

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

**Die Wirkung von antiseptischen alkoholfreien Chlorhexidin-
Mundspüllösungen auf den Stoffwechsel humaner Gingivafibroblasten**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Lisa Frisch
aus
Hildesheim
Göttingen 2013

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
I. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. dent. R. Mausberg
II. Berichterstatter/in:	PD Dr. med. C. S. Seitz
III. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. med. M. Oppermann
Tag der mündlichen Prüfung:	25.03.2014

Inhalt

1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 Antiseptika in der Zahnheilkunde.....	3
2.2 Chlorhexidindigluconat.....	3
2.2.1 Wirkungsweise und Wirksamkeit.....	3
2.2.2 Substantivität von CHX.....	4
2.3 Einsatz chlorhexidinhaltiger Mundspüllösungen.....	5
2.3.1 Indikationen.....	5
2.3.2 Klinische Anwendungen.....	6
2.3.2.1 CHX in der Therapie von Parodontopathien.....	6
2.3.2.2 Full-Mouth-Disinfection.....	7
2.3.3 Alkoholfreie chlorhexidinhaltige Mundspüllösungen.....	9
2.3.4 Klinische Nebenwirkungen von CHX.....	9
2.4 Zytotoxizität von CHX.....	11
2.4.1 CHX-Konzentration < 0,1 %.....	11
2.4.2 CHX-Konzentration 0,1-0,2 %.....	13
2.4.3 CHX-Konzentration > 0,2 %.....	14
2.5 Untersuchungsmethoden zur Zellviabilität und Zytotoxizität.....	15
2.5.1 Nachweis der Integrität der Zellmembran.....	16
2.5.2 Stoffwechselaktivität.....	17
3 Material und Methoden.....	20
3.1 Material.....	20
3.1.1 Mundspüllösungen.....	20
3.1.2 Zellen: Fibroblasten.....	20
3.1.3 Weitere Materialien.....	21
3.2 Versuchsplanung.....	21
3.2.1 Vorversuch: Wachstumsverhalten von hGF in 12-Well-Platten.....	22
3.2.2 Vorversuch: ELISA.....	23
3.3 Versuchsdurchführung/ Methodik.....	24
3.3.1 Zellkultur.....	24
3.3.1.1 Auftauen der Zellen.....	24
3.3.1.2 Subkultur.....	25
3.3.1.3 Aussaat.....	27
3.3.1.4 Kryokonservierung.....	28
3.3.2 Versuchsablauf.....	28

3.3.2.1 Mikroskopische Kontrolle der hGF	30
3.3.2.2 Optische Zellzahlbestimmung mit dem Cellometer™ Auto T4	30
3.3.2.3 ELISA-Test	31
3.4 Statistische Auswertungen	34
4 Ergebnisse.....	36
4.1 Übersicht.....	36
4.2 Mikroskopische Kontrolle.....	36
4.3 Ergebnisse der Zellzahl- und Kollagenmessung.....	37
4.3.1 Cellometer-Zellzahl	37
4.3.1.1 Zellzahlmessung nach 1 Tag	38
4.3.1.2 Zellzahlmessung nach 3 Tagen	39
4.3.1.3 Zellzahlmessung nach 5 Tagen	39
4.3.1.4 Statistische Auswertung.....	41
4.3.2 ELISA-Kollagenmessung	43
4.3.2.1 ELISA-Kollagenmessung nach 1 Tag.....	44
4.3.2.2 ELISA-Kollagenmessung nach 3 Tagen.....	44
4.3.2.3 ELISA-Kollagenmessung nach 5 Tagen.....	45
4.3.2.4 Statistische Auswertung.....	46
4.4 Vergleich der unterschiedlichen Konzentrationen und Einwirkzeiten	49
4.5 Vergleich von Cellometermessung und ELISA	52
4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse	53
4.6.1 Der zeitliche Verlauf der unterschiedlichen Messtage	53
4.6.2 Vergleich der unterschiedlichen Konzentrationen und Einwirkzeiten	53
4.6.3 Korrelation der Methoden ELISA und Cellometer	54
5 Diskussion	55
5.1 Diskussion der Methodik	55
5.1.1 Problematik von <i>in vitro</i> -Untersuchungen.....	55
5.1.2 Beurteilung der Zytotoxizitätsnachweise	56
5.1.3 Zeitlicher Verlauf der Messungen.....	57
5.2 Diskussion der Materialien	58
5.2.1 Untersuchungsmaterial: Humane Gingivafibroblasten.....	58
5.2.2 Bewertung der verwendeten Mundspüllösungen und Einwirkzeiten	59
5.3 Diskussion der Ergebnisse	60
5.4 Empfehlung für die Praxis	63
5.6 Schlussfolgerung.....	64
6 Zusammenfassung	65

7	Abkürzungsverzeichnis	67
8	Tabellenverzeichnis	69
9	Abbildungsverzeichnis	70
10	Literaturverzeichnis	71

1 Einleitung

Chlorhexidin enthaltende Mundspüllösungen gelten heutzutage in der Zahnmedizin, aufgrund ihrer antibakteriellen Wirkung als der Goldstandard in der Prävention und Behandlung von Parodontalerkrankungen. Diverse Studien zeigen, dass Chlorhexidin (im nachfolgenden abgekürzt als CHX) als orales Antiseptikum die Entstehung von Plaque und damit das Entstehen einer Gingivitis verhindern kann (Löe und Schiott 1970; Brex et al. 1989; Ramberg et al. 1996). Dies resultiert aus der inhibitorischen Wirkung von CHX auf das Wachstum der Bakterien des Parodonts (Cervone et al. 1990). Beispielsweise beeinträchtigt CHX die Adhäsion des Bakteriums *Porphyromonas gingivalis* an humanen Epithelzellen (Grenier 1996), es verhindert das Wachstum von *Streptococcus sobrinus* und inhibiert die Matrixmetalloproteinasen 2, 8 und 9, welche Kollagen-Abbau betreiben (Gendron et al. 1999; Houle et al. 2003). Die Überlegenheit gegenüber anderen Wirkstoffen begründet sich unter anderem in seiner hohen Substantivität und damit der kontinuierlichen Abgabe über einen langen Zeitraum (Bonesvoll et al. 1974 b).

Zugleich haben aber verschiedene Arbeitsgruppen dargestellt, dass CHX nicht nur die pathologischen Bakterien inhibiert, sondern auch auf die Zellen der Mundschleimhaut unerwünschte Effekte hat. So wirkt es *in vitro* zytotoxisch auf Epithelzellen und Fibroblasten der Gingiva (Cline und Layman 1992; Pucher und Daniel 1992; Patel et al. 2006; Brito de Souza 2007; Flemingson et al. 2008), auf Parodontalligamentzellen (Cline und Layman 1992), Osteoblasten (Bhandari et al. 2001) und Alveolarknochenzellen (Cabral und Fernandes 2007). Die Gingivafibroblasten spielen mit ihrer Kollagenproduktion eine entscheidende Rolle in der Wundheilung. Genau diese Funktion, also die Proteinbiosynthese, scheint ebenfalls durch CHX negativ beeinflusst zu werden (Pucher und Daniel 1992; Mariotti und Rumpf 1999).

Die vorliegende *in-vitro*-Studie soll aufklären, ob die in vorangegangenen Studien ermittelte Zytotoxizität von CHX in Mundspüllösungen auf humane Gingivafibroblasten (im nachfolgenden abgekürzt als hGF) bestätigt werden kann. Weiterhin muss die Frage beantwortet werden, welche Konzentration und welche Einwirkzeit den geringsten Effekt auf die gingivalen Fibroblasten hat, vor allem in Hinblick auf die Kollagen-1-Synthese und somit auf die Wundheilung im Mund. Insbesondere, da von Quirynen et al. (1995) als neue therapeutische Herangehensweise zur Behandlung von Parodontopathien die *One-Stage-Full-Mouth-Disinfection* mit CHX eingeführt wurde. Diese führte nicht zu statistisch signifikant besseren Ergebnissen als die

konventionelle Therapie, welche über einen längeren Behandlungszeitraum und ohne zusätzliche Anwendung von CHX durchgeführt wird (Apatzidou 2006). Es gilt, dafür eine Erklärung zu finden, da die klinisch positive, antibakterielle Wirkung von CHX bewiesen ist.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu ergründen, ob CHX neben der positiven Wirkung auch einen negativen Effekt hat. Möglicherweise handelt es sich bei diesem um die Beeinflussung der Kollagensynthese. In einem weiteren Schritt soll erforscht werden, ob diese Wirkung zu einer dauerhaften Schädigung führt oder reversibel ist. Folgende Fragen sind zu klären: Erholen sich die hGF nach der Behandlung mit alkoholfreien CHX-Mundspüllösungen unterschiedlicher Konzentration nach einigen Tagen wieder? Nehmen sie ihren Stoffwechsel wieder auf und können daraus Rückschlüsse auf ein mögliches Regenerationspotenzial der Fibroblasten gezogen werden?

Schließlich muss abgewogen werden, ob CHX als Mundspüllösung in der Therapie von Parodontopathien und in anderen Anwendungsgebieten jederzeit eingesetzt werden sollte.

2 Literaturübersicht

2.1 Antiseptika in der Zahnheilkunde

Antiseptische Mundspüllösungen werden zum einen als prophylaktische Maßnahme vor chirurgischen Behandlungen in der Mundhöhle wie zum Beispiel Zahnextraktionen oder Implantationen eingesetzt. Des Weiteren finden sie Verwendung, wenn die mechanische Mundhygiene aus verschiedenen Gründen nicht möglich ist. Zudem werden sie unterstützend in der Prävention und Therapie von Gingivitiden und Parodontitiden angewandt (Cannell 1981; Ciancio 1994; Demke 2012). Als Anforderungen an orale Antiseptika wurden vor allem die antibakterielle Wirksamkeit, eine möglichst hohe Substantivität zu der oralen Mukosa - ein langes lokales Vorhandensein des Wirkstoffes - sowie die entzündungshemmende Wirkung beschrieben (Eley 1999). Chlorhexidindigluconat, im Nachfolgenden abgekürzt mit CHX, scheint zurzeit eine der effektivsten Substanzen unter den oralen Antiseptika zu sein (Ciancio 1994).

2.2 Chlorhexidindigluconat

2.2.1 Wirkungsweise und Wirksamkeit

Chlorhexidindigluconat ist ein kationisches Bisbiguanid mit der Summenformel $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$ (s. Abb.1). Wegen seiner hydrophoben und lipophilen Eigenschaft interagiert das basische Molekül mit den Phospholipiden und Lipopolysacchariden der Membran von Bakterienzellen und kann diese überwinden (Dynes et al. 2006).

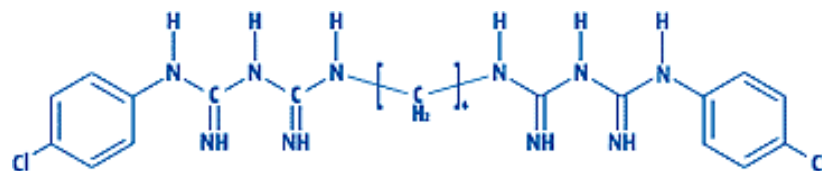


Abbildung 1: Strukturformel von Chlorhexidin (Quelle: <http://www.chlorhexamed.de/d/chlorhexamed/wirkstoff.jsp>)

Die antibakterielle Wirkung von CHX gegen grampositive und gramnegative Bakterien sowie Bakterien-Sporen wurde erstmals von Davies aufgezeigt (1954). Der zytotoxische Effekt kommt durch die Erhöhung der Permeabilität der Bakterienzellwand (Gjerme 1975) und die Zerstörung der zytoplasmatischen Membran zustande (Kuyyakanond und Quesnel 1992).

Seither wurden chlorhexidinhaltige Mundhygienemittel in vielfachen laboratorischen und klinischen Studien untersucht und ihre Effektivität bestätigt (Dogan et al. 2003; Lorenz et al. 2006; Schwerd 2008; Herrera 2013).

So bewirkt eine 0,2%ige CHX-Lösung, selbst wenn nur ein einziges Mal subgingival eingesetzt, eine Woche nach Behandlung ein signifikant verringertes prozentuales Vorkommen von Spirochäten und motilen Bakterien. Die Kolonisation verändert sich in Richtung Kokken und es kommt zu einer verminderten Anzahl blutender Messstellen. Diese Verbesserung hält vier Wochen an, nach zehn Wochen ist wieder der Ausgangszustand erreicht (Lander et al. 1986). Auch in der Implantologie, zum Beispiel bei der simultanen Augmentation mit Knochenabrieb, hat sich die präoperative zweiminütige Behandlung des Knochenmaterials mit einer 0,1%igen CHX-Mundspüllösung als erfolgreich in der Reduktion der oralen Mikroorganismen erwiesen (Young et al. 2002).

2.2.2 Substantivität von CHX

Auf Grund der positiven Ladung zeigt CHX eine hohe Affinität zu der anionischen oralen Mukosa (Winrow 1973). Nach Spülung verbleibt ca. 30 % des Moleküls als Reservoir im Mund, aus welchem es mittels „slow release“ kontinuierlich abgegeben wird (Bonesvoll et al. 1974 b; Gjermo 1975). Diese langsame Abgabe bewirkt auch noch nach 24 Stunden eine Konzentration von 1 µg CHX pro Milliliter (Bonesvoll 1977). Wahrscheinlich bindet CHX an die anionischen Carboxyl-Gruppen der Proteine und wird langsam mit Ca^{++} -Ionen aus dem Speichel ausgetauscht (Rolla und Melsen 1975). Somit kann man von einer antibakteriellen Wirkung über mehrere Stunden sprechen. Diese hohe Substantivität scheint einen größeren Effekt zu haben als die anfängliche antibakterielle Wirksamkeit (Gjermo et al. 1974). Sie kommt durch die starke Bindung von CHX an das anorganische Material zustande (Rolla und Melsen 1975). Diese stabile Verbindung konnten auch Bonesvoll und Gjermo (1978) belegen: Wurde nach dem Spülen mit CHX dreimal für 10 s mit Wasser nachgespült, verblieben anschließend noch 70 % des anfänglich gebundenen CHXs in der Mundhöhle (Bonesvoll 1978; Bonesvoll und Gjermo 1978). Wenn dagegen mit Essigsäure ausgewaschen wurde, kam es zu einer starken Reduktion der CHX-Retention in der Mundhöhle und damit zu einer verringerten Wirkung. Ursächlich ist der pH-Wert der Lösung. Wird dieser gesenkt, stehen weniger negative Gruppen, an welche das positiv geladene CHX binden kann, zur Verfügung (Gjermo et al. 1974; Bonesvoll et al. 1974 a).

Auch Mikroorganismen, extrazelluläre Polysaccharide und Speichelproteine sind negativ geladen, daher konnte eine Bindung von CHX an Plaque nachgewiesen werden (Rolla et al. 1971). *In vitro* konnte ebenfalls eine Bindung an Hydroxyapatit (Bestandteil des Schmelzes) und Zahnoberflächen festgestellt werden. Sinkt in der Umgebung die CHX-Konzentration, kommt es wie in der Mundhöhle zu einer langsamen Abgabe (Rolla et al. 1970).

2.3 Einsatz chlorhexidinhaltiger Mundspüllösungen

2.3.1 Indikationen

Nach Addy und Moran (1997) gibt es verschiedene Indikationsbereiche für chlorhexidinhaltige Mundspüllösungen. Diese sind nachfolgend aufgeführt:

1. In der Parodontitistherapie zusätzlich zur mechanischen Mundhygiene, vor allem in der Hygienephase
2. Präventiv nach chirurgischen Eingriffen, auch nach Parodontalchirurgie
3. Bei intermaxillär fixierten Patienten
4. Bei geistig und körperlich behinderten Menschen
5. Bei Patienten, welche durch Medikamenteneinnahme prädisponiert für bestimmte orale Infektionen sind wie zum Beispiel orale Candidiose durch Immunsuppressiva
6. Bei Patienten mit hohem Kariesrisiko
7. Bei Patienten mit rezidivierenden aphtösen Ulzerationen
8. In der kieferorthopädischen Behandlung, speziell mit festsitzenden Geräten
9. Eventuell unterstützend bei Implantationen
10. Bei Patienten mit sehr hohem Lebensalter, einer längeren Hospitalisation oder welche schwerstkrank sind
11. Um eine Bakteriämie zu verhindern, vor allem bei erhöhtem Endokarditis-Risiko sowie um die Kontamination durch bakterielle Aerosole einzudämmen

Auch Eley (1999) stimmt diesen Indikationsbereichen zu. Das Spülen mit CHX wird hier ebenfalls nach der Parodontitistherapie empfohlen, wenn die mechanische Reinigung durch schmerzende Gingivabereiche und freiliegende Wurzeloberflächen nicht ausreichend möglich ist oder durch zu niedrige Compliance nicht erfolgt. Überdies wird geraten, CHX nur für kurze Zeitabstände anzuwenden und derweil nicht zu rauchen sowie auf Tee, Kaffee und Rotwein möglichst zu verzichten, um Verfärbungen vorzubeugen.

2.3.2 Klinische Anwendungen

In der Plaque- und Gingivitis-Kontrolle zeigt CHX in Mundspüllösungen klinisch signifikante Erfolge.

So präsentierten Løe und Schiøtt (1970), dass ohne weitere Mundhygiene zweimal tägliches Spülen mit 10 ml 0,2%iger CHX-Lösung die Entwicklung von Plaque und Gingivitis vollständig verhindert. Schon Mundspüllösungen mit 0,1 % CHX wirken vorbeugend gegen Plaque-Bildung bzw. verspäten diese in gesunden oralen Verhältnissen ebenso wie in entzündeten Gingiva-Abschnitten (Ramberg et al. 1996). So ließen Brex et al. (1989) im Gegensatz zu Løe und Schiøtt (1970) dreimal täglich mit lediglich 0,12%iger CHX-Lösung über 21 Tage ohne zusätzliche Mundhygienemaßnahmen spülen. Dies konnte ebenfalls die Entwicklung einer Gingivitis vollständig verhindern.

Es wird kein Unterschied zwischen der lokalen Applikation und der Anwendung als Mundspüllösung gesehen (Addy und Moran 1983). Auch über einen längeren Zeitraum, als Ergänzung zur häuslichen Mundhygiene, wird CHX als wirksam erachtet (Wennstrom und Lindhe 1986; Axelsson und Lindhe 1987; Charles et al. 2004).

Nach chirurgischen Parodontalbehandlungen stellt die Plaque-Kontrolle mit einer 0,2%igen CHX-Mundspüllösung zusätzlich zum Zähneputzen eine Alternative zur professionellen Zahnreinigung dar (Westfelt et al. 1983).

Zusätzlich ist CHX für die Behandlung von Patienten mit rezidivierenden aphtösen Geschwüren geeignet. So bewirkt eine 0,2%ige CHX-Mundspüllösung ein geringeres Vorkommen von Aphten bzw. verkürzt deren Auftreten und vermindert die Schmerzen (Addy 1977).

2.3.2.1 CHX in der Therapie von Parodontopathien

Wie weiter oben bereits ausgeführt, ist die Plaque-inhibitorische und antiinflammatorische Wirkung von chlorhexidinhaltigen Mundspüllösungen akzeptiert. Daher ist ihre Anwendung für die Therapie von parodontalen Erkrankungen empfohlen worden (Quirynen et al. 1995; Bollen et al. 1998).

Das primäre Ziel der Parodontitisbehandlung ist die Entfernung bzw. Zerstörung des supra- und subgingivalen Biofilms der Zahnfleischtasche. Es sollte vorerst die konservative nicht chirurgische geschlossene Kürettage mit Hilfe von Handinstrumenten, schallunterstützten Scalern, Luft-Pulver-Wasserstrahlinstrumenten oder Lasern Anwendung finden. Die Wurzeloberflächen werden geglättet, und es können unterstützend Chemotherapeutika eingesetzt werden. Wenn notwendig, werden im An-

schluss resektive Maßnahmen wie Gingivektomien, Gingivoplastiken, mukogingivale Lappenbildung, Osteoplastiken und evtl. Wurzelresektionen oder Hemisektionen durchgeführt, um entzündungsfreie und der Mundhygiene gut zugängliche Verhältnisse zu schaffen (Greenwell 2001). Es ist möglich, dass vor allem bei Furkationsbefall die geschlossene Kürettage zu keinem ausreichend zufriedenstellenden Therapieergebnis führt. Dann ist das chirurgische Vorgehen einer offenen Kürettage erforderlich, da dieses bei dem Befund des Furkationsbefalls bessere Erfolge aufweist als die geschlossene Vorgehensweise (Fleischer et al. 1989). Für einwurzelige Zähne wurde ebenfalls nachgewiesen, dass bei Taschentiefen ab 6 mm ein offenes Vorgehen eine bessere Erreichbarkeit der Konkrementen garantiert und somit einen besseren Effekt hat als Scalen und Wurzelglätten nach der geschlossenen Methode (Brayer et al. 1989; Heitz-Mayfield 2005). Weiterhin kann es nötig sein, vor allem bei der Form der Aggressiven Parodontitis, eine begleitende Antibiose mit Amoxicillin und Metronidazol vorzunehmen (Buchmann et al. 2002).

Die klinischen Merkmale des gesunden Parodonts sind laut Greenwell (2001) die Abwesenheit entzündlicher Hinweise wie Schwellung, Rötung, Eiterung und *Bleeding on Probing*. Weitere Ziele sind der Erhalt des funktionellen Attachments, minimale Rezessionen, wo approximal Knochenabbau vorhanden ist und funktionelle Implantate. Um das Attachment zwischen Zahn und Gingivaepithel wiederherzustellen, müssen Parodontalligamentzellen und gingivale Fibroblasten die gereinigte Wurzeloberfläche besiedeln und extrazelluläres Bindegewebe produzieren können (Meyer 1986; Egelberg 1987). Das heißt, wenn eine Mundspüllösung als Unterstützung der Parodontitistherapie eingesetzt wird, dürfen gleichzeitig die nützlichen Zellen der Mundschleimhaut nicht in ihrer Funktion gehemmt werden.

