der akuten Toxizität einer Substanz (Borenfreund et al. 1988). Mit dem MTT-Test ist es möglich, schwere und tiefer gehende Zellschäden zu charakterisieren. Er geht auf Mosmann (1983) zurück. Die Methode beruht auf der enzymatischen Reduktion des löslichen gelben Tetrazoliums Salzes MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid zu einem blau-violetten, unlöslichen Formazan (Abbildung 2). Die ursprüngliche Annahme, dass die mitochondriale Aktivität der Succinat-Dehydrogenase für diese Reduktionsreaktion ausschließlich verantwortlich ist, wurde durch Berridge & Tan (1993) aufgebrochen. In sehr viel stärkerem Umfang wird diese Reaktion von NADH und NADPH außerhalb der mitochondrialen Innenmembran, dem Sitz der Atmungskettenkomplexe, ausgeführt. Den Nachweis erbrachten die Autoren, indem sie zeigten, dass Inhibitoren der Atmungskette nur zu einem sehr geringen Teil die Reduktion von MTT zu Formazan beeinflussten, die Atmungskette selbst jedoch ihre Funktion in Anwesenheit der Inhibitoren einstellte.

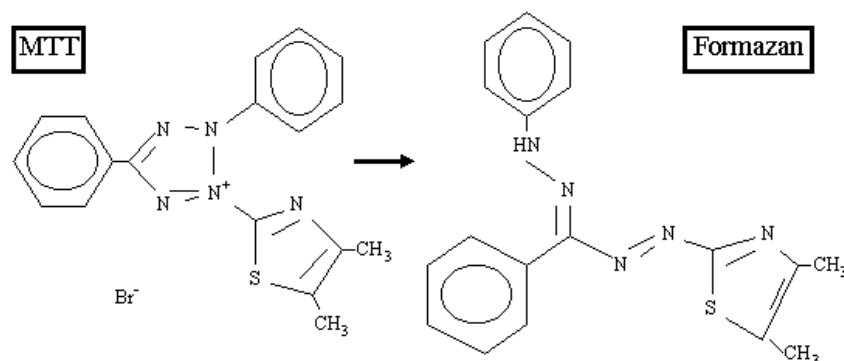


Abbildung 2: Reduktion von MTT zu Formazan

(<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/medizin/schulz-joachim/HTML/schulz-ch3.html>)

Nur lebende, stoffwechselaktive Zellen sind fähig, diese Reaktion durchzuführen. Der violette Farbstoff fällt aus und reichert sich in den Zellen an (Berridge & Tan 1993). Formazan wird anschließend in organischen Lösungsmitteln wie salzsaurem Isopropanollösung (Mosmann 1983) oder einer Mischung aus SDS, DMSO und Eisessig (Lindl 2000) gelöst und die Quantität spektralphotometrisch bestimmt. Die Menge an Formazan korreliert mit dem Proliferationsverhalten der Zellen, was die Bestimmung der Lebendzellzahl ermöglicht (Mosmann 1983).

Der MTT-Assay ist in der Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Zelltypen begrenzt, da Aktivitätsunterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien und in Abhängigkeit vom Alter einer Kultur unter anderem von Carmichael et al. (1987) und Vistica et al. (1991) nachgewiesen wurden (Freshney 2005). Alle Autoren postulieren die Notwendigkeit, für jeden Zelltyp die optimalen Assay-Bedingungen zu ermitteln. Die Messung der optischen Dichte wird bei den Zellpopulation der HGFIB in der Literatur mit 540 nm gegen die Referenzwellenlänge von 690 nm angegeben (Jeng et al. 1999, Flemingson et al. 2008, Hirsch et al. 2009, Ahrari et al. 2010, Nowakowska et al. 2012).

### 2.1.12 Cellometer

Ein Cellometer ist ein mikroskopbasierter Zellzähler. In einer einzelnen Messung können gleichzeitig die Anzahl der lebenden Zellen, die Gesamtzellzahl und der mittlere Zelldurchmesser erfasst werden. Die Basis des Tests bildet eine Trypanblau-Färbung, bei der sich Proteine mit dem sauren Diazofarbstoff Trypanblau verbinden. Proteine befinden sich im Inneren intakter Zellen; Trypanblau kann die Zellmembran nicht passieren. Ist eine Zelle jedoch zerstört, wird die Zellmembran durchgängig und die Proteine im Inneren können sich mit Trypanblau verbinden. Auf diese Weise werden ausschließlich tote Zellen blau angefärbt und sind von

den weißen Zellen unterscheidbar. Ein Cellometer besteht neben der mikroskopischen Komponente aus einer Computereinheit mit spezifischer Software, in welche die gewählte Verdünnung eingetragen werden kann (Burkhardt 2011). Freshney (2005) sowie Chan et al. (2011) beschreiben diese Methode als sensitiv und reproduzierbar. Insbesondere jedoch sind vergleichbare Ergebnisse auch zwischen verschiedenen Zelllinien zu erzielen.

Die verschiedenen vorhandenen Zellkultursysteme sind essenziell für die Identifizierung und Charakterisierung bioaktiver Substanzen und die Prüfung ihrer Bioverfügbarkeit sowie für die Begutachtung potenziell unerwünschter Nebenwirkungen (u.a. akute, chronische Toxizität, Kanzerogenität, Mutagenität, Teratogenität) (Pentzien et al. 2005). Die zellchemischen Nachweisverfahren basieren auf den grundlegenden zellulären Ereignissen Proliferation, Wachstum, Differenzierung und Zelltod (Apoptose und Nekrose). Erst auf der Basis zellchemischer Untersuchungsergebnisse ist die Durchführung klinischer Studien in vielen Fällen möglich (Burkhardt 2011).

### 3. Material und Methoden

#### Zellmaterial

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden an adhärent wachsenden Zellpopulationen der primären humanen Fibroblasten der Gingiva (HGFIB, Bestell-Nr: 1210412, Provitro GmbH, Berlin) durchgeführt. Die Zellen wurden am 10.04.2001 aus der Mundschleimhaut einer 27-jährigen Frau kaukasischen Typus entnommen und primär isoliert. Sie wurden bis zur dritten Passage *in vitro* kultiviert und anschließend unter standardisierten Einfrierbedingungen in Cryo-SFM-Medium (Bestell-Nr: 2040102 Provitro GmbH, Berlin) in 2 ml Einfrierröhrchen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Ein Aliquot der HGFIB enthielt  $5 \cdot 10^5$  Zellen.

Die HGFIB waren bei der immunhistochemischen Analyse positiv für den fibroblastenspezifischen Rezeptor CD90/Thy-1. Infektionsserologisch wurden die HGFIB auf Bakterien, Pilze, Mycoplasmen, HIV-DNA und Hepatitis B/C-DNA getestet und zeigten negative Befunde.

#### Kulturbedingungen

Die Kultivierung der Zellen erforderte grundsätzlich aseptische Arbeitsbedingungen und eine ständige mikroskopische Kontrolle (Invertmikroskop Axiovert 35, Fa. Zeiss) nach jedem Schritt.

Die Versuche und Mediumwechsel wurden ausschließlich unter der Sterilbank (Fa. Heraeus, Hannover) durchgeführt. Alle in der Kultur verwendeten Materialien wurden vom jeweiligen Hersteller steril geliefert oder die Materialien wurden im Labor autoklaviert bzw. steril filtriert.

Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Brutschrank (Sanyo MCO 17 A, Fa. Krannich, Göttingen) bei 37°C, mit einem Anteil von 5% CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 90%.

#### Zellkulturgefäße

Für die vorliegende Studie wurden spezielle Zellkulturgefäße verwendet. Für die Subkultivierung der Zellen wurden Kulturflaschen (Cellstar®, Fa. Greiner-Bio-One, Frickenhausen) verwendet.



Für den Kernversuch wurden 12-Well-Platten (Fa. Greiner-Bio-One, Frickenhausen) verwendet.

## Zellmedium, Puffer und Trypsinlösung

**Zellmedium:** Für die Anzucht der Zellen wurde das **Fibroblasten-Medium (Fib-roblast-Growth-Medium, Bestell-Nr. 2010401, Provitro GmbH, Berlin)** verwendet. Das Wachstumsmedium ist eine sterile Flüssigkeit, die 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS) enthält. Zur Vermeidung einer bakteriellen Infektion wurden dem Medium die Antibiotika Amphotericin B (50.00 ng/ml) und Gentamicin (50.00 µg/ml) beige-mischt. Das Medium selbst wurde im Dunkeln bei +4-8°C aufbewahrt. Das Supplement wurde bei -20°C gelagert und unmittelbar vor Gebrauch im Wasserbad bei +37°C aufgetaut und dem Medium beigemischt.

**3.1.1 Puffer:** Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS, *phosphate-buffered sa-line*, pH7,4) (Fa. Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) besteht aus: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 1 L H<sub>2</sub>O

### 3.1.2

**Trypsin-Lsg.:** Für das Zählen und die Subkultivierung mussten die adhären wachsenden Zellen vom Boden abgelöst werden. Dies wird standardmäßig mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (Passage-Kit 2, Bestell-Nr. 2040002, Provitro GmbH, Berlin) mit einer Einwirkzeit von 5-7 Minuten durchgeführt. Trypsin hat sein Wirkoptimum bei 37°C, daher wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert. Nach der abgelaufenen Zeit wird die proteolytische Wirkung durch die Zugabe von fetalem Kälberserum beendet, um die Viabilität der Zellen zu erhalten.

## CHX-Lösungen

Für diese Untersuchung wurden zwei verschieden konzentrierte, alkoholfreie CHX-Lösungen mit dem Handelsnamen Curasept® (Fa. Curaden Healthcare S.R.L.-Milano) verwendet. In der Tabelle 1 sind die in den Versuchen verwendeten CHX-Lösungen in den Konzentrationen 0,12 % und 0,2 % CHX und ihren Zusätzen dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht der getesteten Lösungen

Produkt	Konzentration	Zusätze	Hersteller
CURASEPT ADS 220®	0,12 % CHX	Aqua, Xylitol, Peg- 40 Hydrogenated Castor Oil, Propylene, Glicol, Poloxamer 407, Ascorbic Acid, Sodium Benzoate, Sodium Metabisulfite, Sodium Citrate, C.I. 42090	Curaden Healthcare S.R.L.- Milano
CURASEPT ADS 212®	0,2 % CHX	Aqua, Xylitol, Propylene, Glicol, Peg- 40 Hydrogenated Castor Oil, Ascorbic Acid, Aroma, Poloxamer 407, Sodium Metabisulfite, Sodium Citrate, C.I. 42090	Curaden Healthcare S.R.L.- Milano

Die Lösungen wurden vor dem Versuchsstart steril filtriert und im Versuch unverdünnt eingesetzt.

### Subkultivierung von Massenkulturen

Die humanen Fibroblasten wachsen als Monolayer, bilden also nur eine Zellschicht auf der Kulturflaschenoberfläche aus. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 70-80% erreichten, wurden sie abgelöst und mit einer verdünnten Zelldichte erneut ausgesät, um weiteres Wachstum zu ermöglichen und auf diese Weise das Zellmaterial für die Versuche zu vermehren. Bei einer Konfluenz von 70-80 % stehen die Zellen untereinander in Kontakt, wodurch die Proliferationsrate stark absinkt und ein Absterben der Zellen begünstigt wird.

Die Zellkulturen wurden ausgehend vom tiefgefrorenen Aliquot gezüchtet (s.o.).

#### 3.1.3 Auftauen tiefgefrorener Zellen

Nach der Entnahme der tiefgefrorenen HGFIB aus dem Stickstofftank wurden die Zellen zunächst für 20 Minuten auf Nasseis und anschließend in einem Wasserbad bei +37°C aufgetaut, dabei wiederholt über Kopf geschüttelt, um ein rapides Auftauen zu erzielen. Die anschließenden Arbeiten wurden unter der sterilen Werkbank durchgeführt.

Der Überstand über der aufgetauten Zellsuspension wurde vorsichtig mithilfe einer Vakuumpumpe und einer Pipette abgesaugt. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein steriles 15-ml-Zentrifugenröhrchen, das mit 10 ml Medium gefüllt war, umgesetzt (Abbildung 3).



Abbildung 3: Umsetzung der Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen

Das Zentrifugenröhrchen wurde bei Raumtemperatur und  $250 \times g$  für 5 Minuten zentrifugiert (Labor-Kühlzentrifuge 2K15C, Fa. Sigma, München), um die Zellen vom Medium zu trennen. Dieser Schritt diente der Entfernung des Einfriermediums aus der Zellsuspension, da dieses zytotoxisches DMSO enthält. Nach dem Entfernen des Überschusses mithilfe einer Pipette wurden 10 ml frisches Medium zum Zellpellet gegeben und die Suspension schonend auf und abpipettiert, um eine homogene Durchmischung zu erreichen. Je 5 ml wurden in zwei  $25 \text{ cm}^2$  Kulturflaschen gegeben. Die HGFIB wurden entsprechend der Empfehlung von Provitro GmbH mit der Dichte von  $4000 \text{ Zellen/cm}^2$  ausgesät. Die Schraubendeckel wurden nur zur Hälfte verschlossen, um einen Gasaustausch zu ermöglichen. Die Kulturflaschen mit den HGFIB wurden im Brutschrank inkubiert.

Nach 24 Stunden fand der erste Mediumwechsel statt. Dabei wurden 4 ml des verbrauchten Mediums durch 4 ml frisches Medium pro Kulturflasche ausgetauscht und die Zellen unter dem Mikroskop auf Adhärenz und Dichte kontrolliert. Der Austausch dient der Entfernung nicht adhärenter Zellen. Der nächste Mediumwechsel fand 72 Stunden nach der ersten Aussaat statt und diente dem Abtransport der Ausscheidungsstoffe der Zellen und deren Versorgung mit Nährstoffen.

Am vierten Tag nach der ersten Aussaat fand die erste Abtrypsinierung (Passagierung) statt, da die adhären wachsenden Zellen eine Konfluenz von 70-80% der Kulturflaschenoberfläche erreicht hatten (Abbildung 4).

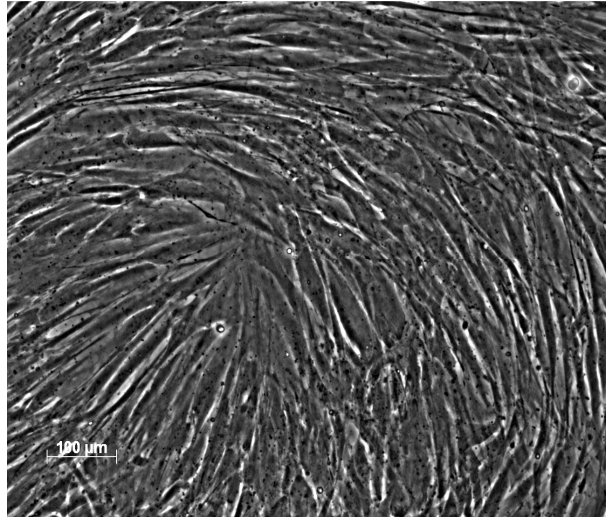


Abbildung 4: Fibroblasten bei Konfluenz von 80%

Im Laufe der gesamten Versuchsreihe erfolgte die Abtrypsinierung stets nach dem gleichen Protokoll, das nachstehend aufgeführt ist:

1. Vorsichtiges Absaugen des gesamten Mediums
3. Hinzufügen von 2 ml auf 37°C vorgewärmte Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)
4. Waschen der Zellen durch mehrfaches Schwenken der Kulturflaschen, um Medium- und Serumreste gründlich zu entfernen
5. Entfernen des PBS und Hinzufügen von 2 ml steriler, auf 37°C vorgewärmter Trypsin-EDTA-Lösung
6. Inkubation der Flaschen im Brutschrank für 5-7 Minuten
7. Die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden wurde mikroskopisch kontrolliert (Abbildung 5) und zusätzlich durch schonendes Klopfen am Flaschenboden verstärkt

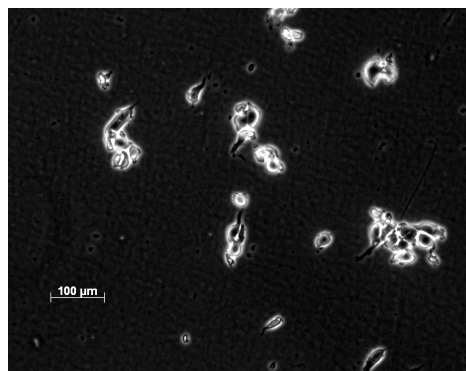


Abbildung 5: Abtrypsinierte Zellen

8. Inaktivierung des Trypsins durch Zugabe von 5 ml Medium mit 10 % fetalem Kälberserum zu den Zellen
9. Aufnahme des gesamten Inhalts der Flasche mittels einer Pipette und Umsetzen in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen
10. Nachspülen der Flasche mit 5 ml Medium, um die noch lose an der Kulturflasche haftenden Zellen abzuspülen
11. Zentrifugation bei Raumtemperatur und 250 x g für 5 Minuten
12. Entfernen des Überstandes und Resuspension des Zellpellets in 1 ml Medium
13. Entnahme von 20 µl Zellsuspension für den Objektträger und Zellzählung mittels Cellometer TN Auto T4 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, USA), um die Gesamtzellzahl zu bestimmen
14. Homogene Verteilung einer definierten Zellzahl in frische Zellkulturflaschen (75cm<sup>2</sup>) und Zuführen von 14 ml Medium pro Flasche
15. Mediumwechsel nach 24 Stunden und dann an jedem dritten Tag (Abbildung 6)



Abbildung 6: Mediumwechsel in den Kulturflaschen während des Anzüchtens

Bei Erreichen einer Konfluenz von 70-80% der Kulturflaschenoberfläche wurden die Zellen erneut passagiert; dies war am siebten Tag nach der Aussaat der Fall. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis eine ausreichende Anzahl an Zellen für den Versuch zur Verfügung stand. Im letzten vorbereitenden Schritt für die Versuche wurden die Zellen in sogenannte 12-Well-Platten (Zellkulturplatten mit zwölf Vertiefungen zur simultanen Durchführung mehrerer Versuche) überführt. Pro Versuch benötigte man 2,5-Well-Platten für 2 Auswertungsmethoden. Jedes Well enthielt eine Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen pro ml Kulturmedium.

### 3.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Mit ansteigender Kulturdauer verändert sich das Proliferationsverhalten und das Differenzierungsmuster der Fibroblasten. Um die Versuche vergleichen zu können, ist daher möglichst auf Zellpopulationen der gleichen Passage innerhalb der Zelllinie zurückzugreifen. Aus diesem Grunde wurden die Zellen in den verschiedenen Stadien tiefgefroren. Zu diesem Zweck wurde wie folgt vorgegangen:

- Abtrypsinieren der konfluenten Zellen (siehe dazu Abschnitt 0)
- Zellzählung
- Zentrifugieren der Zellsuspension bei 250 x g für 5 min
- Aufnahme der Pellets im 1 ml Cryo-SFM-Medium (Provitro GmbH, Berlin) und mehrmalige Resuspendierung des Gemisches
- Aufnahme von Aliquots mit je  $10^6$  Zellen pro vorgekühltes Kryoröhrchen
- Einfrieren der Kryoröhrchen nach Herstellerempfehlung.

Nach der Herstellerempfehlung wurden die Zellen in vorgekühlte 1,5-ml-Röhrchen überführt und für 24 Stunden in einem Isopropanolbad bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert, in welchem die Temperatur schrittweise um  $1^{\circ}\text{C}$  pro Minute reduziert wurde. Zuletzt wurden sie zur Lagerung in Behälter mit flüssigem Stickstoff eingelassen. Dieser Vorgang ermöglicht ein langsames und schonendes Einfrieren der Zellen unter Vermeidung der Eiskristallbildung.

## Versuchsdurchführung

### 3.1.5 Versuchsaufbau

Die Zellen wurden für die Behandlung mit den CHX-Lösungen in 12-Well-Platten umgesetzt. Die Zelldichte wurde auf  $2 \times 10^5$  Zellen/ml Kulturmedium/Well eingestellt. Für einen Versuch wurden 2,5x12-Well-Platten für beide Auswertungsverfahren benötigt. Die Durchführung der Versuche erfolgte immer in gleicher Reihenfolge mit denselben Materialien, Zellen der Passagen 6 und 7, in gleichen Zeitabständen und unter strenger lichtmikroskopischer Kontrolle. Die Versuche wurden 12-mal wiederholt. Jede Versuchsreihe erfolgte als Doppelbestimmung.

Nach dem Befüllen der 12-Well-Platten wurden diese im Brutschrank inkubiert. Nach 24 Stunden fand der erste Mediumwechsel statt.

96 Stunden nach der Aussaat in die Platten fand die Behandlung der Zellen mit CHX-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen bei zwei unterschiedlichen Ein-

wirkzeiten statt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit PBS gespült. Nach 24 Stunden, 3 Tagen und 5 Tagen wurden die Viabilität und die Zellzahl mittels MTT-Test bestimmt.

Der gesamte Versuchsaufbau ist in Abbildung 7 graphisch zusammengefasst.

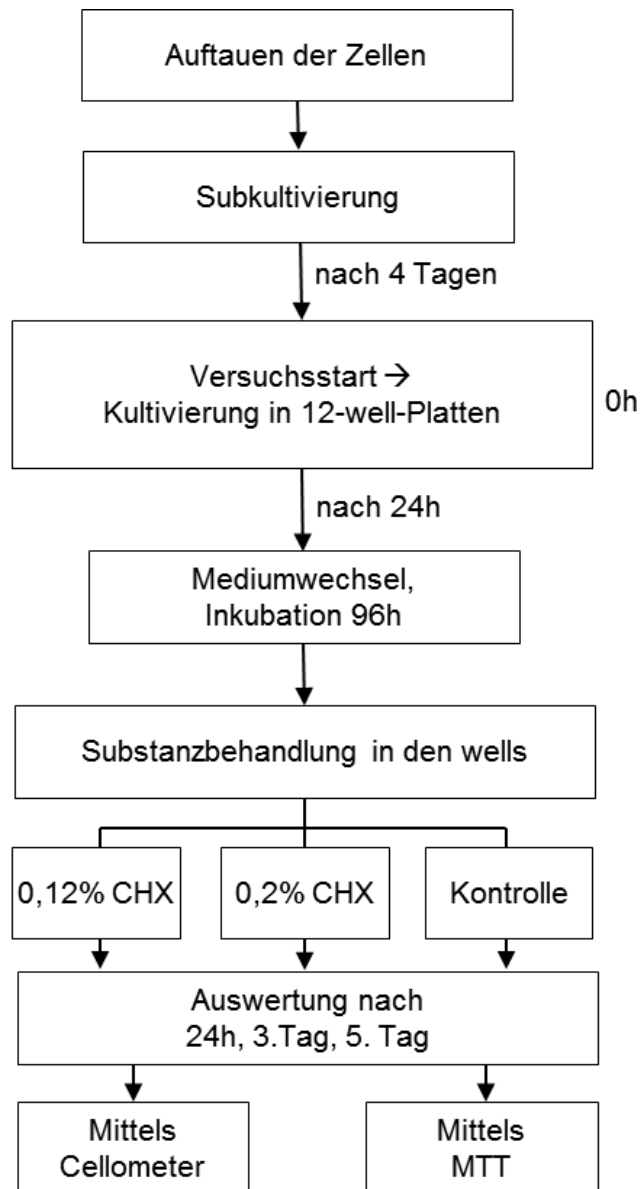


Abbildung 7: Versuchsaufbau

### 3.1.6 Behandlung der Zellen

Das verbrauchte Medium wurde entfernt und 1 ml frisches Medium mit 0,12 % bzw. 0,2 % CHX langsam auf die adhärennten Zellen am Rande der Wells pipettiert (Abbildung 8). Nach 1 Minute bzw. 5 Minuten wurden die Lösungen abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und durch 1 ml frisches Medium ersetzt. Die Kontrolle der Wells wurde nur mit PBS gewaschen und dann mit neuem Medium gefüllt.

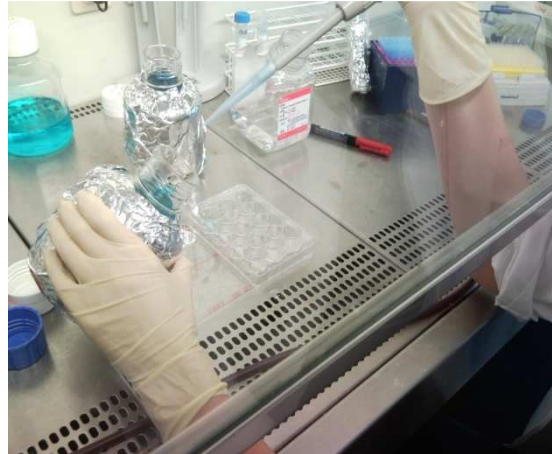


Abbildung 8: Behandlung der Fibroblasten mit den CHX-Spüllösungen

Der Aufbau einer 12-Well-Platte mit dem dazugehörigen Versuchsdesign ist in Abbildung 9 dargestellt.