2.3.2.2 Full-Mouth Disinfection

Um im Rahmen der Parodontitis-Behandlung die Übertragung der Mikroorganismen von den unbehandelten Quadranten auf die schon behandelten im Sinne einer Reinfektion zu verhindern, wurde das Konzept der *one-stage full-mouth disinfection* (OSFMD) entwickelt (Quirynen et al. 1995). Hierbei werden in der gesamten Mundhöhle innerhalb von 24 Stunden mittels Scaling und Wurzelglättung alle mikrobiellen Beläge entfernt. Danach erfolgt:

1. Bürsten des Zungenrückens mit 1%igem CHX-Gel für 60 s
2. Zweimaliges Spülen mit 0,2 % CHX-haltiger Mundspüllösung für 1 min und die letzten 10 s gurgeln, um die Tonsillen zu erreichen
3. 10 min subgingivales Spülen der Taschen mit 1%igem CHX-Gel

4. Nach 7 Tagen Wiederholung der subgingivalen Applikation
5. Über 14 Tage spülen die Patienten zweimal täglich 1 min lang mit 0,2%iger CHX-Mundspüllösung.

Im Gegensatz dazu wird bei der konservativen Methode mit einem zeitlichen Intervall von zum Beispiel 14 Tagen quadrantenweise vorgegangen. Mit der neuen Technik der OSFMD kam es anschließend bei Quiryen et al. (2006) nach einem und zwei Monaten zu einer signifikant höheren Reduktion der Sondierungstiefen der Zahnfleischtaschen. Einen Monat nach der Behandlung war der Anteil potentiell pathogener Mikroorganismen gesunken und die Rate förderlicher Bakterien gestiegen. Wenn ein Full-mouth scaling (FMSRP=*full-mouth scaling and root planing*) ohne Anwendung der Chlorhexidinpräparate durchgeführt wurde, kam es ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Taschentiefen, der blutenden Sites und zu einem Attachmentgewinn im Vergleich zu der konventionellen Herangehensweise. Aber es konnten immer etwas bessere Ergebnisse verzeichnet werden, wenn das Antiseptikum CHX im Sinne der OSFMD angewandt wurde, jedoch ohne statistische Signifikanz. Wenn die mikrobiologischen Veränderungen zwischen OSFMD und Standard-Therapie verglichen wurden, zeigte sich ein signifikanter Unterschied. Bei ersterer resultierte ein geringerer Anteil motiler Organismen und Spirochäten. Es waren weniger koloniebildende Einheiten pathogener Mikroorganismen wie *Aggregatibacter actinomycetem committans* (A.a.c.), *Prevotella intermedia* (P.i.), *Porphyromonas gingivalis* (P.g.) und *Fusobacterium nucleatum* (F.n.) in den Taschen und oralen Nischen wie Mukosa, Zunge und Speichel nachweisbar (Bollen et al. 1998).

Dagegen konnten andere Studiengruppen keine signifikanten Vorteile feststellen (Kinane und Papageorgakopoulos 2008; Latronico et al. 2008; Swierkot et al. 2009). Lang et al. (2008) wiesen zwar für die OSFMD eine bessere Reduktion der blutenden Sites nach, bei der Reduktion der Taschentiefen erzielte die OSFMD im Vergleich zur FMSRP jedoch keine besseren Ergebnisse. Schlussendlich sei der Unterschied zwischen beiden Verfahrensweisen und auch gegenüber der konventionellen Therapie nicht klinisch relevant (Lang et al. 2008). Ebenso ist Apatzidou (2006) der Ansicht, dass sich der zeitliche Rahmen der Parodontitistherapie nach der Verfügbarkeit der Termine und nach dem Patienten richten sollte. In einer Metaanalyse von Eberhard et al. (2008) kam man ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Anzahl verfügbarer Studien zu gering ist. Der Unterschied zur klassischen Therapie sei nicht signifikant, der klinische Nutzen eher moderat und die Vorgehensweise daher noch nicht generell zu empfehlen (Eberhard et al. 2008). Insgesamt ist nicht hinreichend geklärt, ob die OSFMD zu besseren klinischen Resultaten führt (Greenstein

2004; Koshy et al. 2004) und welche Rolle CHX dabei spielt. Möglicherweise beeinflusst CHX die Wundheilung nach dem Scaling und Wurzelglätten negativ, weshalb diese Herangehensweise keine eindeutig signifikant besseren Erfolge aufweist.

2.3.3 Alkoholfreie chlorhexidinhaltige Mundspüllösungen

Die meisten Mundspüllösungen enthalten Alkohol; das kann problematisch sein, wenn es versehentlich zum Verschlucken kommt, sofern Kinder (Weller-Fahy et al. 1980; Leung 1986), Schwangere und Alkoholsucht-Kranke betroffen sind. So wurde von einer Alkoholintoxikation auf Grund des Trinkens einer alkoholhaltigen Mundspüllösung berichtet, welche bei einem Vierjährigen zum Tod führte (Selbst et al. 1985). Außerdem ist mittlerweile bekannt, dass Alkohol in Mundspüllösungen zum Entstehen eines oralen Karzinoms beitragen kann (McCullough und Farah 2008). Ethanol in kommerziellen Mundspüllösungen wie Listerine® und in Wasser-/Alkohol-Mixturen bewirkt ein Schmerzempfinden in der Mundhöhle, abhängig von der Alkoholkonzentration der Spülung. Dies besteht umso länger, je höher konzentriert die Lösung ist (Bolanowski et al. 1995).

Die neue ätherische Öle enthaltende alkoholfreie Mundspüllösung Listerine Zero® war in einer 2 Wochen dauernden klinischen Studie signifikant besser in der Gingivitis- und Plaque-Reduktion als eine wässrige Alkohollösung (Charles et al. 2012). Auch CHX-Formulierungen ohne Alkohol mit 0,2 % CHX bewirken nach 21 Tagen eine signifikante Verringerung der Plaque-Akkumulation und Gingivitis. Sie haben die gleiche Wirksamkeit wie 0,2%iges CHX mit 7 % Alkohol. Somit bieten sie eine gute Alternative zu alkoholhaltigen Mundspüllösungen bzw. stellen die klinische Indikation derselben in Frage (Lorenz et al. 2006; Lorenz 2008). Auch alkoholfreie Mundspüllösungen mit einem CHX-Gehalt von 0,12 % zeigen keine verminderte Wirksamkeit gegenüber der gleichen Lösung mit 11 % Ethanol (Leyes Borrajo et al. 2002). Bei einer Konzentration von 0,12 % CHX kann *Streptococcus mutans* komplett eliminiert werden (Eldridge et al. 1998). Weitere Studien zeigen, dass alkoholfreie chlorhexidinhaltige Mundspüllösungen nicht nur effektiv in der Verminderung der Plaquequantität sind, sondern auch dessen Vitalität verringern (Arweiler et al. 2001).

2.3.4 Klinische Nebenwirkungen von CHX

Es gibt verschiedene Nebenwirkungen, welche vor allem bei der Langzeitanwendung von CHX auftreten.

Im Gastrointestinaltrakt des Menschen wird CHX kaum resorbiert (Winrow 1973). Es kommt zu keinen Schäden, wenn es versehentlich parenteral verabreicht wird, und durch die Haut wird es nur minimal aufgenommen. In Tierversuchen wurde festgestellt, dass die CHX-Anwendung keine onkologischen oder toxischen Folgeschäden bewirkt (Case 1977). Wenn über einen längeren Zeitraum angewandt, führen chlorhexidinhaltige Mundspüllösungen zu Verfärbungen, welche ausgeprägter sind als zum Beispiel bei Meridol® (Brecx et al. 1993) oder Listerine® (Addy et al. 1995; Eldridge et al. 1998). Die Verfärbungen treten vor allem an Restaurationen und Wurzeloberflächen auf, außerdem in approximalen Bereichen (Flotra 1973) und auf dem Zungenrücken (Löe und Schiott 1970). Sie können reduziert werden, wenn auf Rotwein, Tee und Kaffee verzichtet wird. Weiterhin gibt es antiadhäsive Zusätze, welche die Verfärbungen verhindern können (Addy et al. 1995).

Zudem sind bei Langzeitanwendung vermehrte Zahnsteinbildung (Charles et al. 2004) und Geschmacksirritationen zu beobachten (Lorenz 2008). Die durch CHX hervorgerufenen Geschmacksirritationen wurden genauer untersucht. Das Geschmacksempfinden von salzig und bitter wird durch CHX stark vermindert, dagegen von süß und sauer nur leicht. Letzteres ist im Allgemeinen leichter zu identifizieren (Frank et al. 2001; Gent et al. 2002). Wahrscheinlich entstehen diese Geschmacksirritationen dadurch, dass CHX an epitheliale Kationen-Kanäle bindet und somit den Ionenstrom, welcher den salzigen Geschmack vermittelt, blockiert (Breslin und Tharp 2001).

In seltenen Fällen kam es zu einer ungefährlichen ein- oder beidseitigen Schwellung der Glandula Parotis, vermutlich hervorgerufen durch eine Obstruktion des jeweiligen Ausführungsganges nach übermäßiger Anwendung einer CHX-haltigen Mundspüllösung (Rushton 1977).

Weiterhin gibt es Berichte über allergische Reaktionen mit Kontakturtikaria auf CHX (Staab und Gangler 1982; Bergqvist-Karlsson 1988) sowie systemische, die Atemwege betreffende allergische Reaktionen (Wittczak et al. 2013).

Ansonsten wurde in klinischen Studien von Auswirkungen, die auf eine Zytotoxizität von CHX schließen lassen könnten, noch kaum berichtet. Lediglich bei Flotra (1973) kam es durch eine CHX-Mundspüllösung nach einer Studienlänge von vier Monaten zu Desquamationen der oralen Mukosa.

Wenn allerdings Nebenwirkungen dieser Art auftreten, lässt sich vermuten, dass CHX nicht nur auf Bakterien, sondern auch auf die anderen Zellen der Mundhöhle einen Effekt hat. Außerdem muss, da die antimikrobielle und antiinflammatorische Wirkung von CHX bewiesen ist, gefragt werden, warum dieser klinische Effekt keine

besseren Resultate bewirkt. Die Anwendung von CHX in der Parodontose-Behandlung - wie bei der OSFMD - führt nicht zu einer Verbesserung der Therapieergebnisse (Apatzidou 2006; Lang et al. 2008). Es besteht daher die Möglichkeit, dass für die Heilung wesentliche Mundschleimhautzellen, wie hGF durch das Antiseptikum CHX beeinflusst oder verändert werden.

2.4 Zytotoxizität von CHX

Aufgrund dieser Aspekte und um die Sicherheit von CHX zu garantieren, wurden *in-vitro*- und *in-vivo*-Versuche durchgeführt, um eine mögliche Zytotoxizität von CHX festzustellen. Es wurden unterschiedlich konzentrierte chlorhexidinhaltige Lösungen und Mundspülungen untersucht. Bei diesen wurden negative Auswirkungen von CHX festgestellt, welche wiederum die klinische Anwendung in Frage stellen, beziehungsweise nach weiteren Studien verlangen.

2.4.1 CHX-Konzentration < 0,1 %

Schon eine Konzentration von 0,01 % CHX löst *in vitro* den Zelltod von hGF und HeLa-Zellen (eine menschliche Epithelzelllinie eines Gebärmutterhalskarzinoms) aus. Die Zellen waren der Lösung über 4 Stunden ausgesetzt. Auch bei einer Konzentration von 0,006 % über 3 Stunden zeigt CHX eine zytopathologische Wirkung. Ab Konzentrationen von 0,004 % bewirkte CHX eine Hemmung der Proteinbiosynthese (Goldschmidt et al. 1977).

Flemingson et al. (2008) bestätigten die zytotoxische Wirkung einer verdünnten, 0,2%igen chlorhexidinhaltigen Mundspüllösung. Eine Verdünnung mit Medium bis zu einer Konzentration von 0,002 % CHX führte schon zu einer Inhibition der Fibroblastenproliferation. Diese war abhängig von der CHX-Konzentration. Die Länge der Einwirkzeit bewirkte keinen statistisch signifikanten Unterschied in der prozentualen Reduktion der Zellen. Sie ließen CHX 1, 5 und 15 min auf die Fibroblasten einwirken. Ein statistisch signifikanter Unterschied war nur bei den verschiedenen Konzentrationen festzustellen. Im Gegensatz dazu kam eine andere Studie zu dem Ergebnis, dass beides, CHX-Konzentration und auch die Einwirkzeit (5, 10, 60, 120, 240 min) einen Effekt auf die Aktivität des Zellmetabolismus haben. Dieser wurde umso stärker inhibiert, je höher die CHX-Konzentration und je länger die Einwirkzeit war (Patel et al. 2006). In einer weiteren Studie wurde ebenso dargestellt, dass CHX abhängig von der Einwirkzeit und der Konzentration auf hGF und Epithelzellen zytotoxisch wirkt. Diese Forschergruppe zeigte zudem auf, dass sich die Zellen nach

weiteren 48 Stunden in frischem Medium nicht von der Behandlung mit CHX regenerieren konnten (Babich et al. 1995).

Bei Mariotti und Rumpf (1999) hatte 0,00009%iges CHX zwar noch keine Auswirkungen auf die Fibroblastenproliferation. Jedoch führte es zu einer Reduktion von 65 % bzw. 57 % der Kollagen und Non-Kollagen-Protein-Produktion der Fibroblasten. Die Proteinsynthese von hGF wurde auch von Pucher und Daniel (1992) getestet. 0,002%iges CHX, welches für 60 s zu den Zellen gegeben wurde, bewirkte eine minimale Zytotoxizität. Die Zellteilung wurde jedoch beinahe komplett unterdrückt und es kam zu einer Zellreduktion von ca. 90 %. Bei CHX-Konzentrationen von 0,005 % und 0,12 % wurde die Kollagenproduktion (in Kollagengel) ebenfalls reduziert. Bei einer Konzentration von 0,002 % CHX kam es nach sieben Tagen zu einer leichten Erholung, die Zellzahl war ca. 5 % über die Ausgangszellzahl gestiegen. Nach der Behandlung mit 0,005 % und 0,12 % CHX kam es zu keiner Erholung und mit letzterer Konzentration behandelte Zellen zeigten keinerlei Proliferation mehr. Wenn CHX über den Zeitraum von 24 Stunden zu Fibroblastenkulturen gegeben wird, bewirkt schon eine Konzentration von 0,0001 % eine 95%ige Zelltoxizität (Lucarotti et al. 1990).

Bei Cabral und Fernandes (2007) beeinflusste eine Konzentration von 0,0005 % CHX kultivierte Alveolarknochenzellen auch nach 24 Stunden nicht. Höhere Konzentrationen führten jedoch zeit- und dosisabhängig zu einer signifikanten Abnahme des zytoplasmatischen Volumens und der Anzahl adhärenter Zellen. Ab einer Konzentration von 0,005 % CHX lösten sich die Zellen vom Flaschenboden; nach 24 Stunden waren lediglich tote Zellen vorhanden.

Hidalgo und Dominguez (2001) zeigten *in vitro* die zytotoxische Wirkung auf humane Hautfibroblasten bei CHX-Konzentrationen schon ab 0,001 % auf. Sie führten zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Entleerung der Zellen von ATP. Ab einer Konzentration von 0,02 % CHX kam es zu einem Verlust des gesamten ATPs. Nach einer langen Einwirkzeit von 24 Stunden bewirkte CHX auch schon bei einer Konzentration von 0,00025 % einen um die Hälfte verringerten ATP-Gehalt der Zellen, im Vergleich zu kürzeren Einwirkzeiten von 3, 6 und 8 Stunden. Sie führten zudem einen XTT-Assay zur Feststellung der Viabilität durch. Es zeigte sich, dass CHX in Konzentrationen von 0,005 % den totalen Zelltod der Hautfibroblasten zur Folge hat. Bei einer längeren Einwirkzeit von 24 Stunden passierte dies auch schon bei 0,0025%igem CHX. Konzentrationsabhängig kommt es zu einer Unterdrückung der DNA-Synthese. Auch Boyce et al. (1995) konnten nachweisen, dass 0,05%iges CHX auf humane Keratinozyten und hGF toxisch wirkt.

In derselben Weise konnte in laboratorischen Studien eine zytotoxische Wirkung auf Blutzellen festgestellt werden. Gabler et al. (1987) zeigten eine von CHX in niedrigen Konzentrationen verursachte Schädigung der Erythrozyten und Polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) auf. Schon 0,015 - 0,018%iges CHX hatte bei der Hälfte der Zellen einen Schaden zur Folge. Lediglich Konzentrationen von 0,01 % oder weniger resultierten in einer nur geringen Schädigung. In einer neueren Studie wurde eine Zytotoxizität von 0,01-0,02%igem CHX auf humane Nervenzellen nachgewiesen (Doan et al. 2011).

Auch auf Odontoblasten hat CHX bereits in niedrigen Konzentrationen wie 0,0024 % eine zytotoxische Wirkung. Die Zellen der Pulpa werden *in vitro* negativ von CHX beeinflusst, indem der Zellmetabolismus gesenkt und die Zellmorphologie verändert wird. Die untersuchten Odontoblasten rundeten sich bis zur vollständigen Ablösung ab (Brito de Souza 2007). Dies stellt wiederum in Frage, ob CHX als Desinfektion der Kavität geeignet ist und macht abermals dessen zytotoxische Reaktion auf wahrscheinlich alle Zellen der Mundhöhle deutlich.

Demgegenüber kam es *in vivo* durch die Wundbehandlung mit CHX nicht zu einer verringerten Kollagenproduktion oder verzögerten Heilung, hierbei wurde eine 0,05%ige Lösung angewandt (Brennan et al. 1986).

2.4.2 CHX-Konzentration 0,1 - 0,2 %

Die meisten chlorhexidinhaltigen Mundspüllösungen weisen eine Konzentration von 0,12 oder 0,2 % CHX auf. Diese Konzentrationen bewirken *in vitro* nach nur 30 Sekunden eine Proteinsynthesehemmung und den Zelltod von hGF (Goldschmidt et al. 1977). Ebenso lösten sie bei Damour et al. (1992) auf hGF und humane Keratinozyten der Haut eine zytotoxische Wirkung aus. Bei Patel et al. (2006) veranlasste keine Verdünnung einer 0,2%igen Mundspüllösung *in vitro* die totale Zelltoxizität von humanen Osteoblasten-ähnlichen Zellen.

Auch bei Mariotti und Rumpf (1999) bewirkte CHX konzentrationsabhängig ein Absinken der Fibroblastenproliferation. 0,12 % CHX verursachte, gemessen an der Kontrollgruppe, eine Reduktion der Zellproliferation von durchschnittlich 27,3 %. Es hatte eine signifikante Reduktion von 98,8 % beziehungsweise 98,2 % der Kollagen- und Non-Kollagen-Protein-Produktion zum Resultat. Die unterschiedlichen Einwirkzeiten von 1, 5 und 15 min wirkten sich, wenn der Durchschnitt zwischen den verschiedenen Versuchsdurchläufen ermittelt wurde, nicht auf die Proliferationsfähigkeit der hGF aus. Das würde heißen, dass kommerzielle CHX-Lösungen, wenn sie mit der von dem Hersteller empfohlenen Einwirkzeit und Konzentration angewandt

werden, in jedem Fall die Kollagen- und Non-Kollagen-Produktion der hGF eindämmen. Es kann angenommen werden, dass diese Veränderungen der gingivalen extrazellulären Matrix eine Veränderung der Wundheilung bewirken (Mariotti und Rumpf 1999).

Cabral und Fernandes (2007) dokumentierten ebenfalls die Zytotoxizität von CHX. Sie hatten humane Alveolarknochenzellen 24 Stunden kultiviert und anschließend 2 min lang 0,12- und 0,2%igem CHX ausgesetzt. Es kam zum fast sofort auftretenden Zelltod, Abrunden und Ablösen der Zellen.

Als Carlin et al. (2011) ihre Probanden 2 Wochen lang zweimal täglich mit einer 0,12%igen CHX-haltigen Mundspüllösung spülen ließen, konnten sie an den hinterher entnommenen Mundschleimhautzellen DNA-Schäden feststellen.

Desgleichen kam es *in vivo* bei Hamstern zu Reaktionen auf CHX. Wenn 0,2%iges CHX auf die verletzte orale Mukosa von Hamsterbackentaschen gegeben wurde, kam es zu einer Unterbrechung des Blutzufusses, zur Hämolyse und intravaskulärer Thrombenbildung in dem Bereich. Die unverletzte Mukosa zeigte mikroskopisch keine morphologischen Veränderungen nach der Behandlung (Lindhe et al. 1970).

Im Gegensatz dazu dokumentierten Hellden et al. (1974) einen positiven Effekt von 0,2%igem CHX auf die Wundheilung bei Ratten.

2.4.3 CHX-Konzentration > 0,2 %

In mehreren Studien wurden CHX-Lösungen mit höheren Konzentrationen geprüft, wie sie zum Beispiel in Form eines Gels und als antibakterieller Chip (z.B. PerioChip®) Anwendung finden.

Nicht nur durch direkte Einwirkung, sondern auch wenn es zum Kulturmedium gegeben wird, wirkt CHX auf hGF und Parodontalligamentzellen zytotoxisch. Ab einer CHX-Konzentration von 0,5 % kommt es zum Ablösen von kultivierten, ursprünglich auf Wurzeloberflächen anhaftenden hGF. Das Wachstum der PDL-Zellen auf Wurzeloberflächen wird ab einer Konzentration von 1,0 % inhibiert, die Anhaftung der Zellen sowie ihre Morphologie verändern sich (Cline und Layman 1992).

Müller und Kramer (2008) konnten ebenso eine hohe Zytotoxizität *in vitro* von 0,25 % CHX auf Maus-Fibroblasten mittels MTT-Test nachweisen.

Bei Ratten hatte zweimal tägliches Spülen mit 0,5%igem CHX für 30 s eine deutlich verminderte Wundheilung von oralen Schleimhaut-Knochen-Läsionen zur Folge. Es kam laut Bassetti und Kallenberger (1980) zu massiven Residualdefekten. Diese waren fünf bis 16 Mal größer als bei der Kontrollgruppe. 0,1 % und 0,2 % CHX führte nur zu einer leicht verminderten Wundheilung. Genauso führte bei Faria et al.

(2007) *in vivo* die Injektion von bis zu 1%igem CHX in die Pfote lebender Mäuse zu nekrotischen Veränderungen der Epidermis, Dermis und des subkutanen Gewebes. Dagegen kam es bei einer Studie an Wunden von Meerschweinchen nach einer Behandlung mit 0,5%igem CHX zu keiner signifikanten Verzögerung in der frühen Phase der Wundheilung. Erfolgte die Wundbehandlung indessen mit 4 %igem CHX, bewirkte das anfangs eine Verzögerung der Wundheilung. Allerdings war nach 14 bis 21 Tagen kein Unterschied mehr zu der Kontrollgruppe festzustellen (Saatman et al. 1986). Kozlovsky et al. (2007) konnten sogar eine positive Wirkung von CHX *in vivo* feststellen. In ihrer Studie wurde der Einfluss von verschiedenen Mundspüllösungen auf die Wundheilung am Gaumen von Ratten untersucht. Die Wunden wurden über 2 Wochen täglich 1 min mit 1%igem CHX-Gel oder mit einer 0,12%-igen Lösung gespült. Anschließend waren die Residualwunden der mit 1%igem CHX-Gel behandelten Gruppe am kleinsten und wiesen eine höhere Reepithelisierungsrate als die Kontrollgruppe auf.

Wie weiter oben im Kapitel zur Substantivität von CHX ausgeführt, verbleibt CHX auf Grund seiner Bindung an die anionischen Carboxyl-Gruppen der Proteine lange in der Mundhöhle und hat dadurch eine extensive Wirkdauer. Diese Bindung an Proteine kann jedoch auch dazu führen, dass in der Mundhöhle nach dem Spülen mit einer chlorhexidinhaltigen Mundspülung weniger CHX zur Verfügung steht, da es gebunden vorliegt. Ein weiterer Teil liegt an die unzähligen Bakterien der Mundhöhle gebunden vor. Somit ließe sich begründen, dass CHX in der klinischen Verwendung wenige Nebenwirkungen zeigt, allerdings bei *in-vitro*-Versuchen hoch zytotoxische Effekte hat, wie zuvor ausgeführt (Hjeljord et al. 1973).

2.5 Untersuchungsmethoden zur Zellviabilität und Zytotoxizität

Um die zellulären Ereignisse als Reaktion auf ein bestimmtes Reagenz wie chlorhexidinhaltige Mundspüllösungen feststellen zu können, werden Zellkulturen, z.B. Fibroblasten, genutzt.

Eine Abnahme der Zellzahl kann einen zytotoxischen Effekt indizieren. Sie wird z.B. mit einem Hemozytometer wie der Zählkammer nach Neubauer oder Burker und einem Mikroskop „per Hand“ durchgeführt. Dies wird jedoch als nicht repräsentativ erachtet (Schärfe 2004). Eine elektronische Zellzählung wie mit dem Cellometer AutoT4 führt zu einem schnelleren Ergebnis mit hoher Reproduzierbarkeit ohne Möglichkeiten der individuellen Auslegung (Schärfe 2004).

Weiterhin ist die Zellvitalität aussagekräftig, also der prozentuale Anteil von lebenden Zellen einer Kultur. Es gibt verschiedene Untersuchungsmethoden, um die Zell-

viabilität festzustellen. Dazu gehören der Nachweis einer unversehrten Zellmembran und die Messung metabolischer Parameter, also der Nachweis der Stoffwechselaktivität der Zellen.

2.5.1 Nachweis der Integrität der Zellmembran

Um den Vitalitätsstatus einer Zelle zu prüfen, eignen sich die Trypanblau-Färbung, Messung der Chromfreisetzung, Aufnahme von ^3H -Leucin oder ^3H -Thymidin, Freisetzung von Enzymen wie die Lactatdehydrogenase, der Apoptosenachweis, die Neutralrot-Färbung und die CASY-Technologie.

Bei der Trypanblau-Färbung nehmen lediglich die devitalen Zellen den Farbstoff Trypanblau auf, da ihre Zellmembran nicht mehr intakt ist. Anschließend werden in einem Hämozytometer die Anzahl lebender und toter, demnach gefärbter Zellen, bestimmt. Dies geschieht entweder manuell, zum Beispiel mit einer Zählkammer nach Neubauer oder Burker (Poggi et al. 2003), oder aber mit Hilfe eines Computers und Cellometers (Pucher und Daniel 1992; Mariotti und Rumpf 1999). So kann auch der prozentuale Anteil lebender Zellen, die Zellviabilität errechnet werden. Ein Nachteil der Trypanblau-Färbung ist, dass es sich dabei selbst um ein zytotoxisches Reagens handelt, welches schon geschwächte Zellen abtöten kann. Das könnte zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen. Ebenfalls wird vor dem Ablösen der Zellen zur Zellzählung das Medium abgenommen und die Zellen gewaschen. Dabei werden tote, das heißt schwimmende, nicht adhärente Zellen entfernt und somit nicht mehr repräsentiert. Die Trypanblau-Färbung ist jedoch eine einfache und weit verbreitete Methode (Schärfe 2004).

Goldschmidt et al. (1977) haben die Auswirkungen von CHX auf Fibroblasten anhand der Chromfreisetzung nach 60-minütiger Inkubation der Zellen gemessen. Per Szintigrafie kann bei toten Zellen auf Grund der eintretenden Zellyse eine erhöhte Freisetzung von ^{51}Cr festgestellt werden. Weiterhin nehmen beschädigte Zellen ^3H -Leucin auf, was in einem Szintillationszähler dargestellt und ausgewertet werden kann (Goldschmidt et al. 1977). Ähnlich ist die Methode, bei welcher die Zellkulturen mit ^3H -Thymidin inkubiert werden. Wenn dieses in die Zellen aufgenommen wird, kann anschließend die Höhe der Radioaktivität mit einem Flüssig-Szintillations-Spektralphotometer gemessen werden (Cline und Layman 1992).

Außerdem kann die Freisetzung von Enzymen die fehlende Integrität der Plasmamembran anzeigen. Ist diese defekt, weil Zellen zugrunde gehen, kommt es zu einer Erhöhung zum Beispiel der Lactatdehydrogenase, welche sich in fast allen Zellen befindet (Babich et al. 1995).

Eine andere Untersuchung, um toxikologische Auswirkungen festzustellen, ist zu prüfen, ob ein Stoff die Nekrose bzw. Apoptose von Zellen veranlasst. Der Unterschied ist, dass bei nekrotischen- im Gegensatz zu apoptotischen Zellen- die Plasmamembran nicht mehr intakt ist. Bei letzteren kann es aber sekundär zur Nekrose kommen (Haanen und Vermes 1995). Mit dem fluoreszierendem Stoff Annexin V, welches an negativ geladene Phospholipide wie Phosphatidylserine an nekrotische Zellen bindet, und Propidium Iodid, welches ausschließlich nekrotische Zellen mit zerstörter Membran markiert, lässt sich der Unterschied darstellen. Da in der frühen Phase der Apoptose die Phosphatidylserin-Moleküle ebenfalls von der inneren zur äußeren Membran wandern, werden diese mittels Propidium Iodid von den nekrotischen Zellen unterschieden (Faria et al. 2007; Roche 2010). Für die Auswertung werden die fluoreszenzmarkierten Zellen bei einer Durchflusszytometrie sortiert (Vermes et al. 1995).

Bei dem Neutralrot-Assay kann der Farbstoff lediglich von den vitalen Zellen in die Liposome aufgenommen und einbehalten werden (Babich und Borenfreund 1991). Tote oder inaktive Zellen zeichnen sich im Gegensatz zu der Trypanblau-Färbung durch eine fehlende Rotfärbung aus (Schärfe 2004).

Bei der CASY-Technologie wird durch einen Cell Analyzer die Anzahl der Zellen mit intakter Zellmembran erkannt, da diese in einem Stromfeld ein größeres Signal produzieren als tote Zellen. Diese haben eine permeable und elektrisch durchlässige Zellmembran (Schärfe 2004). Die CASY-Methode ist laut Lindl et al. (2005) im Vergleich zu dem MTT- und dem Neutralrot-Assay die sensitivste Methode zum Nachweis der Zellviabilität.

2.5.2 Stoffwechselaktivität

Um die Stoffwechselaktivität von Zellen zu beurteilen, kann man den Stoffumsatz oder die Enzymaktivität der Zellkultur bestimmen. Anerkannte Methoden stellen der MTT-Test, XTT-Test, Radiopharmazeutische Diagnostik und Luciferin-Luciferase-Bioluminescent-Test dar. In der vorliegenden Studie wurde ein *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) verwendet.

Der MTT-Test trifft eine Aussage über die Aktivität eines mitochondrialen Enzyms der Zelle, der Dehydrogenase, und damit über die Anzahl der lebenden Zellen. Diese Dehydrogenase spaltet den Tetrazolium-Ring von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT, Sigma, USA), wodurch in saurer Isopropanol-lösung eine violette Färbung resultiert. Die Intensität der Färbung wird spektrophotometrisch bei 570 nm gemessen und ist direkt proportional zu der vitalen Zellzahl

bzw. der Zellen mit aktivem Stoffwechsel (Mosmann 1983; Patel et al. 2006; Flemingson et al. 2008). Anstatt MTT kann auch XTT (2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazoliumchlorid) verwendet werden, dies führt bei der Reaktion zu einer roten Färbung.

Eine andere Methode, um den Stoffwechsel von Zellen zu überprüfen bzw. zu ergründen, auf welche Art die Zellen beeinflusst werden, ist, ihre Stoffwechselprodukte zu untersuchen. So wurde die Kollagen- und Non-Kollagen-Protein-Produktion von hGF nach Behandlung mit unterschiedlichen CHX-Konzentrationen untersucht (Pucher und Daniel 1992; Mariotti und Rumpf 1999). In dieser Untersuchung wurden Kollagen-bildende Zellen mit ^3H -Prolin oder einer anderen Aminosäure radioaktiv markiert und mithilfe von Trichloressigsäure die Proteine gefällt. Die Aufspaltung erfolgt durch eine Kollagenase und in einem Flüssig-Szintillations-Spektralphotometer wird die Radioaktivität gemessen, welche dann dem synthetisierten Kollagenanteil entspricht (Peterkofsky und Diegelmann 1971; Diegelmann et al. 1990). Ein Nachteil der Methodik der Radio-Markierung ist das dabei entstehende radioaktive Material sowie die nötige laboratorische Ausstattung wie ein Szintillations-Spektralphotometer (Babich und Borenfreund 1991).

Um die Nutzung von Radioisotopen zu vermeiden, kann der zelluläre ATP-Gehalt gemessen werden. Er steht für die der Zelle zur Verfügung stehende Energie bzw. deren Verlust. Somit kann eine Aussage über den Stoffwechsel der behandelten Zellkultur getroffen werden. Hierbei ist mit Hilfe des Luciferin-Luciferase-Bioluminescent-Test die kleinste Menge ATP durch Lichtentwicklung zählbar und proportional für die vorhandenen Zellen (Crouch et al. 1993). Die Biolumineszenz, welche bei der ATP-abhängigen Luciferin-Luciferase-Reaktion entsteht, wird mit einem Luminometer gemessen (Hidalgo und Dominguez 2001).

Eine andere Möglichkeit zeigten Ishikawa et al. (2004). Sie testeten die Auswirkung von Ascorbinsäure auf die Kollagenproduktion von PDL-Zellen und benutzten dafür ein ELISA-System von der Firma TAKARA-BIO®. Hierbei werden gebildete Propeptide (PIP) erfasst, welche von dem Prokollagen, aus welchem später durch Triple-Helix-Bildung Kollagen entsteht, abgespalten werden. Damit wird stöchiometrisch die Menge an synthetisiertem Kollagen widerspiegelt.

Die Fähigkeit von PDL-Zellen und Fibroblasten, Kollagen zu bilden, ist hinsichtlich der Wundheilung von Interesse.

Bei dem *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) handelt es sich um eine immunologische Nachweismethode, welche häufig zur Suche nach Antikörpern verwendet wird (Holtzhauer 1997). Man unterscheidet den kompetitiven ELISA von

dem Sandwich-ELISA (Pingoud und Urbanke 1997). Bei ersterem werden vorab Antikörper gegen das nachzuweisende Antigen auf einer Trägerplatte fixiert. Anschließend wird das Antigen sowie Antigen, welches ein Enzym gebunden hat, hinzugegeben. Diese besetzen die Bindungsplätze der Antikörper. Nach dem Waschen der Platte kommt ein Substrat hinzu, welches von dem Enzym verstoffwechselt wird. Dies führt zu einer Farbreaktion, welche photometrisch gemessen werden kann und das Verhältnis von enzymgebundenem Antigen und dem Antigen der Probe darstellt. War eine große Menge Antigen in der Probe, kommt es zu einer geringeren Farbreaktion, die Menge lässt sich an einer Eichkurve mit Standards ablesen. Bei dem vorliegenden Studiendesign wurde ELISA der Sandwich-Methode verwendet (s. Abb. 2).

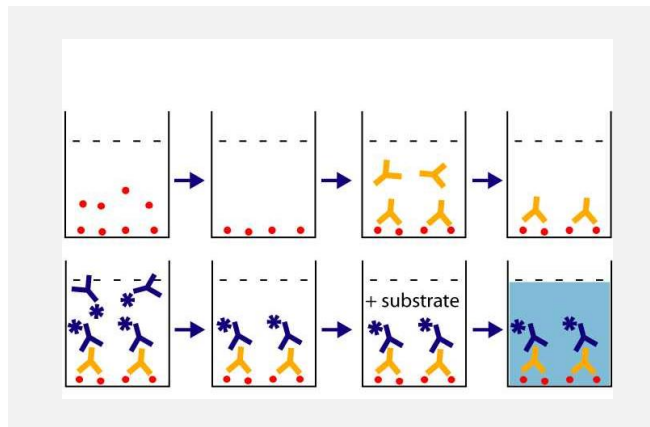


Abbildung 2: Veranschaulichung eines Sandwich-ELISAs; rot: Antikörper, gelb: Probe (Antigen), blau: Antikörper mit gebundenem Enzym (Quelle: http://virus.usal.es/web/de_mo_microali/enterotoxina/imagenes/portada.jpg)

Dabei liegen ebenfalls zunächst gebundene Antikörper vor. Es wird die Probe, das Antigen, in diesem Fall Propeptide des Prokollagens Typ I (TAKARA-BIO®) (Ishikawa et al. 2004), hinzu pipettiert. Diese besetzen die Bindungsplätze der Antikörper. Dafür muss eine Inkubationszeit von meist ca. 2 Stunden unter leichtem Schütteln eingehalten werden. Der Überstand wird durch Ausschütten entfernt und die Platten gewaschen. Anschließend werden freie Antikörper, welche das Enzym (z.B. Peroxidase) gebunden haben, im Überschuss hinzugegeben und der Versuch ca. 1 Stunde inkubiert. Daraufhin muss die Trägerplatte wieder von den Resten gereinigt und mehrmals gewaschen werden und das Substrat wird hinzugegeben. Kommt es zu einer starken, photometrisch messbaren Farbentwicklung, war eine große Menge des Antigens in der Probe.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Mundspüllösungen

Für die Versuche wurde eine alkoholfreie chlorhexidinhaltige Mundspüllösung in den Konzentrationen 0,12 und 0,2 % verwendet (Curasept ADS, Fa. CURADEN Healthcare S.R.L. Milano, Italien). ADS steht für Anti-Discolorations-System (siehe Tab. 1). Vor dem Gebrauch unter der Reinraumwerkbank (Fa. Heraeus, Hannover) wurden die Mundspüllösungen steril filtriert.

Tabelle 1: Verwendete Mundspüllösungen Curasept ADS 220® und 212® von Curaden Healthcare

Mundspüllösungen	Chargenr.	Inhaltsstoffe
CURASEPT ADS 220® CURADEN Healthcare	609DEL1108	Chlorhexidindigluconat 0,20 %, Aqua, Xylitol, Propylenglycol, PEG-40, Hydrogenated Castor Oil, Ascorbic Acid, Aroma, Poloxamer 407, Sodium Metabisulfite, Sodium Citrate, C.I. 42090
CURASEPT ADS 212® CURADEN Healthcare	011DEL0108	Chlorhexidindigluconat 0,12 % Aqua, Xylitol, Propylenglycol, PEG-40, Hydrogenated Castor Oil, Ascorbic Acid, Aroma, Poloxamer 407, Sodium Metabisulfite, Sodium Citrate, C.I. 42090

3.1.2 Zellen: Fibroblasten

Für diese Studie wurden Zellpopulationen von primären humanen Gingiva-Fibroblasten (HGFiB, Bestell-Nr. 1210412, Provitro GmbH, Berlin, Deutschland) genutzt, welche als Aliquots mit $5 \cdot 10^5$ Zellen in Cryo-SFM-Medium (Bestell-Nr. 2040102, Fa. Provitro GmbH, Berlin, Deutschland) in 2-ml-Einfrierröhrchen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren vorlagen. Sie waren am 04.05.2001 aus der Mundschleimhaut einer 27-jährigen Frau europäischer Ethnologie primär isoliert und *in vitro* bis zur dritten Passage vermehrt worden. Zuvor wurden die Zellen auf Bakterien, Pilze, Mycoplasmen, HIV-DNA und Hepatitis B/C-DNA geprüft und als negativ eingestuft, sowie bei der immunhistochemischen Analyse positiv für den hGF spezifischen Rezeptor CD90/Thy-1 getestet.

Alle Versuche wurden im Weiteren mit hGF der 5. bis 7. Passage durchgeführt.

3.1.3 Weitere Materialien

Alle Zellkulturgefäße, welche in der Zellkultur und für die Versuchsdurchführung unter der Reinraumwerkbank (Fa. Heraeus, Hannover) benutzt wurden wie die Zentrifugenflaschen (Fa. greiner-bio-one, Frickenhausen), 12-Well-Platten (Multiwellplatten, Fa. greiner-bio-one, Frickenhausen) und Zellkulturflaschen (Cellstar®, Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) waren steril geliefert worden. Wiederverwendbare Gefäße wie Pasteurpipetten oder nicht steril gelieferte Ware wie Pipettenspitzen (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) wurden vor der Benutzung autoklaviert. Die im Labor gebrauchten Geräte wie das Cellometer (Cellometer™ Auto T4, Fa. Nexcelom Bioscience, Lawrence, Massachusetts), die Zentrifuge (Labor-Kühlzentrifuge 2K15C, Sigma, Gelnau) und das Photometer (Spectramax M2 mit Software SoftMax® Pro) sind regelmäßig geeicht worden.

3.2 Versuchsplanung

Im Rahmen dieser *in-vitro*-Untersuchung sollte die Wirkung von antiseptischen chlorhexidinhaltigen, alkoholfreien Mundspüllösungen auf Fibroblasten der menschlichen Mundschleimhaut in Abhängigkeit von der Zeit der Einwirkung und der CHX-Konzentration ermittelt werden. Das Ausmaß ihrer Toxizität für die Mundschleimhautzellen sollte durch die Messung ihrer Kollagenproduktion mittels eines *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) und der elektrischen Zellzahlbestimmung mit Hilfe eines Cellometers verglichen werden.

Weiterhin sollte der zeitliche Verlauf der Kollagenproduktion und der Zellzahl untersucht werden, also ob und nach welcher Zeit die Zellen sich wieder erholen bzw. sie ihren Stoffwechsel wieder aufnehmen.

Um die optimale Einwirkzeit der oralen CHX-Antiseptika auf die Mundschleimhaut zu bestimmen, wurde die Einwirkzeit auf 1 min und 5 min festgelegt, und jeweils die von dem Hersteller empfohlene Konzentration angewandt. Bei der Kontrollgruppe wurde keine Mundspüllösung, sondern eine pH-neutrale, nicht zytotoxische Salzlösung (PBS) eingesetzt.

Die Mundspüllösungen sind alkoholfrei und der Gehalt an CHX beträgt 0,12 % (Curasept ADS 212) bzw. 0,2 % (Curasept ADS 220).

Mit einem kommerziellen ELISA (Procollagen-Type-I-C-Peptide EIA Kit der Firma Takara) wurde die von den Mundschleimhautzellen produzierte Kollagen-I-Konzentration bestimmt; 1 Tag, 3 und 5 Tage nach dem Einwirken der Mundspüllösungen. Parallel wurde die Zellzahl mittels optischer Zellzählung im Cellometer™ Auto T4 er-

fragt. Zellzahlbestimmung und ELISA sind jeweils als Doppelbestimmung erfolgt und für jeden Parameter wurde der Versuch 12 Mal durchgeführt.

Wie vom Hersteller empfohlen wurden die Zellen in dem speziell für die jeweilige Zelllinie entwickelten Medium (Fibroblast growth medium, FCS, complete, Cat.-No.: 2010401 Provitro GmbH) bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Bei der Passage der Zellen wurden die fertigen Lösungen verwendet (Passage kit 2, Cat.-No.: 2040002 Provitro GmbH). In Abbildung 3 ist der Versuchsplan der Studie dargestellt.