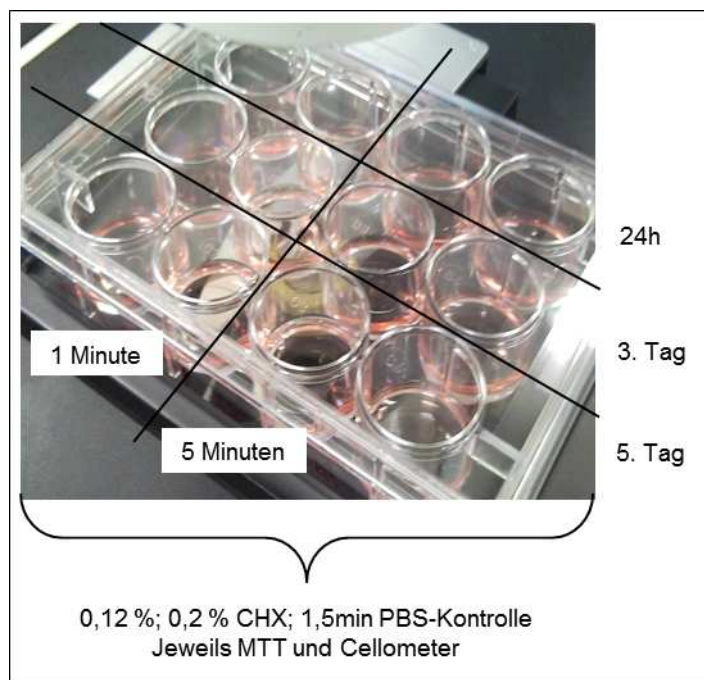


Abbildung 9: Aufbau einer 12-Well-Platte mit zugehörigem Versuchsdesign

Bis zu den Auswertungszeiten befanden sich die Zellen im Inkubator. Bei den Zellen, die nach 3 und 5 Tagen ausgewertet wurden, fand der Mediumwechsel nach 24 Stunden und nach dem dritten Tag statt.



## Auswertungsmethoden

Es wurde mittels zweier unterschiedlicher Methoden die Viabilität der Zellen (MTT, Cellometer) und die Zellzahl mittels Cellometer ermittelt. Die MTT- und Cellometerauswertung der behandelten Zellen fand jeweils nach 24 Stunden, 3 und 5 Tagen statt.

### 3.1.7 Auswertungsvorgehen mittels MTT ( Bestimmung der Viabilität)

1. Pipettieren von 250  $\mu$ l MTT-Substanz (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Fa. Sigma-Aldrich) je Well und Inkubation im Brutschrank für 2 Stunden
2. Anschließende mikroskopische Kontrolle der Bildung violetter Kristalle (Abbildung 10)

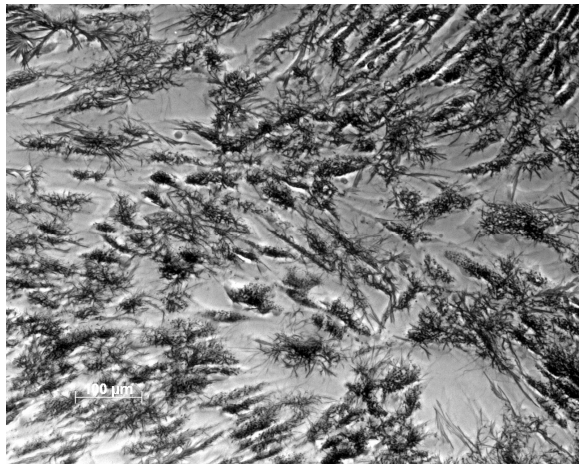


Abbildung 10: Fibroblasten nach zweistündiger Einwirkung der MTT-Substanz

3. Absaugen des Mediums und tröpfchenweises Hinzufügen von 1 ml DMSO (Fa. Merck, Hohenbrunn), um die entstandenen Kristalle lösen zu können
4. Inkubation im Brutschrank für 15 Minuten
5. Visuelle Kontrolle der gelösten Kristalle im Lichtmikroskop (Abbildung 11)

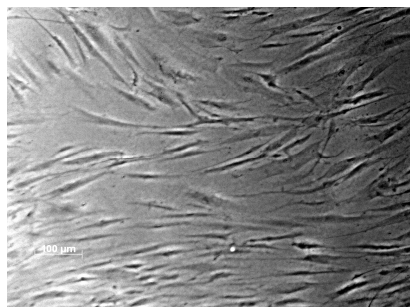


Abbildung 11: Fibroblasten nach Einwirkung des DMSO

6. Platzierung der Wells im Photometer (Spectramax M2, Fa. Molecular Devices, USA)
7. Einstellen der Wellenlänge von 555 nm für Fibroblasten und der Referenzwellenlänge von 690 nm in der zum Photometer gekoppelten Software (SoftMax® Pro, Fa. Molecular Devices, USA)
8. Messung der Excitation der Zellen der einzelnen Wells
9. Anzeigen der Ergebnisse zu den dazugehörigen Referenzwellenlängen

Für die Auswertung werden die Ergebnisse der Referenzwellenlänge von den Ergebnissen der Exzitationswellenlängen subtrahiert. Die Ergebnisse der Kontrollwells jeder Platte wurden als 100% ausgegeben, da hier die Zellen lediglich mit PBS behandelt wurden und folglich das unter den angegebenen Bedingungen optimale Wachstum zeigen.

### **3.1.8 Auswertungsvorgehen mittels Cellometer**

Das Cellometer TM Auto T4 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, USA) ist ein mikroskopbasierter, automatisierter Zellzähler. Nach weniger als 30 Sekunden wurden die Ergebnisse (Zellzahl, Viabilität) übersichtlich dargestellt.

1. Visuelle Kontrolle der Dichte der adhärennten Zellen im Lichtmikroskop
2. Absaugen des Mediums
3. Waschen mit 1 ml PBS
4. Ersetzen der PBS-Lösung durch 250 µl Trypsin-EDTA-Lösung
5. Inkubation für 5-7 Minuten im Brutschrank
6. Zugabe von 1 ml Medium und Resuspension der Zellen
7. Aufnahme des gesamten Volumens jedes Wells und Umsetzen der Zellen in ein Zentrifugenröhrchen
8. Zentrifugieren der Röhrchen bei Raumtemperatur und 250 x g für 5 Minuten
9. Entfernen des Überstandes und Resuspension des Zellpellets in 1 ml Medium
10. Entnahme von 20 µl Zellsuspension zur Messung
11. Eingabe des Zelltyps (Fibroblasten), des Verdünnungsfaktors (1) und des Zelldurchmessers (10-50 nm) in das Programm

## Statistische Auswertungen

Die Wirkung der CHX-Lösungen auf die Viabilität und das Proliferationsverhalten der menschlichen Gingivafibroblasten wurde mithilfe von SPSS, Version 20.0.0, ausgewertet. Es wurde für beide Auswertungsverfahren getrennt überprüft, um vor allem drei Fragen zu klären:

- Unterscheidet sich die Wirkung der beiden Konzentrationen auf die HGFIB in Abhängigkeit von der Einwirkzeit und der Auswertungszeit voneinander?
- Unterscheidet sich die Wirkung der beiden Einwirkzeiten auf die HGFIB in Abhängigkeit von der Konzentration und der Auswertungszeit voneinander?
- Unterscheiden sich die Auswertungszeitpunkte in der Wirkung auf die HGFIB in Abhängigkeit von der Einwirkzeit und der Konzentration voneinander?

Zunächst wurde für jede Kombination Methode-Lösungskonzentration-Einwirkzeit überprüft, ob Unterschiede zwischen den verschiedenen Zeitpunkten bestehen und, falls dem so ist, ob diese signifikant sind.

Dafür wurde im ersten Schritt überprüft, ob Normalität und Varianz-Homogenität für alle Kombinationen und Zeitpunkte vorliegen. Diese Informationen sind zur Anwendung des Varianzanalyse-Verfahrens, mit dem Mittelwertsunterschiede zwischen den Gruppen eruiert werden, essenziell.

Die Prüfung auf Varianz-Homogenität erfolgte mit dem Levene-Test. Bei Ergebnissen kleiner als 0.05 liegt keine Varianzhomogenität vor. Der Test auf Normalverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt. Bei Ergebnissen unter 0.05 liegt keine Normalverteilung vor.

Die Prüfungen zeigten bei fast allen Auswertungskriterien weder eine Normalverteilung noch Varianzhomogenität, denn die Signifikanzen beim Levene-Test und beim Kolmogorov-Smirnow-Test waren sehr häufig kleiner als 0.05.

In solchen Fällen werden nichtparametrische Verfahren eingesetzt. Um die möglichen Unterschiede zwischen den Auswertungstagen zu evaluieren, wurde zur Überprüfung der drei Hypothesen der Friedmann-Test als Alternative zur ANOVA verwendet; dieser fordert mildere Voraussetzungen. Grundsätzlich wird von abhängigen Messungen ausgegangen, da es sich um Messwiederholungen handelt. Nachdem beim Friedmann-Test festgestellt wurde, dass die Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten signifikant waren, ergab sich die Frage, wie sich die Zeit-

punkte untereinander unterschieden. Um Unterschiede bei den Messwiederholungen zwischen zwei Zeitpunkten zu ermitteln, wurde der Wilcoxon-Test verwendet. Statistisch gesicherte Unterschiede liegen vor, wenn ein Signifikanzniveau kleiner als 0.05 erreicht wird.

Zur Überprüfung der ersten Hypothese wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet, da die Stichproben unabhängig voneinander unterschiedlichen Behandlungen unterworfen wurden. Die Unterschiede zwischen den mit beiden Konzentrationen CHX behandelten Zellen und der Kontrolle wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test getestet, da hier ebenfalls unabhängige Stichproben vorlagen. Die Überprüfung der zweiten Hypothese wurde erneut mittels Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### Übersicht

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Zytotoxizitätstests bei unterschiedlichen CHX-Konzentrationen und Einwirkzeiten auf primäre humane Fibroblasten zusammengefasst, grafisch dargestellt und erläutert.

### Ergebnisse mittels MTT-Test

#### 4.1.1 Ergebnisse nach Einwirkzeiten und nach Auswertungstagen

Die Ergebnisse der Stoffwechselaktivität der HGFIB nach Behandlung mit 0,12 %/ 0,2 % CHX und der Kontrolle sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Die Tabelle zeigt die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardfehlern für die Viabilität der HGFIB, die mittels MTT bei unterschiedlichen Einwirkzeiten (1,5 Minuten) und unterschiedlichen Auswertungszeiten (24 h, 3 Tag und 5 Tag) ermittelt wurden.

Tabelle 2: Mittelwerte und Standardfehler für die MTT-Messungen (OD) nach der Behandlung mit 0,12 %, 0,2 % CHX und der Kontrolle

Konz. CHX	1 Minute Einwirkzeit		5 Minuten Einwirkzeit		Kontrolle
	0,12 %	0,2 %	0,12 %	0,2 %	
1 Tag	0,30 ± 0,04	0,22 ± 0,08	0,24 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,38 ± 0,08
2 Tag	0,22 ± 0,09	0,15 ± 0,10	0,20 ± 0,07	0,11 ± 0,07	0,41 ± 0,05
3 Tag	0,31 ± 0,14	0,22 ± 0,14	0,26 ± 0,10	0,18 ± 0,13	0,50 ± 0,05

Die graphischen Darstellungen dieser Werte sind in Abbildung 12 bis Abbildung 14 separat für jeden Auswertungstag dargestellt.

Die Versuchsreihen mit 0,12 % und 0,2 % CHX zeigten eine Reduktion der metabolischen Stoffwechselaktivität der Zellen in Abhängigkeit von der Einwirkzeit der Mundspüllösung: Je länger CHX beider Konzentrationen auf den Zellen verbleibt, desto stärker sind die Zellen in ihrer Aktivität gehemmt. Dieser Unterschied zwischen den Einwirkzeiten ist bei beiden Konzentrationen am ersten Tag signifikant ( $p < 0,002$ ), wobei in allen drei Abbildungen eine einwirkzeitabhängige Hemmung der Stoffwechselaktivität bereits erkennbar ist: Die Werte bei einer Minute sind in allen Fällen höher als bei fünf Minuten Einwirkzeit. Während nach einer Minute Einwirkzeit der Mundspüllösung zum ersten Auswertungszeitpunkt (24h) bei 0,12 % CHX  $0,30 \pm 0,04$  OD gemessen wurde, zeigten sich nach fünf Minuten  $0,25 \pm 0,02$  OD.

Im Vergleich dazu wurde bei 0,2 % bei einer Minute Einwirkzeit der Mundspüllösung am ersten Auswertungszeitpunkt (24h)  $0,23 \pm 0,08$  OD gemessen, nach fünf Minuten  $0,19 \pm 0,03$  OD (Abbildung 12).

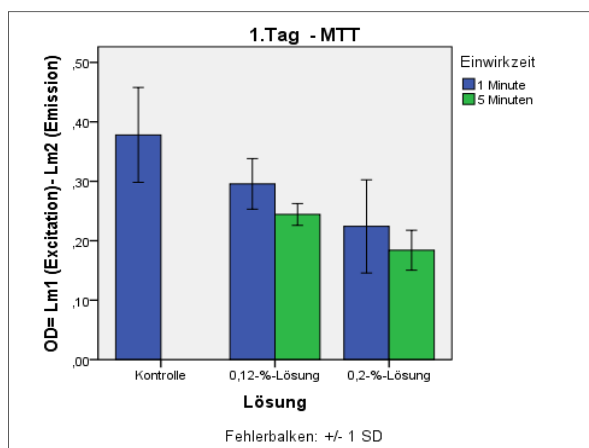


Abbildung 12: Einfluss der 0,12 % CHX-Lösung, 0,2 % CHX-Lösung und der Kontrolle auf die HGFIB in Abhängigkeit von der Einwirkzeit am ersten Auswertungstag

Nach drei Tagen wurde bei einer Minute bei 0,12 % CHX  $0,22 \pm 0,09$  OD im Vergleich zu fünf Minuten  $0,20 \pm 0,07$  OD registriert. Bei 0,2 % CHX wurde nach einer Minute Einwirkzeit  $0,15 \pm 0,10$  OD im Vergleich zu fünf Minuten  $0,11 \pm 0,07$  OD gemessen (Abbildung 13).

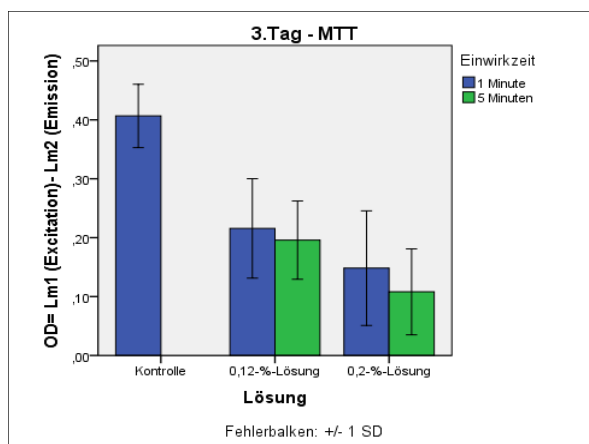


Abbildung 13: Einfluss der 0,12 % CHX-Lösung, 0,2 % CHX-Lösung und der Kontrolle auf die HGFIB in Abhängigkeit von der Einwirkzeit am dritten Auswertungstag

Auch nach fünf Tagen wurde bei beiden Konzentrationen eine höhere Aktivität der Zellen nach einer Minute Einwirkzeit als nach fünf Minuten gemessen. Bei 0,12 % wurde  $0,31 \pm 0,14$  OD im Vergleich zu fünf Minuten  $0,26 \pm 0,10$  OD gemessen. Bei

0,2 % CHX wurde nach einer Minute CHX-Verweildauer  $0,20 \pm 0,14$  OD im Vergleich zu fünf Minuten  $0,18 \pm 0,13$  OD gemessen (Abbildung 14).

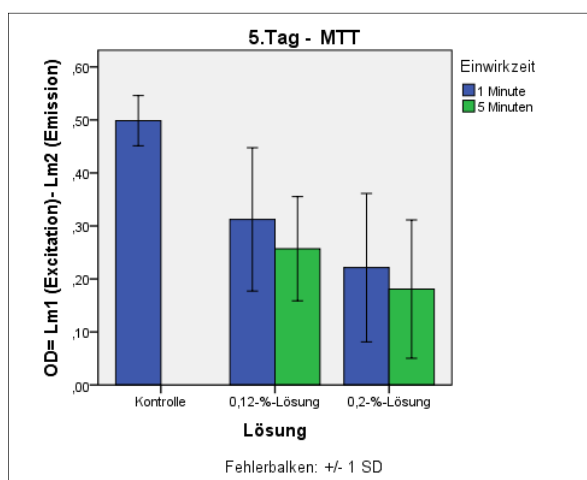


Abbildung 14: Einfluss der 0,12 % CHX-Lösung, 0,2 % CHX-Lösung und der Kontrolle auf die HGFIB in Abhängigkeit von der Einwirkzeit am fünften Auswertungstag

Die metabolische Aktivität war nach der Behandlung mit 0,12 % und 0,2 % CHX bei allen Versuchsreihen (1-12) bei den beiden Einwirkzeiten (1/ 5 Minuten) an jedem Auswertungszeitpunkt (1., 3. und 5. Tag) im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert ( $p < 0,0001$ ).

#### 4.1.2 Vergleich der CHX-Konzentrationen untereinander

Der Vergleich zeigt die Wirkung der einzelnen CHX-Konzentrationen auf die metabolische Aktivität der Zellen bei unterschiedlichen Einwirkzeiten und Auswertungstagen.

Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über die Vergleiche.

Tabelle 3: Paarweise Vergleiche der Mundspüllösungen in Abhängigkeit von Einwirk- und Auswertungszeit

Auswertungstag		Einwirkzeit	
		1 Minute	5 Minuten
1. Tag		<b>0,006</b>	<b>&lt;0,0001</b>
3. Tag	0,12 % CHX vs. 0,2 % CHX	0,089	<b>0,004</b>
5. Tag		0,143	0,114

Abbildung 15 stellt die Unterschiede zwischen beiden Konzentrationen, Einwirkzeiten und Auswertungstagen grafisch dar. In Abbildung 15 wird erkennbar, dass die

Streuungen bei Tag 1 sehr gering ausfielen. Hier sind die Unterschiede zwischen den beiden Lösungen bei beiden Einwirkzeiten signifikant (s. Tab. 3). Bei Tag 3 sind die Unterschiede geringer und die Streuungen größer, so dass nur noch bei 5-minütiger Einwirkzeit ein signifikanter Unterschied zwischen den Lösungen erreicht wurde (s. Tab. 3). Bei Tag 5 ist eine weitere Verringerung und größere Streuung in der Abbildung 15 zu sehen. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Lösungen wurde nicht mehr eruiert, wie man der Tabelle 3 entnehmen kann.

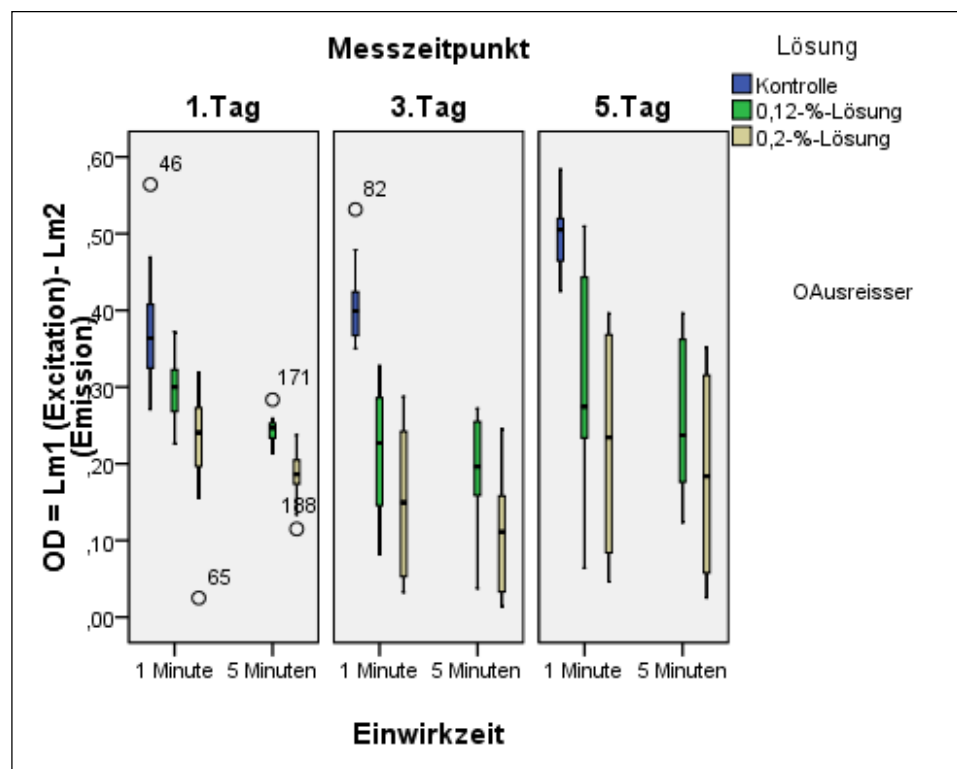


Abbildung 15: Vergleiche der CHX-Konzentrationen in Abhängigkeit von Einwirkzeit und Auswertungstag

Fazit: Im MTT-Test zeigte sich, dass die Lösung mit 0,2 % CHX einen schädigenderen Einfluss auf die Metabolik der Zellen ausübte als die Lösung mit 0,12 % CHX. Dies gilt insbesondere bei einer 5-minütigen Einwirkzeit. Da die Zellen sich jedoch im weiteren Zeitverlauf erholen, werden die aus der Behandlung resultierenden Unterschiede aufgehoben, sodass keine Unterschiede mehr ermittelbar sind.



### 4.1.3 Vergleich der Auswertungstage untereinander

Die metabolische Aktivität war ebenfalls bei 0,12 % und 0,2 % CHX ähnlich: Bei beiden Einwirkzeiten war die Aktivität nach fünf Tagen am höchsten und nach drei Tagen am niedrigsten – im Gegensatz zur Kontrolle. Hier war zwar die Aktivität nach fünf Tagen ebenfalls am höchsten ( $0,50 \pm 0,05$  OD), aber zum ersten Auswertungszeitpunkt am niedrigsten ( $0,38 \pm 0,08$  OD). Am ersten Auswertungszeitpunkt wurden bei 0,12 % CHX  $0,27 \pm 0,04$  OD, am zweiten Zeitpunkt  $0,21 \pm 0,08$  OD und nach fünf Tagen  $0,28 \pm 0,12$  OD gemessen. Bei 0,2 % CHX wurden am ersten Auswertungszeitpunkt  $0,21 \pm 0,06$  OD, am zweiten Zeitpunkt  $0,13 \pm 0,09$  OD und am dritten Zeitpunkt  $0,20 \pm 0,13$  OD gemessen. Diese Ergebnisse zeigten meist einen signifikanten Unterschied zwischen den Auswertungstagen (p-Werte zwischen 0,006 und  $< 0,05$ ; Tabelle 4).

Tabelle 4: Paarweiser Vergleich zwischen den CHX-Konzentrationen in Abhängigkeit von Einwirkzeit und Auswertungszeit

		Einwirkzeit	
		1 Minute	5 Minuten
<b>Vergleiche (p-Werte)</b>	CHX 0,12 % 3.Tag vs. CHX 0,12 % 1.Tag	<b>0,005</b>	<b>0,010</b>
	CHX 0,12 % 5.Tag vs. CHX 0,12 % 1.Tag	0,695	0,610
	CHX 0,12 % 5.Tag vs. CHX 0,12 % 3.Tag	<b>0,005</b>	<b>0,015</b>
	CHX 0,2 % 3.Tag vs. CHX 0,2 % 1.Tag	<b>0,015</b>	<b>0,005</b>
	CHX 0,2 % 5.Tag vs. CHX 0,2 % 1.Tag	0,875	0,814
	CHX 0,2 % 5.Tag vs. CHX 0,2 % 3.Tag	<b>0,034</b>	<b>0,008</b>

Wie Tabelle 4 zu entnehmen ist, waren die Unterschiede zwischen Tag 1 und Tag 3, Tag 3 und Tag 5 meist signifikant. Zwischen Tag 1 und Tag 5 gab es hingegen keine signifikanten Unterschiede, weil die Werte wieder ähnlich hoch waren.

Anhand der Boxplots in Abbildung 15 ist erkennbar, dass bei einer fünfminütigen Einwirkzeit eine negative Wirkung auf die Zellen stattfand, die sich am Untersuchungstag 3 besonders stark zeigte. Von dieser Behandlung konnten die Zellen sich bis zum Tag 5 offensichtlich gut erholen. Dies zeigt sich auch in der Tabelle 4, dass zwischen Tag 1 und 5 kaum signifikante Unterschiede bestanden.

## Ergebnisse der optischen Zellzählung

### 4.1.4 Ergebnisse nach Einwirkzeiten und nach Auswertungstagen

Die Ergebnisse der Gesamtzellzahl der HGFIB nach Behandlung mit 0,12 %, 0,2 % CHX und der Kontrolle sind in Tabelle 5 aufgeführt. Diese zeigt die Mittelwerte und Standardfehler für die Gesamtzellzahlbestimmung der HGFIB, die mittels Cello-meter bei unterschiedlichen Einwirkzeiten an den verschiedenen Auswertungstagen ermittelt wurden.

Tabelle 5: Mittelwerte und Standardfehler für die Gesamtzellzahl ( $\times 10^5$  Zellen/ml) der HGFIB nach der Behandlung mit 0,12 %, 0,2 % CHX und der Kontrolle

Konz. CHX	1 Minute Einwirkzeit		5 Minuten Einwirkzeit		Kontrolle
	0,12 %	0,2 %	0,12 %	0,2 %	
1 Tag	1,51 $\pm$ 0,22	1,46 $\pm$ 0,20	1,40 $\pm$ 0,38	1,19 $\pm$ 0,42	1,79 $\pm$ 0,16
2 Tag	1,43 $\pm$ 0,26	1,43 $\pm$ 0,23	1,47 $\pm$ 0,20	1,19 $\pm$ 0,45	1,98 $\pm$ 0,27
3 Tag	1,57 $\pm$ 0,27	1,41 $\pm$ 0,36	1,34 $\pm$ 0,47	1,14 $\pm$ 0,27	2,23 $\pm$ 0,34

Die graphischen Darstellungen dieser Werte erfolgen in den Abbildungen 16 bis 18 separat für jeden Auswertungstag.

Die Versuchsreihen mit Konzentrationen von 0,12 % bzw. 0,2 % CHX zeigten eine Reduktion der Zellzahl in Abhängigkeit von der Einwirkzeit der Mundspüllösung. Je länger die Mundspüllösungen auf den Zellen verbleiben, desto geringer war die Gesamtzellzahl und dies an jedem der Auswertungszeitpunkte, außer bei 0,12 % am 3. Tag. Der Unterschied zwischen den beiden Einwirkzeiten erreicht bei 0,2 % Signifikanzniveau ( $p < 0,0302$ ).

Während nach einer Minute Einwirkzeit der 0,12 % Mundspüllösung am ersten Auswertungszeitpunkt  $1,51 \pm 0,21 \times 10^5$  Zellen/ml gemessen wurden, wurden nach fünf Minuten  $1,40 \pm 0,38 \times 10^5$  Zellen/ml gemessen.

Bei der 0,2 % CHX-Versuchsreihe wurden nach einer Minute Einwirkzeit der Mundspüllösung am ersten Auswertungszeitpunkt  $1,46 \pm 0,20 \times 10^5$  Zellen/ml, nach fünf Minuten  $1,19 \pm 0,42 \times 10^5$  Zellen/ml erfasst (Abbildung 16).

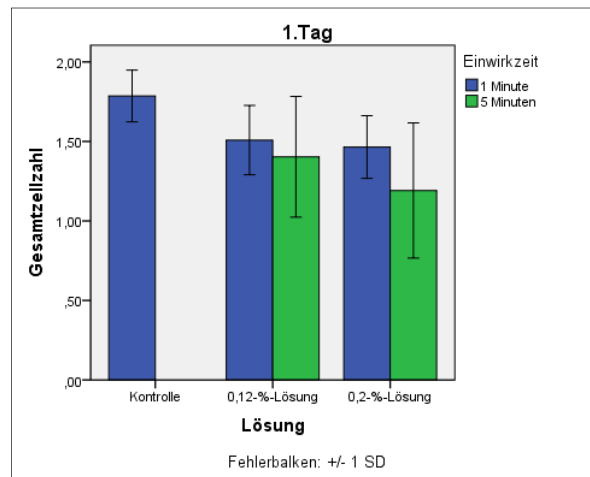


Abbildung 16: Einfluss der 0,12 %, 0,2 % CHX-Lösung und der Kontrolle auf die Zellzahl ( $x \cdot 10^5$  /ml) der HGFIB in Abhängigkeit von der Einwirkzeit am 1. Auswertungstag

Nach drei Tagen wurden bei 0,12 % CHX nach einer Minute  $1,43 \pm 0,26 \times 10^5$  Zellen/ml und nach fünf Minuten  $1,47 \pm 0,20 \times 10^5$  Zellen/ml registriert und somit geringfügig mehr als nach einer Minute.

Bei 0,2 % CHX wurden nach drei Tagen und nach einer Minute Einwirkzeit  $1,43 \pm 0,23 \times 10^5$  Zellen/ml im Vergleich zu fünf Minuten, hier wurden dieses Mal  $1,19 \pm 0,45 \times 10^5$  Zellen/ml registriert (Abbildung 17).

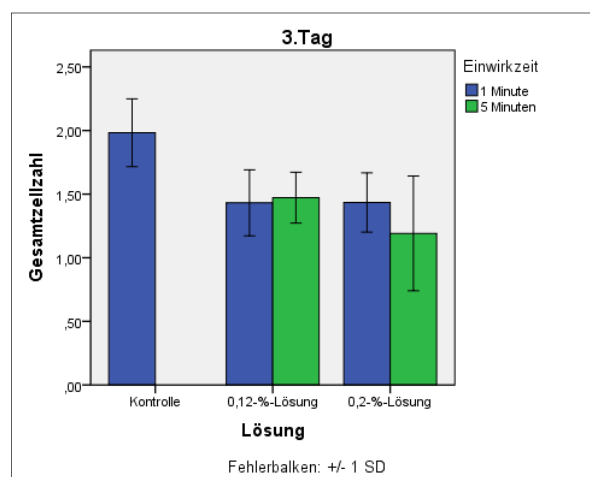


Abbildung 17: Einfluss der 0,12 %, 0,2 % CHX-Lösung und der Kontrolle auf die Zellzahl ( $x \cdot 10^5$  /ml) der HGFIB in Abhängigkeit von der Einwirkzeit am 2. Auswertungstag

Nach fünf Tagen wurden bei 0,12 % CHX wieder eine höhere Gesamtzellzahl bei einer Minute Einwirkdauer  $1,57 \pm 0,27 \times 10^5$  Zellen/ml im Vergleich zu fünf Minuten  $1,34 \pm 0,47 \times 10^5$  Zellen/ml gemessen.

Auch bei 0,2 % CHX wurden wieder eine höhere Gesamtzellzahl nach einer Minute  $1,40 \pm 0,36 \times 10^5$  Zellen/ml im Vergleich zu fünf Minuten  $1,14 \pm 0,27 \times 10^5$  Zellen/ml gemessen (Abbildung 18).

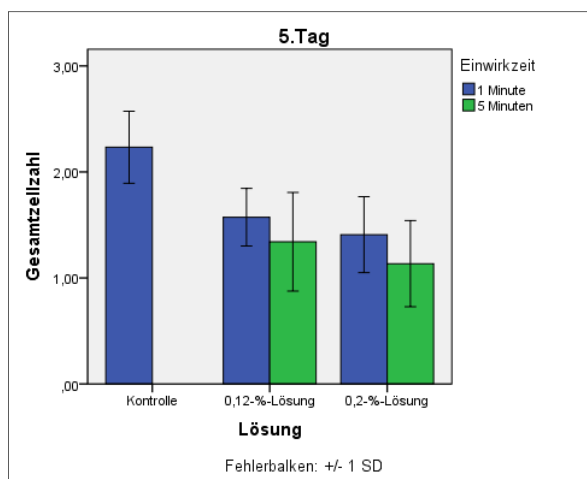


Abbildung 18: Einfluss der 0,12 %, 0,2 % CHX-Lösung und der Kontrolle auf die Zellzahl ( $\times 10^5$ /ml) der HGFIB in Abhängigkeit von der Einwirkzeit am 3. Auswertungstag

Die Gesamtzellzahl war nach der Behandlung mit 0,12 % und 0,2 % CHX bei allen Versuchsreihen (1-12) bei beiden Einwirkzeiten (1, 5 Minuten) an jedem Auswertungszeitpunkt (1., 3 und 5 Tag) im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert ( $p < 0,0001$ ).

#### 4.1.5 Vergleich der CHX-Konzentrationen untereinander

Der vollzogene Vergleich beschreibt die Zellwirkung der einzelnen CHX-Konzentrationen untereinander bei den unterschiedlichen Einwirkzeiten und Auswertungstagen. Tabelle 6 zeigt eine Übersicht der Vergleiche.

Tabelle 6: Paarweise Vergleiche der Mundspüllösungen in Abhängigkeit von der Einwirkzeit und der Auswertungszeit (Signifikanzen = p-Werte)

Auswertungstag		Einwirkzeit	
		1 Minute	5 Minuten
1. Tag		0,410	<b>0,050</b>
3. Tag	0,12 % CHX vs. 0,2 % CHX	0,740	<b>0,055</b>
5. Tag		0,178	<b>0,052</b>

Abbildung 19 stellt die Unterschiede zwischen beiden Konzentrationen, Einwirkzeiten und Auswertungstagen grafisch dar.

Bei der einminütigen Einwirkzeit waren die Unterschiede zwischen den Konzentrationen nicht signifikant, jedoch bei der fünfminütigen über alle Tage. Die Signifikanzen lagen zwischen 0,05 und 0,1. Dies ist als statistisch schwach signifikant zu interpretieren.

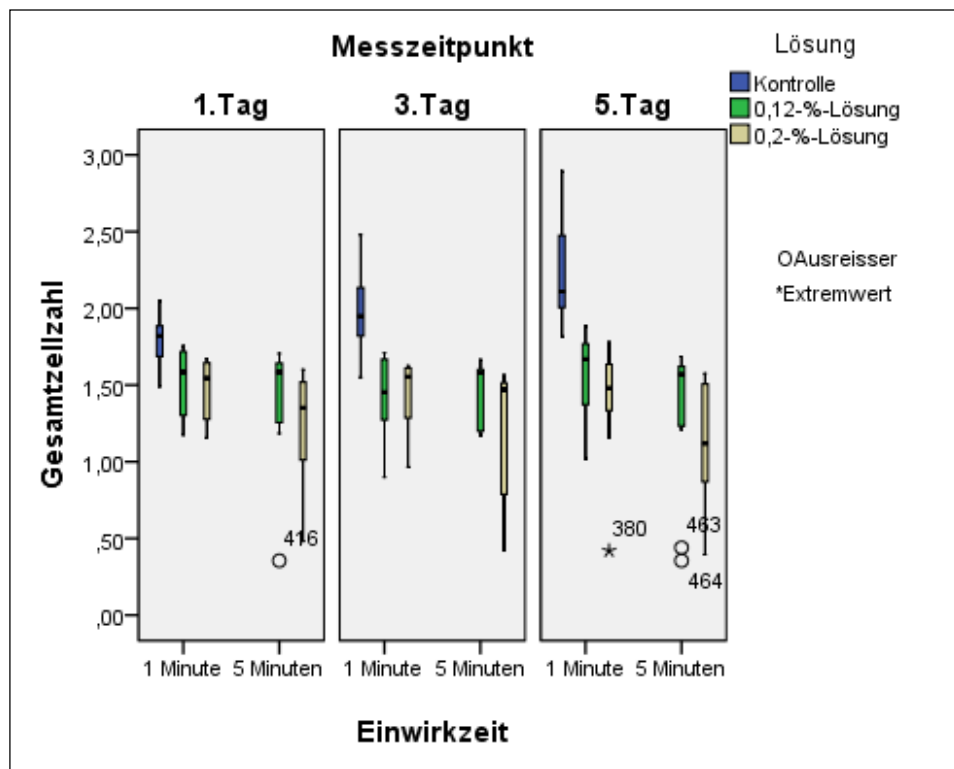


Abbildung 19: Vergleiche der CHX-Konzentrationen in Abhängigkeit von Einwirkzeit und Auswertungstag

#### 4.1.6 Vergleich der Auswertungstage untereinander

Die Gesamtzellzahl zeigte nach Einwirkung von 0,12 % und 0,2 % CHX für beide Einwirkzeiten einen unterschiedlichen Zeitverlauf auf. Dieser Zeitverlauf zwischen den beiden Lösungen zeigt signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) an den Auswertungstagen. Nach einer Minute war die Zellzahl bei der 0,12 % CHX-Lösung nach fünf Tagen am höchsten ( $1,57 \pm 0,27 \times 10^5$  Zellen/ml) und nach drei Tagen am niedrigsten ( $1,43 \pm 0,28 \times 10^5$  Zellen/ml). Nach fünf Minuten Einwirkzeit war die Zellzahl nach fünf Tagen am niedrigsten ( $1,34 \pm 0,47 \times 10^5$  Zellen/ml) und nach drei Tagen am höchsten ( $1,47 \pm 0,20 \times 10^5$  Zellen/ml).

Nach einer Minute Einwirkzeit der 0,2 % CHX war die Zellzahl nach 24 Stunden am höchsten ( $1,46 \pm 0,20 \times 10^5$  Zellen/ml) und nach fünf Tagen am niedrigsten ( $1,41 \pm 0,36 \times 10^5$  Zellen/ml), nach fünf Minuten Einwirkzeit hingegen war die Zellzahl nach

24 Stunden ( $1,19 \pm 0,42 \times 10^5$  Zellen/ml) und nach drei Tagen ( $1,19 \pm 0,45 \times 10^5$  Zellen/ml) gleich und höher als nach fünf Tagen ( $1,14 \pm 0,27 \times 10^5$  Zellen/ml).

Tabelle 7 zeigt meist signifikante Unterschiede zwischen Tag 1 und 3, außer bei 0,2 % CHX. Zwischen Tag 3 und 5 sind die Unterschiede meist signifikant; zwischen Tag 1 und 5 hingegen nicht signifikant.

Tabelle 7: Paarweise Vergleiche der Auswertungstage in Abhängigkeit von der Einwirkzeit und der Konzentration (Signifikanzen = p-Werte)

		Einwirkzeit	
		1 Minute	5 Minuten
<b>Vergleiche</b>	CHX 0,12 % 3Tag vs. CHX 0,12 % 1Tag	<b>0,021</b>	<b>0,005</b>
<b>(p-Werte)</b>	CHX 0,12 % 5 Tag vs. CHX 0,12 % 1Tag	0,071	0,722
	CHX 0,12 % 5 Tag vs. CHX 0,12 % 3Tag	<b>0,002</b>	<b>0,012</b>
	CHX 0,2 % 3 Tag vs. CHX 0,2 % 1Tag	0,108	0,183
	CHX 0,2 % 5 Tag vs. CHX 0,2 % 1Tag	0,789	0,683
	CHX 0,2 % 5 Tag vs. CHX 0,2 % 3Tag	<b>0,059</b>	<b>0,012</b>

Den Boxplots (Abbildung 19) kann entnommen werden, dass vor allem die fünfminütige Einwirkzeit eine stark negative Wirkung auf die Zellen ausübte, insbesondere am Untersuchungstag 3. Von dieser Behandlung konnten sich die Zellen bis zum Tag 5 offensichtlich gut erholen. Dies zeigt sich auch in der Tabelle 7, dass die Unterschiede zwischen Tag 1 und 5 kaum Signifikanzlevel erreichen.

## Ergebnisse der Viabilität

### 4.1.7 Ergebnisse nach Einwirkzeiten und Auswertungstagen

Die Ergebnisse der Viabilität, d.h. die Anzahl der lebenden Zellen in Relation zu den toten Zellen, der HGFIB nach Behandlung mit 0,12 % und 0,2 % CHX sowie der Kontrolle sind in Tabelle 8 wiedergegeben. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardfehlern für die Viabilität der HGFIB, die mittels Cellometer gleichzeitig zur Gesamtzellzahlbestimmung bei unterschiedlichen Einwirkzeiten und unterschiedlichen Auswertungstagen ermittelt wurden.

Die Werte sind in den Abbildung 20 bis Abbildung 22 für jeden Auswertungstag graphisch dargestellt. Die Versuchsreihen mit einer Konzentration von 0,12 % und

0,2 % CHX zeigten gegenüber der Kontrolle ohne CHX eine Reduktion der Viabilität in Abhängigkeit von der Einwirkzeit der Mundspüllösung.

Tabelle 8: Mittelwerte und Standardfehler für die Viabilität (in %) der HFGIB nach der Behandlung mit 0,12 %, 0,2 % CHX und der Kontrolle

Konz. CHX	1 Minute Einwirkzeit		5 Minuten Einwirkzeit		Kontrolle
	0,12 %	0,2 %	0,12 %	0,2 %	
1 Tag	77,4 ± 4,4	76,0 ± 4,4	76,2 ± 3,7	73,6 ± 3,4	94,0 ± 1,4
2 Tag	75,7 ± 5,4	69,0 ± 2,2	63,0 ± 3,0	58,9 ± 3,1	93,1 ± 2,1
3 Tag	78,3 ± 3,4	77,4 ± 4,5	78,2 ± 4,0	73,6 ± 3,9	94,3 ± 2,7

Je länger das 0,12 % und 0,2 % CHX auf den Zellen verbleibt, desto geringer war die Viabilität der Zellen an jedem der Auswertungszeitpunkte. Dieser Unterschied zwischen den Einwirkzeiten war allerdings nicht signifikant ( $p < 0.1783$ ).

Nach einer Minute Einwirkzeit der Mundspüllösung mit 0,12 % CHX wurde zum ersten Auswertungszeitpunkt (24h) eine Zellviabilität von  $77,4 \pm 4,4$  % gemessen; dieser Wert war nach fünf Minuten mit  $76,2 \pm 3,7$  % geringfügig kleiner (Abbildung 20).

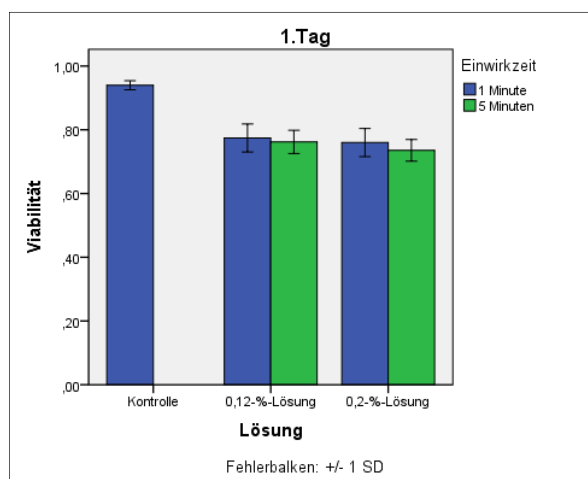


Abbildung 20: Einfluss der 0,12 %, 0,2 % CHX-Lösung und der Kontrolle auf die Viabilität in Prozent ( $\times 100$ ) der HFGIB in Abhängigkeit von der Einwirkzeit am 1. Auswertungstag

Nach drei Tagen wurde bei 0,12 % CHX nach einer Minute  $75,7 \pm 5,4$  % und nach 5 Minuten  $63,0 \pm 3,0$  % Viabilität gemessen. Bei 0,2 % CHX wurden nach drei Tagen nach einer Minute  $69,1 \pm 2,2$  % und nach fünf Minuten  $58,9 \pm 31,1$  % Viabilität gemessen (Abbildung 21).

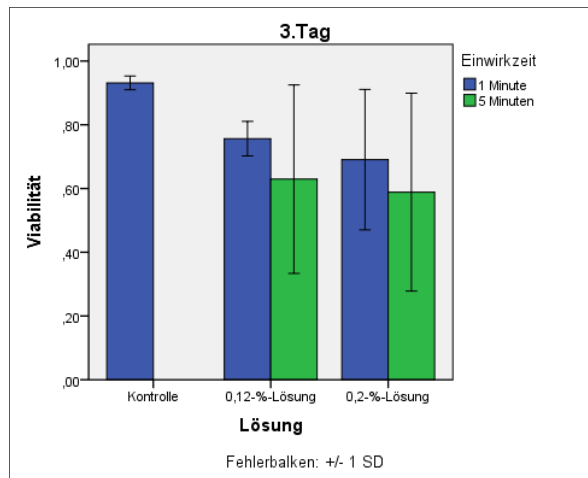


Abbildung 21: Einfluss der 0,12 %, 0,2 % CHX-Lösung und der Kontrolle auf die Viabilität in Prozent ( $\times 100$ ) der HGFIB in Abhängigkeit von der Einwirkzeit am 2. Auswertungstag

Nach fünf Tagen wurde erneut bei 0,12 % CHX eine geringfügig höhere Viabilität nach einer Minute  $78,3 \pm 3,4\%$  im Vergleich zum Wert nach fünf Minuten  $78,2 \pm 4,0\%$  gemessen.

Auch bei 0,2 % CHX wurde wieder nur eine geringfügig höhere Viabilität nach einer einer Minute ( $77,4 \pm 4,5\%$ ) im Vergleich zu fünf Minuten ( $73,6 \pm 3,91\%$ ) gemessen (Abbildung 22).

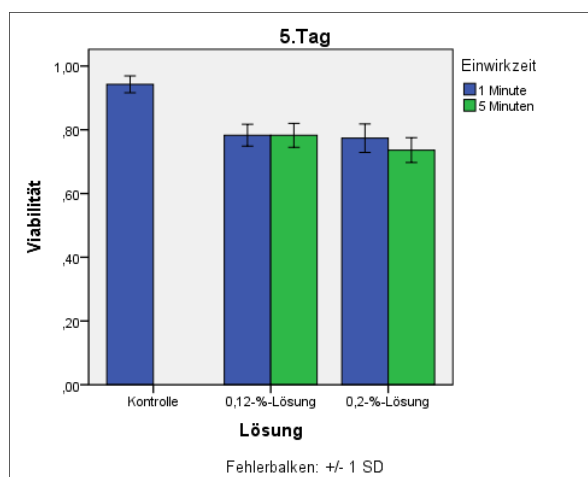


Abbildung 22: Einfluss der 0,12 %, 0,2 % CHX-Lösung und der Kontrolle auf die Viabilität in Prozent ( $\times 100$ ) auf die HGFIB in Abhängigkeit von der Einwirkzeit am 3. Auswertungstag

Die Viabilität war nach der Behandlung mit 0,12 % und 0,2 % CHX bei allen Versuchsreihen (1-12) beiden Einwirkzeiten (1, 5 Minuten) an jedem Auswertungszeitpunkt (1., 3., 5. Tag) im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert ( $p < 0,0001$ ).



### 4.1.8 Vergleich der CHX-Konzentrationen untereinander

Der Vergleich beschreibt die Zellwirkung der einzelnen CHX-Konzentrationen untereinander bei unterschiedlichen Einwirkzeiten und Auswertungstagen. Tabelle 9 zeigt eine Übersicht der Vergleiche.

Tabelle 9: Paarweise Vergleiche der Mundspüllösungen in Abhängigkeit von Einwirk- und Auswertungszeit

Auswertungstag		Einwirkzeit	
		1 Minute	5 Minuten
1. Tag		0,378	0,418
3. Tag	0,12 % CHX vs. 0,2 % CHX	0,590	0,314
5. Tag		0,478	<b>0,014</b>

Abbildung 23 stellt die Unterschiede zwischen beiden Konzentrationen, Einwirkzeiten und Auswertungstagen grafisch dar.

Die unterschiedlichen Konzentrationen wiesen keine signifikanten Unterschiede auf und haben keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität mit Ausnahme des fünften Auswertungstages nach fünf Minuten Einwirkzeit ( $p < 0.014$ ).

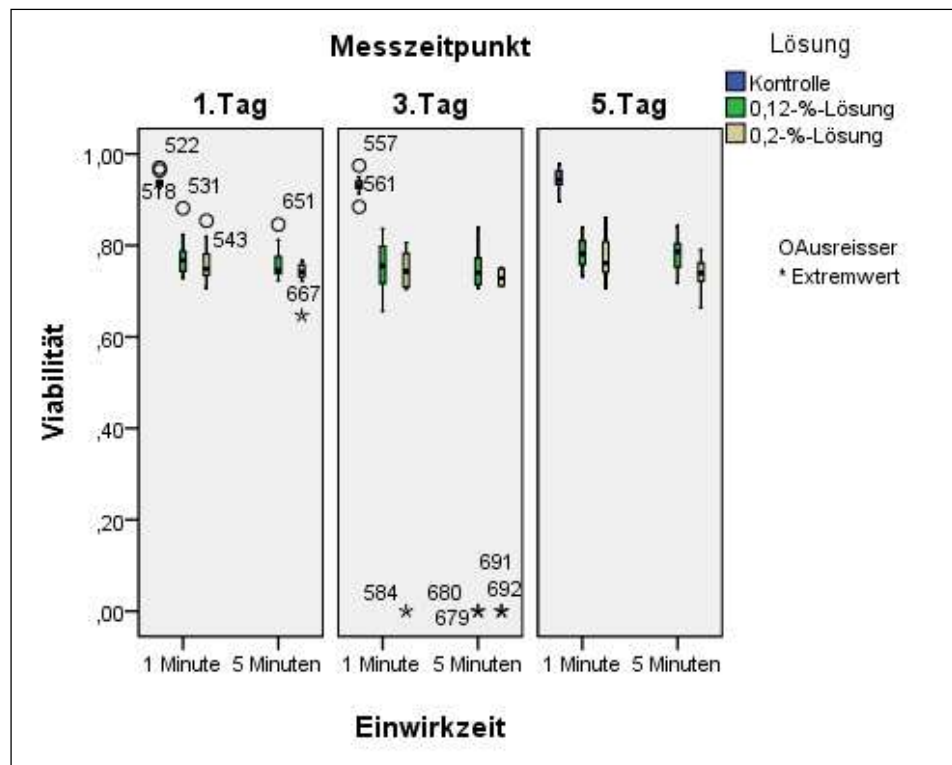


Abbildung 23: Vergleiche der CHX-Konzentrationen in Abhängigkeit von Einwirkzeit und Auswertungstag

#### 4.1.9 Vergleich der Auswertungstage untereinander

Die Viabilität zeigte bei beiden Konzentrationen und beiden Einwirkzeiten sowie der Kontrolle einen ähnlichen Zeitverlauf. Bei beiden Zeiten und der Kontrolle war die Viabilität nach fünf Tagen am höchsten und nach drei Tagen am niedrigsten. Während am ersten Auswertungszeitpunkt bei der 0,12 % CHX-Lösung  $76,8 \pm 4,0$  % der Fibroblasten vital blieben, waren es zum zweiten Zeitpunkt  $69,3 \pm 3,0$  % und nach fünf Tagen  $78,2 \pm 4,0$  %. Bei der 0,2 % CHX-Lösung waren zum ersten Auswertungszeitpunkt  $74,9 \pm 4,1$  % der Fibroblasten vital, zum zweiten Zeitpunkt  $64,4 \pm 2,6$  % und nach 5 Tagen  $78,3 \pm 3,5$  %. Diese Ergebnisse zeigten bei beiden Lösungen und bei der Kontrolle einen signifikanten Unterschied zwischen den Auswertungstagen auf (p-Wert: zwischen  $<0,004$  und  $0,02$ ).