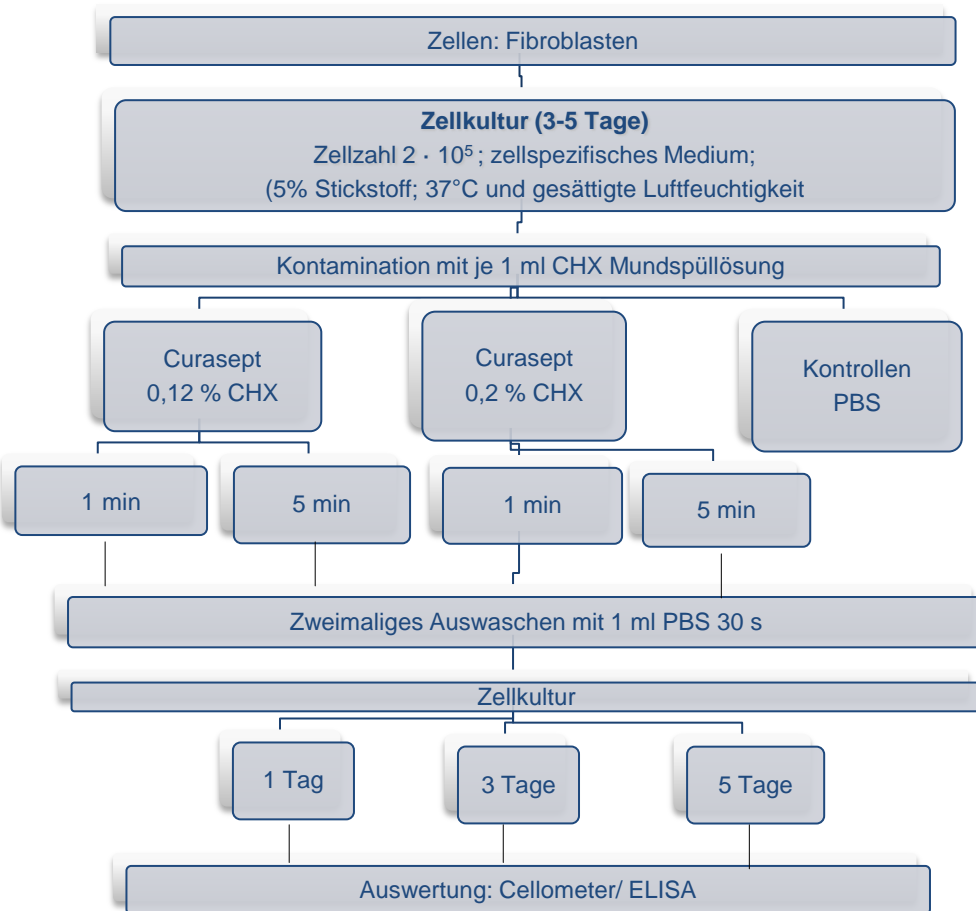


Abbildung 3: Versuchsablauf der Studie

3.2.1 Vorversuch: Wachstumsverhalten von hGF in 12-Well-Platten

Zu Beginn wurden hGF der 14. Passage mit der für die Versuche vorgesehenen Konzentration von $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml ausgesät. Nach drei Tagen Wachstum wurde täglich mittels Cellometer die Zellzahl, sowie der Anteil der lebenden Zellen gemessen. So konnte in Erfahrung gebracht werden, wie lange hGF in einer 12-Well-Platte unter normalen Bedingungen lebensfähig sind.

Der Vorversuch ergab, dass die Zellzahl und Viabilität bis zum 5. Tag stetig anstieg, bis sie am 6. Tag abnahm. Daraufhin wurde für die Verlaufskontrolle der Versuche eine Zeitspanne von 5 Tagen festgelegt.

3.2.2 Vorversuch: ELISA

Zunächst musste getestet werden, in welchem Bestandteil der Zellkulturen Kollagen zu finden war bzw. auf welche Art die Zellen am besten aufzuschlüsseln waren, um enthaltenes Kollagen nachzuweisen. Aufgrund dessen lief der ELISA in den Vorversuchen pro Probe drei Mal:

- Mit dem Überstand der Zellkultur
- Mit einem Teil der Zellen, welche durch einen Lysispuffer aufgeschlüsselt wurden
- Mit einem Teil der Zellen, welche zuvor mit einer Ultraschallsonde behandelt worden waren

Somit begann die Zellernte der behandelten Zellen zunächst mit dem Abnehmen von 500 µl Überstand aus jedem Well. Dieser wurde in ein Eppendorf-Cup (Eppendorf-Cup, Fa. Eppendorf, Hamburg) überführt, welches sofort auf Eis gelagert wurde. Der restliche Überstand wurde abgesaugt und die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen. Dann wurde 500 µl PBS zugegeben und die Zellen mit einem Schaber abgenommen und die entstandene Zellsuspension in ein E-Cup überführt. Die Wells wurden erneut mit 500 µl PBS ausgespült und der gesamte Inhalt in ein E-Cup gegeben. Daraufhin wurden alle gesammelten Proben bei 650 g (=2000 rpm / Umdrehungen pro min), welches der 650-fachen Erdschwerebeschleunigung entspricht, und 4°C 10 min lang zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 250 µl Lysispuffer resuspendiert, welcher direkt vorher angesetzt worden war (für die Bestandteile s. Tab.2). Die Probe musste dann aufgeteilt werden. Ein Teil, welcher später mit der Ultraschallsonde behandelt werden sollte, wurde bei -20°C eingefroren. Die zweite Hälfte der Probe wurde 30 min auf Eis gelagert und dann bei maximaler Geschwindigkeit (13200 rpm) 30 min zentrifugiert. Der Überstand, also das entstandene Lysat, wurde ebenfalls in ein E-Cup überführt und bei -20°C eingefroren. Somit waren von jedem Versuch die drei oben genannten verschiedenartigen Proben-Bestandteile vorhanden.

Der ELISA Vorversuch ergab, dass das meiste Kollagen I in dem Überstand zu messen war. Der Kollagenanteil in den Zellen wurde zum größten Teil durch die Anwendung des Lysispuffers freigesetzt. Infolgedessen wurden die Proben für die

ELISAs der Hauptversuche dem hGF-Kultur-Überstand und dem Lysat der Zellen entnommen.

Tabelle 2: Inhalt des Lysis-Puffers sowie Anwendungsgebiet der einzelnen Bestandteile

	Inhalt	Anwendung
Lysis-Puffer 5 ml	4740 µl PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)	Bewirkt einen konstanten pH-Wert von 7,4
	10 µl EDTA	Komplexbildner
	250 µl Triton-x-100 10%	Löst Membranproteine aus Membranen heraus
	50 µl PMSF	Ein Protease-Inhibitor, welcher beim Aufschluss der kultivierten Zellen den unerwünschten Proteinabbau durch im Lysat enthaltene Proteasen verhindert

Parallel wurde eine Zellzählung mit dem Cellometer vorgenommen. Jedes Well wurde mit 1 ml PBS gewaschen, welches danach abgesaugt wurde. Die Zellen wurden mit 250 µl Trypsin/EDTA trypsiniert, 10 min inkubiert, mit 250 µl Neutralisierungslösung und anschließend 1 ml Medium in ein Röhrchen überführt. Dieses wurde 5 min bei 250 x g zentrifugiert und das Zellpellet anschließend in 1 ml Medium resuspendiert. Dann wurden zum Zählen 20 µl auf einen Cellometer-Objekträger gegeben.

3.3 Versuchsdurchführung/ Methodik

3.3.1 Zellkultur

3.3.1.1 Auftauen der Zellen

Die in kleinen Behältern aufgeteilten Zellen, die Aliquots, wurden beim Auftauen aus dem flüssigen Stickstoff zunächst für den Transport auf Eis gelagert. Anschließend wurden sie für kurze Zeit in ein 37°C warmes Wasserbad überführt.

Unter der Reinraumwerkbank (Fa. Heraeus, Hannover) wurde unter sterilen Bedingungen die aufgetaute Flüssigkeit in eine 15-ml-Zentrifugenflasche (Fa. greiner-bio-one, Frickenhausen) überführt. Zu den aufgetauten Zellen wurde 10 ml Fibroblastenmedium (Abb. 4) bei einer Temperatur von 37°C hinzugefügt (Inhaltsstoffe siehe Tab. 3).



Abbildung 4: Das Fibroblast Growth Medium von Provitro

Tabelle 3: Inhaltsstoffe des Fibroblast Growth Mediums, welches von Provitro für die humanen Gingivafibroblasten empfohlen wird und regelmäßig ausgetauscht werden musste

Fibroblast Growth Medium	Inhalt	Eigenschaften
Bestell-Nr. 2010401 Provitro GmbH Berlin	10 % FCS (fetales Kälberserum) Optional: 50.00 ng/ml Amphotericin B; 50.00 ng/ml Gentamicin	Steriles Kulturmedium für hGF pH: 7,6

Diese Suspension musste bei Raumtemperatur 5 min bei 250 x g zentrifugiert (Labor-Kühlzentrifuge 2K15C, Sigma, Gelenau) werden.

Unter der Reinraumwerkbank wurde der abzentrifugierte Überstand verworfen und das Zellpellet mit einer Pipette in 10 ml Medium resuspendiert. Dann wurde das Volumen geteilt und in zwei 25-cm²-Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) überführt (je 5 ml). So würde bei versehentlicher Kontamination einer Kulturflasche oder späterer fehlerhafter Abtrypsinierung dessen ungeachtet noch ein Teil der Zellen zur Verfügung stehen. Anschließend wurden die Kulturflaschen in einen Inkubator (Sanyo MCO 17 A mit CO₂, Göttingen) bei +37°C, einem konstanten Stickstoffanteil von 5 %, und gesättigter Luftfeuchtigkeit platziert und kultiviert. Dabei wurden die Schraubdeckel der Flaschen nie vollständig zuge dreht, um einen ungehinderten Gasaustausch zu gewährleisten.

3.3.1.2 Subkultur

Nach dem Auftauen der Zellen musste der erste Kulturmediumwechsel nach 24 Stunden erfolgen, danach noch alle zwei bis drei Tage.

Dafür wurde mit Hilfe einer Vakuumpumpe und sterilen Pasteurpipetten, wie in Abb. 5 ersichtlich, das Medium abgesaugt und durch Frisches ersetzt.

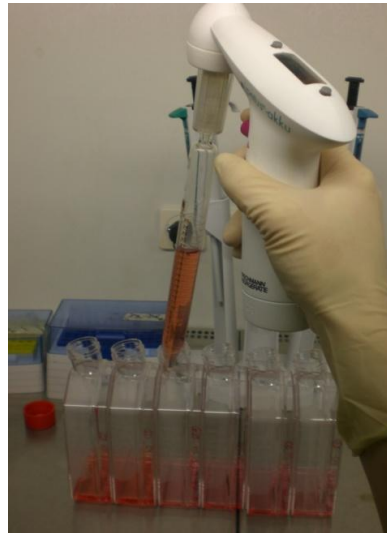


Abbildung 5: Zugabe des Fibroblast Growth Mediums in die Zellkulturflaschen unter der Reinraumwerkbank

Es wurde täglich mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Axiowert 35, Zeiss, Oberkochen) kontrolliert, ob die Zellen auf der Kunststoffoberfläche der Kulturflaschen anhafteten. Es wurde überprüft, wie weit ihre Konfluenz fortgeschritten war, das heißt, inwieweit die Zellen schon zusammengewachsen waren und miteinander in Kontakt standen. Wenn die hGF eine Konfluenz von 70-80 % erreicht hatten, also 70-80 % des Flaschenbodens von ihnen bedeckt war, mussten sie umgesetzt werden, da es sonst zu einer Kontaktinhibition gekommen wäre. Zum Passagieren der Zellkulturen wurde das Passage-Kit 2 benutzt, dessen Bestandteile und Eigenschaften sind in Tab. 4 aufgeführt.

Dazu mussten alle drei Lösungen des Passage-Kits zunächst auf Raumtemperatur gebracht werden. Dann wurde unter der Reinraumwerkbank das Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt, und die hGF mit PBS gewaschen. So wurden auch letzte Reste des Mediums entfernt. Das im Medium enthaltene fetale Kälberserum würde sonst das Trypsin/EDTA neutralisieren und die Wirkung somit inhibieren.

Tabelle 4: Inhalt und Eigenschaften der einzelnen Bestandteile des Passage Kits zum Ablösen und zur weiteren Aussaat der Zellen

	Bestandteile:	Eigenschaften:
Passage-Kit 2 Bestell-Nr. 2040002 Provitro GmbH Berlin	50 ml PBS (Phosphat- gepufferte Kochsalzlö- sung)	Steril; pH: 7,4; bewirkt einen kon- stanten pH-Wert, nicht zytotoxisch
	25 ml Trypsin/ EDTA	Steril; löst adhärenente Zellen vom Boden der Kulturflaschen ab, ver- einzelt Zellen
	25 ml serumfreie Neutra- lisierungslösung	Steril; zum Neutralisieren des Tryp- sins

In die 25-cm²-Zellkulturflaschen wurde 5 ml PBS, in die 75-cm²-Zellkulturflaschen 15 ml PBS pipettiert, wobei die Zellschicht nicht berührt werden durfte. Nachdem die Flaschen 30 s lang geschwenkt worden waren, wurde das PBS abgesaugt und die Zellen je nach Flaschengröße mit 2 bzw. 6 ml Trypsin/EDTA Suspension überschichtet. Anschließend wurden die Flaschen für 4-7 min in den Inkubator gegeben. Direkt danach wurde unter dem Mikroskop sichergestellt, dass alle Zellen abgelöst worden waren. Danach wurde das Trypsin/EDTA mit dem gleichen Volumen, also 2 bzw. 6 ml Neutralisierungslösung inhiert. Die gesamte Suspension wurde dann in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Damit keine Zellen verloren gehen konnten, wurden die Kulturflaschen noch einmal mit 5 ml Medium gespült, welches dann ebenfalls in die Zentrifugenflasche gegeben wurde. Anschließend wurde 5 min bei 250 x g zentrifugiert, unter sterilen Bedingungen der Überstand abgenommen und die Zellen mit Hilfe von sterilen 1-ml-Pipetten (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) in 2 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Nun konnte die Zellzahl bestimmt werden (z.B. mittels Cellometer™) und die Zellen wurden wiederum in mehreren größeren Kulturflaschen ausgesät, mit Kulturmedium aufgefüllt und inkubiert. Bei den 25-cm²-Zellkulturflaschen benötigt man 5 ml Fibroblastenmedium, für die 75-cm²-Zellkulturflaschen stellt man den Zellen mindestens 15 ml Fibroblastenmedium zur Verfügung. Es wird wieder nach 24 Stunden das erste Mal beobachtet, ob die Zellen anhaften und das Kulturmedium ausgetauscht.

3.3.1.3 Aussaat

Wenn die Zellen der Kulturflaschen eine Konfluenz von 70-80 % aufwiesen, konnten sie für die Versuche genutzt werden. Dafür wurden die Zellen wie bei der Subkultivierung zunächst gewaschen, mit Trypsin/EDTA abgelöst, neutralisiert und abzentrifugiert. Mittels Cellometer wurde optisch die Zellzahl bestimmt, anschließend konnte

der Verdünnungsfaktor berechnet und die benötigte Zellsuspension für die Versuchsdurchführung in 12-Well-Platten (Multiwellplatten, Fa. greiner-bio-one, Frickenhausen) ausgesät werden. Dies erfolgte in einer Konzentration von $2 \cdot 10^5$ Zellen pro 1 ml Kulturmedium je Well. Auch in den Wells musste 24 Stunden später lichtmikroskopisch kontrolliert werden, ob die hGF sich an der Oberfläche angehaftet hatten, sowie das Medium ersetzt werden. Dafür wurde pro Well 0,5 ml Kulturmedium samt nicht anhaftenden Zellen unter sterilen Bedingungen abgesaugt und durch 0,5 ml frisches Medium ersetzt.

3.3.1.4 Kryokonservierung

Falls die Anzahl voller Kulturflaschen höher war als der Bedarf, mussten die restlichen Zellen in Aliquots von je 10^6 Zellen pro ml Cryo-Solution-Medium eingefroren werden. Zu diesem Zweck wurden die Zellen wie zuvor zunächst mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA abgelöst und diesmal bei $200 \times g$ 4 min abzentrifugiert. Der Überstand, in diesem Fall die Mischung aus Trypsin/EDTA und Neutralisierungslösung, musste abgenommen und die Zellen in 1 ml kaltem serumfreien Cryo-Medium resuspendiert werden (Inhalt siehe Tab. 5).

Tabelle 5: Inhalt der Cryo-Solution (Provitro, Berlin) zum Einfrieren von hGF

Cryo-Solution	Inhalt	Anwendung
Bestell-Nr. 2040102 Provitro GmbH Berlin Deutschland	DMSO Methyl Cellulose Serumfrei (ohne fetales Kälberserum)	Als Gefrierschutzmittel verhindert es die Bildung von Eiskristallen während des Einfrierprozesses, welche sonst zur Zerstörung von Zellorganellen führen würden.

Gleich darauf wurden sie in vorgekühlte 1,5-ml-Röhrchen überführt und für 24 Stunden in einem Isopropanolbad bei -80°C aufbewahrt, in welchem die Temperatur schrittweise um 1°C pro Minute reduziert wird. Zuletzt wurden sie zur Lagerung in Behälter mit flüssigem Stickstoff gegeben.

3.3.2 Versuchsablauf

Die Ergebnisse der Vorversuche zeigten, dass in dem Überstand der hGF am meisten gebildetes Kollagen vorhanden ist. Daher konnte im Hauptversuch ein direkter Vergleich zwischen Zellzahl und Stoffwechselaktivität jedes einzelnen Wells vorgenommen werden.

Dafür wurden die Zellen nach dem Auftauen und der Anzucht in den Kulturflaschen abgelöst, und mit einer Endkonzentration von $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Milliliter Kulturmedium pro Well in 12-Well-Platten ausgesät.

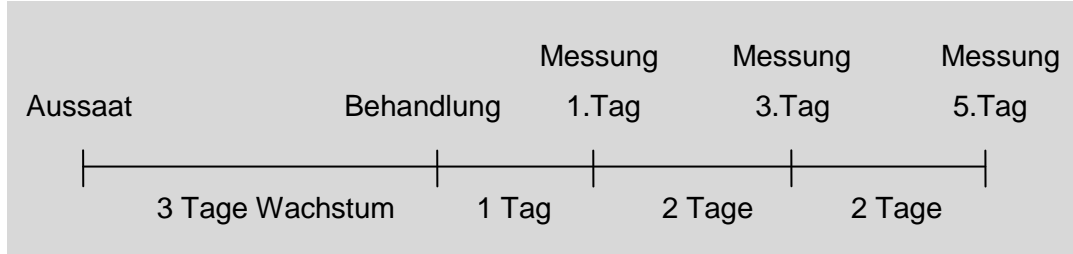


Abbildung 6: Diagramm zur Veranschaulichung des Versuchsverlaufs

24 Stunden später erfolgte der Mediumwechsel (s. Abb. 6). Die Zellen wurden zwei weitere Tage lang kultiviert, während ihre Ausbreitung unter dem Mikroskop (Axiowert 35, Zeiss, Oberkochen) kontrolliert wurde. Am vierten Tag erfolgte die Behandlung der Zellen (siehe Abb. 7) mit den verschiedenen Mundspüllösungen, wobei jeder Versuch in Doppelbestimmung durchgeführt wurde. Bevor die chlorhexidinhaltigen Antiseptika auf die Zellen pipettiert wurden, wurde mit einer sterilen Pasteurpipette das Kulturmedium abgenommen. Es wurde dann mit einer 0,12 % und einer 0,2 % chlorhexidinhaltigen Mundspüllösung behandelt. Die Lösung wirkte jeweils einmal 1 min und einmal 5 min lang auf die Zellen ein. Zur Kontrolle wurden für jeden Messtag zwei Wells ausschließlich mit PBS gespült. Anschließend wurden die Wells zweimal mit je 1 ml PBS gespült und den hGF je Well wieder 1 ml Medium zugesetzt.

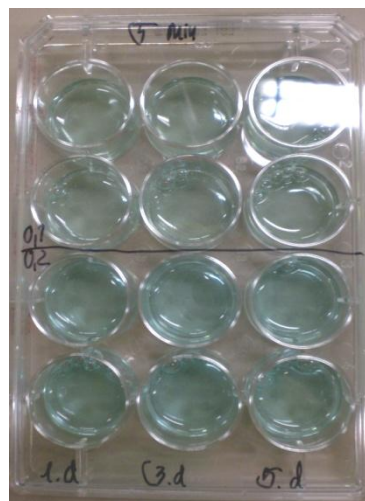


Abbildung 7: Beispielhafte Anzeichnung einer mit Curasept pipettierten 12-Well-Platte, bei welcher die Curasept Lösung 5 Minuten einwirkte

Nun erfolgte das Ausmessen nach 1 Tag, 3 und 5 Tagen. Zur Bestimmung der Zytotoxizität der chlorhexidinhaltigen Mundspüllösungen wurde zum einen mit einem ELISA der noch vorhandene Stoffwechsel der hGF beurteilt, das heißt, ob die Zellen nach der Behandlung noch in der Lage waren Kollagen zu bilden. Des Weiteren wurde mit der optischen Zellzählung im Cellometer™ Auto T4 die Zellzahl ermittelt. Aufgrund der aufeinanderfolgenden Messtage konnte beurteilt werden, ob die Zellen sich wieder erholen, bzw. ob sie ihren Stoffwechsel wieder aufnehmen.

3.3.2.1 Mikroskopische Kontrolle der hGF

Zusätzlich wurden die Zellen an allen Tagen unter einem Auflichtmikroskop (Axiowert 35 von Zeiss) kontrolliert; zu Anfang um die Konfluenz der Zellen zu bestimmen, das heißt, ob sie schon ausreichend gewachsen waren, und nach der Behandlung, um die Auswirkung der Mundspüllösung auf die Zellen zu beobachten.

3.3.2.2 Optische Zellzahlbestimmung mit dem Cellometer™ Auto T4

Nachdem der Überstand aus den Wells für die ELISAs abgenommen und eingefroren worden war, wurden die hGF für die Zellzahlbestimmung mittels Cellometer™ Auto T4 abgelöst. Die Zellen jedes Wells wurden mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend abgesaugt. Die Zellen wurden mit je 200 µl Trypsin/EDTA überschichtet, für 5-7 min bei 5 % CO₂, einer Temperatur von 37°C und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend musste lichtmikroskopisch die Ablösung kontrolliert werden. Danach wurde mit je 200 µl Neutralisierungslösung das Trypsin/EDTA inhibiert und die Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Wells wurden jeweils noch einmal mit 1 ml Medium gespült und dann bei 250 x g 5 min zentrifugiert. Nachkommend musste der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert werden. Zum Zählen wurden 20 µl Zellsuspension auf einen Cellometer-Objektträger gegeben. Abschließend wurde mittels Mikroskop wieder kontrolliert, ob auch sämtliche Fibroblasten aus dem Well entfernt worden waren.

Bei dem Cellometer™ Auto T4 handelt es sich um ein bildbasiertes automatisches Zellzählssystem. Gleichzeitig wird die Anzahl der lebenden Zellen von der Gesamtzellzahl (Viabilität) mit Hilfe der Trypanblau-Färbung und der mittlere Zelldurchmesser der Zellen bestimmt. Durch Angabe des Verdünnungsfaktors wird die Zellkonzentration automatisch berechnet. Außerdem muss der Zelltyp gewählt werden, damit die Zellzählung mit einer hohen Reproduzierbarkeit und Genauigkeit durchgeführt werden kann.

Für den Ablauf wurde zunächst der Computer (DELL, Fa. Molecular Devices, USA, California) und das Cellometer™ Auto T4 eingeschaltet und der Cellometer Objektträger platziert (siehe Abb. 8 und 9). In das Programm wurde der Verdünnungsfaktor „1“, der Zelltyp „humane Gingivafibroblasten“ und ein Zelldurchmesser von 10–50 µm eingegeben. Daraufhin erstellte der Computer ein Bild, auf dessen Grundlage die Daten gewonnen wurden.

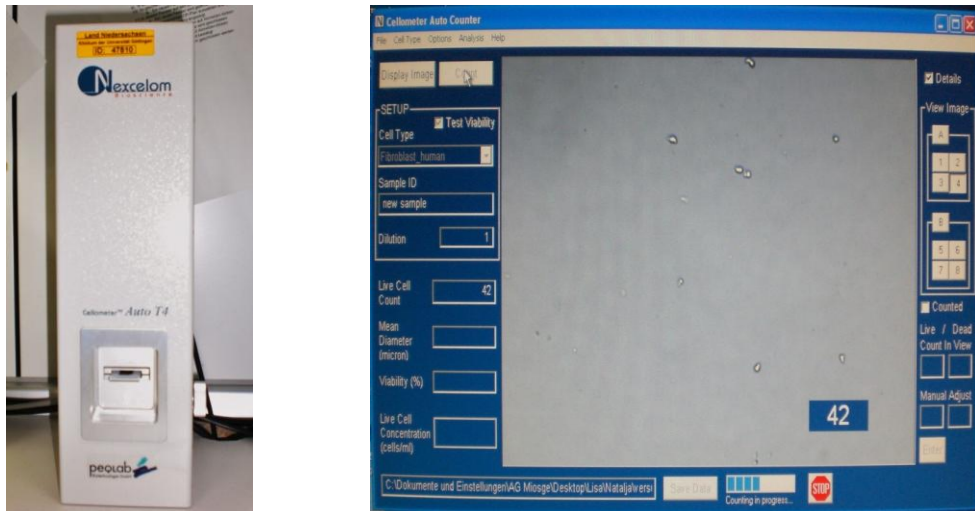


Abbildung 8 und 9: Cellometer™ Auto T4 von Nexcelom sowie die Oberfläche des Programms, mit welchem die hGF optisch ausgezählt wurden

Wenn die Zellzahl zu gering war, konnte das Cellometer diese nicht erfassen. In diesem Fall musste mit einer Neubauer-Zählkammer (Fa. Brand, Wertheim) gezählt werden. Dafür wurden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden nun die Zellen in den vier großen Quadranten ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Dieser musste mit der Zellsuspension-Ausgangsmenge und dem Verdünnungsfaktor 0,5 multipliziert werden. Das Ergebnis wurde durch 100 geteilt und man erhielt die Gesamtzellzahl in 10⁶.

3.3.2.3 ELISA-Test

Bei dem ELISA handelte es sich um ein kommerziell zu erwerbendes Produkt von der Firma Takara, das Procollagen Type I C-Peptide EIA Kit (siehe Tab. 6).

Tabelle 6: Inhalt und einzelne Anwendungsgebiete des Prokollagen Typ I c-Peptide EIA Kit zum Kollagennachweis

Procollagen Type I C-Peptide EIA Kit	Inhalt	Anwendung
Bestell-Nr. MK101 LOT No: 171 TAKARA BIO INC. Tokyo Japan	Collagen coated microtiter plate	Monoklonale anti-PIP Antikörper haften auf der Platte
	Antikörper-POD Konjugat	Lyophilized horseradish peroxidase (POD) konjugiert mit PIP-Antikörpern
	Kollagen Standard	PIP Standard
	Sample Diluent	Verdünnungslösung für Proben und Standards
	Substrate Solution	Hydrogen Peroxide und Tetramethylbenzidine
	Washing Buffer	Um nicht gebundene Antikörper abzuwaschen
	Stop Solution	Stoppt die Reaktion

Während der verschiedenen Messtage wurden die Samples für die ELISA-Platten gesammelt und eingefroren. Dabei wurde jeweils der Zellüberstand entnommen und in ein auf Eis gelagertes E-Cup (Eppendorf-Cup, Fa. Eppendorf, Hamburg) überführt. Nach der Cellometer-Messung wurden die Zellen wie im Vorversuch mit einem Lysispuffer behandelt. Hierfür wurde das Zellpellet in 500 Mikroliter PBS resuspendiert, die Zellsuspension in ein auf Eis stehendes E-Cup überführt und erneut mit 500 Mikroliter PBS die restlichen Zellen aufgenommen. Folgend wurden diese bei 650 g (=2000 rpm) und 4°C 10 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 250 µl Lysispuffer resuspendiert. Im Anschluss wurde die Suspension 30 min auf Eis gelagert. Danach erfolgte das Zentrifugieren für 30 min bei maximaler Geschwindigkeit. Der entstandene Überstand, das Lysat, wurde ebenfalls in einem E-Cup bei -20°C eingefroren.

Die ELISAs wurden durchgeführt, als alle Versuche mit den hGF abgeschlossen waren, dies musste nicht mehr unter der Reinraumwerkbank verrichtet werden.

Kollagen wird zunächst als Prokollagen synthetisiert. Dieses enthält sogenannte Propeptide am Amino- und Carboxy-Ende, welche später bei der Triple-Helix Bildung abgespalten werden. Mit diesem Enzym-Immunoassay kann die Menge der abgespaltenen, freien Propeptide (PIP) gemessen werden, welche stöchiometrisch die Menge an synthetisiertem Kollagen widerspiegelt.

Bei dem Procollagen Type I C-Peptide EIA handelt es sich um einen ELISA der Sandwich-Methode. Hierbei befindet sich der spezifische Antikörper für die Propeptide fest gebunden auf 96-well-Platten. Man gibt die Probe, das Antigen, und einen

weiteren Antikörper hinzu, welcher eine Peroxidase gebunden hat. Bei stattfindender Reaktion (also Vorhandensein von Propeptiden in der Probe) wandelt die Peroxidase unter Zugabe des Substrats dieses in einen Farbstoff um. Photometrisch kann daraufhin die Absorption festgestellt werden.

Vorbereitend mussten anfangs die gesammelten Samples und das ELISA Kit aufgetaut und auf Raumtemperatur gebracht werden. Kurz vor Beginn des Versuchs wurden die benötigten Lösungen angesetzt. Dazu gehörte das Antibody-POD-Conjugate, welches in 11 ml destilliertem Wasser 10 min unter langsamem Rollen und Vermeiden von Schaumbildung aufgelöst wurde. Wenn im Experiment gebildetes Prokollagen vorhanden war, band das Antibody-POD-Conjugate an dessen Propeptide. Außerdem musste für die spätere Standardkurve eine Standard Solution wie in Tabelle 7 aufgeführt, angemischt werden.

Tabelle 7: Verdünnungsreihe der Prokollagen-Standards für die spätere Standardkurve, anhand welcher die in der Probe vorhandene Menge Prokollagens ablesbar ist

Standards	1	2	3	4	5	6	7	8
Konzentration [ng/ml]	0	10	20	40	80	160	320	640
Sample Diluent (4) [µl]	400	393,7 5	387,5	375	350	300	200	-
Standard Solution (3) [µl]	-	6,25	12,5	25	50	100	200	400

Anhand dieser Standardkurve konnte die existente Prokollagenmenge abgelesen werden. Dazu wurde zunächst der Kollagen-Standard in 1 ml destilliertem Wasser bei 10 min langsamen Rollens aufgelöst, danach lag eine Konzentration von 640 ng/ml vor. Nachkommend wurde die entstandene Lösung mit dem Sample Diluent verdünnt um die acht Standards zu erhalten.

Des Weiteren musste eine Stop Solution angesetzt werden. Dafür wurde 5,8 ml konzentriertes H₂SO₄ zu 180 ml Aqua dest. gegeben und bis zu einem Volumen von 200 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und vermengt.

Nachdem sämtliche Vorbereitungen getroffen worden waren, wurde für die immunologische Reaktion 100 µl Antibody-POD-Conjugate in jedes Well pipettiert. Sofort danach wurde 20 µl Standard Solution für die Standardkurve oder 20 µl aus einer Probe hinzugegeben. Es musste jeweils eine Probe des Fibroblast Growth Medium als „Blank“ pipettiert werden. Das Fibroblastenmedium enthält fetales Kälber-Serum, welches ebenfalls ein Protein ist, und die Ergebnisse verfälschen könnte. Daher musste der „Blank“ später bei der Zellüberstand-Probenmessung abgezogen wer-

den. Die ELISA-Platte wurde leicht mit einem Plate-Mixer geschüttelt, mit einer Folie abgedichtet und 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Antibody-POD-Conjugate-Proben-Mischung abgesaugt und die Wells viermal mit je 400 µl PBS gewaschen. Zwischen den Waschvorgängen und nach dem letzten Mal wurde die Platte auf einem Papiertuch ausgeklopft. Anschließend wurde in jedes Well 100 µl Substratlösung pipettiert und die Platte 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurde je Well 100 µl Stopplösung hinzugegeben und die Platte vorsichtig zum Mixen geklopft. Ab diesem Zeitpunkt musste sie vor Licht geschützt werden und war bei Raumtemperatur bis zu eine Stunde im Plattenphotometer (Spectramax M2 mit Software SoftMax® Pro) bei einer Wellenlänge von 450 nm messbar. Mit den gemessenen Standard-Werten wurde am Computer eine Standardkurve generiert. An dieser konnten die gemessenen Absorptionswerte der Proben abgelesen werden, welche somit die Menge des gebildeten Procollagen Type I in ng/ml repräsentierten.

3.4 Statistische Auswertungen

Für die statistischen Auswertungen erfolgte eine biometrische Beratung im Institut für Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen. Die Auswirkung der chlorhexidinhaltigen Mundspüllösung auf die Mundschleimhautfibroblasten wurde mittels einer dreifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) geprüft um folgende Fragen zu untersuchen:

1. Gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen den Mundspüllösung-Konzentration-Einwirkzeit-Kombinationen in Abhängigkeit der unterschiedlichen Messtage hinsichtlich produziertem Kollagen und Zellzahl?
2. Oder liegen Wechselwirkungen zwischen den Mundspüllösung-Konzentration-Einwirkzeit-Kombinationen in Abhängigkeit der unterschiedlichen Messtage vor?
3. Werden die Zellen durch CHX irreversibel geschädigt, erkennbar in verringerter Kollagensynthese und Zellzahlrückgang oder kommt es im Verlauf der unterschiedlichen Messtage zu einer Regeneration und Wiederaufnahme des Stoffwechsels?

Für die statistische Auswertung wurden die Ergebnisse zunächst in Prozente umgewandelt, also in Bezug zum Ausgangszustand gesetzt sowie logarithmiert, da davon ausgegangen wird, dass das Zellwachstum exponentiell verläuft. Dann wurde zunächst mit allen Daten eine dreifaktorielle Varianzanalyse, ANOVA, durchgeführt

und dabei untersucht, ob es eine signifikante Mittelwertdifferenz zwischen den Mundspüllösung-Einwirkzeit-Kombinationen an den unterschiedlichen Messtagen gab. Kam es zu Wechselwirkungen (p -Werte $< 0,05$) wurde der interagierende Faktor heraus genommen und eine zweifaktorielle ANOVA durchgeführt. Die graphischen Darstellungen der gemittelten Ergebnisse der Kollagen und Zellzahl-Messungen wurden mit Hilfe von STATISTIKA (Version 9) und Microsoft Excel 2007 erzeugt. Lagen signifikante Unterschiede vor, wurden in multiplen T-Tests die Mittelwerte noch einmal direkt miteinander verglichen. Bei diesen wurden die p -Werte nach Bonferroni adjustiert. Die Analysen wurden mit SAS (Version 9.1, SAS Institute) durchgeführt, dabei wurde als Signifikanzniveau für alle Tests $\alpha = 5\%$ festgelegt. Um eine mögliche Korrelation der Werte aus der Zellzahlmessung und des ELISAs festzustellen, wurde mit Statistika eine Korrelationsanalyse durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Übersicht

Im folgenden Kapitel werden zunächst exemplarisch mikroskopische Bilder der hGF dargestellt. Folgend werden die Resultate der Cellometer- und Kollagen-Messung zusammengefasst und abgebildet. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgt neben Säulen- und Verlaufsdiagrammen mittels Boxplots. Auf der Ordinate ist jeweils der Kollagenanteil bzw. die Fibroblasten-Zellzahl, auf der Abszisse der entsprechende Messtag, Einwirkzeit oder Spüllösung aufgetragen.

4.2 Mikroskopische Kontrolle

Die hGF wurden regelmäßig unter dem Auflichtmikroskop erfasst. Zunächst musste festgestellt werden, ob die Zellen schon eine ausreichende Konfluenz erreicht hatten, um sie mit der Mundspüllösung zu behandeln. Dabei waren anfangs nach der Aussaat nur einzelne Zellen zu sehen (Abb. 10), welche für die Versuchsdurchführung jedoch eine Monolayer-Struktur ausbilden sollten (Abb. 11).

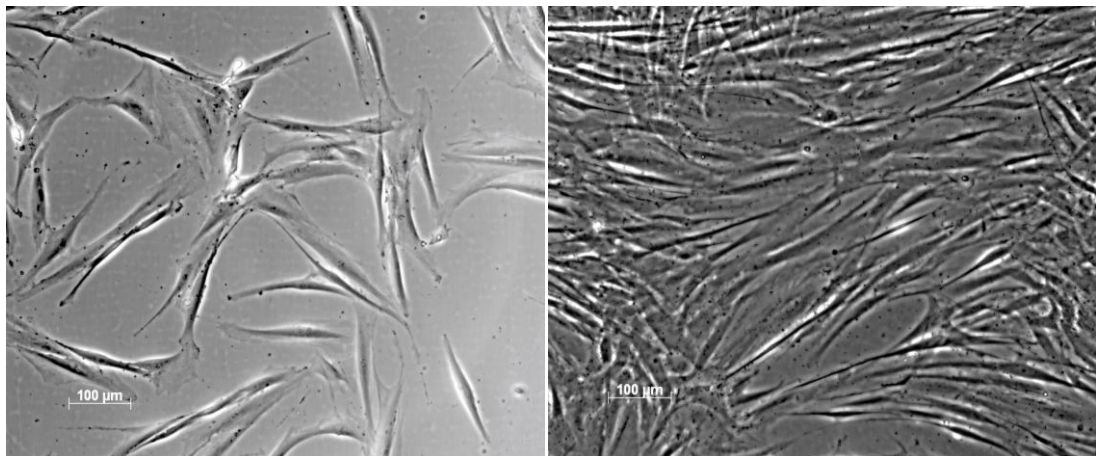


Abb. 10: Mikroskopisches Bild: Einzelne humane Gingivafibroblasten 2 Tage nach Aussaat

Abb. 11: Mikroskopisches Bild: Humane Gingivafibroblasten konfluent gewachsen

Nach der Behandlung konnten unterschiedliche Bilder beobachtet werden. Teilweise kam es zu einem kompletten Ablösen der Zellen vom Boden der Well-Platte (Abb. 12).

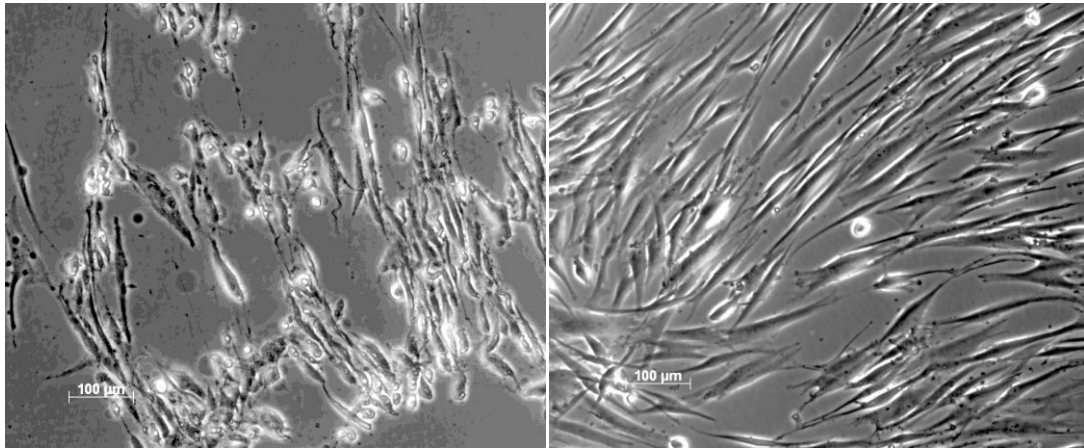


Abb. 12: Mikroskopisches Bild: Abgelöste Fibroblasten aus Versuch 4, 24 Stunden nach der Behandlung mit Curasept 0,2 % CHX für 1 min

Abb. 13: Mikroskopisches Bild: Leicht abgerundete (links im Bild) Fibroblasten aus Versuch 1, 1 Tag nach der Behandlung mit Curasept 0,12 % CHX für 1 min

Bei anderen Versuchen erschienen die hGF in einer leicht abgerundeten Form (s. Abb. 13) oder aber es war nur ein weniger dichter Zellverbund als bei den mit der Kontrolllösung behandelten hGF zu sehen.

Bei der mikroskopischen Kontrolle wurde deutlich, dass die Curasept-Mundspülösung eine Formveränderung bewirkte. Zudem kam es aber auch zu einer Veränderung der Eigenschaften, da die hGF, vielleicht als Resultat, ihre Anhaftung an den Plattenboden verloren.

4.3 Ergebnisse der Zellzahl- und Kollagenmessung

An den verschiedenen Messtagen kam es zu signifikanten Unterschieden bei den Zellzahlen und der Menge des gebildeten Kollagens.

4.3.1 Cellometer-Zellzahl

Tabelle 8 gibt die Mittelwerte der Fibroblasten-Anzahl nach Einwirken der jeweiligen Lösung für die verschiedenen Einwirkzeiten an den Messtagen wieder, in den Abbildungen 14-18 erfolgt die grafische Darstellung.

Tabelle 8: Zellzahl-Mittelwerte [Zellzahl · 10⁵/ml] mit Standardabweichungen aller Mundspüllösungen an allen Messzeitpunkten

Einwirkzeit und Konzentration	Ausgangszustand	Nach 1Tag	Nach 3 Tagen	Nach 5 Tagen
Kontrolle - PBS	1,12 ± 0,15	1,18 ± 0,13	1,46 ± 0,18	1,58 ± 0,16
0,12 % CHX 1 min	1,12 ± 0,15	0,94 ± 0,32	1,31 ± 0,37	1,26 ± 0,54
0,12 % CHX 5 min	1,12 ± 0,15	0,95 ± 0,23	1,01 ± 0,30	1,01 ± 0,45
0,2 % CHX 1 min	1,12 ± 0,15	0,93 ± 0,24	1,06 ± 0,37	0,84 ± 0,59
0,2 % CHX 5 min	1,12 ± 0,15	0,75 ± 0,25	1,05 ± 0,32	0,86 ± 0,62

Die hGF-Zellzahl stieg kontinuierlich an, wenn die Zellen wie in der Kontrollgruppe nur mit PBS gespült wurden. Am Tag der Behandlung waren durchschnittlich 1,12 · 10⁵ Zellen in einem Well messbar, einen Tag später 1,18 · 10⁵/ml, nach drei Tagen ließen sich 1,46 · 10⁵ Zellen in 1 ml registrieren und nach fünf Tagen im Mittel 1,58 · 10⁵/ml.

4.3.1.1 Zellzahlmessung nach einem Tag

Wurden die Zellen mit einer Mundspüllösung behandelt, so wird bei den Mittelwertvergleichen deutlich, dass bei allen CHX-Konzentrationen und Einwirkzeiten 24 Stunden später eine geringere Zellzahl als in der Kontrollgruppe gemessen wurde (siehe Abb. 14).