Wie in Tabelle 10 erkennbar, waren zwischen Tag 1 und 3 und Tag 3 und 5 meist signifikante Unterschiede bei beiden Lösungen eruiert. Zwischen Tag 1 und Tag 5 waren die Unterschiede bei 0,12 % Lösung bei 5 Minuten signifikant.

Tabelle 10: Paarweise Vergleiche der Auswertungstage in Abhängigkeit von Einwirkzeit und Konzentration

		Einwirkzeit	
		1 Minute	5 Minuten
<b>Vergleiche (p-Werte)</b>	CHX 0,12 % 3Tag vs. CHX 0,12 % 1Tag	<b>0,023</b>	<b>0,015</b>
	CHX 0,12 % 5 Tag vs. CHX 0,12 % 1Tag	0,307	<b>0,034</b>
	CHX 0,12 % 5 Tag vs. CHX 0,12 % 3Tag	<b>0,014</b>	<b>0,004</b>
	CHX 0,2 % 3 Tag vs. CHX 0,2 % 1Tag	0,077	<b>0,013</b>
	CHX 0,2 % 5 Tag vs. CHX 0,2 % 1Tag	0,182	0,646
	CHX 0,2 % 5 Tag vs. CHX 0,2 % 3Tag	<b>0,004</b>	<b>0,037</b>

Den Boxplots aus Abbildung 23 ist zu entnehmen, dass bei einer fünfminütigen Einwirkzeit eine stark negative Wirkung auf die Zellen ausgeübt wurde, insbesondere am Untersuchungstag 3. Von dieser Behandlung konnten die Zellen sich bis zum Tag 5 offensichtlich gut erholen (kaum signifikante Unterschiede zwischen Tag 1 und 5).

## Vergleich von MTT-Test und optischer Zellcharakterisierung mittels Cellometer™ Auto T4

Es ist von grundlegender Bedeutung bei der Suche nach Mechanismen, Strukturänderungen und anderen physiologischen und pathologischen Vorkommnissen, dass unterschiedliche Verfahren zu denselben Ergebnissen führen. Andernfalls sind die Ergebnisse nicht gesichert und Schlussfolgerungen daraus nur marginal zu ziehen. Daher wurde die Frage gestellt, ob die Ergebnisse beider Verfahren miteinander korrelieren.

Der MTT-Test basiert auf der photometrischen Messung metabolischer Aktivität in den Fibroblasten. Die Zellzahlbestimmung mittels Cellometer ermittelt hingegen die Intaktheit der Zellmembran.

Zur Prüfung der Ergebnisevidenz wurde der Korrelationskoeffizient bestimmt (Abbildung 24).

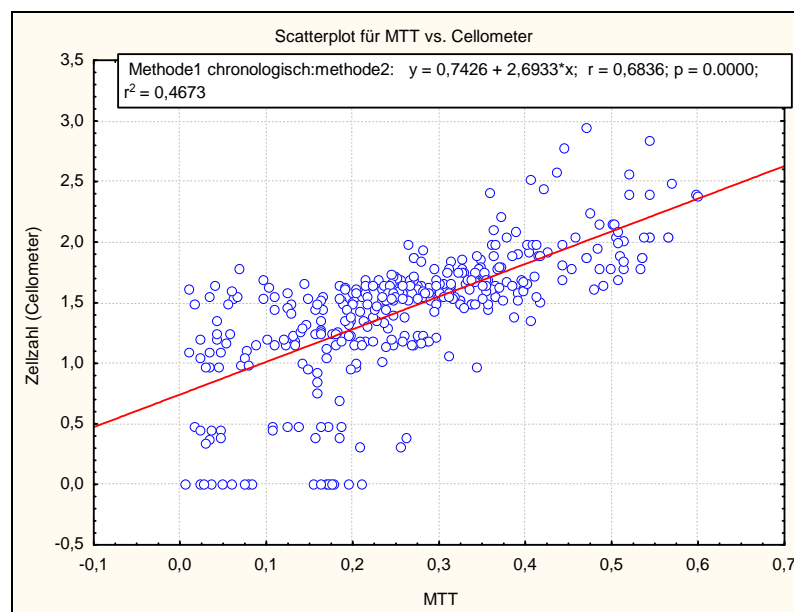


Abbildung 24: Korrelationsbestimmung zwischen MTT-Test und Zellzahlbestimmung mittels Cellometer™ Auto T4 für HGFIB.

Abbildung 24 lässt erkennen, dass beide Methoden in der hier durchgeführten Studie an HGFIB einen signifikanten, positiven Zusammenhang zeigen ( $r=0,68$ ,  $p=0,00$ ). Das heißt, dass die hier verwendeten Methoden miteinander korrelieren.

## Zusammenfassungen der Ergebnisse

Die Viabilität und die Zellzahl zeigten folgende Ergebnisse:

1. Reduktion der beiden Parameter bei 0,12 % und 0,2 % CHX in Abhängigkeit von der Einwirkzeit an jedem der Auswertungstage. Bei einer Einwirkzeit von fünf Minuten waren die Zellen stärker in ihrer Stoffwechselaktivität gehemmt als bei einer Minute, jedoch war lediglich eine Tendenz zu erkennen; ein statistisches Signifikanzniveau wurde nur am ersten Auswertungstag beim MTT-Test gefunden.
2. Signifikante Reduktion der beiden Parameter bei beiden Einwirkzeiten, beiden Konzentrationen und jeder Auswertungszeit im Vergleich zur Kontrolle.
3. Beide Parameter zeigten sich im Zeitverlauf bei beiden Konzentrationen und beiden Einwirkzeiten nach fünf Tagen am höchsten und nach drei Tagen am niedrigsten.
4. Beide Parameter zeigten im Vergleich beider Konzentrationen an jedem der Auswertungstage und beiden Einwirkzeiten bei 0,2 % CHX durchgängig geringere Werte an als bei 0,12 % CHX; dies war bei der fünfminütigen Einwirkzeit signifikant.
5. Die beiden Auswertungsmethoden korrelieren positiv miteinander.

## 5. Diskussion

In diesem Kapitel werden Methodik und Ergebnisse der Versuche zur Zytotoxizität von CHX-Lösungen handelsüblicher Konzentrationen auf die HGFIB und deren Regenerationsverhalten diskutiert und mit bislang veröffentlichten Studien verglichen.

### Untersuchungsmaterial

In der vorliegenden Studie wurde die Wirkung zweier alkoholfreier Mundspüllösungen mit unterschiedlicher CHX-Konzentrationen (0,12 %, 0,2 %) auf humane Fibroblasten analysiert. Auf alkoholhaltige CHX-Lösungen wurde mit Bedacht verzichtet. Grund dafür war, dass der reguläre Ethanol, der in Mundspüllösungen eingesetzt wird, meist als Lösungsvermittler dient und im Gegensatz zum stärkeren Isopropylalkohol nicht als Desinfektionsmittel eingesetzt werden kann (Myklebust 1985, Bartzokas et al. 1987). Dementsprechend ist eine antibakterielle Aktivität von Ethanol weder *in vitro* noch *in vivo* nachzuweisen (Gjeramo et al. 1970). Im Gegenteil: Slomiany et al. (2000) vermuteten sogar anhand ihrer Untersuchungen, dass Alkohol die Wundheilung des Gewebes negativ beeinflusst. Gottsegen et al. (1993) stellten fest, dass Alkohol eine toxische Wirkung auf das Parodontalgewebe ausübt, wobei diese Untersuchungen meist an alkoholerkrankten Patienten durchgeführt wurden (Tezal et al. 2001). Dennoch wiesen Poggi et al. (2003) nach, dass auch geringe Konzentrationen an Acetaldehyd in Mundspüllösungen eine dosis- und zeitabhängige Hemmung der Zellhaftung und Viabilität der menschlichen Gingivafibroblasten bewirken. Beides war mit einer Störung des Zytoskeletts und der zytoplasmatischen Organellen kombiniert. Die Autoren fanden heraus, dass diese qualitativen und quantitativen Störungen nach Beendigung des Lösungsgebrauchs verschwanden.

Es finden sich widersprüchliche Publikationen zum Risiko der Entwicklung von oralem Krebs bei Gebrauch alkoholhaltiger Mundspüllösungen (Eley 1999): Während Mashberg et al. (1985) keine Korrelation zwischen der Nutzung der alkoholhaltigen Mundspülungen und oralem Krebs feststellen konnten, fanden Winn et al. (1991) eine solche. Der zusammenfassende Rückblick von Elmore & Horwitz (1996) ergab ebenfalls keine fundierte Kausalität zwischen alkoholhaltigen Mundspüllösungen und oralem Krebsvorkommen. Zahlreiche Studien weisen jedoch darauf hin, dass der Gebrauch von alkoholhaltigen Mundspüllösungen Schmerzen und Brennen im Mund verursachen und für Patienten mit Schleimhauthypersensibilität problematisch sein kann (Bolanowski et al. 1995). Weiterhin kann die Nutzung von alkoholhaltigen Mundspüllösungen bei Kindern zum Alkoholkonsum führen, wenn die Lösung

versehentlich verschluckt wird (Shulman et al. 1997). In einem Übersichtsartikel von Brex et al. (2003) wird klar herausgearbeitet, dass Alkohol in den meisten Fällen in einer Mundspüllösung unnötig ist. Diverse Studien gaben Anlass, in der vorliegenden Untersuchung keine alkoholhaltigen CHX-Lösungen zu verwenden. Beispielsweise führte der Verzicht auf Alkohol in der Mundspüllösung zu keiner Minderung der Wirksamkeit bei der Reduktion von Plaque und Gingivitis. Befunde, in denen der Alkohol Wirkung gegen planktonische Bakterien im Mundraum entfaltet (Sissons et al. 1996), wurden mit einer Alkoholkonzentration von 40% erreicht. Die Alkoholkonzentration der handelsüblichen Mundspüllösungen liegt jedoch mit 5 bis 27% deutlich unterhalb dieser Konzentration. Die Autoren postulieren anhand dieser Ergebnisse und der möglichen negativen Eigenschaften des Alkohols, künftig auf alkoholhaltige Mundspüllösungen zu verzichten, da ein zusätzlicher antibakterieller Nutzen in den kommerziellen Tinkturen nicht nachweisbar ist (Arweiler et al. 2001, Leyes Borrajo et al. 2002).

In dieser Untersuchung wurden die Konzentrationen 0,12 % und 0,2 % CHX ausgewählt, da diese auf dem Markt erhältlich sind und sowohl im klinischen als auch im häuslichen Bereich oftmals genutzt werden. Die Plaquehemmung durch CHX ist dosisabhängig. Anhand der bisherigen Studien scheint es für die Plaquehemmung unerheblich zu sein, ob größere Volumina mit geringen Konzentrationen oder kleinere Volumina mit höheren Konzentrationen verabreicht werden (Cumming et al. 1973, Cancro et al. 1974, Agerbaek et al. 1975, Bonesvoll 1978). Flötra et al. (1972) haben die These aufgestellt, eine zweimal am Tag durchgeführte Mundspülung mit einer Konzentration von ca. 0,2 % CHX könne eine Plaquehemmung optimal bewerkstelligen. Bei dieser Konzentration scheint die Patientenakzeptanz hoch zu sein bei gering ausgeprägten Nebenwirkungen. Von Konzentrationen über 0,2 % wird abgeraten, da verstärkt Nebenwirkungen auftreten, insbesondere Geschmacksstörungen, Zahnverfärbungen und Schleimhauterosionen (Flötra et al. 1972, Mendieta et al. 1994).

Zahlreiche Studien zeigten, dass 0,12 % CHX eine ähnliche Wirkung gegenüber Plaque und Gingivitis aufweist wie 0,2 % CHX, wenn das Volumen der Verdünnung der 0,12 %-Lösung auf 15 ml (15 ml 0,12 % enthält 18 mg CHX und 10 ml 0,2 % enthält 20 mg CHX) bei ebenfalls zweimaliger Anwendung pro Tag erhöht wurde (Segreto et al. 1986, Mendieta et al. 1994). Diverse Studien bestätigten diese These (Smith et al. 1995, Keijser et al. 2003, Van Strydonck et al. 2005). Ernst et al. (1998) bestätigten dies ebenfalls und vermuteten darüber hinaus, dass beide Konzentrationen CHX in einer Mundspüllösung nicht nur in der Plaquehemmung keine signifikanten Unterschiede zeigen, sondern ebenfalls in den Nebenwirkungen, wie

Zahnverfärbungen und Schleimhauterosionen. Aus diesem Grunde war es für die vorliegende Studie wichtig zu erfahren, ob die beiden Konzentrationen auch ähnliche Ergebnisse bei der Wirkung der Zytotoxizität auf die Gingivafibroblasten erzielen.

Als Untersuchungsobjekt wurden humane Gingivafibroblasten gewählt. Diese bilden den dominierenden Zelltyp im weichen Bindegewebe des Parodontiums und besitzen somit eine zentrale Funktion bei den pathologischen Veränderungen des Parodontiums und der Wundheilung (Schroeder 1986). Die Fibroblasten sind Produzenten des Stützgewebes. Sie produzieren Kollagen, ein fibrilläres Protein, welches das Gerüst der extrazellulären Matrix im Bindegewebe bildet und stützt. Somit wird die Gewebeintegrität gewährleistet (Hassell 1993; Plagmann 1998). Zudem synthetisieren sie Glykoproteine, Proteoglykane, Glykosaminoglykane, die für die Stabilisierung der extrazellulären Matrix verantwortlich sind (Flemingson et al. 2008). Die im Versuch verwendeten Fibroblasten lagen im Gegensatz zu dieser komplexen Konstruktion als Monolayer vor. In dieser Konstellation fehlt den Zellen eine vollständige Matrix, in die sie eingebunden sind und die eine funktionelle Barriere mit Entgiftungspotenzial bildet (Welk et al. 2007). Weiterführende Untersuchungen könnten daher zur besseren Anpassung an die Verhältnisse in der Mundhöhle mit Multilayer-Schichten (Dongari-Bagtzoglou & Kashleva 2006) oder im Explantationstest als sensitives Screeningmodell durchgeführt werden (*Semi-in-vivo*-Test; Welk et al. 2007).

Zahlreiche Forschungsgruppen haben für ihre Versuche Fibroblasten von Patienten entnommen und *in vitro* kultiviert (Cline & Layman 1992, Pucher & Daniel 1992, Mariotti & Rumpf 1999, Flemingson et al. 2008). Sie beziehen sich alle auf die Methode nach Somerman et al. (1988). Im Gegensatz wurden die hier gezeigten Analysen mit kommerziell erhältlichen Zellen der Firma Provitro GmbH, Berlin, durchgeführt. Die Zellen wurden am 10.04.2001 aus der Mundschleimhaut einer 27-jährigen Frau kaukasischen Typus entnommen und primär isoliert. Sie wurden bis zur dritten Passage *in vitro* kultiviert und anschließend standardisiert eingefroren. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen nach den gleichen Kulturbedingungen, wie sie in zahlreichen Studien beschrieben wurden, kultiviert (Somerman et al. 1988, Mariotti & Cochran 1990, Cline and Layman 1992, Pucher and Daniel 1992, Kent et al.1996, Flemingson et al. 2008). Die Autorin der vorliegenden Studie betrachtet diese Vorgehensweise als optimal, da die Gingivafibroblasten von einer Person stammten und somit die Vergleichbarkeit im Gegensatz zu den genannten Studien hoch war, da an diesen häufig mehrere Patienten teilgenommen haben oder es wurden unterschiedliche Entnahmestellen an einer Person ausgesucht. Somit wurden in den bis-

her publizierten Studien absolute Aussagen über die Heterogenität der Eigenschaften in den Zelllinien humaner Gingivafibroblasten erschwert. Von verschiedenen Individuen, unterschiedlichen Stellen sowie von kranken oder gesunden Geweben entnommene orale Fibroblasten können in ihrer Zellmorphologie, dem proliferativen Potenzial (Larjava et al. 1989, Häkkinen & Larjava 1992), differieren.

Die Vorgehensweise in der vorliegenden Studie stützt sich auf die Analysen von Kent et al. (1995). Die Autoren zeigten, dass kultivierte menschliche Gingivafibroblasten in den Passagen 1-7 eine Viabilität von etwa 90% aufwiesen. Die Passagen 8-10 hingegen wiesen die niedrigste Viabilität auf.

### **Beurteilung der Untersuchungsbedingungen**

In den hier vorgenommenen Versuchen wurden die Zellen jeweils eine und fünf Minuten mit den verschiedenen Testlösungen gespült, um eine möglichst realistische Dauer der intraoralen Anwendung mit Mundspüllösungen zu simulieren. Durch die Inkubation der Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> während des gesamten Versuchsvorgangs wurden mundähnliche Bedingungen geschaffen. Es finden sich nur wenige Studien, die realistische Einwirkzeiten verwendet haben, wie 30 Sekunden, eine oder fünf Minuten (Pucher & Daniel 1992, Mariotti & Rumpf 1999, Flemingson et al. 2008). Viele Studien wurden mit unrealistischen Einwirkzeiten, die ein Patient gewöhnlich nicht mit einer Mundspüllösung spülen würde, wie drei Stunden (Goldschmidt et al. 1977), 15 Minuten (Cline & Layman 1992), 30 Minuten durchgeführt oder es wurden als Untersuchungsobjekte Tierzellen gewählt (Müller & Kramer 2007 a). Abgesehen davon wurde bislang keine Studie unter Simulation der Speichelflora durchgeführt, die jedoch mit ihrem Puffersystem einen natürlichen Schutz und eine Beschichtungsbarriere für die Gingivafibroblasten darstellt.

In den veröffentlichten Studien wurden unterschiedliche Parameter zur Wirkung der CHX-Lösung auf die Gingivafibroblasten untersucht, überwiegend gemeinsam war diesen Studien, dass diese Parameter ausschließlich nach 24 Stunden Wirkstoffabstinenz und Inkubation der Zellen unter weitgehend intraoralen Bedingungen ausgewertet wurden. Die meisten Studien, deren Ziel die Analyse der Zytotoxizität von CHX war, zogen demnach unterschiedliche Kriterien zur Bewertung heran (Helgeland et al. 1971, Goldschmidt et al. 1977). Es ist bekannt, dass der Wirkstoff CHX eine Substantivität von 12 Stunden aufweist (Schiott 1973) und bevorzugt an saure Phospholipide der Plasmamembran von Mikroorganismen und der Zellmembran von humanen und Säugerzellen bindet (Gilbert & Moore 2005). Die Bindung ist mit einer toxischen Reaktion verbunden. Müller & Kramer veröffentlichten 2007 (b), dass CHX



irreversibel an Säugerfibroblasten koppelte und die zytotoxische Wirkung des Wirkstoffs während 24 Stunden Folgekultur verstärkt wurde. Eine offene Frage blieb jedoch, ob und inwieweit der zellgebundene Wirkstoff über 5 Tage aktiv ist, ob also das Wirkstoffdepot über 24 Stunden hinaus verfügbar bleibt und die Zellen im Zeitverlauf von fünf Tagen eine veränderte Viabilität, Zellwachstum und Zellmorphologie aufweisen und ob die Zellen im Verlauf der fünf Tage revitalisieren. Die Literaturrecherche ergab eine einzige Studie, in der die Zytotoxizität des CHX auf humane Fibroblasten in einem Zeitverlauf *in vitro* dokumentiert wurde (Pucher & Daniel 1993). Diese Studie zeigte die Wirkung von CHX in den Konzentrationen 0,002%, 0,005%, 0,12% auf die humanen Fibroblasten der Gingiva, des Parodonts und der Haut. Die Auswertungskriterien waren die Viabilität, das Wachstum und die Proteinsynthese der Zellen. Ausgewertet wurde am ersten, dritten, fünften und siebten Tag nach CHX-Behandlung. Im Vergleich zu der hier vorliegenden Studie stammten die Zellen von unterschiedlichen Probanden, welche die Phase 1 der Parodontitistherapie abgeschlossen hatten. Der Vorteil für den Erkenntnisgewinn, den die Nutzung der Zellen einer parodontal gesunden Person mit sich bringt, wurde bereits diskutiert. Zusätzlich wurden in der vorliegenden Studie Viabilität und Zellwachstum nicht nur mittels einer Zählkammer ausgewertet, sondern auch spektralphotometrisch mit dem MTT-Test. Dieser Assay diente dem Nachweis mitochondrialer Aktivität der Fibroblasten, wie er auch schon in den wissenschaftlichen Veröffentlichungen von Flemingson et al. im Jahre 2008 verwendet wurde. Der Nachweis der Zellvitalität mittels MTT-Test beruht auf der enzymatischen Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Die Menge des umgesetzten und abschließend gemessenen Farbstoffs gleicht damit der Glykolyserate der lebenden Zellen (Mosmann 1983). Zur Bestätigung der Aussagen über die Zelltoxizität wurde als Farbstoffausschlusstest der Trypanblau-Exklusion-Test mithilfe des Cellometers durchgeführt. Dieser gestattet Aussagen über Vitalität und Proliferation der Zellen sowie den Zelldurchmesser. Der Cellometer hat erfahrungsgemäß mehrere Vorteile gegenüber den üblichen Zählkammern. Typisch für diese Geräte sind hohe Zählraten, die Zählung auch unregelmäßig geformter Zellen, höchste Reproduzierbarkeit, Schnelligkeit und Unabhängigkeit von der Interpretation des Experimentators, eine Verringerung der Gefahr der Verunreinigung und damit des Absterbens der Zellen während des Zählprozesses. Allerdings muss bei der Beurteilung der Ergebnisse mit Trypanblau berücksichtigt werden, dass bei starker Schädigung der Zellen, die unter dem Einfluss toxischer Agenzien bis zur Entstehung freier Zellkerne führen kann, Trypanblau problematisch ist: Die Zellen müssen noch von einer semiper-

meablen Membran umgeben sein, anderenfalls wird das Zytoplasma nicht angefärbt. Eine Überschätzung der Zellvitalität durch Trypanblau wurde von anderen Autoren bereits gezeigt (Altmann et al. 1993, Falkenhain et al. 1998). Die elektronische Vitalitätsbestimmung, wie die CASY-Technology, erfasst alle Übergangszustände, auch freie Zellkerne, korrekt als tote Zellen. Trypanblau selbst ist ein zytotoxisches Agens (Halle 1998), dessen Toxizität ausreicht, geschwächte Zellen abzutöten. Das Trypanblauergebnis ist stark abhängig von der eingesetzten Zelllinie, der Proteinkonzentration im Medium und der Durchführung des Assays selbst (Bhuyan et al. 1976).

### **Diskussion der Ergebnisse**

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, die Zytotoxizität zweier unterschiedlich konzentrierter CHX-Mundspüllösungen in Abhängigkeit von zwei Einwirkzeiten auf die Gingivafibroblasten im Zeitverlauf bis zu fünf Tagen zu untersuchen, um das Regenerationspotenzial der Zellen zu eruieren. Bislang ist nur geringfügig bekannt, ob sich parodontal vorgeschädigte Gingivafibroblasten von der Einwirkung des CHX erholen können.

Diverse Studien in den 1970er und 1980er Jahren stellten fest, dass sich die Toxizität des Chlorhexidins nicht selektiv nur auf Bakterien beschränkt, sondern auch schädlich für Säugetierzellen ist. Zum Beispiel gelangten Louis et al. (1985) zu der Erkenntnis, dass 21,5 µg/ml CHX die Spermamotilität um 50 % reduziert. Kenney et al. (1972) publizierten, dass die Einwirkung von 0,2 % CHX eine Störung der Zellmembran und der Fixierung des zytoplasmatischen Inhalts der polymorphkernigen Leukozyten zur Folge hat. Knuttila et al. (1981) beschäftigten sich mit der Wirkung von 0,01% CHX auf Makrophagen und stellten fest, dass diese Dosis die Makrophagen zur Produktion lysosomaler Enzyme veranlasste. Weiterhin bewirkte 1 µM CHX eine Hämolyse der Erythrozyten von 100 % und die Behandlung mit 2 bis 200 µM CHX hatte eine dosisabhängige Hemmung der Na-K-ATPase-Aktivität zur Folge (Helgeland et al. 1971). Goldschmidt et al. (1977) demonstrierten, dass 0,2 % CHX für 30 Sekunden Wirkdauer den Zelltod von humanen Gingivafibroblasten herbeiführt und der Einbau von Aminosäuren in Proteine signifikant gehemmt wird. Ebenso zeigten die Autoren, dass 0,004 % CHX, das im Handel in der Formation nicht erhältlich ist, bei 10 min Einwirkzeit die humanen Gingivafibroblasten für einen Zeitraum von vier Stunden an der Proteinsynthese hindert. Cline & Layman (1992) fanden heraus, dass die Haftung parodontaler Ligamentzellen an der Wurzeloberfläche einerseits nach einer 15-minütigen Behandlung mit 0,12 % CHX nicht wesentlich beeinflusst wird, andererseits jedoch die Zellmorphologie bei Konzentra-

tionen von 0,2 bis 2 % stark verändert wird. So hatten die Zellen bei 0,2 % ein rundliches Aussehen, bei 2 % quollen sie auf – das Zytoplasma schien aus der Zelle ausgetreten zu sein. Außerdem erzeugte eine direkte Exposition von humanen gingivalen Fibroblasten mit 0,01 % CHX (100 µg/ml) eine Reduktion von inkorporiertem 3H Thymidin, das als selektiver Marker für die DNA-Synthese verwendet wird, um 92 %. In zahlreichen Studien mit Zellen des Parodontiums konnte gezeigt werden, dass Chlorhexidin die zelluläre Proliferation beeinflusst (Cline & Layman 1992) sowie die Proteinproduktion hemmt (Pucher & Daniel 1992). Mariotti & Rumpf (1990) stellten ebenfalls fest, dass Chlorhexidin eine dosisabhängige Reaktion auf die Zellproliferation induziert und Konzentrationen, die keinen Effekt auf die Zellproliferation zeigen, dennoch die Produktion von Kollagen- und Nichtkollagenproteinen von humanen Gingivafibroblasten signifikant reduzieren.