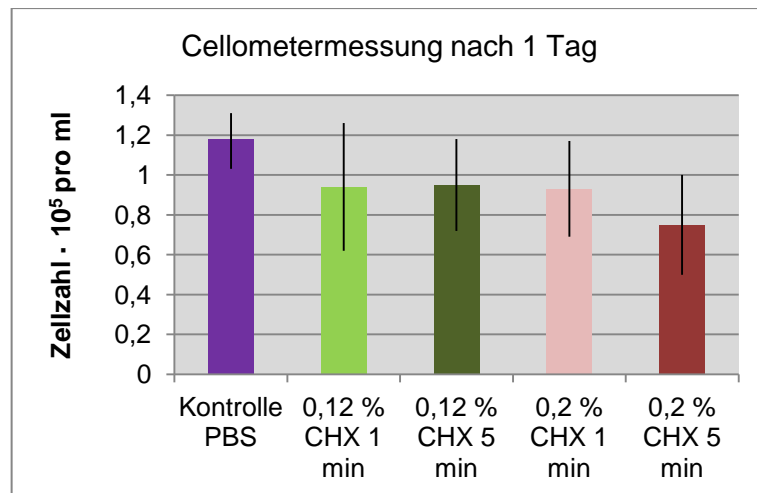


Abbildung 14: Säulendiagramm der mittleren Zellzahlen; Ergebnisse der Cellometer-Messung [Zellzahl · 10⁵/ml] mit Standardabweichung einen Tag nach Behandlung

Wurden die Zellen mit der 0,12%igen CHX-Lösung 1 min lang behandelt, wurde eine durchschnittliche Zellzahl von $0,94 \cdot 10^5$ Zellen/ml erfasst; wurden sie der gleichen Lösung 5 min lang ausgesetzt, waren $0,95 \cdot 10^5$ hGF pro Milliliter messbar. Die Mundspülung mit 0,2 % CHX für 1 oder 5 min bewirkte, dass 24 Stunden nach der Behandlung $0,93$ bzw. $0,75 \cdot 10^5$ Zellen pro Milliliter vorhanden waren.

4.3.1.2 Zellzahlmessung nach drei Tagen

Drei Tage nach der Behandlung der Zellen mit einer Mundspüllösung waren, wie in Abb. 15 dargestellt, bei allen Gruppen wieder etwas mehr Zellen vorhanden.

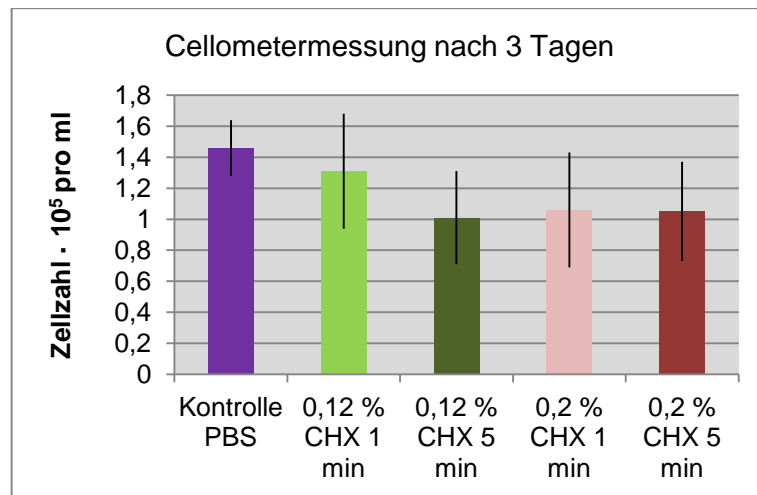


Abbildung 15: Säulendiagramm der mittleren Zellzahlen; Ergebnisse der Cellometermessung [Zellzahl $\cdot 10^5$ /ml] mit Standardabweichung drei Tage nach Behandlung

Bei der Konzentration von 0,12 % CHX für 1 bzw. 5 min waren $1,31$ bzw. $1,01 \cdot 10^5$ hGF/ml messbar. Wurde mit der 0,2%igen CHX-Mundspülung behandelt, waren nach 1 min Einwirkzeit $1,06 \cdot 10^5$ hGF/ml zählbar. Nach einer Einwirkzeit von 5 min konnte eine Konzentration von $1,05 \cdot 10^5$ /ml gemessen werden. Die Kontrollgruppe hat die höchste messbare Zellzahl mit $1,46 \cdot 10^5$ Zellen/ml. Es ist erkennbar, dass nachfolgend die Gruppe, bei welcher mit 0,12 % CHX für 1 min behandelt wurde, mit durchschnittlich $1,31 \cdot 10^5$ hGF/ml, die höchste verbleibenden Zellzahl aufweist.

4.3.1.3 Zellzahlmessung nach fünf Tagen

Im Vergleich zum dritten Tag waren fünf Tage nach der Behandlung bei der 0,2 % CHX enthaltenden Mundspülung für die beiden Einwirkzeiten 1 min und 5 min mit $0,84$ und $0,86 \cdot 10^5$ /ml wieder etwas geringere Zellzahlen zu verzeichnen (Abb. 16).

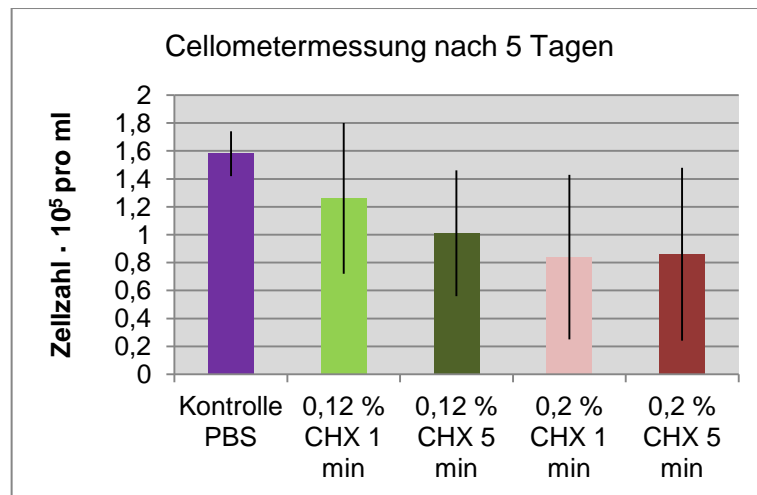


Abbildung 16: Säulendiagramm der mittlere Zellzahlen; Ergebnisse der Cellometermessung [Zellzahl · 10⁵ /ml] mit Standardabweichung 5 Tage nach der Behandlung

Dies war mit $1,26 \cdot 10^5/\text{ml}$ bei der 0,12%igen Lösung, welche 1 min eingewirkt hatte, auch der Fall. Wurden die hGF derselben Lösung 5 min ausgesetzt, änderte sich die durchschnittliche Zellzahl mit $1,01 \cdot 10^5$ Zellen/ml im Vergleich zum dritten Messtag kaum. Obwohl die Zellzahl bei der 0,12%igen Lösung mit 1 min Einwirkzeit im Vergleich zu der Messung zwei Tage zuvor gesunken ist, zeigt sie wieder die geringsten Auswirkungen auf die Zellzahl. Die messbare Zahl von $1,26 \cdot 10^5$ hGF/ml entspricht, nach der Messung der nur mit PBS behandelten Kontroll-Zellen von $1,58 \cdot 10^5$ hGF/ml, dem höchsten Wert.

Augenscheinlich sinkt die Zellzahl nach der Behandlung bei beiden CHX-Konzentrationen und Einwirkzeiten zunächst ab. Nach drei Tagen steigt sie leicht an. Am fünften Tag war die Zellzahl durchschnittlich wieder geringer oder gleich geblieben. Zur Veranschaulichung dieses Verlaufs an den unterschiedlichen Messtagen eignet sich das folgende Diagramm (Abb. 17), bei dem alle Ergebnisse, die Konzentrationen und Einwirkzeiten, zusammengefasst und in Bezug zu der Kontrolllösung gesetzt wurden.

Die Graphik zeigt die Tendenz, dass es 1 Tag nach der Behandlung zunächst zu einem Abfall der Zellzahlen kam. 3 Tage später waren diese wieder etwas höher und 5 Tage nach der Behandlung sanken sie wieder ab. Die Zellzahl der Kontrollgruppe stieg kontinuierlich an.

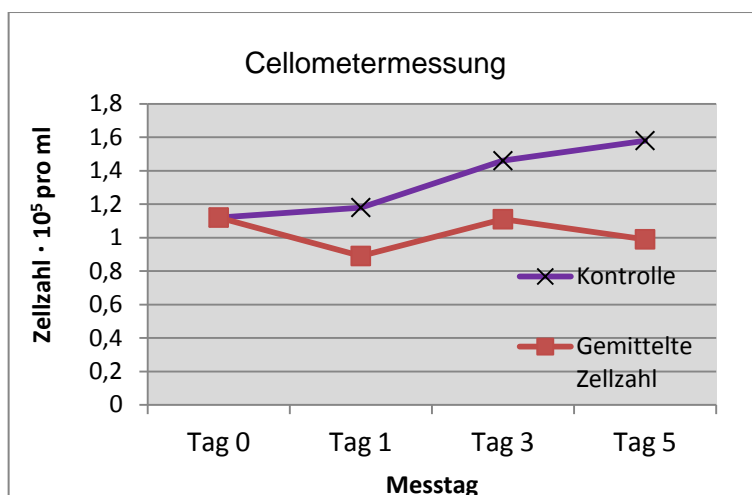


Abbildung 17: Mittlere Zellzahl [Zellzahl · 10⁵/ml] aller Lösungen und Einwirkzeiten in Bezug zu der PBS-Kontrolle an den unterschiedlichen Messtagen

4.3.1.4 Statistische Auswertung

Die Varianzanalyse für die drei Faktoren Messtag, Einwirkzeit und Chlorhexidinkonzentration ergab, dass der Unterschied der Zellzahlen an den verschiedenen Messtagen signifikant ($p=0,04704$) war (s. Tab. 9).

Tabelle 9: P-Werte der statistischen Auswertung der dreifaktoriellen Varianzanalyse der logarithmierten Cellometer-Werte, Signifikanz bei $p < 0,05$

Effekt	p-Wert
Lösung	0,88516
Einwirkzeit	0,36377
Messtag	0,04704
Lösung: Einwirkzeit	0,99828
Wechselwirkung Lösung: Messtag	0,66743
Wechselwirkung Einwirkzeit: Messtag	0,44644
Wechselwirkung Lösung: Einwirkzeit: Messtag	0,94456

Die Einwirkzeit und die Konzentration wirkten sich nicht signifikant auf die Zellzahl aus und eine signifikante Wechselwirkung der Einwirkzeiten oder Chlorhexidinkonzentrationen war ebenfalls nicht festzustellen. Deswegen wurden im Anschluss, unabhängig von der Gruppe, paarweise Vergleiche (T-Tests) der unterschiedlichen Messtage durchgeführt, um aufzuklären, ob dieser Verlauf über alle fünf Tage signifikant war (Tab. 10).

Tabelle 10: T-Tests für die verschiedenen Messtage der Cellometermessung, Signifikanz bei $p < 0,05$

Vergleich zwischen den Messtagen	P-Werte bei Vergleich der mittleren logarithmierten kontrollbezüglichen Cellometerwerte
1:3	< 0,0001
1:5	0,68
3:5	0,02

Dabei zeigte sich ein signifikanter (p -Wert $< 0,0001$ und $0,02$) Unterschied zwischen dem ersten und dritten und dem dritten und fünften Messzeitpunkt (s. Abb. 18).

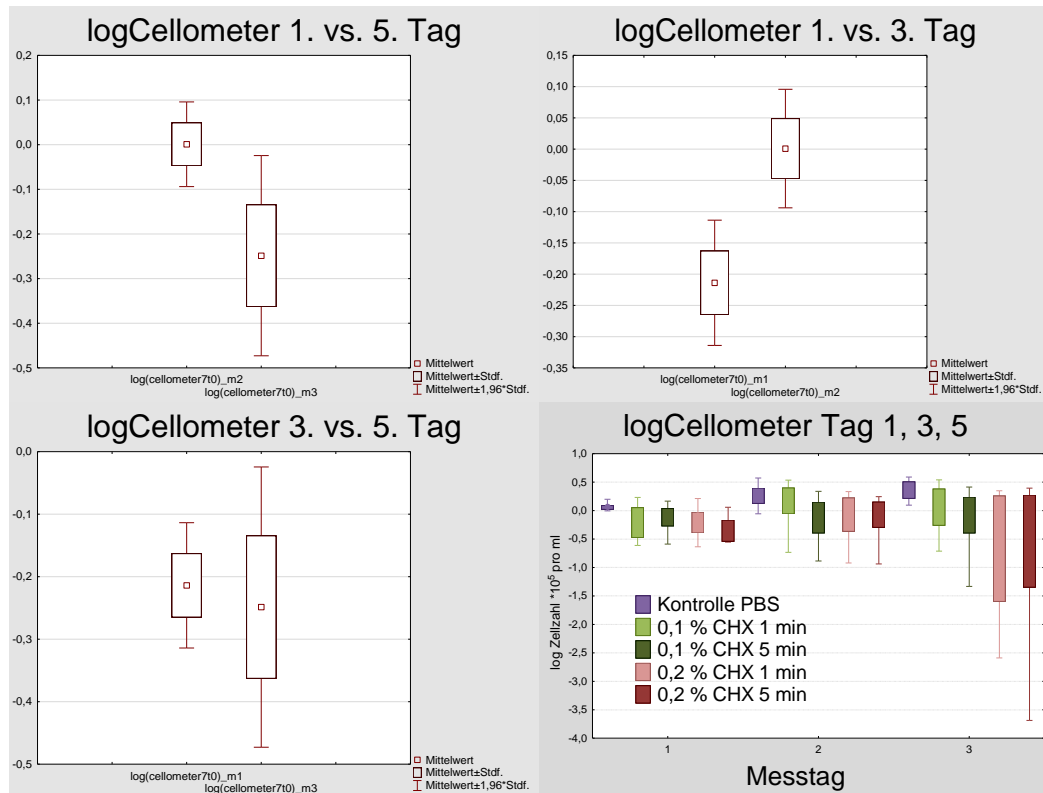


Abbildung 18: Darstellung der T-Tests für die verschiedenen Messtage der Cellometermessung sowie Darstellung aller kontrollbezüglichen logarithmierten Cellometer-Werte aller Mundspüllösung-Einwirkzeit-Kombinationen an den drei Messtagen [$\log \text{Zellzahl} \cdot 10^5/\text{ml}$]

Somit war der Verlauf der Zellzahlen der behandelten Zellen, welche 24 Stunden nach der Spülung abfallen, sich nach 3 Tagen etwas erholen und nach 5 Tagen wieder sinken, signifikant (siehe Abb. 18).

In Abbildung 18 sind unten rechts alle Ergebnisse über die drei Messzeitpunkte mittels Boxplots noch einmal grafisch dargestellt. Hierbei sind für alle Gruppen der direkte Vergleich und auch der Verlauf über die Messtage ersichtlich. Zum einen fällt auf, dass die PBS Spülung jeweils die geringste Auswirkung auf die Zellzahl hatte. Nachfolgend wurde in absteigender Reihenfolge ein fast immer stärkerer reduzierender Effekt nachgewiesen mit 0,12 % CHX mit 1 min Einwirkzeit, dieselbe Lösung mit 5 min Einwirkzeit und 0,2 % CHX mit 1 min Einwirkzeit. Die 0,2%ige CHX-Mundspülung mit 5 min Einwirkzeit bewirkte immer die größte Reduktion der Zellzahl.

Es kann somit die vorsichtige Annahme gemacht werden, dass von den getesteten Lösungen die niedrig konzentrierte 0,12%ige CHX-Mundspüllösung und von den geprüften Einwirkzeiten 1 min die geringsten zytotoxischen Auswirkungen hat. Des Weiteren wird hier bei allen Gruppen der signifikant ($p < 0,0001$) höhere Wert am zweiten Messtag im Vergleich zum ersten sowie der signifikante ($p = 0,02$) Abfall der Mittelwerte von dem zweiten auf den dritten Messtag deutlich.

4.3.2 ELISA-Kollagenmessung

Tabelle 11 gibt die Mittelwerte des gebildeten Kollagens nach Einwirken der jeweiligen Lösung für die verschiedenen Einwirkzeiten an den Messtagen wieder und in den Abb. 19 bis 23 erfolgt die graphische Darstellung.

Tabelle 11: Kollagen-Mittelwerte mit Standardabweichungen [ng Kollagen/ml] aller Mundspüllösungen an allen Mess-Zeitpunkten

Einwirkzeit und Konzentration	Ausgangszustand	Nach 1 Tag	Nach 3 Tagen	Nach 5 Tagen
Kontrolle - PBS	661,23 ± 146,88	639,20 ± 135,98	787,18 ± 121,29	854,50 ± 179,24
0,12 % CHX 1 min	661,23 ± 146,88	314,34 ± 87,38	404,84 ± 152,15	463,83 ± 244,58
0,12 % CHX 5 min	661,23 ± 146,88	332,18 ± 79,99	384,38 ± 114,18	334,72 ± 58,55
0,2 % CHX 1 min	661,23 ± 146,88	314,08 ± 69,56	367,32 ± 110,51	341,43 ± 82,98
0,2 % CHX 5 min	661,23 ± 146,88	306,17 ± 82,03	371,80 ± 110,32	331,71 ± 112,99

Auch das von den hGF gebildete Kollagen stieg in der Kontrollgruppe im zeitlichen Verlauf kontinuierlich an. Am Tag des Versuchs war durchschnittlich 661,23 ng Kollagen/ml in den Wells enthalten. Am ersten Tag nach der Behandlung war durch-

schnittlich 639,20, am dritten 787,18 und am fünften Tag 854,50 ng/ml Kollagen messbar.

4.3.2.1 ELISA-Kollagenmessung nach einem Tag

Wurden die Zellen einer Mundspüllösung ausgesetzt, so wurde bei den multiplen Mittelwertvergleichen deutlich, dass 24 Stunden später bei allen Gruppen weniger Kollagen messbar war als bei der Kontrollgruppe an demselben Messtag nachgewiesen wurde (siehe Abb. 19).

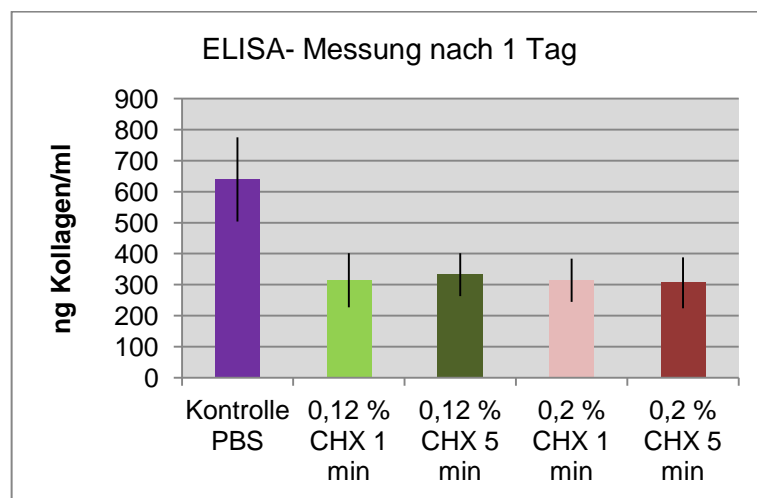


Abbildung 19: Säulendiagramm der Kollagen-Mittelwerte der ELISA-Messung [ng Kollagen/ml] mit Standardabweichungen einen Tag nach der Behandlung

Bei der 0,12%igen CHX-Mundspülung wurde für beiden Einwirkzeiten 1 min und 5 min mit 314,34 und 332,18 ng/ml eine geringere durchschnittliche Kollagenmenge festgestellt als bei der Kontrollgruppe (639,20ng/ml). Dies war ebenfalls mit 314,08 ng/ml bei der 0,2%igen Lösung, welche 1 min eingewirkt hatte sowie bei derselben Mundspülung, welcher die Zellen 5 min lang ausgesetzt worden waren, mit 306,17 ng/ml der Fall.

Nach der Kontrollgruppe wurde die höchste Kollagenmenge von den Zellen, welche mit der niedrig konzentrierten Lösung für 5 min behandelt worden waren, produziert.

4.3.2.2 ELISA-Kollagenmessung nach drei Tagen

Nach drei Tagen konnte, wie in Abb. 20 dargestellt, bei allen Mundspüllösung- und Einwirkzeit-Kombinationen wieder mehr Kollagen gemessen werden, als nach einem Tag, jedoch weiterhin weniger als bei der Kontrolle.

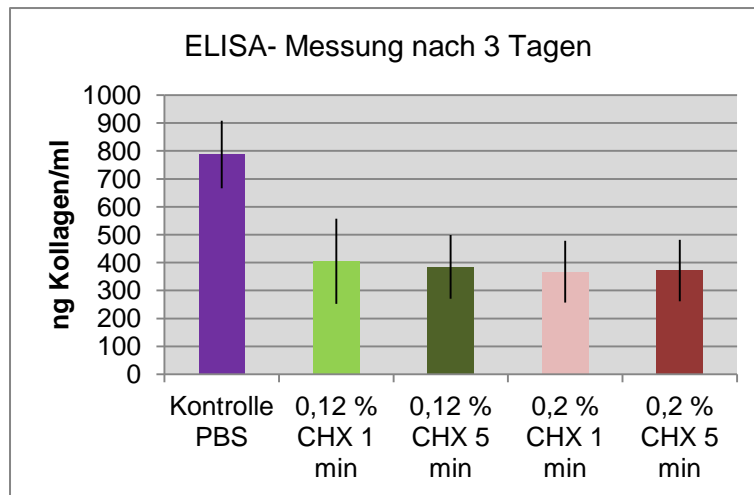


Abbildung 20: Säulendiagramm der Kollagen-Mittelwerte der ELISA-Messung [ng Kollagen/ml] mit Standardabweichungen drei Tage nach der Behandlung

Bei der Konzentration von 0,12 % CHX für 1 bzw. 5 min war durchschnittlich 404,84 bzw. 384,38 ng Kollagen/ml nachweisbar. Wurde mit der 0,2%igen CHX-Mundspülung behandelt, war bei 1 min 367,32 und bei 5 min Einwirkzeit 371,80 ng/ml Kollagen gebildet worden. Es kam also, ähnlich wie bei der gemessenen Zellzahl, am dritten Tag wieder zu einem Anstieg der Werte.