Es konnte in der vorliegenden Studie die zytotoxische Wirkung des CHX auf die humanen Gingivafibroblasten im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe *in vitro* mit statistischer Signifikanz nachgewiesen werden und bestätigte damit viele vorherige Studien (Goldschmidt et al. 1977, Mariotti & Rumpf 1990, Cline & Layman 1992, Pucher & Daniel 1992, Wilken et al. 2001, Flemingson et al. 2008).

Wie im Ergebnisteil beschrieben, waren Viabilität und Anzahl der Zellen zeitabhängig reduziert: Bei fünf Minuten Einwirkzeit wurde die Viabilität der Zellen stärker reduziert als bei einer Minute. Dieses Ergebnis erreichte zwar in den meisten Fällen kein Signifikanzniveau, eine entsprechende Tendenz war jedoch klar erkennbar. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu anderen Studien, die eine zeitunabhängige zytotoxische Wirkung des Chlorhexidins postulieren (Mariotti & Rumpf 1990, Alleyne et al. 1991, Flemingson et al. 2008).

In der vorliegenden Studie wurde beobachtet, dass Viabilität und Zellzahl überwiegend signifikant konzentrationsabhängig bei beiden Einwirkzeiten und allen Auswertungstagen gehemmt waren. Dieses Ergebnis korreliert mit zahlreichen Studien. Flemingson et al. (2008) postulierten, dass der Zelltod der Fibroblasten mit der Konzentration des CHX ansteigt, auch Mariotti & Rumpf (1990) sowie Cline & Layman (1992) sind der Meinung, dass bereits in niedrigen Konzentrationen eine Hemmwirkung auf die Proliferation von Fibroblastenkulturen ausgeübt wird. Zudem ist zu bemerken, dass diese Studien einen signifikanten Zelltod zeigen, der schon durch sehr niedrige Konzentrationen, wie 0,004 % bis 0,01 % CHX, hervorgerufen wurde, jedoch mit längeren Einwirkzeiten als in der vorliegenden Studie (Goldschmidt et al. 1977).

Zur Untersuchung der Regeneration nach der Schädigung der Fibroblasten wurde in der vorliegenden Studie die Anzahl der vitalen Gingivafibroblasten und deren Viabilität nach einem, drei und fünf Tagen ermittelt. Die Viabilität (bei beiden Auswertungsmethoden) und die Zellzahl waren nach fünf Tagen am höchsten und nach drei Tagen am niedrigsten. Zudem zeigte sich zwischen dem ersten und fünften Untersuchungstag kein signifikanter Unterschied mehr, der jedoch zwischen den Ergebnissen des dritten und fünften Tages noch bestand. Dies zeigt, dass sich die Glykolyserate der Zellen innerhalb von fünf Tagen nach CHX-Behandlung wieder normalisierte und die Zellen proliferierten, wenn auch noch nicht vollständig auf dem Niveau der Kontrollzellen. Die Einwirkzeit war hierbei unerheblich. Eine andere Erklärung wäre die Wirkung des Chlorhexidins über 24h hinaus, sodass die am dritten Tag beobachtbare Schädigung und Minderung der Zellen nicht zwingend allein dem direkten Kontakt der Zellen mit dem CHX-Medium geschuldet war, sondern durch eine nach Entfernung des Mediums hinausgehende Wirkung des CHX (Wirkungsdepoteffekt) verursacht wurde. Dies bestätigt beispielsweise die Publikation von Babich et al. (1995), die zeigten, dass humane Gingivafibroblasten nach zweistündiger Chlorhexidinexposition die dadurch verursachte Schädigung nach 48 Stunden in chlorhexidinfreier Umgebung nicht kompensieren konnten.

Die Vermutung, dass sich die Zellen im weiteren Zeitverlauf erholen, steht jedoch im Widerspruch zur Studie von Pucher & Daniel (1992). Sie zeigten in ihrer Untersuchung, dass die Fibroblasten nach Behandlung mit 0,12 % CHX für 30 Sekunden Einwirkzeit nach sieben Tagen keine Erholung zeigten. Diese Zellen zeigten keinerlei Proliferation. Die Zellen, die eine Stunde 0,002 % CHX ausgesetzt wurden, konnten sich am siebten Tag im Vergleich zum ersten Tag erholen. Pucher & Daniel werteten drei Parameter aus. Es waren Viabilität, Proliferation der Zellen und das Modell der Gelkontraktion. Die Zellen stammten von einem parodontal erkrankten Patienten und wurden für die Versuche zwischen der 10 ten und 15 ten Passage verwendet. Kent et al. (1995) zeigten, dass kultivierte menschliche Gingivafibroblasten in den Passagen 1-7 eine Viabilität von etwa 90% aufwiesen und dass höhere Passagen hingegen eine niedrigere Viabilität aufzeigten ohne dass sie einem toxischen Agens ausgesetzt wurden. Diese Versuchsbedingungen von Pucher & Daniel hatten möglicherweise in ihrer Studie einen Einfluss auf die Fähigkeit der Zellen, sich von dem Wirkstoff Chlorhexidin regenerieren zu können.

Außer in den Studien von Pucher und Daniel (1992) sowie der vorliegenden Arbeit wurden bislang keine weiteren *In-vitro*-Untersuchungen zur Revitalisierung von humanen Gingivafibroblasten nach CHX-Exposition veröffentlicht. Um klare Aussagen zum Regenerationsverhalten humaner Gingivafibroblasten nach CHX-Exposition *in*

*vitro* zu erhalten, sind weitere Studien erforderlich. Optimalerweise sollten folgende Studien, sofern dies technisch umsetzbar ist, das Matrixgefüge der Zellen sowie die Speichelflora *in vivo* imitieren, um aussagekräftige Ergebnisse zu generieren. Das vorliegende Datenmaterial zeigt eine Viabilitätshemmung der Gingivafibroblasten durch 0,12 % und 0,2 % CHX. Mariotti & Rumpf (1990) postulierten sogar, dass niedrigere Konzentrationen, welche die Proliferation nicht hemmen, die Proteinsynthese insgesamt reduzieren. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Chlorhexidin die Wundheilung bei Patienten beeinträchtigen könnte. Diese Hypothese wurde in zahlreichen klinischen Studien mit widersprüchlichen Ergebnissen untersucht. Einerseits demonstrierten Basetti & Kallenberger (1980) eine durch die zweimal täglich erfolgte, 30-sekündige Exposition von CHX auf offene Mukosa- und Knochenwunden am Gaumen von Ratten verursachte Verzögerung und Störung der Wundheilung. Bei 0,5 % CHX war die Wundheilung fünf bis 16 Mal langsamer als bei der Kontrollgruppe. Histomorphologisch zeigte sich im knöchernen Defekt ein stark verminderter Bindegewebeanteil und ein erhöhter Anteil an Granulationsgewebe. Bei der Behandlung mit 0,1 % und 0,2 % CHX konnte eine leicht verminderte Wundheilung festgestellt werden. Diverse andere Studien zeigten hingegen, dass CHX in der Nachsorge parodontalchirurgischer Eingriffe vielmehr zu einem raschen Abklingen der Entzündungssymptome und einer reduzierten Taschentiefe führten (Asboe-Joergensen et al. 1974, Addy & Douglas 1975, Addy & Dolby 1976, Langenbaek & Bay 1976, Sanz et al. 1989). Des Weiteren zeigen *In-vivo*-Studien von Kozlowsky et al. (2007), der die Wundheilung ebenso am Gaumen von Ratten untersucht hat, dass CHX eine positive Wirkung auf die Wundheilung im Zeitraum von 14 Tagen ausübt. Die Wunden wurden einmal täglich eine Minute lang mit 1% CHX Gel und 0,12 % Lösung in Berührung gebracht. Diese Ergebnisse werden von einer weiteren *In-vivo*-Studie bestätigt, in welcher Granulationsgewebe von Ratten mit 0,2 % CHX behandelt wurde. Auch in dieser Studie konnten im untersuchten Gewebe, das mit CHX gespült wurde, zusätzlich proliferierende Fibroblasten dokumentiert werden, was ebenfalls auf einen positiven Effekt des CHXs hinsichtlich der Wundheilung hinweist (Hellden et al. 1974). In einer weiteren *In-vivo*-Studie konnte eine Studiengruppe von Saatmann et al. (1986) an Wunden von Meerschweinchen aufzeigen, dass es bei Behandlung dieser mit 0,5% CHX zu keiner signifikanten Verzögerung in der frühen Phase der Wundheilung kommt. Eine Applizierung von 4 % CHX bewirkte eine Verzögerung in der frühen Phase der Wundheilung. Zusammenfassend konnte jedoch in dieser Studie festgestellt werden, dass nach einem Verlauf von 14 bis 21 Tagen kein Unterschied mehr zur Kontrollgruppe zu verzeichnen war.

Die aktuellen Erkenntnisse aus den vorliegenden Daten lassen darauf schließen, dass ein protektiver Mechanismus gegenüber Chlorhexidin in unserer Schleimhaut existieren muss und dafür sorgt, dass CHX-Expositionen in handelsüblichen Konzentrationen sowie den üblichen Einwirkzeiten während eines Mundspülvorgangs, die *in vitro* schädliche Auswirkungen zeigen, *in vivo* nicht nur keine schädlichen Effekte zeigen, sondern die Wundheilung sogar verbessern können (Sanchez et al. 1988). Die oben beschriebene Studie von Basetti und Kallenberger an Ratten könnte durchaus in dieses Bild integriert werden. Ratten als Untersuchungsobjekte verfügen möglicherweise nicht über denselben schützenden Mechanismus gegenüber CHX wie der Mensch oder Dieser konnte aufgrund der Wundbeschaffenheit keinen wirksamen Schutz mehr entfalten. Die Epithelbarriere könnte die darunterliegenden Zellen vor direktem Eindringen der Agens schützen (Lindhe et al. 1970). An dieser Stelle sei auch darauf hingewiesen, dass *In-vitro*-Zellkulturen unter sterilen Bedingungen und somit frei von Bakterien untersucht werden. Die Keimdichte der Mundhöhlenflora liegt im Speichel bei etwa 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> KbE/ml, in der Plaque bei ca. 10<sup>10</sup> KbE/g Plaque und im Exsudat des gingivalen Sulkus bei bis zu 10<sup>12</sup> KbE/ml (Rahn 1996). *In vivo* bindet der CHX-Wirkstoff nicht selektiv an den Zellen der Schleimhaut, sondern adsorbiert an Bakterien, Zähnen und Speichelproteinen (Davies et al. 1970, Hjeljord et al. 1973), wodurch die toxikologische Wirkung auf die Zellen eventuell herabgesetzt wird im Vergleich zu den *In-vitro*-Versuchen, bei denen die Zellen vollständig mit dem CHX-Wirkstoff in der entsprechenden Dosis exponiert sind. Ebenso möglich ist die partielle Umsetzung des CHX in ein neues Produkt durch die verschiedenen Bakterien.

Bei allen Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität werden einzelne Vitalitätsmerkmale der Zelle untersucht, die jedoch möglicherweise unterschiedlich durch CHX beeinflusst werden. Folglich ist es möglich, dass die Ergebnisse verschiedener Methoden voneinander abweichen. Aus diesem Grund ist die gleichzeitige Untersuchung mit mehreren unterschiedlichen Methoden zur Ermittlung der Zytotoxizität so bedeutsam für die Generierung aussagekräftiger Ergebnisse. Weiterhin sind unbedingt mehrere Zeitpunkte notwendig, um zuverlässige Informationen zum Irritationspotenzial des CHX und zur Regenerationsfähigkeit der Zellen zu erhalten. Zwar ist das Merkmal der Zytotoxizität für ein Screening geeignet, unterliegt jedoch bestimmten Restriktionen zur Voraussage der Wundverträglichkeit, Regeneration und Proliferationsfähigkeit der Fibroblasten nach Behandlung mit CHX durch die hohe Sensitivität der Monolayerschicht der Zellkultur, die aus der fehlenden Gewebematrix und den damit verbundenen Schutzmechanismen resultiert (Kramer et al. 1995) sowie der damit nur partiell imitierbaren tatsächlichen Mundverhältnisse,

die zudem auch individuelle Unterschiede aufweisen können, was die Reaktion der Mundhöhle auf Expositionen mit CHX möglicherweise erheblichen Schwankungen unterwirft. Dies implizieren die teils widersprüchlichen Daten und Interpretationen der veröffentlichten Studien. Ferner ist zu beachten, dass die Mundspüllösungen hauptsächlich effektiv gegen supragingivale Plaque sind und dass nur 4% den subgingivalen Bereich erreichen können (Newman et al. 2003), wodurch die Zellen in tieferen Zellschichten möglicherweise nicht in dem Ausmaße geschädigt werden würden wie *in vitro*.

Diese Vergleiche sind jedoch eher hypothetischer Natur, da Ergebnisse aus *In-vitro*-Studien nicht vollständig auf *In-vivo*-Studien oder klinisch beschriebene Ereignisse übertragbar sind – die entsprechenden Gründe für die hier betrachtete Thematik wurden bereits diskutiert. So stabil, nachweisbar und aussagekräftig solche *In-vitro*-Ergebnisse im Einzelnen sein mögen – die entscheidende Frage ist schlussendlich stets die nach Relevanz und Übertragbarkeit dieser Befunde auf die Praxis (Niedner 1996).

Es ist zu überlegen, ob CHX weiterhin dort eingesetzt werden sollte, wo die Ergebnisse widersprüchlich sind und durchaus schädliche Wirkungen bezüglich seiner Toxizität gezeigt wurden, wie zum Beispiel im Bereich der *full-mouth-disinfection*. Unter anderem wurde in einer Langzeitstudie untersucht, ob die positive Wirkung dieses Behandlungskonzepts als Folge auf die Verwendung des Chlorhexidins oder auf das einzeitige subgingivale Scaling aufzufassen war (Quirynen et al. 2000, Swierkot 2008). Resultierend konnten etwas bessere Ergebnisse eruiert werden, sofern das Antiseptikum im Sinne der *one-stage full-mouth disinfection* (OSFMD) angewandt wurde (Swierkot 2008). Nichtsdestotrotz blieben diese Resultate ohne statistische Signifikanz (Koshy et al. 2004, Quirynen et al. 2006, Kinane & Papageorgakopoulos 2008). Möglicherweise sind die guten Ergebnisse der OSFMD explizit auf die Durchführung des subgingivalen Scalings mit Rootplaning innerhalb dieses kurzen Zeitintervalls zurückzuführen (Swierkot 2008). In weiteren Untersuchungen wurde ein Vergleich zwischen der konservativen quadrantenweise mechanischen Parodontalbehandlung einerseits und der Behandlung innerhalb von 24 Stunden ohne den adjuvanten Einsatz von Chlorhexidin andererseits gezogen (Apatzidou & Kinane 2004, Koshy et al. 2005, Wennström et al. 2005, Jervøe-Storm et al. 2006, Swierkot 2008). In all diesen Studien gab es bei diesem Vergleich sechs Monate nach der Behandlung keine signifikanten Gruppenunterschiede bezüglich der klinischen und mikrobiologischen Parameter (Swierkot 2008). Weiterhin zeigte eine Metaanalyse von Eberhard et al. (2008) zu diesem Thema, dass die Anzahl der verfügbaren Studien zu gering ist und der Unterschied zur traditionellen Herangehensweise

nicht signifikant ist. Infolgedessen ist es nicht ausreichend erforscht, ob die *one-stage full-mouth disinfection* zu verbesserten klinischen Resultaten führt (Greenstein 2004, Koshy et al. 2004, Kinane & Papageorgakopoulos 2008) und welche Rolle genau Chlorhexidin dabei einnimmt.

Nach heutigem Stand und in Anbetracht der geringen Probandenzahlen in den bisherigen Studien kann noch keine generelle Empfehlung für die *full mouth disinfection* als Ersatz zum konventionellen *scaling & rootplaning* gegeben werden und somit auch ein Gebrauch des Chlorhexidins.

### Schlussfolgerung

1. Die 0,12 % und 0,2 % CHX-Mundspüllösungen zeigen einen signifikanten Einfluss auf die Hemmung der Viabilität der humanen Gingivafibroblasten gegenüber Kontrollen. Dies an jedem der Auswertungszeitpunkte.
2. Die Hemmung ist bei 5 Minuten stärker als bei 1 Minute Einwirkzeit. Die Viabilität ist bei 0,2 % geringer als bei 0,12 %. Das heißt, dass die Wirkung der Lösungen konzentrations- und zeitabhängig ist. Dies ist häufig signifikant.
3. Die Viabilität und die Zellzahl und dadurch die Proliferation der Zellen ist am 3. Tag am geringsten und erholt sich am 5. Tag am stärksten.
4. Aufgrund der ermittelten Ergebnisse dieser *In-vitro*-Untersuchung kann angenommen werden, dass die im Handel erhältlichen CHX-Mundspüllösungen zytotoxisch auf die humanen Gingivafibroblasten wirken. Aber auch dass sich diese Zellen durch die Wirkstoffsabstinenz wieder revitalisieren können.



## 6. Zusammenfassung

Den antiseptischen, antiphlogistischen und kariesprotektiven Wirkungen von Chlorhexidin-Mundspüllösungen wird in der heutigen Zeit zunehmende Wichtigkeit zugeschrieben, da eine mechanische Plaquerreduktion in vielen Fällen nicht ausreichend ist. Zahlreiche Studien konnten bisher eine prophylaktische und therapeutische Wirkung nachweisen. Dagegen gibt es keine systematischen Untersuchungen zur Verträglichkeit dieser Präparate. Da diese häufig jahrelang angewendet werden, ist die Kenntnis der Gewebeverträglichkeit sehr bedeutsam.

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von CHX-Mundspüllösungen in zwei handelsüblichen Konzentrationen auf humane Gingivafibroblasten und deren mögliche Revitalisierung *in vitro* zu untersuchen. Für die Untersuchung wurden eingefrorene Gingivafibroblasten einer parodontal gesunden Probandin verwendet und bis zur 5. Passage kultiviert. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>.

Die Zellen wurden mit 0,12 % und 0,2 % CHX für je eine und fünf Minuten exponiert und mit unbehandelten Kontrollzellen in ausgewählten Parametern verglichen. Hierbei wurden die Viabilität mittels MTT-Assay und Cellometer und die Zellzahl mittels Cellometer in allen Versuchsanordnungen an drei verschiedenen Zeitpunkten (24 Stunden, drei und fünf Tage) geprüft. Diese Versuche wurden zwölfmal wiederholt.

Die Ergebnisse zeigten einen signifikanten Einfluss beider CHX-Konzentrationen auf die Gingivafibroblasten: Sie wirkten zytotoxisch. Die Zytotoxizität präsentierte sich dosis- und zeitabhängig. Die Viabilität der Zellen erhöhte sich zwar nach anfänglich starker Reduktion bis zum fünften Tag, war jedoch im Vergleich zur Kontrolle noch immer signifikant reduziert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen einschlägige Publikationen zur zytotoxischen Wirkung von Chlorhexidin auf Gingivafibroblasten. Alle Ergebnisse zusammen zeigen, dass es grundsätzlich mehrerer Parameter zur Beurteilung der Zellfunktionen und der Wirkung des CHX auf die Fibroblasten *in vitro* bedarf. Zellzahl und Zellviabilität allein, wie in der vorliegenden Studie, führen nicht zu einem klaren Bild der Toxizität des CHX-Wirkstoffs, verhelfen jedoch zur weiteren Aufklärung. Dennoch ist der Prozess des Erkenntnisgewinns damit nicht abgeschlossen. Es wurden bis dato nur wenige *In-vitro*-Studien mit diesen humanen Zelltypen durchgeführt, die eine realistische Einwirkzeit und CHX-Konzentration verwendeten. Weiterhin blieben in diesen Studien die Regenerationszeiten- und –mechanismen der Zellen auf die Einwirkung des Chlorhexidins fast unbeachtet. Daher bleiben derzeit noch viele Fragen offen, die einer Beantwortung bedürfen.

Infolge der möglichen Zytotoxizität von Chlorhexidin auf die Gingivafibroblasten sollte die Behandlung gesunder parodontaler Verhältnisse im Sinne einer Prophylaxe zwingend hinterfragt werden und nur unter strenger Indikationsstellung erfolgen. Eine direkte Spülung des freigelegten parodontalen Knochens oder des parodontalen Bindegewebes mit CHX-haltigen Lösungen während parodontalchirurgischer Interventionen sollte auf Basis der hier generierten Ergebnisse und auch anderer Studiengruppen stark überdacht werden. Auf der anderen Seite muss der Tatsache Rechnung getragen werden, dass die Wundheilung eher durch bakterielle Einflüsse gestört werden kann als durch eine schonende gezielte Anwendung von Antiseptika. Auf der Grundlage vorliegender Ergebnisse und früherer Studien sollte man bei Anwendung der CHX-Spülung auf kurze Einwirkzeiten und niedrige Konzentration achten. Bevor die hier dargestellten Resultate auch klinisch relevant werden, sind weitere toxikologische und zytotoxische Analysen zu CHX-Mundspüllösungen erforderlich, um die Sicherheit dieser kommerziell erhältlichen Produkte zu gewährleisten und eine gezielte, effektive Anwendung in der Zahnmedizin zu sichern.