4.3.2.3 ELISA-Kollagenmessung nach fünf Tagen

Nach fünf Tagen war weniger Kollagen messbar als bei den Versuchen, die zwei Tage zuvor gemessen worden waren (siehe Abb. 21).

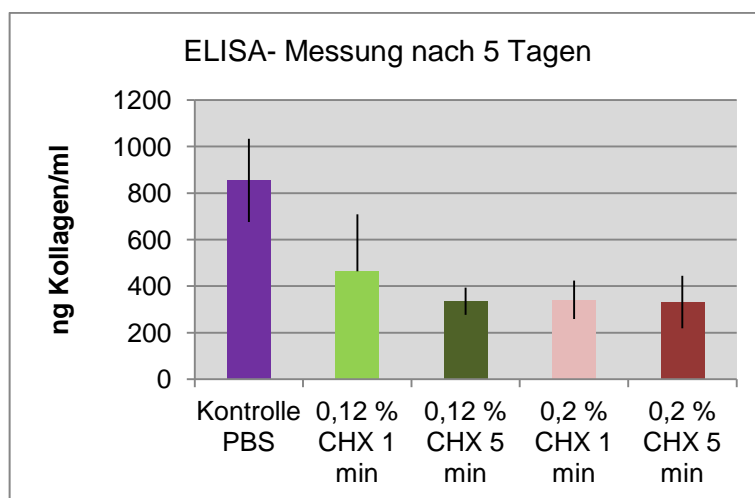


Abbildung 21: Säulendiagramm der Kollagen-Mittelwerte der ELISA-Messung [ng Kollagen/ml] mit Standardabweichungen fünf Tage nach der Behandlung

Eine Ausnahme stellte die Gruppe der 0,12%igen Chlorhexidinlösung, welche 1 min eingewirkt hatte, dar. Der Kollagenanteil war im Vergleich zum dritten Tag weiter angestiegen. Wurden die Zellen mit der 0,12 % CHX enthaltenden Lösung 1 min lang behandelt, wurde fünf Tage später ein Kollagenanteil von 463,83 ng/ml erfasst. Wurden sie der gleichen Lösung 5 min lang ausgesetzt, war dieser mit 334,72 ng/ml geringer. Die Mundspülung mit 0,2 % CHX für 1 und 5 min bewirkte, dass 5 Tage nach der Behandlung nur noch 341,43 bzw. 331,71 ng Kollagen/ml gebildet worden war. Wie am dritten Messtag war der gemessene Wert bei der 0,12 % CHX enthaltenden Lösung für 1 min nach der Kontrollgruppe am höchsten.

Zur Veranschaulichung wurden alle Kollagenwerte gemittelt und in Bezug zu der Kontrolle gesetzt; es entstand ein ähnliches Bild (Abb. 22) wie bei der Cellometermessung.

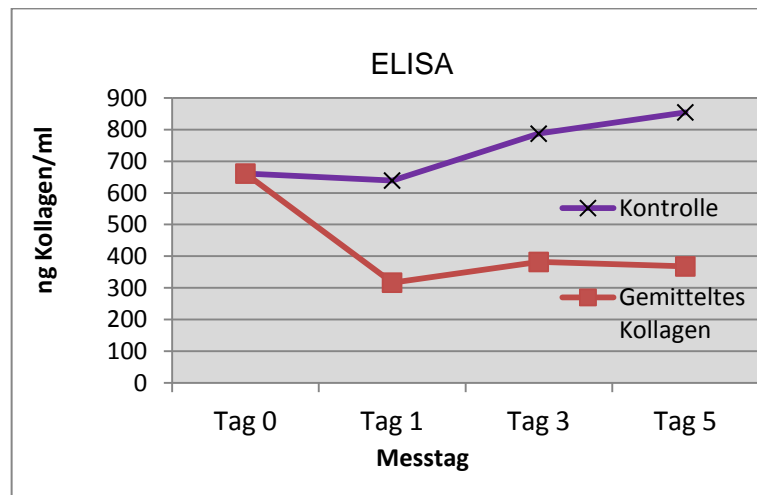


Abbildung 22: Mittlere Kollagenproduktion [ng Kollagen/ml] aller Lösungen und Einwirkzeiten in Bezug zu der PBS-Kontrolle an den unterschiedlichen Messtagen

Im Mittel kam es einen Tag nach der Behandlung zu einem Abfall des gebildeten Kollagens. Drei Tage später war der Wert etwas höher und fünf Tage nach der Behandlung blieb er nahezu gleich. Die hGF hatten fünf Tage nach der Behandlung kein weiteres Kollagen produziert. Es war nur die Menge an Kollagen vorhanden, welche schon innerhalb der ersten drei Tage nach Behandlung gebildet worden war. Bei der Kontrollgruppe kam es zu einem stetigen Anstieg von gebildetem Kollagen.

4.3.2.4 Statistische Auswertung

Bei der dreifaktoriellen ANOVA für die logarithmierten ELISA-Werte war der zeitliche Verlauf, also die Unterschiede zwischen den Messtagen, signifikant ($p=0,00277$). Es kam zu signifikanten Wechselwirkungen zwischen den Einwirkzeiten und Messtagen

($p=0,03600$; s. Tab. 12). Deswegen wurde im Anschluss in einer zweifaktoriellen (Lösung und Messtag) Varianzanalyse nach den unterschiedlichen Einwirkzeiten (1 min und 5 min) aufgetrennt.

Tabelle 12: P-Werte der statistischen Auswertung der dreifaktoriellen Varianzanalyse der logarithmierten ELISA-Werte, Signifikanz bei $p < 0,05$

Effekt	p-Wert
Lösung	0,94309
Einwirkzeit	0,82715
Messtag	0,00277
Lösung: Einwirkzeit	0,99879
Wechselwirkung Lösung: Messtag	0,76674
Wechselwirkung Einwirkzeit: Messtag	0,03600
Wechselwirkung Lösung: Einwirkzeit: Messtag	0,71787

Wenn nach den Einwirkzeiten aufgeteilt wurde, waren für beide Einwirkzeiten, ohne dass Wechselwirkungen auftraten, eine Signifikanz bei den Lösungen und Messtagen vorhanden (s. Tabelle 13).

Tabelle 13: Statistische Auswertungen der zweifaktoriellen ANOVA für die logarithmierten ELISA-Werte, Signifikanz bei $p < 0,05000$

Effekt	p- Wert 1 min Einwirkzeit	p- Wert 5 min Einwirkzeit
Lösung	0,00040	0,00038
Messtag	0,00740	0,01026
Wechselwirkung	0,27907	0,05670

Infolgedessen wurden wegen der hier nachweislich auftretenden Signifikanzen paarweise Vergleiche zwischen den fünf Gruppen (PBS-Kontrolle; 0,12 % CHX 1 min Einwirkzeit; 0,12 % CHX 5 min Einwirkzeit; 0,2 % CHX 1 min Einwirkzeit und 0,2 % CHX 5 min Einwirkzeit) an den einzelnen Messtagen vorgenommen (Tab. 14). Die grafische Darstellung erfolgt in Abbildung 23.

Tabelle 14: P-Werte der statistischen Auswertungen der T-Tests für die logarithmierten ELISA-Werte an den einzelnen Messtagen, Signifikanz bei $p < 0,05$

Vergleich Konzentration-Einwirkzeit-Kombinationen	Nach 1 Tag	Nach 3 Tagen	Nach 5 Tagen
Kontrolle PBS : 0,12 % CHX 1 min	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Kontrolle PBS : 0,12 % CHX 5 min	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Kontrolle PBS : 0,2 % CHX 1 min	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Kontrolle PBS : 0,2 % CHX 5 min	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
0,12 % CHX 1 min : 0,12 % CHX 5 min	0,4410	1,0000	0,1056
0,12 % CHX 1 min : 0,2 % CHX 1 min	1,0000	0,7269	0,1347
0,12 % CHX 1 min : 0,2 % CHX 5 min	1,0000	1,0000	0,0753
0,12 % CHX 5 min : 0,2 % CHX 1 min	0,9603	0,3225	1,0000
0,12 % CHX 5 min : 0,2 % CHX 5 min	0,9810	1,0000	1,0000
0,2 % CHX 1 min : 0,2 % CHX 5 min	1,0000	1,0000	1,0000

Die paarweisen Vergleiche ergaben, dass an allen drei Messtagen jeweils die Werte der Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,0001$) höher waren als die der behandelten Gruppen. Im direkten Vergleich zwischen den verschiedenen CHX-Konzentrationen

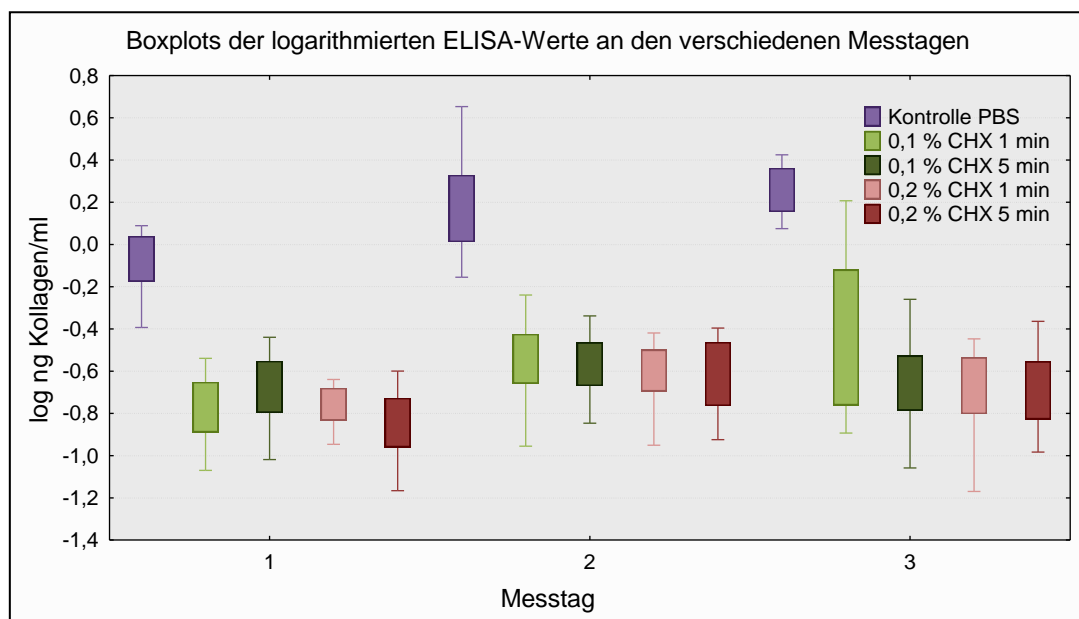


Abbildung 23: Logarithmierte ELISA-Werte kontrollbezüglich aller Mundspüllösung-Einwirkzeit-Kombinationen an den drei Messtagen [log ng Kollagen/ml]

und Einwirkzeiten war kein signifikanter Unterschied festzustellen. Das heißt, die Konzentration der CHX-Lösung und die Länge der Einwirkzeit haben keine statistisch signifikante Auswirkung auf die Menge des produzierten Kollagens.

Weiterhin wurden paarweise Vergleiche innerhalb jeder Konzentration-Einwirkzeit-Kombination zwischen den unterschiedlichen Messtagen vorgenommen. Dieser ergab, dass die mittleren logarithmierten Kollagen-Werte der Kontrollgruppe am fünften Messtag signifikant ($p=0,0092$) höher waren, als am ersten Messtag. Der Unterschied zum dritten und zwischen dem dritten und fünften Messtag war nicht signifikant ($0,0981$ und $0,6898$).

Bei Betrachtung der mit den Lösungen für 1 min behandelten Zellen waren die Werte im zeitlichen Verlauf nur teilweise signifikant unterschiedlich. Nur bei zwei Gruppen war am dritten Messtag signifikant mehr Kollagen gebildet worden, als noch nach 24 Stunden. Dies war die Gruppe der 1-minütigen Einwirkzeit der 0,12%igen Lösung ($p=0,0336$) und die der 5-minütigen Einwirkzeit der 0,2%igen Lösung ($p=0,0325$). Bei den anderen Lösung- und Einwirkzeit-Kombinationen war im Verlauf der Tage kein signifikanter Unterschied feststellbar. Nur bei diesen beiden Gruppen hatte sich die Kollagenproduktion drei Tage nach der Behandlung signifikant erholt.

4.4 Vergleich der unterschiedlichen Konzentrationen und Einwirkzeiten

In der obigen Betrachtung der Daten über die drei verschiedenen Messtage ist kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei CHX-Konzentrationen und den beiden Einwirkzeiten festzustellen. Lediglich bei der Kollagenproduktion ist an allen drei Mess-Zeitpunkten der Wert der Kontrollgruppe signifikant höher, als der der behandelten Zellen.

Es zeigte sich jedoch, dass die höhere CHX-Konzentration und die längere Einwirkzeit sich jeweils mehr auf die hGF auswirkten, als die jeweilig Niedrigere. Zur Verdeutlichung wurden einmal, unabhängig vom Tag der Messung, nur die Mittelwerte der Einwirkzeiten und der Lösungen untereinander verglichen. Es zeigte sich, dass die nur 0,12 % CHX enthaltende Curasept-Lösung, welche für 1 min angewandt wurde, immer den geringsten Einfluss auf die Zellzahl und die Kollagenproduktion hatte. Im Mittelwertvergleich hat die 0,2 % CHX enthaltende Curasept-Lösung, welche 5 min auf die Zellen gewirkt hatte, immer den größten Zellzahl reduzierenden Effekt, auch die Kollagenproduktion war am stärksten reduziert. Siehe Tabelle 15 und 16.

Tabelle 15: Mittelwerte aller Ergebnisse der Kollagen- und Zellzahlmessung, nach Einwirkzeit sortiert

Einwirkzeit	Zellzahl-Mittelwerte mit Standardabweichungen [Zellzahl · 10 ⁵ /ml]	Kollagen-Mittelwerte mit Standardabweichungen [ng Kollagen/ml]
Kontrolle PBS	1,41 ± 0,23	760,30 ± 169,85
1 min	1,06 ± 0,44	367,64 ± 143,61
5 min	0,94 ± 0,39	343,51 ± 95,70

Im Gegensatz zu der Kontrolle, bei der im Mittel über alle Tage $1,41 \pm 0,23 \cdot 10^5$ Zellen/ml vorlagen und $760,30 \pm 169,85$ ng Kollagen/ml gebildet wurde, ließen sich bei den für 1 min einer CHX-haltigen Mundspülung ausgesetzten hGF verringerte Werte von lediglich $1,06 \pm 0,44 \cdot 10^5$ mittlere Zellzahl/ml und $367,64 \pm 143,61$ ng Kollagen/ml feststellen. Wenn 5 min lang behandelt wurde, waren die Werte mit durchschnittlich $0,94 \pm 0,39 \cdot 10^5$ /ml bzw. $343,51 \pm 95,70$ ng/ml am geringsten. Dies wird auch in Abbildung 24 und 25 ersichtlich.

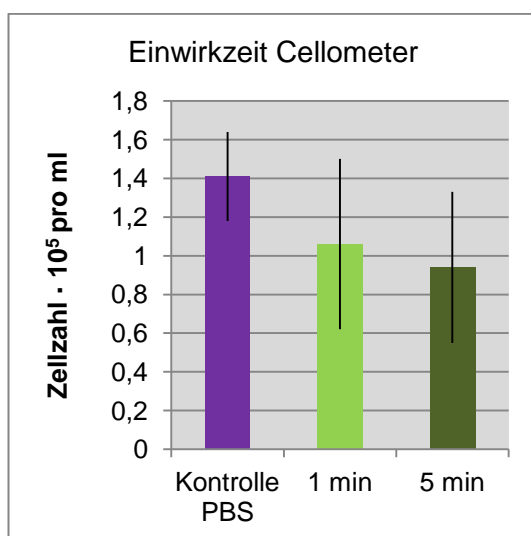


Abb. 24 Einfluss der Einwirkzeit der CHX-Mundspüllösung auf die Zellzahl [Zellzahl · 10⁵/ml]

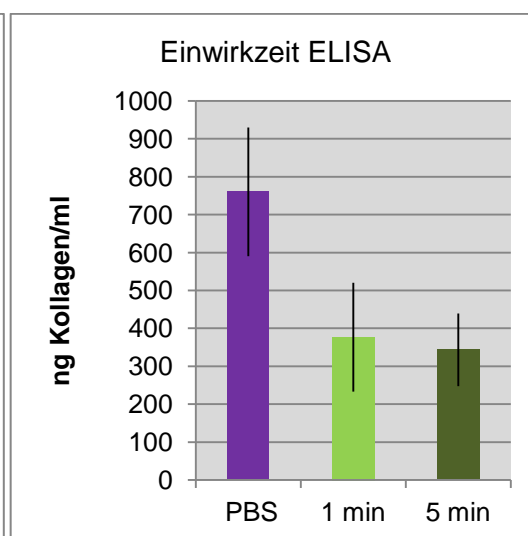


Abb. 25 Einfluss der Einwirkzeit der CHX-Mundspüllösung auf die Kollagenproduktion [ng Kollagen/ml]

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der Untersuchung der über alle Tage gemittelten Zellzahl- und Kollagen-Werte der unterschiedlichen CHX-Konzentrationen in Tabelle 16.

Tabelle16: Mittelwerte aller Ergebnisse der Kollagen- und die Zellzahlmessung, nach Lösung sortiert

Lösung	Zellzahl-Mittelwerte mit Standardabweichungen [Zellzahl · 10 ⁵ /ml]	Kollagen-Mittelwerte mit Standardabweichungen [ng Kollagen/ml]
Kontrolle PBS	1,41 ± 0,23	760,30 ± 169,85
0,12 % CHX	1,08 ± 0,42	372,38 ± 122,81
0,2 % CHX	0,92 ± 0,40	338,75 ± 94,73

Anders als bei der PBS-Spülung, bei der im Mittel über alle Tage $1,41 \pm 0,23 \cdot 10^5$ Zellen/ml vorlagen und $760,30 \pm 169,85$ ng Kollagen/ml gebildet wurde, ließen sich bei den mit einer Curasept-Lösung behandelten Zellen niedrigere Werte feststellen. Wenn die hGF einer 0,12%igen CHX-haltigen Mundspülung ausgesetzt worden waren, ließen sich reduzierte Werte von $1,08 \pm 0,42 \cdot 10^5$ mittlere Zellzahl/ml und durchschnittlich $372,38 \pm 122,81$ ng Kollagen/ml messen. War mit der höher konzentrierten 0,2%igen CHX-haltigen Lösung gespült worden, waren die Werte mit $0,92 \pm 0,40 \cdot 10^5$ /ml bzw. $338,75 \pm 94,73$ ng/ml Kollagen am geringsten. Dies ist in Abbildung 26 und 27 grafisch dargestellt.

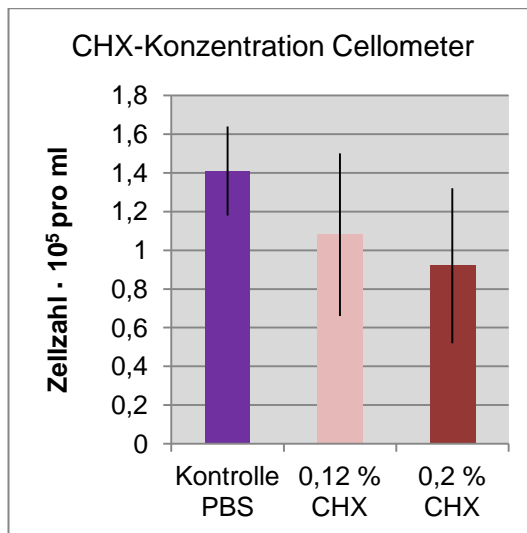


Abb. 26: Einfluss der CHX-Konzentration der CHX-Mundspüllösung auf die Zellzahl [Zellzahl · 10⁵/ml]

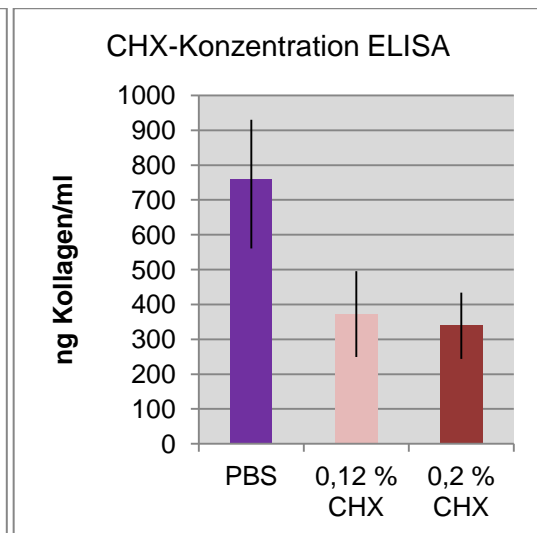


Abb. 27: Einfluss der CHX-Konzentration der CHX-Mundspüllösung auf die Kollagenproduktion [ng Kollagen/ml]

Allerdings zeigen diese dargestellten Mittelwerte nur einen Trend, da sich die Konzentrationen und Einwirkzeiten an den einzelnen Tagen nicht signifikant voneinander unterscheiden.

4.5 Vergleich von Cellometermessung und ELISA

Für die beiden in dieser Studie angewandten Methoden wurden Korrelationsberechnungen (siehe Tabelle 17) durchgeführt.