## 7. Literaturverzeichnis

- Addy M (1986):** Chlorhexidine compared with other locally delivered antimicrobials. A short review. *J Clin Periodontol* 13, 957–964
- Addy M, Dolby AE (1976):** The use of chlorhexidine mouthwash with a periodontal dressing following the gingivectomy procedure. *J Clin Periodontol* 3, 59-65
- Addy M, Douglas WH (1975):** A chlorhexidine-containing methacrylic gel as a periodontal dressing. *J Periodontol* 46, 465-468
- Addy M, Moran J (1983):** Comparison of plaque accumulation after topical application and mouth rinsing with chlorhexidine gluconate. *J Clin Periodontol* 10, 69-71
- Agerbaek N, Melsen B, Rolla G (1975):** Application of chlorhexidine by oral irrigation systems. *Scand J Dent Res.* 83, 284-7
- Ahrari F, Tavakkol Afshari J, Poosti M, Brook A (2010):** Cytotoxicity of orthodontic bonding adhesive resins on human oral fibroblasts. *Eur J Orthod.* 32, 688-92
- Al-Doori Z, Goroncy-Bermes P, Gemmell CG, Morrison D (2007):** Low-level exposure of MRSA to octenidine dihydrochloride does not select for resistance. *J Antimicrob Chemother* 59, 1280–1281
- Alleyn CD, O’Neal RB, Strong SL, Scheidt MJ, Van Dyke TE, Mc Phearson JC (1991):** The effect of chlorhexidine treatment of root surfaces on the attachment of human gingival fibroblast in vitro. *J Periodontol* 62, 434-438
- Almqvist H, Luthman J (1988):** Gingival and mucosal reactions after intensive chlorhexidine gel treatment with or without oral hygiene measures. *Scand J Dent* 96, 557-560
- Altman SA, Randers L, Rao G (1993):** Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnol Prog.* 9, 671-4
- American Academy of Periodontology (AAP) (1999):** International workshop for a classification of periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 4, 1-112
- Apatzidou DA, Kinane DF (2004):** Quadrant root planing versus same-day full-mouth root planing. I. Clinical findings. *J Clin Periodontol* 31, 132-140
- Apatzidou DA, Riggio MP, Kinane DF (2004):** Quadrant root planing versus same-day full-mouth root planing. II. Microbiological findings. *J Clin Periodontol* 31, 141-148

- Arweiler NB, Netuschil L, Reich E (2001):** Alcohol-free mouthrinse solutions to reduce supragingival plaque regrowth and vitality. A controlled clinical study. *J Clin Periodontol* 28, 168–174
- Asboe-loergensen V, Attstrom R, Lang NP, Loe H (1974):** Effect of a chlorhexidine dressing on the healing after periodontal surgery. *J of Periodontal* 45, 13-17
- Ashley FP, Skinner A, Jackson P, Woods A, Wilson RF (1984):** The effect of a 0.1 %cetylpyridinium chloride mouthrinse on plaque and gingivitis in adult subjects. *Br Dent J* 157, 191-196
- Asikainen S, Alaluusua S, Saxen L (1991):** Recovery of *A. actinomycetemcomitans* from teeth, tongue, and saliva. *J Periodontol* 62, 203-206
- Autio-Gold J (2008):** The role of chlorhexidine in caries prevention. *Oper Dent.* 33, 710-6
- Axelsson P, Lindhe J (1987):** Efficacy of mouthrinses in inhibiting dental plaque and gingivitis in man. *J Clin Periodontol.* 14, 205-12
- Axelsson P, Lindhe J, Nystrom B (1991):** On the prevention of caries and periodontal disease. Results of a 15-year longitudinal study in adults. *J Clin Periodontol* 18, 182-189
- Babich H, Martin-Alguacil N, Raul C, Rosenberg D. W, Borenfreund E: (1991)** Response of human cell cultures to cytotoxicants requiring metabolic activation. In: *Alternatives methods in toxicology*. [Goldberg, A. M., Editor], S. 263 – 276
- Babich H, Wurzburger BJ, Rubin YL, Sinensky MC, Blau L (1995):** An *in vitro* study on the cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to human gingival cells. *Cell Biol Toxicol.* 11, 79-88
- Badersten A, Nilveus R and Egelberg J (1987):** Effect of nonsurgical periodontal therapy. VIII. Probing attachment changes related to clinical characteristics. *J Clin Periodontol* 14, 425-432
- Bailey DM, De Grazia CG, Hoff SJ (1984):** Bispyridinamines: a new class of topical antimicrobial agents as inhibitors of dental plaque. *J Med Chem.* 27, 1457–1464
- Banoczy J, Nemes J (1991):** Effect of amine fluoride (AmF)/ stannous fluoride (SnF<sub>2</sub>) toothpaste and mouthwashes on dental plaque accumulation, gingivitis and root-surface caries. *Proc Finn Dent Soc* 87, 555-559
- Banoczy J, Szoke J, Kertesz P, Toth Z, Zimmermann P, Gintner Z (1989):** Effect of amine fluoride/stannous fluoride-containing toothpaste and mouthrinsings on dental plaque, gingivitis, plaque and enamel Faccumulation. *Caries Res.* 23, 284-288

- Bansemir K, Goroncy - Bermes H, Harke HP, Heeg P, Hepper M, Hingst V, Jülich WD, Kirschner U, Kramer A, Reimer K, von Rheinhaben F, Rödger HJ, Schwarzmann S, Schwemmer J, Wahl G, Werner HP, Weuffen W, Wewalka G, Zippel M (1993):** Mitteilungen der Fachkommission Klinische Antiseptik; 2.Mitteilung :Indikationen zur Antiseptik in der Mundhöhle. Hyg Med 18, 79-81
- Barkvoll P, Rolla G (1995):** Triclosan reduces the clinical symptoms of the allergic patch test reaction (APR) elicited with 1% nickel sulphate in sensitised patients. J Clin Periodontol 22, 485-487
- Barnett ML (2003):** The role of therapeutic antimicrobial mouthrinses in clinical practice. Control of supragingival plaque and gingivitis. J Am Dent Assoc 134, 699-704
- Bartzokas CA, Corkill JE, Makin T, Parry E (1987):** Comparative evaluation of the immediate and sustained antibacterial actions of two regimens, based on triclosan- and chlorhexidine-containing handwash preparations, on volunteers. Epidemiol Infect 98, 337-344
- Bassetti C, Kallenberger A. (1980):** Influence of chlorhexidine rinsing on the healing of oral mucosa and osseous lesions. J Clin Periodontol. 7, 443-456
- Bay I, Roella, G (1980):** Plaque inhibition and improved gingival condition by use of stannous fluoride toothpaste. Scand J Dent Res 88, 313-315
- Beiswanger BB, Mallatt ME, Mau MS, Jackson RD, Hennon DK (1990):** The clinical effects of a mouth rinse containing 0.1% octenidine. J Dent Res 69, 454-457
- Bender IB, Barkan MJ, Einstein A (1989):** Dental bacteremia and its relationship to bacterial endocarditis: Preventive measures. Compend Contin Educ Dent 10, 474-482
- Bernimoulin JP (2003):** Recent concepts in plaque formation. J Clin Periodontol 30, 7-9
- Bernimoulin JP, Deschner J (1995):** Antimikrobielle Lösungen in der Parodontologie – Eine allgemeine Übersicht. Parodontologie 6, 173-180
- Bernstein D, Schiff G, Echler G, Prince A, Feller M and Briner W (1990):** *In vitro* virucidal effectiveness of a 0,12%-chlorhexidine gluconate mouthrinse. J Dent Res 69, 874-876
- Berridge MV, Tan AS (1993):** Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular location, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. Arch Biochem Biophys 303, 474-482
- Berridge MV, Tan AS (2000):** Cell-surface NAD(P)H-oxidase: relationship to transplasma membrane NADH-oxidoreductase and a potential source of circulating NADH-oxidase. Antioxid Redox Signal 2, 277 – 288

- Bhandari M, Adili A, Schemitsch EH (2001):** The efficacy of low pressure lavage with different irrigating solutions to remove adherent bacteria from bone. *J Bone Jt Surg* 83, 412–419
- Bhargava HN, Leonard PA (1996):** Triclosan: applications and safety. *Am J Infect Control* 24, 209-218
- Bhuyan BK, Loughman BE, Fraser TJ, Day KJ (1976):** Comparison of different methods of determining cell viability after exposure to cytotoxic compounds. *Exp Cell Res.* 97, 275-80
- Blenman TV, Morrison KL, Tsau GJ, Medina AL, Gerlach RW (2005):** Practice implication with an alcohol-free 0.07 % cetylpyridinium chloride mouthrinse. *Am J Dent* 18, 29-34
- Bley A, Gülzow H J (1991):** [The influence of an amine fluoride/stannous fluoride-containing gel on the oral microorganisms]. *Dtsch.Stomatol.* 41, 455-456
- Bolanowski SJ, Gescheider GA, Sutton SV (1995):** Relationship between oral pain and ethanol concentration in mouthrinses. *J Periodontal Res* 30, 192-197
- Bollen CM, Quirynen M (1996):** Microbiological response to mechanical treatment in combination with adjunctive therapy. A review of the literature. *J Periodontol* 67, 1143-1158
- Bollen CM, Vandekerckhove B N, Papaioannou W, Van Eldere J, Quirynen M (1996):** Full- versus partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections. A pilot study: long-term microbiological observations. *J Clin Periodontol* 23, 960-970
- Bonesvoll P (1977):** Oral pharmacology of chlorhexidine. *J Clin Periodontol* 4 (49-65)
- Bonesvoll P (1978):** Retention and plaque-inhibiting effect in man of chlorhexidine after multiple rinses and retention and release of chlorhexidine after toothbrushing with a chlorhexidine gel. *Arch Oral Biol* 23, 295-300
- Bonesvoll P, Gjermo P (1978):** A comparison between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with regard to retention, salivary concentration and plaque-inhibiting effect in the human mouth after mouth rinses. *Arch Oral Biol* 23, 289-94
- Bonesvoll P, Lokken P, Rolla G (1974 a):** Influence of concentration, time, temperature and pH on the retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. *Arch Oral Biol* 19, 1025-9
- Bonesvoll P, Lokken P, Rolla G, Paus PN (1974 b):** Retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. *Arch Oral Biol* 19, 209-12
- Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N (1988):** "Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays: The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests." *Toxicology in vitro* 2, 1-6

- Bowen WH (1990):** Mechanisms of action of known plaque inhibitors. *Z Stomatol* 87, 19-23
- Bratthall D, Serinirach R, Rapisuwon S (1995):** A study into the prevention of fissure caries using an antimicrobial varnish. *Int Dent J* 45, 245–254
- Brecx M, Brownstone E, MacDonald L, Gelskey S, Cheang M (1992):** Efficacy of Listerine®, Meridol and chlorhexidine mouthrinses as supplements to regular tooth cleaning measures. *J Clin Periodontol.* 17, 292-297
- Brecx M, Liechti T, Widner J, Gher P, Lang NP (1989):** Histological and clinical parameters of human gingiva following 3 weeks of chemical (chlorhexidine) control or mechanical plaque control. *J Clin Periodontol* 16, 150-155
- Brecx M, Macdonald LL, Legary K, Cheang M, Forgay MG (1993):** Long-term effects of Meridol and chlorhexidine mouthrinses on plaque, gingivitis, staining, and bacterial vitality. *J Dent Res.* 72, 1194-1197
- Brecx M, Netuschil L, Hoffmann T (2003):** How to select the right mouthrinses in periodontal prevention and therapy. Part II. Clinical use and recommendations. *Int J Dent Hygiene* 1, 188-194
- Brecx M, Netuschil L, Reichert B, Schreil G (1990):** Efficacy of Listerine®, Meridol and chlorhexidine mouthrinses on plaque, gingivitis and plaque bacteria vitality. *J Clin Periodontol* 17, 292-297
- Brennan SS, Foster ME, Leaper DJ (1986):** Antiseptic toxicity in wounds healing by secondary intention." *J Hosp Infect* 8, 263-7
- Bruhn G, Netuschil L, Richter S, Brecx M, Hoffmann T (2002):** Effect of a toothpaste containing triclosan on dental plaque, gingivitis, and bleeding on probing--an investigation in periodontitis patients over 28 weeks. *Clin.Oral Investig.* 6, 124-127
- Bundesinstitut für Risikobewertung (2006):** Stellungnahme Nr. 030/2006 des BfR
- Burkhardt B (2011):** Untersuchungen zur Resorption, zum Metabolismus und zur Mutagenität von *Alternaria* –Toxinen *in vitro*. Fakultät für Chemie und Biowissenschaften. Karlsruher Institut für Technologie Diss
- Cabral CT, Fernandes MH (2007):** *In vitro* comparison of chlorhexidine and povidone-iodine on the long-term proliferation and functional activity of human alveolar bone cells. *Clin Oral Investig.* 11, 155-64
- Cancro LP, Paulovich DB, Bolton S, Picozzi A (1974):** Dose response of chlorhexidine gluconate in a model *in vivo* plaque system. *J Dent Res* 53, 765
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB (1987):** "Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing." *Cancer Research* 47, 936-942

- Chan LL, Zhong X, Qiu J, Li PY, Lin B (2011):** Cellometer Vision as an Alternative to Flow Cytometry for Cell Cycle Analysis, Mitochondrial Potential, and Immunophenotyping, *Cytometry*, 79A: 507-517
- Charles CH, Bartels LL, Mostler KM, Mankodi SM (2004):** Comparative anti-plaque and antigingivitis efficacies of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial. *J Clin Periodontol* 31, 878-84
- Charles CH, Sharma NC, Galustians HJ, Qaqish J, McGuire JA, Vincent JW (2001):** Comparative efficacy of an antiseptic mouthrinse and an anti-plaque/antigingivitis dentifrice. A six-month clinical trial. *J Am Dent Assoc* 132, 670-675
- Chen CC, Chen CL, Chiang CH, Pan SC (2005):** Herpes simplex infection in a minor burn wound: a case report. *J Burn Care Rehabil* 26, 453-455
- Chen YT, Hung SL, Lin LW, Chi LY, Ling LJ (2003):** Attachment of periodontal ligament cells to chlorhexidine-loaded guided tissue regeneration membranes. *J Periodontol* 74, 1652-1659
- Christersson L, Slots J, Zambon J, Genco, R (1985):** Transmission and colonization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontal patients. *J Periodontol* 56, 127-131
- Ciancio SG (1992):** Agents for the management of plaque and gingivitis. *J Dent Res* 71, 1450-1454
- Ciancio SG (1995):** Nonsurgical chemical periodontal therapy. *Periodontol 2000* 9, 27-37
- Ciancio SG (2003):** Improving oral health: current considerations. *J Clin Periodontol* 35, 4-6
- Cline NV, Layman DL (1992):** The effect of chlorhexidine on the attachment and growth of cultured human periodontal cells. *J Periodontol* 63, 598-602
- Cobb CM (1996):** Non-surgical pocket therapy: mechanical. *Ann Periodontol*. 1, 443-90
- Cosyn J, Wyn I, De Rouck T, Moradi Sabzevar M (2006):** Clinical benefits of subgingival chlorhexidine varnish application as an adjunct to same-day full-mouth root planing: a pilot study. *J Periodontol*. 77, 1074-9
- Council on Dental Therapeutics AHA (1991):** Preventing bacterial endocarditis: a statement for the dental profession. *JADA* 122, 87-92
- Cugini M A, Haffajee A D, Smith C, Kent R L, JR., Socransky S S (2000):** The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12-month results. *J Clin Periodontol* 27, 30-36



- Cumming BR, Loe H (1973):** Optimal dose and method of delivering chlorhexidine solutions for the inhibition of dental plaque. *J Periodont Res* 8, 57-62
- Cummins D, Creeth JE (1992):** Delivery of antiplaque agents from dentifrices, gels, and mouthwashes. *J Dent Res* 71, 1439-1449
- Damour O, Hua SZ, Lasne F, Villain M, Rousselle P, Collombel C (1992):** Cytotoxicity evaluation of antiseptics and antibiotics on cultured human fibroblasts and keratinocytes. *Burns* 18, 479-85
- Danser MM, Timmerman MF, van Winkelhoff AJ, van der Velden U (1996):** The effect of periodontal treatment on periodontal bacteria on the oral mucous membranes. *J Periodontol* 67, 478-485
- Danser MM, van Winkelhoff AJ, de Graaff J, Loos BG, van der Velden U (1994):** Short-term effect of full-mouth extraction on periodontal pathogens colonizing the oral mucous membranes. *J Clin Periodontol* 21, 484-489
- Davies A (1973):** The mode of action of chlorhexidine. *J Periodontal Res* 12, 68-75
- Davies GE, Francis J, Martin AR, Rose PL, Swain G (1954):** 1:6-di 4' -chlor-phenyldiguanidohexane ('Habitane'). Laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. *Br J Pharmacol* 9, 192-197
- Davies RM (2007):** The clinical efficacy of triclosan/copolymer and other common therapeutic approaches to periodontal health. *Clin Microbiol Infect.* 13, 25-9
- Davies RM, Jensen SB, Schiott CR, Loe H (1970):** The effect of topical application of chlorhexidine on the bacterial colonization of the teeth and gingiva. *J Periodont Res* 5, 96-101
- DePaola LG, Overholser CD, Meiller TF, Minah GE, Niehaus C (1989):** Chemotherapeutic inhibition of supragingival dental plaque and gingivitis development. *J Clin Periodontol.* 1989 May 16, 311-5
- DeRiso AJ, Ladowski JS, Dillon TA, Justice JW, Peterson AC (1996):** Chlorhexidine Gluconate 0,12% oral rinse reduces the incidence of total nosocomial respiratory infection and nonprophylactic systemic antibiotic use in patients undergoing heart surgery. *Chest* 109, 1556-1561
- De Soete M, Mongardini C, Pauwels M, Haffajee AD, Socransky SS, van Steenberghe D, Quirynen M (2001):** One-stage full-mouth disinfection. Long-term microbiological results analyzed by checkerboard DNA-DNA hybridization. *Journal of Periodontology* 72, 374-382
- Denton GW (1991):** Chlorhexidine. In Block SS, ed. *Disinfection, Sterilization and Preservation*. 4th edn. Philadelphia: Lea and Febiger 274-289
- DIN EN 30993-5 (1994):** Biologische Beurteilung von Medizinprodukten, Teil 5: Prüfungen auf Zytotoxizität: in vitro-Methoden.

- Dogan S, Gunay H, Leyhausen G, Geurtsen W (2003):** Effects of low-concentrated chlorhexidine on growth of *Streptococcus sobrinus* and primary human gingival fibroblasts. *Clin Oral Investig* 7, 212-216
- Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H (2006):** Development of a highly reproducible three-dimensional organotypic model of the oral mucosa. *Nat Protoc.* 1, 2012-2018
- Dragoo MR, Grant DA, Gutverg D, Stambaugh R (1984):** Experimental periodontal treatment in humans. I. Subgingival root planning with and without chlorhexidine gluconate rinses. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 4, 8-29
- Dreizen S, McCredie KB, Dicke KA, Zander AR, Peters LJ (1979):** Oral complications of bone marrow transplantation. *Postgrad Med* 66, 87–193
- Earnest R, Loesche W (1991):** Measuring harmful levels of bacteria in dental aerosols. *J Am Dent Assoc* 122, 55–57
- Eberhard J, Jepsen S, Jervoe-Storm PM, Needleman I and Worthington HV (2008):** Full-mouth disinfection for the treatment of adult chronic periodontitis. *Cochrane Database Syst Rev*1, CD004622
- Edgar WM (1990):** Biochemical control of plaque-induced disease. *Z Stomatol* 87, 9–18-----<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/medizin/schulz-joachim/HTML/objct6.gif>
- Eick S, Pfister W (2004):** Efficacy of antibiotics against periodontopathogenic bacteria within epithelial cells: an *in vitro* study. *J Periodontol* 75, 1327-1334
- Eley BM (1999):** Antibacterial agents in the control of supragingival plaque – a review. *Br Dent J* 186, 286–96
- Elmore JG, Horwitz RI (1996):** Oral cancer and mouthwash use: evaluation of the epidemiologic evidence. *Otolaryngol Head Neck Surg* 113, 253–61
- Elworthy A, Greenman J, Doherty FM, Newcombe RG, Addy M (1996):**The substantivity of a number of oral hygiene products determined by the duration of effects on salivary bacteria. *J Periodontol.*67, 572-6
- Emilson CG (1994):** Potential efficacy of chlorhexidine against mutans streptococci and human dental caries. *J Dent Res* 73, 682–691
- Emilson CG, Bowen WH, Robrish SA, Kemp CW (1981):** Effect of the antibacterial agents octenidine and chlorhexidine on the plaque flora in primates. *Scand J Dent Res* 89, 384–392
- Emilson CG, Gillselsson H, Birkhed D (1999):** Recolonisation pattern of mutans streptococci after suppression by three different modes of chlorhexidine gel application. *Eur J Oral Science* 107, 170-175

- Ernst CP, Prockl K, Willershausen B (1998):** The effectiveness and side effects of 0.1% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses: a clinical study. *Quintessence Int.* 29, 443-8
- European Committee for Standardization (1997) confirmed (2002):** EN 1040: Chemical Disinfectants and Antiseptics – Basic Bactericidal Activity – Test Method and Requirements (Phase 1). Brussels, European Committee for Standardization
- Exner M, Harke HP, Brill H (1988):** Ergebnis einer Arbeitstagung zur Frage der Schleimhautantiseptik 28.–30.1.87 in Würzburg. *Hyg Med* 13, 9–16
- Fabreguette A, Zhi Hua S, Lasne F, Damour O (1994):** Evaluation of the cytotoxicity of antiseptics used in current practice on cultures of fibroblasts and keratinocytes. *Pathol Biol (Paris)* 42, 888-92
- Falkenhain et al. (1998):** Dead cell estimation – a comparison of different methods. Merten et al. (Eds.), *New Developments and New Applications in Animal Cell Technology*, 333–336. 15 th ESACT Meeting. Kluwer Academic Publishers
- Fardal O, Turnbull RS (1986):** A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J Amer Dent Soc* 11, 863
- Fathilah AR, Himratul-Aznita WH, Fatheen AR, Suriani KR (2012):** The antifungal properties of chlorhexidine digluconate and cetylpyridinium chloride on oral *Candida*. *J Dent.* 19
- Faveri M, Gursky LC, Feres M, Shibli JA, Salvador SL, de Figueiredo LC (2006):** Scaling and root planing and chlorhexidine mouthrinses in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 33, 819-28
- FDI Commission (2002):** Mouthrinses and dental caries. *Int J Dent* 52, 337-345
- Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2007) :** Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. *Braz Dent J.* 18, 294-8
- Ferretti GA, Raybould TP, Brown AT (1990):** Chlorhexidine prophylaxis for chemotherapy- and radiotherapy-induced stomatitis: A randomized double-blind trial. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 69, 331–338
- Fine DH, Furgang D, Sinatra K, Charles C, McGuire A, Kumar LD (2005):** *In vivo* antimicrobial effectiveness of an essential oil-containing mouth rinse 12 h after a single use and 14 days' use. *J Clin Periodontol* 32, 335–340
- Fine DH, Letizia J, Mandel, ID (1985):** The effects of rinsing with Listerine® antiseptic on the properties of developing dental plaque. *J Clin Periodontol* 12, 660

- Fine DH, Mendieta C, Barnett ML, Furgang D, Meyers R, Olshan A, Vincent J (1992):** Efficacy of preprocedural rinsing an antiseptic in reducing viable bacteria in dental aerosols. *J Periodontol* 63, 821-826
- Flemingson, Emmadi P, Ambalavanan N, Ramakrishnan T, Vijayalakshmi R (2008):** Effect of three commercial mouth rinses on cultured human gingival fibroblast: An vitro study. *Indian J Dent Res* 19, 29-35
- Flemmig TF, Milian E, Kopp C, Karch H, Klaiber B (1998 b):** Differential effects of systemic metronidazole and amoxicillin on *Actinobacillus action-mycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in intraoral habitats. *J Clin Periodontol* 25, 1-10
- Flötra L, Gjermo P, Rølla G, Waerhaug J (1972):** A 4-month study on the effect of chlorhexidine mouth washes on 50 soldiers. *Scand J Dent Res* 80, 10-17
- Francis JR, Hunter B, Addy M (1987):** A comparison of three delivery methods of chlorhexidine in handicapped children. I. Effects on plaque, gingivitis and toothstaining *J Periodontol* 58, 451-454
- Freshney RI (2005):** Culture of Animal Cells, Verlag Wiley & Sons
- Fure S, Gahnberg L, Birkhed D (1998):** A comparison of four home-care fluoride programs on the caries incidence in the elderly. *Gerodontology* 15, 51-60
- Garcia-Gordoy F (2005):** Advances in therapeutic mouthrinses. *Am J Dent* 18, 2A
- Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D (1999):** Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol* 6, 437-9
- Gent JF, Frank ME, Hettinger TP. (2002):** Taste confusions following chlorhexidine treatment. *Chem Senses* 27, 73-80
- Gilbert P, Moore LE (2005):** Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *JAppl Microbiol.* 99, 703-15
- Gjermo P (1974):** Chlorhexidine in dental practice. *J Clin Periodontol* 1, 143–152
- Gjermo P (1989):** Chlorhexidine and related compounds. *J Dent Res* 68, 1602
- Gjermo P, Rolla G (1970):** Plaque inhibition by antibacterial dentrifices. *Scand J Dent Res* 78: 464-470
- Gjermo P, Bastaad K, Rolla G (1970):** The plaque-inhibiting capacity of 11 antibacterial compounds. *J Periodont Res* 5, 102–9
- Gjermo P, Bonesvoll P, Rolla G (1974):** Relationship between plaque-inhibiting effect and retention of chlorhexidine in the human oral cavity. *Arch Oral Biol* 19, 1031-4

- Goldschmidt P, Cogen R, Taubman S (1977):** Cytopathologic effects of chlorhexidine on human cells. *J Periodontol* 48, 212-215
- Goltz S (2010):** In-vitro-Wirksamkeit verschiedener Mundspüllösungen auf parodontopathogene Mikroorganismen der Mundhöhle. Med. Dis.s Jena
- Gordon JM, Walker CB (1993):** Current status of systemic antibiotic usage in destructive periodontal disease. *J Periodontol* 64, 760-771
- Gordon JM, Lamster IB, Seiger MC (1985):** Efficacy of Listerine® antiseptic in inhibiting the development of plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol* 12, 697-704
- Goroncy-Bermes P (1999):** Untersuchung zur Resistenz von MRSA gegen Octenidindihydrochlorid und andere kationenaktive Wirkstoffe. *Krh Hyg + Infverh* 21, 144-148
- Goroncy-Bermes P (2007):** Antimikrobielle Wirksamkeit von Octenidol®. Schülke Forschung und Entwicklung, Nordestedt
- Goroncy-Bermes P, Harke HP (1990):** Untersuchungen über die Wirkung von Octenisept® Gegen Mikroorganismen der Vaginalflora. S&M Forschung, Nordestedt
- Gottsegen R. (1993):** Diabetes mellitus, cardiovascular diseases and alcoholism. In: Schluger S, Yuodelis R, Page RC, Johnson RH, eds, *Periodontal Diseases*, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lea&Febiger, 273-283
- Greenstein G (2004):** Efficacy of full-mouth disinfection vs quadrant root planing. *Compend Contin Educ Dent* 25, 380-2, 384-6, 388 passim.
- Greenstein G, Berman C, Jaffin R (1986):** Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *J Periodontol* 57, 370-7
- Greenstein G, Tonetti M (2000):** The role of controlled drug delivery for periodontitis. The Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. *J Periodontol* 7, 125-40
- Grossman E, Meckel AH, Isaacs RL, Ferretti GA, Sturzenberger OP, Bollmer B W, Moore DJ, Lijana RC, Manhart MD (1989):** A clinical comparison of antibacterial mouthrinses: effects of chlorhexidine, phenolics, and sanguinarine on dental plaque and gingivitis. *J Periodontol* 60, 435-440
- Grossmann E, Reiter D, Sturzenberger OP, De La Rosa M, Dickinson TD, Ferretti GA, Lundlam GE, Meckel AH (1986):** Six-month study of the effects of a chlorhexidine mouthrinse on gingivitis in adults. *J Periodont Res* 21, 33-43
- Haffajee A D, Cugini M A, Dibart S, Smith C, Kent R L, JR, Socransky SS (1997):** The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 24, 324-334

- Häkkinen L, Larjava H (1992):** Characterization of fibroblast clones from periodontal granulation tissue in vitro. J Dent Res 71, 1901–1907
- Halle W (1998):** Toxizitätsprüfungen in Zellkulturen für eine Vorhersage der akuten Toxizität (LD 50) zur Einsparung von Tierversuchen. Life Sciences 1, 94
- Harke HP (1989):** Octenidin Dihydrochlorid, Eigenschaften eines neuen antimikrobiellen Wirkstoff. Zentralbl Hyg Umweltme. 188, 188-93
- Harke HP, Streek M (1989):** Octenidin - ein neuer antimikrobieller Wirkstoff Hyg Med 14, 372-374
- Harke HP, Goroncy-Bermes P (1991):** Schleimhautantiseptik-Octenidinhydrochlorid als neuer Wirkstoff. Hyg Med 16, 46-50
- Harper DS, Robinson PJ (1987):** Correlation of histometric, microbial, and clinical indicators of periodontal disease status before and after root planing. J Clin Periodontol 14, 190-196
- Hartmann R, Günther S, Martin , Meisel H, Pentzien AK, Schlimme E, Scholz K (2000):** Cytochemical model systems for the detection and characterization of potentially bioactive milk components. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 52, 61 – 85
- Hassell TM (1993):** Tissues and cells of the periodontium. Periodontol 2000 (3), 9-38
- Heasman PA, Seymour RA (1994):** Pharmacological control of periodontal disease. I. Antiplaque agents. J Dent 22, 323-335
- Hefti AF, Huber B (1987):** The effect on early plaque formation, gingivitis and Salivary bacterial counts of mouthwashes containing hexetidine/zinc, amine-fluoride/tin or chlorhexidine. J Clin Periodontol 14, 515-518
- Helgeland K, Heyden G, Rolla G (1971):** Effect of chlorhexidine on animal cells in vitro. Scand J Dent Res 79, 209-215
- Hellden L, Lundgren D, Heyden G (1974):** Effect of chlorhexidine gluconate on granulation tissue. J Periodontal Res 9, 255-9
- Hellwig E, Klimek J, Attin T (2003):** Therapie der entzündlichen Parodontopathien. In: Hellwig E, Klimek J, Attin T (Hrsg.). Einführung in die Zahnerhaltung. München, Jena: Urban und Fischer, 407 und 457-458
- Henessey TD (1973):** Some antibacterial properties of chlorhexidine. J Periodontal Res 12, 61-67
- Herrera D, Roldan S, Santacruz I, Santos S, Masdevall M, Sanz M (2003):** Differences in antimicrobial activity of four commercial 0.12 % chlorhexidine mouthrinse formulations: an *in vitro* contact test and salivary bacterial counts study. J Clin Periodontol 30, 307-314

- Herrera D, Santos S, Ferrus J, Barbieri G, Trombelli L, Sanz M (2005):** Efficacy of benzydamine hydrochloride and 0.05 % cetylpyridiumchlorid mouthrinse on 4-day de novo plaque formation. *J Clin Periodontol* 32, 595-603
- Hickel R (1997):** Wirkstoffe gegen Plaque und Bakterien. *Quintessenz Bonusausgabe* 1, 45-57
- Hirsch T, Jacobsen F, Rittig A, Goertz O, Niederbichler A, Steinau HU, Seipp HM, Steinstraesser L (2009):** Vergleichende *In-vitro*-Studie zur Zytotoxizität klinisch eingesetzter Antiseptika. *Hautarzt* 60, 984-991
- Hjeljord LG, Rölla G, Bonesvoll P (1973):** Chlorhexidine-protein interactions. *J Periodontal Res* 12, 11-16
- Houle MA, Grenier D, Plamondon P, Nakayama K (2003):** The collagenase activity of *Porphyromonas gingivalis* is due to Arg-gingipain. *FEMS Microbiol Lett* 221, 181-5
- Huizinga E, Ruben J, Arends J (1990):** Effect of an antimicrobial-containing varnish on root demineralization in situ. *Caries Res* 24, 130-132
- Hugo B, Longworth AR (1966):** The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of *Escheria coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Pharm Pharmacol* 18, 569-578
- Jeng JH, Chan CP, Ho YS, Lan WH, Hsieh CC, Chang MC (1999):** Effects of butyrate and propionate on the adhesion, growth, cell cycle kinetics, and protein synthesis of cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontol*. 70, 1435-42
- Jenkins S, Addy M, Wade W (1988):** The mechanism of action of chlorhexidine. A study of plaque growth on enamel inserts in vivo. *J Clin Periodontol* 15, 415-424
- Jenkins S, Addy M, Newcombe RJ (1993):** A dose-response study of triclosan mouthrinses on plaque regrowth. *J Clin Periodontol* 20, 609-612
- Jervøe-Storm PM, Semaan E, AlAhdab H, Engel S, Fimmers R, Jepsen S (2006):** Clinical outcomes of quadrant root planing versus fullmouth root planing. *J Clin Periodontol* 33, 209-215
- Jokinen MA (1978):** Prevention of post-extraction bacteremia by local prophylaxis. *Int J Oral Surg* 7, 450-452
- Jones CG (1997):** Chlorhexidine: is still the gold standard? *Periodontal 2000* 15, 55-62
- Jones RD, Jampani HB, Newman JL, Lee AS (2000):** Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. *Am J Infect Control* 28, 184-196
- Kahl R (2003):** Zytotoxizität, frei verfügbares Praktikumsskript des Insituts für Toxikologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

- Kaiser T (1999):** Zellkulturtest für den täglichen Gebrauch. LaborPraxis 10, 50- 52
- Kalaga A, Addy M, Hunter B (1989):** The use of 0,2 % chlorhexidine as an adjunct to oral health in physicyllx an mentally handicapped adults. J Periodontol 60, 381-385
- Kalteis T, Lüring C, Schaumburger J, Perlick L, Bähthis H, Grifka J (2003):** Tissue toxicity of antiseptics. Z Orthop Ihre Grenzgeb. 141, 233-8
- Keijser JA, Verkade H, Timmerman MF, Van der Weijden FA (2003):** Comparison of 2 commercially available chlorhexidine mouthrinses. J Periodontol. 74, 214-8
- Kenney EB, Saxe SR, Bowles RD (1972):** Effect of chlorhexidine on human polymorphonuclear leucocytes. Arch Oral Biol 17, 1633-1636
- Kent LW, Dyken RA, Rahemtulla F, Allison AC, Michalek SM (1996):** Effect of *in vitro* passage of healthy human gingival fibroblasts on cellular morphology and cytokine expression. Archs oral Biol 41, 263-270
- Killooy WJ (1999):** Assessing the effectiveness of locally delivered chlorhexidine in the treatment of periodontitis. J Am Dent Assoc 130, 567-570
- Kinane DF, Papageorgakopoulos G (2008):** Full mouth disinfection versus quadrant debridement: the clinician's choice. J Int Acad Periodontol 10, 6-9
- Kjaerheim V, Barkvoll P, Waaler SM, Rolla G (1995):** Triclosan inhibits histamine-induced inflammation in human skin. J Clin Periodontol 22, 423-426
- Knuutila M, Soederling E (1981):** Effect of chlorhexidine on the release of lysosomal enzymes from cultured macrophages. Acta Odontol Scand 39, 285-289
- Kolahi J, Soolari A (2006):** Rinsing with chlorhexidine gluconate solution after brushing and flossing teeth: a systematic review of effectiveness. Quintessence Int 37, 605-612
- Kornman KS (1987):** The role of antimicrobials in the prevention and treatment of periodontal disease. In: Perspectives on Oral Antimicrobial Therapeutics. The American Academy of Periodontology: Chicago 43
- Koshy G (2001):** Full-mouth disinfection versus one-stage mechanical debridement in the management of adult periodontitis - Clinical results. J Dent Res, 1985 (Abstract P-44)
- Koshy G, Kawashima Y, Kiji M, Nitta H, Umeda M, Nagasawa T, Ishikawa I (2005):** Effects of single-visit full-mouth ultrasonic debridement versus quadrant-wise ultrasonic debridement. J Clin Periodontol 32, 734-743
- Kozlovsky A, Artzi Z, Hirshberg A, Israeli-Tobias C, Reich L (2007):** Effect of local antimicrobial agents on excisional palatal wound healing: a clinical and histomorphometric study in rats. J Clin Periodontol 34, 164-71



- Kramer A (2001):** Antiseptika und Händedesinfektionsmittel. In: Korting HC, Sterry W, Hrsg. Therapeutische Verfahren in der Dermatologie. Berlin: BlackWell Wissenschaft p. 273-94
- Kramer A, Adrian V, Rudolph P, Kühl H (1995):** *In-vitro* Prüfung der Verträglichkeit ausgewählter antiseptischer Wirkstoffe bzw. Präparate. In: Kramer A, Wendt M, Werner H-P, Hrsg. Möglichkeiten und Perspektiven der Klinischen Antiseptik. Wiesbaden: mhp; 41-48
- Kramer A, Heeg P, Harke H, Rudolph H, Koch S, Jülich W, Hingst V, Merka V, Lippert H (1993):** Wundantiseptik. Berlin Springer
- Kramer A, Müller G (2007):** Mikrobiozide Wirksamkeit, weitere biologische Wirkungen, Verträglichkeit und Abbaubarkeit von Octenidindihydrochlorid. GMS Krankenhaushyg Interdiszip. 2, Doc49
- Kramer A, Roth B, Müller G, Rudolph P, Klöcker N (2004):** Influence of the antiseptic agents polihexanide and octenidine on FL-cells and on healing of experimental superficial aseptic wounds in piglets. A double-blind, randomised, stratified, controlled, parallel-group study. *Skin Pharmacol Physiol* 17, 141-146
- Kuyyakanond T, Quesnel LB (1992):** The mechanism of action of chlorhexidine. *FEMS Microbiol Lett* 79, 211-5
- Laine P, Meurman JH, Murtomaa H, Lindqvist C, Torkko H, Pyrhonen S, Teerenhovi L (1993):** One-year trial of the effect of rinsing with an amine fluoride-stannous-fluoride-containing mouthwash on gingival index scores and salivary microbial counts in lymphoma patients receiving cytostatic drugs. *J Clin Periodontol* 20, 628-634
- Lamster IB, Alfano MC, Seiger MC, Gordon JM (1983):** The effect of Listerine® Antiseptic on reduction of existing plaque and gingivitis. *Clin Prev Dent* 5, 2-16
- Lang NP, Brex MC (1986):** Chlorhexidine digluconate-an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. *J Periodont Res* 21, 74-89
- Lang NP, Catalanotto FA, Knöpfli RU, Antczak AA (1988):** Quality-specific taste impairment following the application of chlorhexidine digluconate mouthrinses. *J Clin Periodontol* 15, 43
- Lang NP, Hotz P, Graf H, Geering AH, Saxer UP, Sturzenberger OP, Meckel AH (1982):** Effects of supervised chlorhexidine mouthrinses in children. A longitudinal clinical trial. *J Periodont Res* 17, 101-111
- Langebaek J, Bay L (1976):** The effect of chlorhexidine mouthrinse on healing after gingivectomy, *Scand J of Dent Res* 84, 224-228
- Langhoff F (2007):** Antiseptischer Knochenzement: Freisetzung von Octenidin aus Polymethylmethacrylat (PMMA). Med. Diss. Ulm

- Larjava H, Heino J, Kahari VM, Krusius T, Vuorio E (1989):** Characterization of one phenotype of human periodontal granulation tissue fibroblasts. *J Dent Res* 68, 20–25
- Latronico M, Russo R, Garbarino F, Rolandi C, Mascolo A, Blasi G (2008):** Randomized clinical trial on the effects of full mouth disinfection versus conventional quadrant therapy in the control of chronic periodontitis. *Minerva Stomatol* 57, 181-8
- Leyes Borrajo JL, Garcia VL, Lopez CG, Rodriguez-Nuñez I, Garcia FM, Gallas TM (2002):** Efficacy of chlorhexidine mouthrinses with and without alcohol: a clinical study. *J Periodontol.* 73, 317-21
- Leverett D, McHugh W, Jensen O (1981):** Effect of daily stannous fluoride rinsing on plaque, gingivitis, extrinsic staining. *J Dent Res* 60, 364
- Lindhe J, Heyden G, Svanberg G, Löe H, Schiott C (1970):** Effect of local applications of chlorhexidine on the oral mucosa of the hamster. *J Periodont Res* 5, 177-182
- Lindhe J, Westfelt E, Nyman S, Socransky S, Haffajee A (1984):** Long-term effect of surgical/ non-surgical treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 11, 448-458
- Lindl T (2000):** "Zell- und Gewebekultur";4.Auflage; Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH
- Löe H (1973):** Does chlorhexidine have a place in the prophylaxis of dental diseases? *J Periodont Res* 8, 93–99
- Löe H, Schiott CR (1970):** The effect of the mouthrinses and topical application of chlorhexidine on development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodont Res* 5, 79-83
- Löe H, Schiott CR, Glavind L, Karring T (1976):** Two years oral use of chlorhexidine in man. I. General design and clinical effects. *J Periodontal Res* 11, 135-144
- Löffler G, Petrides PE (1997):** Biochemie und Pathobiochemie. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 1155 Seiten
- Loos B, Claffey N, Egelberg J (1988):** Clinical and microbiological effects of root debridement in periodontal furcation pockets. *J Clin Periodontol* 15, 453-463
- Lorenz K (2008):** Chlorhexidin-Mundspüllösungen. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 63, 274-280
- Louis SM, Pearson RM (1985):** A comparison of the effects of nonoxynol-9 and chlorhexidine on sperm motility. *Contraception* 32, 99-205
- Lynch E, Beighton D (1993):** Short-term effect of Cervitec on the microflora of primary root caries lesions requiring restorations. *Caries Res* 27, 236

- Madlena M, Gintner Z, Banoczy J, Dombi C (2005):** Evaluation of clinical effects of amine fluorid / stannous fluorid containing toothpaste and mouthrinse. *Fogorv Sz* 98, 229-232
- Macfarlane TW, Ferguson MM, Mulgrew CJ (1984):** Post- extraction bacteraemia: role of antiseptics and antibiotics. *Br Dent J* 156, 179-181
- MacNeill S, Rindler E, Walker A, Brown A R and Cobb C M (1997):** Effects of tetracycline hydrochloride and chlorhexidine gluconate on *Candida albicans*. An in vitro study. *J Clin Periodontol* 24, 753-60
- Magnusson I, Lindhe J, Yoneyama T, Liljenberg B (1984):** Recolonization of a subgingival microbiota following scaling in deep pockets. *J Clin Periodontol* 11, 193-207
- Mandel ID (1988):** Chemotherapeutic agents for controlling plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol* 15, 488
- Mandel ID (1994):** Antimicrobial mouthrinses: overview and update. *J Am Dent Assoc* 2, 2-10
- Mariotti AJ, Cochran DL (1990):** Characterization of Fibroblasts Derived From Human Periodontal Ligament and Gingiva *Journal of Periodontology* 61, 103-111
- Mariotti AJ, Rumpf DA (1999):** Chlorhexidine-Induces Changes to Human Gingival Fibroblast Collagen and Non-Collagen Protein Production. *J Periodontal* 70, 1443-1448
- Marsh PD (1992):** Microbial aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *J Dent Res* 71, 1431–1438
- Maruniak J, Clark WB, Walker CB, Magnusson I, Marks RG, Taylor M, Clouser B (1992):** The effect of 3 mouthrinses on plaque and gingivitis development 3. *J Clin Periodontol* 19, 19-23
- Marthaler TM (1990):** Cariostatic effect of the combined use of fluorides. *J Dent Res* 69, 797--823
- Martin A, Clynes M (1991):** Acid phosphatase: Endpoint for *in vitro* toxicology tests. *In vitro Cell Dev Biol* 27, 183 – 184
- Marsh PD (1992):** Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *J Dent Res* 71, 1431
- Mashberg A, Barsa P, Grossman ML (1985):** A study of the relationship between mouthwash use and oral and pharyngeal cancer. *J Am Dent Assoc* 110, 731–4
- Mc Elroy T (1984):** Infection in the patient receiving chemotherapy for cancer: oral considerations. *J Am Dent Assoc* 109, 454–456

- Mengel R, Wissing E, Schmitz-Habben A, Flores-de-Jacoby L (1996):** Comparative study of plaque and gingivitis prevention by AmF/SnF<sub>2</sub> and NaF. A clinical and microbiological 9-month study. *J Clin Periodontol* 23, 372-378
- Mendieta C, Vallcorba N, Binney A, Addy M (1994):** Comparison of 2 chlorhexidine mouth washes on plaque regrowth *in vivo* and dietary staining *in vitro*. *J Clin Periodontol* 21, 296-300
- Modéer T, Bengtsson A, Rölla G (1996):** Triclosan reduces prostaglandin biosynthesis in human gingival fibroblasts challenged with interleukin-1 *in vitro*. *J Clin Periodontol* 23, 927-933
- Mohammed CJ, Manhold JH, Manhold BS (1964):** Efficacy of preoperative oral rinsing to reduce air contamination during use of air turbine handpieces. *J Am Dent Assoc* 69, 715-718
- Mombelli A, Marxer M, Gaberthüel T, Grunder U, Lang N (1995):** The microbiota of osseointegrated implants on patients with a history of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 22, 124-130
- Mongardini C, van Steenberghe D, Dekeyser C, Quirynen M (1999):** One stage full versus partial-mouth disinfection in the treatment of chronic adult or generalized early-onset periodontitis. I. Long-term clinical observations. *J Periodontol* 70, 632-645
- Moran J, Addy M, Roberts S (1992):** A comparison of natural product, triclosan and chlorhexidine mouthrinses on 4-day plaque regrowth. *J Clin Periodontol* 19, 578-582
- Mosmann T (1983):** Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival – application to proliferation and cyto-toxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63
- Mühlemann HR (1981):** Auf dem Weg zum sauberen Zahn? *Swiss Dent* 2, 7-9
- Mühlemann HR, Duhamel L (1981):** [Amine fluorides or monofluorophosphate? Generalities and experimental caries] .*Rev.Odontostomatol.(Paris)* 10, 439-445
- Mühlemann HR, Rudolf ER (1975):** Fluoride retention after rinsing with sodium fluoride and amine fluoride. *Helv Odontol Acta* 19, 81-84
- Müller G, Kramer A (2006):** Biokompatibilitätsindex von Octenidin im Vergleich zu anderen Wundantiseptika. *Hygiene und Medizin* 31, 23
- Müller G, Kramer A (2007 a):** Revitalisierung von Säugerzellen nach Einwirkung von Antiseptika. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* 2
- Müller G, Kramer A (2007 b):** Wechselwirkung von Octenidin und Chlorhexidin mit Säugerzellen und die resultierende Mikrobiozide( Remanenzverhalten) der Reaktionsprodukte. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* 2

- Mustafa M, Bakhiet M, Wondimu B, Modéer T (2000):** Effect of triclosan on interferon-gamma production and major histocompatibility complex class II expression in human gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol* 27, 733-737
- Mutters R, Bykow H, Kulhat M (2007):** Microbicidal efficacy of antiseptic mouth rinses on the basis of Octenidine, Chlorhexidine or amine/tin-fluoride on periodontal pathogens *GMS Krankenhaushyg Interdiszip* 2, 48
- Myklebust S (1985):** Comparative antibacterial effectiveness of seven hand antiseptics. *Scand J Dent Res* 93, 546–554
- Nash ES, Addy M (1979):** The use of chlorhexidine gluconate mouthrinses in patients with inter-maxillary fixation. *Br J Oral Surg* 17, 251–255
- Netuschil L, Weiger R, Preisler R, Brex M (1995):** Plaque bacteria counts and vitality during chlorhexidine, meridol and Listerine® mouthrinses. *Eur J Oral Sci* 103, 355-361
- Netuschil L, Rauh T, Riethe P (1997):** Substantivität und antibakterielle Wirkung von Aminfluorid/Zinnfluorid in situ. *Parodontologie* 7, 7-16
- Netuschil L, Bruhn G, Hoffmann T (2002):** Auswahl und Anwendung von oralen Chemoprophylactica. *Der Freie Zahnarzt* 3, 50-54
- Netuschil L, Hoffmann T, Brex M (2003):** How to select the right mouthrinses in periodontal prevention and therapy. Part I. Test systems and clinical investigations. *Int J Dent Hyg* 1, 143-150
- Newbrun E (1989):** Anticaries and antiplaque/antigingivitis agents. In: Neidle EA, Yagiela JA (eds.): *Pharmacology and therapeutics for dentistry*, 3 Mos-by, St. Louis 603-617
- Newman, Carranza, Takei (2003):** Supragingival and subgingival irrigation. *Clin Periodontol* 9, 615
- Ng CK, Singhal V, Widmer F, Wright LC, Sorrell TC, Jolliffe KA (2007):** Synthesis, antifungal and haemolytic activity of a series of bis(pyridinium)-alkanes. *Bioorg Med Chem* 15, 3422-3429
- Nordland P, Garrett S, Kiger R, Vanooteghem R, Hutchens LH, Egelberg J (1987):** The effect of plaque control and root debridement in molar teeth. *J Clin Periodontol* 14, 231-236
- Nowakowska D, Saczko J, Kulbacka J, Choromska A, Raszewski Z (2012):** Cytotoxic potential of vasoconstrictor experimental gingival retraction agents: *in vitro* study on primary human gingival fibroblasts. *Folia Biol* .58, 37-43
- Ogaard B, Gjermo P, Rölla G (1980):** Plaque inhibiting effect in orthodontic patients of a dentifrice containing stannous fluoride. *Am J Orthod* 78, 266-272

- Olsen I (1975):** Denture stomatitis. The clinical effects of chlorhexidine and amphotericin B. *Acta Odontol Scand* 33, 47–52
- Oppermann RV, Rølla G, Johansen JR, Assev S (1980):** Thiol groups and reduced acidogenicity of dental plaque in the presence of metal ions in vivo. *Scand J Dent Res* 88, 389–396
- Overholser CD, Meiller TF, DePaola LG, Minah GE, Niehaus C (1990):** Comparative effects of 2 chemotherapeutic mouthrinses on the development of supragingival plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol* 17, 575-9
- Pan PC, Harper S, Ricci-Nittel D, Lux R, Shi W (2010):** *In-vitro* evidence for efficacy of antimicrobial mouthrinses. *J Dent.* 38, 16-20
- Pan PH, Finnegan MB, Sturdivant L, Barnett ML (1999):** Comparative antimicrobial activity of an essential oil and an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse in vitro. *J Clin Periodontol* 26, 474-476
- Patel P, Ide M, Coward P, Di Silvio L (2006):** The effect of a commercially available chlorhexidine mouthwash product on human osteoblast cells. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 14, 67-72
- Park JB, Park NH (1989):** Effect of chlorhexidine on the *in vitro* and *in vivo* herpes simplex virus infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 67, 149-153
- Patters MR, Anerud K, Trummel CL, Kornman KS, Nalbandian J, Robertson PB (1983):** Inhibition of plaque formation in humans by octenidine mouth rinse. *J Periodontal Res* 18, 212–219
- Pentzien AK (2005):** Zellchemische Untersuchungen der Wirkung von Peptiden und Proteinhydrolysaten auf Humanzellen. *Oec. Troph. Kiel*
- Persson RE, Truelove EL, LeResche L, Robinovitch MR (1991):** Therapeutic effects of daily or weekly chlorhexidine rinsing on oral health of a geriatric population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 72, 184–191
- Pitten FA, Kramer A (1999):** Antimicrobial efficacy of antiseptic mouthrinse solutions. *Eur J Clin Pharmacol* 55, 95–100
- Pitten FA, Kramer A (2001 a):** Efficacy of cetylpyridinium chloride used as oropharyngeal antiseptic. *Arzneimittelforschung.* 51, 588-95
- Pitten FA, Kramer A (2001 b):** Untersuchungsdesign für die Prüfung von Mundhöhlenantiseptika. *Hyg Med* 26, 137-141
- Pitten FA, Splieth C, Kramer A (2000):** Prophylactic and therapeutic application of antimicrobial agents in the oral cavity. *Pharmazie* 55, 635–639
- Pitten FA, Kramer A, Rosin M (2001):** Antiseptik des Mund-Rachen-Raums. Welche Substanz für welche Indikation? *PZ Prisma* 8, 185–196

- Pitten FA, Werner HP, Kramer A (2003):** A standardized test to assess the impact of different organic challenges on the antimicrobial activity of antiseptics. *J Hosp Infect.* 55, 108-15
- Pizzo G, La Cara M, Licata ME, Pizzo I, D'Angelo M (2008):** The effects of an essential oil and an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse on supra-gingival plaque regrowth. *J Periodontol.* 79, 1177-83
- Plagmann HC (1998):** Lehrbuch der Parodontologie; Hanser Fachbuch
- Plischke I (2001):** Klinisch kontrollierte Studie der Wirkung verschiedener Mundspüllösungen auf die bakterielle Vitalität und Neubildung der Plaque. Diss Univ Dresden
- Poggi P, Rodriguez y Baena R, Rizzo S, Rota MT (2003):** Mouthrinses with alcohol: cytotoxic effects on human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol.* 74, 623-9
- Product- Description by Roche; "Cell Proliferation Kit I (MTT)" (1999)**
- Pucher JJ, Daniel JC (1992):** The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 63, 526-532
- Quirynen M, Bollen CM, Vandekerckhove BN, Dekeyser C, Papaioannou W, Eyssen H (1995):** Full- vs. partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections: short-term clinical and microbiological observations. *J Dent Res* 74, 1459-1467
- Quirynen M, Mongardini C, Pauwels M, Bollen C M, van EJ, van Steenberghe D (1999):** One stage full- versus partial-mouth disinfection in the treatment of chronic adult or generalized early-onset periodontitis. II. Long-term impact on microbial load. *J Periodontol* 70, 646-656
- Quirynen M, Mongardini C, De Soete M, Pauwels M, Coucke W, Van Eldere J, Van Steenberghe D (2000):** The role of chlorhexidine in the one-stage full-mouth disinfection treatment of patients with advanced adult periodontitis. Long-term clinical and microbiological observations. *J Clin Periodontol* 27, 578-589
- Quirynen M, De Soete M, Boschmans G, Pauwels M, Coucke W, Teughels W, van Steenberghe D (2006):** Benefit of "one-stage full-mouth disinfection" is explained by disinfection and root planing within 24 hours: a randomized controlled trial. *J Clin Periodontol* 33, 639-47
- Rahn, R (1996):** Antiseptik in der Mundhöhle. In: Hierholzer G, Reimer K, Weisenbacher ER (Hrsg), Topische Infektionstherapie und Prophylaxe – Aktueller Stellenwert von PVP-JOD. Thieme, Stuttgart 41-46
- Rahn R, Diehl O, Schäfer V, Shah PM, Fleischer W, Reimer K (1994):** The effect of topical Povidone-Iodine and Chlorhexidine on the incidence of bacteremia following dental treatment procedures. *Hyg Med* 19, 128-131

- Ramberg P, Furuichi Y, Lindhe J, Gaffar A (1992):** A model for studying the effects of mouthrinses on de novo plaque formation. *J Clin Periodontol* 19, 509-520
- Rateitschak KH, Wolf HF (2004):** Farbatlant der Zahnmedizin. Band 1: Parodontologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag S. 53, 74-76, 160, 171, 177, 299, 828
- Rehner G, Daniel H (1999):** Biochemie der Ernährung. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, 551 Seiten
- Renton-Harper P, Addy M, Moran J, Doherty FM, Newcombe RG (1996):** A comparison of chlorhexidine, cetylpyridinium chloride, triclosan, and C31G mouthrinse products for plaque inhibition. *J Periodontol* 67, 486-489
- Rijkom vH, Truin G, van't Hof M (1996):** A metaanalysis of clinical studies on the cariesinhibiting effect of chlorhexidine treatment. *J Dent Res* 75, 790-795
- Rohr U, Mueller C, Wilhelm M, Muhr G, Gatermann S (2003):** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* whole-body decolonization among hospitalized patients with variable site colonization by using mupirocin in combination with octenidine dihydrochloride. *J Hosp Infect* 54, 305-309
- Rolla G, Loe H, Schiott CR (1970):** The affinity of chlorhexidine for hydroxyl-apatite and salivary mucins. *J Periodontal Res* 5, 90-5
- Rolla G, Loe H, Schiott CR (1971):** Retention of chlorhexidine in the human oral cavity. *Arch Oral Biol* 16, 1109-16
- Rolla G, Melsen B (1975):** On the mechanism of plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res* 54, 57-62
- Ruppert M, Schlagenhaut U (2004):** Chlorhexidin in der Zahnheilkunde. *Quintessenz* 55, 55-65
- Saatmann RA, Carlton WW, Hubben K, Streett C S, Tuckosh JR, DeBaecke PJ (1986):** A wound healing study of chlorhexidine digluconate in guinea pigs. *Fundam Appl Toxicol* 6, 1-6
- Sanchez IR, Swaim SF, Nussbaum KE, Hale AS, Henderson RA, McGuire JA (1988):** Effects of chlorhexidine diacetate and povidone-iodine on wound healing in dogs. *Vet Surg* 17, 291-295
- Sanz M, Newman MG, Anderson L, Matoska W, Otomo-Corgel J, Saltini C (1989):** Clinical enhancement of post-periodontal surgical therapy by a 0,12% chlorhexidine gluconate mouthrinse. *J Periodontal* 60, 570-576
- Saxer U (1980):** Kommt die chemische Zahnbürste? *Swiss Dent* 1, 24-32



- Saxer U (1991):** Plaquehemmung mit verschiedenen Konzentrationen von Aminfluorid und Zinnfluorid. In: Flores-de-Jacoby, L. (Hrsg.): Möglichkeiten der Plaque- und Gingivitisprävention. Neue Erkenntnisse zum Wirkstoffsystem Aminfluorid/Zinnfluorid. Quintessenz, Berlin, 67-79
- Scheie AA (2003):** The role of antimicrobials. In: Fejerskov O, Kidd AM (eds): Dental Caries. The disease and clinical management. Munksgaard: BlackWell 179-187
- Schiffner U (1999):** Zur Rolle der chemischen Plaquekontrolle. Teil 2 : Substanzen zur chemischen Plaquekontrolle - Wirkung und Nebenwirkung. Oralprophylaxe 21, 13-19
- Schiffner U (2000):** Chemische Plaquekontrolle: Welche antibakteriellen Zusätze zu Zahnpasten und Spüllösungen sind empfehlenswert? Schweiz Monatsschr. Zahnmed, 110, 8
- Schiott CR (1973):** Effect of chlorhexidine on the microflora of the oral cavity. J Periodontal Res Suppl 12, 7-10
- Schmid H (1981):** Aminfluorid in der Kariesprophylaxe. Wirkungsmechanismen – Anwendungen – Neue Perspektiven. Swiss Dent 2, 13-23
- Schmid J (1988) :** Chlorhexidin. Wirkung, Nebenwirkung, Anwendung. Restaurative Zahnmed 5, 348-349
- Schneider P, Mühlemann HR (1974):** The antiglycolytic action of amine fluorides on dental plaque. Helv.Odontol.Acta 18, Suppl-70
- Schnuch A, Geier J, Uter W, Frosch P (1998):** Patch testing with preservatives, antimicrobials and industrial biocides. Results from a multicentre study. Br J Dermatol 138, 467-476
- Schreil G (1991):** Antibakterielles und klinisches Wirkungsspektrum von Meridol. Diss Med Fak, Univ Tübingen
- Schweizer HP (2001):** Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. FEMS Microbiol Lett. 202, 1-7
- Segreto VA, Collins EM, Beiswanger BB et al.(1986):** A comparison of mouth-rinses containing two concentrations of chlorhexidine. J Periodont Res 21, 23-32
- Sekino S, Ramberg P (2005):** The effect of a mouth rinse containing phenolic compounds on plaque formation and developing gingivitis. J Clin Periodontol 32, 1083–8
- Sedlock DM, Bailey DM (1985):** Microbicidal activity of octenidine hydrochloride, a new alkanediylbis[pyridine] germicidal agent. Antimicrob Agents Chemother 28, 786–790

- Seydenschwanz J (2010):** Behandlung von infraalveolären, interproximalen Defekten bei Patienten mit generalisierter fortgeschrittener chronischer Parodontitis Vergleich zwischen dem „Modified Widman flap“ und einer Lappenoperation mit Applikation von Wachstumsfaktoren. Med. Diss. Marburg
- Sharma NC, Charles CH, Lynch NC, Qaqish J, McGuire JA, Galustians JG, Kumar LD (2004):** Adjunctive benefit of an essential oil-containing mouthrinse in reducing plaque and gingivitis in patients who brush and floss regularly. J Am Dent Assoc 135, 496-504
- Shern RJ, Monnel-Torrens E, Bowen WH, Kingman A (1980):** Effects of two recently developed antiseptics on dental plaque and caries in rats. AADR Prog & Abst 59, 186
- Sheperd JP (1978):** The management of the oral complication of leukemia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 45, 543-548
- Shulman JD, Wells LM (1997):** Acute ethanol toxicity from ingesting mouthwash in children younger than 6-years of age. Pediatr Dent 19, 404-408
- Siegrist BE, Gusberti FA, Brex MC, Weber HP, Lang NP (1986):** Efficacy of supervised rinsing with chlorhexidine digluconate in comparison to phenolic and plant alkaloid compounds. J Periodont Res 21, 60-73
- Sissons CH, Wong L, Cutress TW (1996):** Inhibition by ethanol of the growth of biofilm and dispersed microcosm dental plaques. Arch Oral Biol 41, 27-34
- Skaare AB, Kjaerheim V, Barkvoll P, Rølla G (1997):** Does the nature of the solvent affect the anti-inflammatory capacity of triclosan? An experimental study. J Clin Periodontol 24, 124-128
- Slomiany BL, Piotrowsky J, Slomiany A (2000):** Suppression of endothelin-converting enzyme-1 during buccal mucosal ulcer healing: Effect of chronic alcohol ingestion. Biochem Biophys Res Commun 271, 318-322
- Slout N, Siebert J, Höffler UE (1999):** Radication of MRSA from carriers by means of whole-body washing with an antiseptic in combination with mupirocin nasal ointment Zentralbl Hyg Umweltmed 202, 513-523
- Smith RG, Moran J, Addy M, Doherty F, Newcombe RG (1995):** Comparative staining *in vitro* and plaque inhibitory properties *in vivo* of 0,12% and 0,2 % chlorhexidine mouthrinses. J Clin Periodontal 22, 613-617
- Sodhi RN, Grad HA, Smith DC (1992):** Examination by X-ray photoelectron spectroscopy of the adsorption of chlorhexidine on hydroxyapatite. J Dent Res 71, 1493
- Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA (1988):** A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts *in vitro*. J Dent Res 67, 66-70

- Sonnenschein K (2009):** Behandlung des Furkationsbefalls und intraalveolärer Defekte bei Patienten mit fortgeschrittener chronischer Parodontitis durch resorbierbare Membran und bioaktives Glas. Ergebnisse einer klinischen und radiologischen Langzeitstudie. Med. Diss. Marburg
- Sopata M, Ciupińska M, Głowacka A, Muszyński Z, Tomaszewska E (2008):** Effect of Octenisept antiseptic on bioburden of neoplastic ulcers in patients with advanced cancer. *J Wound Care*. 17, 24-27
- Spijkervert FK, van Saene HKF, Pander AK (1989):** Effect of chlorhexidine rinsing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 67, 154–161
- Splieth C, Kramer A (2000):** Chlorhexidineinsatz. In: Splieth C (Hrsg.) *Professionelle Prävention, Quintessenz Berlin*, 129-138
- Splieth C, Bernhardt O, Rosin M (1999):** Intensive group prevention with chlorhexidine-thymol varnish in schoolchildren. *Community Dent Oral Epidemiol*
- Svatun B, Saxton CA, Rolla G (1990):** Six-month study of the effect of a dentifrice containing zinc citrate and triclosan on plaque, gingival health, and calculus. *Scand J Dent Res* 98, 301-304
- Swierkot K (2008):** One-stage full-mouth disinfection versus subgingivales Scaling an einem Tag oder subgingivales Scaling quadrantenweise bei Patienten mit generalisierter chronischer Parodontitis. Ergebnisse einer prospektiven Langzeitstudie. Med. Diss. Marburg
- Swierkot K, Nonnenmacher CI, Mutters R, Flores-de-Jacoby L, Mengel R (2009):** One-stage full-mouth disinfection versus quadrant and full-mouth root planing. *J Clin Periodontol* 36, 240-9
- Szep S, Grumann L, Ronge K, Schriever A, Schultze M, Heidemann D (2003):** In vitro cytotoxicity of medicated and nonmedicated gutta-percha points in cultures of gingival fibroblasts. *J Endod* 29, 36-40
- Takamatsu N, Yano K, He T, Umeda M, Ishikawa I (1999):** Effect of initial periodontal therapy on the frequency of detecting *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol* 70, 574-580
- Tandjung L, Waltimo T, Hauser I, Heide P, Decker EM, Weiger R (2007):** Octenidine in root canal and dentine disinfection ex vivo *Int Endod J* 40, 845-851
- Tatnall FM, Leigh IM, Gibson JR (1990):** Comparative study of antiseptic toxicity on basal keratinocytes, transformed human keratinocytes and fibroblasts. *Skin Pharmacol* 3, 157-63
- Teuscher E, Melzig M, Villman E, Möritz KU (1990) :** Untersuchungen zum Wirkmechanismus ätherischer Öle. *Z Phytother* 11, 87-92
- Tezal M, Grossi SG, Ho AW, Genco RJ (2001):** The effect of alcohol consumption on periodontal disease. *J Periodontol* 72, 183-189

- Tietz A, Frei R, Dangel M, Bolliger D, Passweg JR, Gratwohl A, Widmer AE (2005):** Octenidine hydrochloride for the care of central venous catheter insertion sites in severely immunocompromised patients *Infect Control Hosp Epidemiol* 26, 703-707
- Tinanoff N (1995):** Progress regarding the use of stannous fluoride in clinical dentistry. *J Clin Dent* 6, 37-40
- Tinanoff N, Hock J, Camosci P, Hellden L (1980):** Effect of stannous fluoride mouthrinse on dental plaque formation. *J Clin Periodontol* 7, 232-241
- Tinoco E, Sivakumar M, Preus H (1998):** The distribution and transmission of AAC in families with localized juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* 25, 99-105
- Tobgi RS, Samaranayake LP, Macfarlane TW (1987):** Adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells exposed to chlorhexidine gluconate. *J Med Vet Mycol* 25, 335-338
- Tomás I, Alvarez M, Limeres J, Tomás M, Medina J, Otero JL, Diz P (2007):** Effect of a chlorhexidine mouthwash on the risk of postextraction bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 28, 577-82
- Überschär M, Günay H (1991):** (Root caries incidence with regular use of AmF/SnF<sub>2</sub> mouth rinse). *Dtsch Zahnärztl Z* 46, 566-568
- Vacher C, Bert F, Lambert N, Lezy JP (1996):** [Transmission of infection in oral medicine. Evaluation of the risk of transmission in the office surgery]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 97, 121-4
- Vandekerckhove BN, Bollen CM, Dekeyser C, Darius P, Quirynen M (1996):** Full- versus partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections. Long-term clinical observations of a pilot study. *J Periodontol* 67, 1251-1259
- van der Velden U, van Winkelhoff A J, Abbas F, De Graaff J (1986):** The habitat of periodontopathic micro-organisms. *J Clin Periodontol* 13, 243-248
- van der Weijden GA, Timmerman MF (2002):** A systematic review on the clinical efficacy of subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 29, 55-71;discussion 90-91
- Van Rijkom HM, Truin GJ, Van´T Hof MA (1996):** A meta-analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of chlorhexidine treatment. *J Dent Res* 75, 790-795
- Van Strydonck DA, Timmerman MF, van der Velden U, van der Weijden GA (2005):** Plaque inhibition of two commercially available chlorhexidine mouthrinses. *J Clin Periodontol*. 32, 305-9
- Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR (1991):** "Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production." *Cancer Research* 51, 2515-2520

- Volpe A R, Petrone ME, DeVizio W, Davies RM (1993):** A review of plaque, gingivitis, calculus and caries clinical efficacy studies with a dentifrice containing triclosan and PVM/MA Copolymer. *J Clin Dent* 4, 31-41
- Wagner H, Wiener N (1988):** *In vitro* Hemmung der Prostaglandinsynthese durch ätherische Öle, phenolische Verbindungen und Knoblauchinhaltsstoffe. *Z Phytother* 9, 11-14
- Walter C, Weiger R (2006):** Antibiotics as the only therapy of untreated chronic periodontitis: a critical commentary. *J Clin Periodontol* 33, 938-939
- Weiger R, Wester-Ebinghaus T, Netuschil L (1997):** Wirkung einer Amin-Zinn-fluorid-Mundspüllösung auf die frühe Plaquebildung und den Speichel. *Prophylaxe Impuls* 4, 170-176
- Welk A, Rosin M, Lüdke C, Schwahn C, Kramer A, Daeschlein G (2007):** The peritoneal Explant Test for Evaluating Tissue Tolerance to Mouthrinses. *Skin Pharmacol Physiol* 20, 162-166
- Wennberg A (1980):** Biological evaluation of root canal antiseptics using *in vitro* and *in vivo* methods. *Scand J Dent Res* 88, 46-52
- Wennström JL, Tomasi C, Bertelle A, Dellasega E (2005):** Full-mouth ultrasonic debridement versus quadrant scaling and root planing as an initial approach in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 32, 851-859
- White DJ (2005):** An alcohol-free therapeutic mouthrinse with cetylpyridium-chloride (CPC) – The latest advance in preventive care: Crest Pro-Health Rinse. *Am J Dent* 18, 6-8
- Wiebe C, Putins E (2000):** The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology- an update. *J Can Dent Assoc* 66, 594-597
- Wieder SE, Newman HN, Strahan JD (1983):** Stannous fluoride and subgingival chlorhexidine irrigation in control of plaque and chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 10, 172-181
- Wikipedia:**  
<http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Chlorhexidin.svg&filetimestamp=20080708224005> (11/2012)
- Wilken R, Botha SJ, Grobler A, Germishuys PJ (2001):** *In vitro* cytotoxicity of chlorhexidine gluconate, benzydamine-HCl and povidone iodinemouthrinses on human gingival fibroblasts. *SADJ*. 56, 455-60
- Winn DM, Blot WJ, McLaughlin JK et al.(1991):** Mouthwash use and oral condition in the risk of oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 51, 3044–7
- Winrow MJ (1973):** Metabolic studies with radiolabelled chlorhexidine in animals and man. *J Periodontal Res Suppl*, 12, 45-48

- Witt JJ, Ramji N, Gibb R, Dunavent J, Flood J, Barns J (2005a):** Antibacterial and antiplaque effects of a novel, alcohol-free oral rinse with cetylpyridinium chloride. *J Contemp Dent Pract* 6, 1-9
- Witt JJ, Walters P, Bsoul S, Gibb R, Dunavent J, Putt M (2005b):** Comparative clinical trial of two antigingivitis mouthrinse. *Am J Dent* 18, 15-17
- Woolf TF (1999):** "Handbook of Drug Metabolism"; New York; Basel: Marcel Dekker, Inc
- Yamalik MK, Yucetas S, Abbasoglu U (1992):** Effects of various antiseptics on bacteremia following tooth extraction. *J Nihon Univ Sch Dent* 34, 28-33
- Yanover L (1988):** Effect of a daily 0.2% Chlorhexidine rinse on the oral health of an institutionalized elderly population. *Can Dent Assoc J* 54, 595–598
- Ziada H, Irwin C, Mullally B, Byrne PJ, Allen E (2007):** Periodontics: 4. Surgical management of gingival and periodontal diseases. *Dent Update* 34, 390-392, 395-396
- Zickert I, Emilson C, Krasse B (1982):** Effect of caries preventive measures in children highly infected with bacterium streptococcus mutans. *Arch Oral Biol* 27, 861–868
- Zimmermann A, Flores-de-Jacoby L, Pan P, Pan P (1993):** Gingivitis, plaque accumulation and plaque composition under long-term use of Meridol. *J Clin Periodontol*

## 8. Anhang

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel Chlorhexidingluconat.....	15
Abbildung 2: Reduktion von MTT zu Formazan .....	23
Abbildung 3: Umsetzung der Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen.....	28
Abbildung 4: Fibroblasten bei Konfluenz von 80% .....	29
Abbildung 5: Abtrysinierte Zellen .....	29
Abbildung 6: Mediumwechsel in den Kulturflaschen während des Anzüch- tens.....	30
Abbildung 7: Versuchaufbau.....	32
Abbildung 8: Behandlung der Fibroblasten mit den CHX-Spüllösungen.....	33
Abbildung 9: Aufbau einer 12-Well-Platte mit zugehörigem Versuchsdesign .....	33
Abbildung 10: Fibroblasten nach zweistündiger Einwirkung der MTT-Substanz.....	34
Abbildung 11: Fibroblasten nach Einwirkung des DMSO .....	34
Abbildung 12: Einfluss der 0,12 % CHX-Lösung, 0,2 % CHX-Lösung und der Kontrolle auf die HGFIB in Abhängigkeit von der Einwirkzeit am ersten Auswertungstag .....	39
Abbildung 13: Einfluss der 0,12 % CHX-Lösung, 0,2 % CHX-Lösung und der Kontrolle auf die HGFIB in Abhängigkeit von der Einwirkzeit am dritten Auswertungstag .....	39
Abbildung 14: Einfluss der 0,12 % CHX-Lösung, 0,2 % CHX-Lösung und der Kontrolle auf die HGFIB in Abhängigkeit von der Einwirkzeit am fünften Auswertungstag.....	40
Abbildung 15: Vergleiche der CHX-Konzentrationen in Abhängigkeit von Ein- wirkzeit und Auswertungstag.....	41
Abbildung 16: Einfluss der 0,12 %, 0,2 % CHX-Lösung und der Kontrolle auf die Zellzahl ( $x \cdot 10^5$ /ml ) der HGFIB in Abhängigkeit von der Ein- wirkzeit am 1. Auswertungstag.....	44
Abbildung 17: Einfluss der 0,12 %, 0,2 % CHX-Lösung und der Kontrolle auf die Zellzahl ( $x \cdot 10^{5/}$ /ml) der HGFIB in Abhängigkeit von der Einwirkzeit am 2. Auswertungstag.....	44
Abbildung 18: Einfluss der 0,12 %, 0,2 % CHX-Lösung und der Kontrolle auf die Zellzahl ( $x \cdot 10^{5/}$ /ml) der HGFIB in Abhängigkeit von der Einwirkzeit am 3. Auswertungstag.....	45
Abbildung 19: Vergleiche der CHX-Konzentrationen in Abhängigkeit von Einwirkzeit und Auswertungstag.....	46
Abbildung 20: Einfluss der 0,12 %, 0,2 % CHX-Lösung und der Kontrolle auf die Viabilität in Prozent ( $x \cdot 100$ ) der HGFIB in Abhängigkeit von der Einwirkzeit am 1. Auswertungstag.....	48
Abbildung 21: Einfluss der 0,12 %, 0,2 % CHX-Lösung und der Kontrolle auf die Viabilität in Prozent ( $x \cdot 100$ ) der HGFIB in Abhängigkeit von der Einwirkzeit am 2. Auswertungstag.....	49

---

Abbildung 22: Einfluss der 0,12 %, 0,2 % CHX-Lösung und der Kontrolle auf die Viabilität in Prozent ( $x \cdot 100$ ) auf die HGFIB in Abhängigkeit von der Einwirkzeit am 3. Auswertungstag.....	49
Abbildung 23: Vergleiche der CHX-Konzentrationen in Abhängigkeit von Einwirkzeit und Auswertungstag.....	50
Abbildung 24: Korrelationsbestimmung zwischen MTT-Test und Zellzahlbestimmung mittels Cellometer™ Auto T4 für HGFIB. ....	52



---

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:	Übersicht der getesteten Lösungen.....	27
Tabelle 2:	Mittelwerte und Standardfehler für die MTT-Messungen (OD) nach der Behandlung mit 0,12 %, 0,2 % CHX und der Kontrolle .....	38
Tabelle 3:	Paarweise Vergleiche der Mundspüllösungen in Abhängigkeit von Einwirk- und Auswertungszeit.....	40
Tabelle 4:	Paarweiser Vergleich zwischen den CHX-Konzentrationen in Abhängigkeit von Einwirkzeit und Auswertungszeit .....	42
Tabelle 5:	Mittelwerte und Standardfehler für die Gesamtzellzahl ( $\times 10^5$ Zellen/ml) der HGFIB nach der Behandlung mit 0,12 %, 0,2 % CHX und der Kontrolle .....	43
Tabelle 6:	Paarweise Vergleiche der Mundspüllösungen in Abhängigkeit von der Einwirkzeit und der Auswertungszeit (Signifikanzen = p-Werte).....	45
Tabelle 7:	Paarweise Vergleiche der Auswertungstage in Abhängigkeit von der Einwirkzeit und der Konzentration (Signifikanzen = p-Werte).....	47
Tabelle 8:	Mittelwerte und Standardfehler für die Viabilität (in %) der HFGIB nach der Behandlung mit 0,12 %, 0,2 % CHX und der Kontrolle.....	48
Tabelle 9:	Paarweise Vergleiche der Mundspüllösungen in Abhängigkeit von Einwirk- und Auswertungszeit.....	50
Tabelle 10:	Paarweise Vergleiche der Auswertungstage in Abhängigkeit von Einwirkzeit und Konzentration .....	51

## Lebenslauf

Am 26.11.1984 wurde ich, Natalja Schalaikin, in Ust-Talowka (Kasachstan) als zweite Tochter meiner Eltern Sergej Schalaikin und Olga Schalaikin, geb. Kunz, geboren.

Von 1991 bis 1994 besuchte ich die Allgemeinschule Astafjewa in Ust-Talowka. Im Jahre 1994 wanderte ich mit meiner Familie nach Deutschland aus. Im Juli 2004 erlangte ich die Allgemeine Hochschulreife auf dem Grotefeld-Gymnasium in Hann. Münden.

Im Oktober 2004 begann ich das Studium der Zahnheilkunde an der Georg-August-Universität in Göttingen, wo ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung im September 2005 ablegte und im März 2007 die zahnärztliche Vorprüfung absolvierte.

Mit bestandenem Staatsexamen der Zahnmedizin wurde mir am 08.12.2009 die Approbation als Zahnärztin erteilt. In den folgenden 6 Monaten war ich als Doktorandin im Labor der Abteilung für Präventive Zahnheilkunde, Parodontologie und Kariologie an der Georg-August-Universität Göttingen mit dem experimentellen Teil dieser Dissertation beschäftigt.

Vom 1. August 2010 bis zum 31. März 2011 war ich als Privatzahnärztin im Dentalpark in Ebstorf tätig. Vom 1. April 2011 bis zum 30. Juni 2013 war ich in der Praxis Dr. Kornitzky in Geesthacht angestellt und absolvierte hier auch einen Teil meiner Assistenzzeit. Seit dem 1. Juli bin ich als angestellte Zahnärztin in der Praxis Dr. Hoch in Göttingen tätig.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. D. Ziebolz für die intensive persönliche und fachliche Betreuung während der gesamten Entstehungszeit. Herzlichen Dank auch an Herrn Prof. Dr. R. Mausberg für die Überlassung des Themas.

Für die Unterstützung bei der Ausführung der praktischen Arbeiten und der Hilfe bei organisatorischen Fragen möchte ich mich bei Frau Grybz und Frau Hoch bedanken. Weiterer Dank geht an David Ellenberger für die Bearbeitung der statistischen Daten.