Tabelle 17: p-, r- und r²-Werte der Korrelationsanalyse, signifikante Korrelation bei p < 0,05

	Korrelationskoeffizient r	Signifikanzwert p	Bestimmtheitsmaß r ²
Nach 1 Tag	0,304	0,018	0,092
Nach 3 Tagen	0,338	0,008	0,114
Nach 5 Tagen	0,448	<0,0001	0,201
Alle Werte	0,384	<0,0001	0,147

Es wurde mit Statistika für jeden einzelnen Messtag und ebenfalls für alle Messtage eine Analyse der logarithmierten Werte der Kollagenmessung und der Zellzahlen vorgenommen.

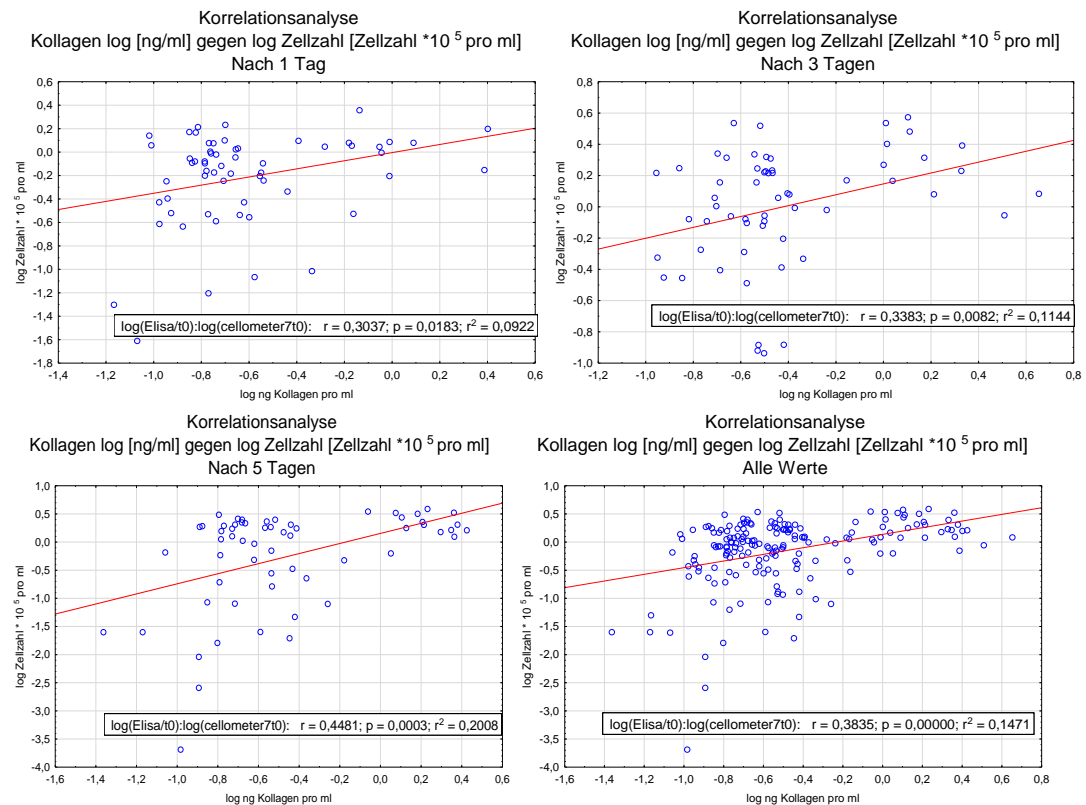


Abbildung 28: Korrelationsbestimmung zwischen der Kollagenmessung mittels ELISA und der Zellzahlbestimmung mit dem Cellometer™ Auto T4; für jeden einzelnen und für alle Werte

Zwischen beiden Methoden wurde für jeden Messtag, aber auch insgesamt ein signifikanter positiver Zusammenhang ermittelt, da $p \leq 0,05$ und r (= der Korrelationskoeffizient) größer als 0 ist (Abb. 28).

4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

4.6.1 Der zeitliche Verlauf der unterschiedlichen Messtage

Im zeitlichen Verlauf der drei Messzeitpunkte:

- Bei der Kontrollgruppe kam es vom Tag der Behandlung bis fünf Tage danach zu einem kontinuierlichen Anstieg der Zahl lebender Zellen und des gebildeten Kollagens.
- Die Zellzahlen der behandelten Fibroblasten waren einen Tag nach dem Spülen niedriger als die Ausgangszahlen, nach drei Tagen signifikant angestiegen und nach fünf Tagen signifikant gesunken.
- Die gebildeten Kollagenmengen der behandelten Fibroblasten waren einen Tag nach dem Spülen niedriger als die Ausgangszahlen, nach drei Tagen angestiegen und nach fünf Tagen gleich geblieben.
- Bei dem ELISA war bei einzelnen Lösungen (0,12 % CHX für 1 min und bei 0,2 % CHX für 5 min) der Unterschied, also der Anstieg, zwischen dem ersten und dritten Messtag signifikant.

4.6.2 Vergleich der unterschiedlichen Konzentrationen und Einwirkzeiten

- Die chlorhexidinhaltigen Mundspüllösungen CURASEPT ADS 220® und ADS 210® beeinflussen unabhängig von der Konzentration und der Einwirkzeit die Fibroblasten-Zellzahl und ihre Kollagenproduktion. Es zeigt sich eine Tendenz, dass dieser negative Effekt mit steigender Konzentration und längerer Einwirkzeit zunimmt, jedoch ohne statistische Signifikanz.
- Die 0,12%ige Chlorhexidinlösung welche für 1 min angewandt wurde, hatte den geringsten zellzahlreduzierenden Effekt und ließ die Zellen am meisten Kollagen produzieren, während die 0,2 % CHX enthaltende Curasept-Lösung, welche 5 min auf die Zellen einwirken konnte, den größten zellzahlreduzierenden Effekt hatte und die Kollagen-Bildung am stärksten inhibierte.
- Wenn die Kollagen-Werte der unterschiedlichen Gruppen an den einzelnen Messzeitpunkten direkt miteinander verglichen wurden, waren diese bei allen behandelten Zellen im Vergleich zu der Kontrollspülung mit PBS signifikant

geringer. Auch die Zellzahlen der behandelten Gruppen waren an allen Tagen geringer als die der Kontrolle, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

4.6.3 Korrelation der Methoden ELISA und Cellometer

- Die Werte der Zellzählung mit dem Cellometer und der Kollagenmessung mit dem ELISA korrelieren signifikant miteinander.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methodik

5.1.1 Problematik von *in-vitro*-Untersuchungen

Die Wirksamkeit von chlorhexidinhaltigen Mundspüllösungen wurde mit Hilfe von *in-vitro*- (Davies et al. 1954) und *in-vivo*-Untersuchungen (Quiryneen et al. 2001) festgestellt. Die Toxizität von CHX konnte bereits mit *in-vitro*-Versuchen bewiesen (Flemingson et al. 2008), aber nur teilweise mit *in-vivo*-Versuchen (Faria et al. 2007) bestätigt werden.

Bei *in-vitro*-Versuchen sollen die Bedingungen für die Zellen, in diesem Fall hGF, annähernd denen der Mundhöhle eines Patienten entsprechen. Aus diesem Grund wurden die Zellen zwischen den verschiedenen Messungen bei +37°C, einem konstanten Stickstoffanteil von 5 % und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Wie auch schon in vorangegangenen Studien (Mariotti und Rumpf 1999; Flemingson et al. 2008) wurden ihnen somit optimale Lebensbedingungen, ähnlich wie in der Mundhöhle, geboten.

Die Methodik dieser Studie ist an den Versuchsaufbau von Flemingson et al. (2008), Mariotti und Rumpf (1999) und Pucher und Daniel (1992) angelehnt. Diese hatten CHX-haltige Mundspüllösungen ebenfalls *in vitro* auf kultivierte hGF angewandt. Sie hatten die Lösung unverdünnt, jedoch auch mit Medium verdünnt, benutzt. In der vorliegenden Studie wurden die Konzentrationen gemäß der vom Hersteller empfohlenen Höhe gewählt und während der Dauer der Behandlung die Well-Platten geschwenkt, um das Spülen im Mund zu simulieren. Nach der Behandlung wurden die Zellen zweimal mit der neutralen Lösung PBS abgespült, da in der Mundhöhle durch den Speichel eine ebensolche Spülung erfolgt und danach das CHX nicht mehr direkt einwirkt. Auch Flemingson et al. (2008) und Mariotti und Rumpf (1999) wuschen die hGF nach der Behandlung zweimal mit Medium.

Trotzdem kann eine solche Methodik nicht zu 100 Prozent die Gegebenheiten in der Mundhöhle darstellen. Zum Beispiel ist im Mund schon während der Spülung Speichel vorhanden bzw. wird durch die Anwendung der Lösung der Speichelfluss ange-regt. Deswegen kann man nicht genau vorhersagen, in welcher Konzentration das CHX wirklich auf die Mundschleimhautzellen einwirkt. Zudem bindet CHX, wie oben ausgeführt, im Mund an vorhandene anionische Bindungsstellen wie zum Beispiel die Speichelproteine (Rolla und Melsen 1975) und Bakterien (Hjeljord et al. 1973). Dadurch ist *in vivo* zum Zeitpunkt der Behandlung weniger freies CHX verfügbar,

welches einen zytotoxischen Effekt haben könnte. Andererseits wirkt CHX *in vivo* länger, da es nach und nach abgegeben wird und die antimikrobielle und somit auch die gegebenenfalls zytotoxische Wirkung persistiert. Somit sollten einer *in-vitro*-Untersuchung auch immer klinisch kontrollierte *in-vivo*-Untersuchungen folgen.

5.1.2 Beurteilung der Zytotoxizitätsnachweise

Schon eine Konzentration von 0,001% CHX bewirkt, dass es zum ATP-Verlust der Fibroblastenzelle und zum Zelltod kommt (Hidalgo und Dominguez 2001). Abhängig von der Einwirkzeit und der Konzentration der Lösung wirkt CHX nicht nur auf hGF zytotoxisch, sondern auch auf Epithelzellen (Babich et al. 1995) und Keratinozyten (Damour et al. 1992). Ebenso wurde eine Zytotoxizität auf Osteoblasten (Patel et al. 2006; Cabral und Fernandes 2007), Parodontalligamentzellen (Cline und Layman 1992) und Odontoblasten (Brito de Souza 2007) nachgewiesen.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die zytotoxische Wirkung von CHX enthaltenden Mundspüllösungen auf hGF getestet. Hierfür diente zum einen die Zellzahlmessung, welche auch von Pucher und Daniel (1992) als Zytotoxizitätsnachweis durchgeführt wurde. Zum anderen sollte wie bei Goldschmidt et al. (1977), Pucher und Daniel (1992) und Mariotti und Rumpf (1999) die Menge des gebildeten Kollagens erfasst werden. Kollagene machen drei Fünftel der Proteine der humanen Gingiva aus, wobei Kollagen Typ I vorherrscht. Auch im parodontalen Ligament überwiegen bei Betrachtung der Proteine die Kollagene und von diesen Kollagen Typ I mit einem Anteil von 80 % vor Kollagen Typ III (Mariotti 1993).

Kollagen ist ein wichtiger Faktor bei der Wundheilung, gerade auch bei der Parodontitis-Therapie; es kann nur von lebenden Zellen produziert werden und stellt somit einen Indikator für die mögliche eingeschränkte Stoffwechselaktivität der Zellen nach Exposition einer chlorhexidinhaltigen Mundspüllösung dar. Dass CHX schon in niedrigen Konzentrationen *in vitro* die Proliferation von Fibroblastenkulturen hemmt und eine Reduktion der Produktion von Kollagen- und Nichtkollagenproteinen bewirkt, konnte bereits bewiesen werden (Pucher und Daniel 1992; Mariotti und Rumpf 1999). Deswegen sollte in diesem Versuchsdesign ebenfalls die Kollagen-Produktion der hGF gemessen werden, jedoch idealerweise ohne der Benutzung von radioaktivem Material. Infolgedessen wurde der Nachweis des gebildeten Kollagens bzw. der Propeptide des Prokollagens Typ I mittels eines Prokollagen-I-Assays durchgeführt. Dieser ELISA wurde auch von Ishikawa et al. (2004) zum Nachweis von Kollagen Typ I verwendet.

5.1.3 Zeitlicher Verlauf der Messungen

Eine der Fragestellungen dieser Arbeit lautete, ob die Zellen durch CHX irreversibel geschädigt werden oder ob es nach einiger Zeit in chlorhexidinfreier Umgebung zu einer Regeneration der Zellen und deren Stoffwechsel kommt. Von Babich et al. (1995) konnte gezeigt werden, dass hGF die entstandene Beeinträchtigung durch die zytotoxische CHX-Lösung nicht kompensieren konnten. Allerdings hatte die Studiengruppe die hGF zwei Stunden lang der Lösung ausgesetzt; ein Zeitraum, welcher keiner realistischen Spüldauer entspricht.

Interessant war, ob vielleicht ein längerer Zeitraum den Zellen die Möglichkeit gibt, sich zu regenerieren. Pucher und Daniel (1992) haben die Zellzählung und Messung der Proteinsynthese von hGF 1 Tag, 3, 5 und 7 Tage nach CHX-Exposition durchgeführt. Sie ließen die Zellen jedoch in den größeren 35 mm-Kultur-Schalen wachsen. In den von uns verwendeten kleineren 12-Well-Platten wurden deshalb - nach einer 7-tägigen Vorversuchsreihe - als Mess-Zeitpunkte 1 Tag, 3 und 5 Tage gewählt.

Es muss beachtet werden, dass das Wachstum von hGF auf Wellplatten nicht demjenigen in der Mundhöhle entspricht. Zwar wurde eine wie vom Hersteller (Provitro) empfohlene Konfluenz der Zellen auf den Well-Platten von 70-80 % angestrebt, jedoch kann es bei einer höheren Zellzahl zu einem spontanen Ablösen der Zellen kommen. Im Versuch wurden alle Zellen zunächst mindestens 3 Tage auf den Wellplatten angezüchtet, danach behandelt und wiederum teilweise 5 Tage in chlorhexidinfreier Umgebung weiter kultiviert. Daher kann nicht genau vorausgesagt werden, ob das Verhalten der hGF über diesen längeren Zeitraum demjenigen in der Gingiva entspricht.

Im vorliegenden Versuchsdesign bleibt außerdem unberücksichtigt, dass es sich bei allen untersuchten Zellen um einzelne Populationen handelt. Wenn nach einem Tag hGF zur Untersuchung abgelöst wurden, wurde nach drei Tagen nicht dieselbe Zellpopulation wieder abgelöst, sondern eine weitere, welche zwei Tage länger wachsen konnte. Das heißt, es wurden zu jedem Messzeitpunkt unterschiedliche Wells abgelöst und untersucht. Somit waren es verschiedene und nicht dieselben Zellpopulationen, welche sich nach der Behandlung gewissermaßen erholen konnten. In den Verlaufsmessungen von Pucher und Daniel (1992) war ebenso verfahren worden.

5.2 Diskussion der Materialien

5.2.1 Untersuchungsmaterial: Humane Gingivafibroblasten

Das Bindegewebe der Gingiva besteht aus Zellen, Faserproteinen, Gefäßen, Nerven und Grundsubstanz. Die Fibroblasten stellen mit 200×10^6 Zellen/cm² Bindegewebe die vorherrschende Zellart dar und sorgen mit ihrem Kollagenstoffwechsel für wichtige Vorgänge bei der Wundheilung (Schroeder 1986). Sie produzieren die Bindegewebsproteine Kollagen und Elastin sowie Glykoproteine und Glykosaminoglykane, welche das parodontale Ligament ausmachen (Hassell 1993; Plagmann 1998). Somit haben sie einen hohen Wert in der Therapie und Heilung von parodontalen Erkrankungen. Auch Goldschmidt et al. (1977), Pucher und Daniel (1992), Cline und Layman (1992), Mariotti und Rumpf (1999) und Flemingson et al. (2008) nutzten für ihre Zytotoxizitäts-Studien primäre humane Fibroblasten der Gingiva.

Die Zellpopulationen von primären hGF (HGFiB, Bestell-Nr. 1210412, Provitro GmbH, Berlin, Deutschland), welche in dieser Studie eingesetzt wurden, lagen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren vor. Die Zellen waren negativ auf Bakterien, Pilze, Mycoplasmen, HIV-DNA und Hepatitis B/C-DNA geprüft worden.

Die Stickstofflagerung und der dadurch bedingte Auftauvorgang sind als nachteilig anzusehen, da die Zellen dadurch nicht in derselben Form vorliegen, in der sie natürlicherweise in der Mundschleimhaut vorkommen. Gegebenenfalls sind sie geschwächt. Es wurde hGF der fünften, sechsten und siebten Passage genutzt. Bei dieser *in-vitro*-Passage ist die Zellvitalität noch hoch, während sie bei weiter kultivierten Zellen sinkt (Kent et al. 1996).

Bei der Kultur und Aussaat der hGF wurde gemäß dem Hersteller (Provitro) darauf geachtet, dass die Konfluenz der Zellen idealerweise für die Kultur auf Well-Platten 70-80 % beträgt, demnach fast die gesamte Fläche bedeckt ist. Bei einer stärkeren Bewachung würden sich die Zellen spontan ablösen, die Nährstoffzufuhr könnte nicht mehr gewährleistet werden und die Zellen würden teilweise absterben. Deshalb müssen die hGF für diesen Versuchsaufbau in einer Monolayer-Struktur vorliegen, während sie in der Mundschleimhaut jedoch als komplexe Multilayer-Struktur existieren, bestehend aus dem produzierten Kollagen, Glykoproteinen, Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen und geschützt durch ein mehrschichtiges Plattenepithel. Aufgrund dessen kann nicht vorhergesagt werden, ob sie genau so auf Behandlungen reagieren, wie bei diesen *in-vitro*-Versuchen. Weiter wäre in Zukunft ein Versuchsaufbau mit Multilayer-Struktur zur besseren Simulation der Mundhöhlenbedingungen anzustreben. Beispielsweise haben Dabija-Wolter et al. (2012) in ihrer *in-*

vitro-Studie über das Bakterium *F.n.* ein dreidimensionales Modell der humanen Gingiva verwendet, welches aus primären hGF und gingivalen Keratinozyten besteht.

5.2.2 Bewertung der verwendeten Mundspüllösungen und Einwirkzeiten

Um dem klinischen Gebrauch der Mundspüllösungen möglichst gut zu entsprechen, wurden im Handel erhältliche Produkte gewählt. In den Vorversuchen wurde die von anderen Forschungsteams bestimmte starke Zytotoxizität von Alkohol enthaltenden Antiseptika bestätigt. Da für die klinische Anwendung aufgrund verschiedenster Nebenwirkungen (Selbst et al. 1985; McCullough und Farah 2008) nur noch alkoholfreie Mundspüllösungen empfohlen werden können, deren antibakterielle Wirksamkeit ebenso bewiesen ist (Leyes Borrajo et al. 2002; Lorenz 2008), wurden auch für die vorliegende Studie ausschließlich alkoholfreie Lösungen ausgesucht. Um verschiedene Konzentrationen der gleichen Lösung bzw. eines Herstellers testen zu können, wurde Curasept ADS 220 und Curasept ADS 212 von Curaden Healthcare verwendet, welche 0,2 % und 0,12 % CHX enthalten. Diese Konzentrationen entsprechen dem Inhalt in herkömmlichen CHX-haltigen Mundspüllösungen. Ihre Anwendung in der unverdünnten Form wird auch von Quirynen et al. (1995) während der OSFMD nahe gelegt.

Zur Kontrolle diente bei allen Versuchen PBS, welches pH-neutral und nicht zytotoxisch ist. Andere Studiengruppen verwendeten als negative Kontrolle entweder ebenfalls eine Salzlösung (Pucher und Daniel 1992) oder aber Kulturmedium (Cline und Layman 1992; Patel et al. 2006)

Die Einwirkzeiten sollten möglichst einem realistischen Gebrauch entsprechen. 1-minütiges Spülen wird gemäß der Anwendung der OSFMD empfohlen (Quirynen et al. 1995). Falls der Patient die Mundspüllösung versehentlich länger im Mund behält, wurde als zweite vergleichende Einwirkzeit eine Dauer von 5 min gewählt. Auch andere Studiengruppen haben diese Behandlungsdauer angewandt, jedoch zusätzlich eine längere Einwirkzeiten von 15 min eingehalten (Mariotti und Rumpf 1999; Flemingson et al. 2008). Auch Cline und Layman (1992) behandelten die Zellen über 15 min mit einer 0,12%igen CHX-Lösung, andere sogar über 1 (Pucher und Daniel 1992), 4 (Patel et al. 2006) oder 24 Stunden (Babich et al. 1995). Auf diese langen Einwirkzeiten wurde in der vorliegenden Studie verzichtet, da sie kaum einer wirklichkeitsnahen klinischen Anwendung gleichkommen.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu ermitteln, ob die chlorhexidinhaltige Mundspüllösung Curasept® auf die hGF der Gingiva zytotoxisch wirkt. Dies wäre anhand einer verringerten Kollagensynthese und dem Rückgang der Zellzahl erkennbar. Eine weitere Fragestellung lautete, ob diese in vorangegangenen Studien genannte Wirkung von Dauer ist, oder ob sich die behandelten Zellen nach einigen Tagen regenerieren und ihren Stoffwechsel wieder aufnehmen. Außerdem sollte herausgefunden werden, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen den unterschiedlichen CHX-Konzentrationen und den Einwirkzeiten gibt. Besonders wichtig scheint diese Frage in Hinblick auf die Kollagen-I-Synthese und die Wundheilung im Mund zu sein.

In diesem Versuch konnte eine *in-vitro*-Zytotoxizität beider Curasept Mundspüllösungen auf hGF aufgezeigt werden. Bei Behandlung der Zellen mit den zwei Lösungen entwickelten sich eine Verminderung des gebildeten Kollagens von durchschnittlich 50 % und eine Zellzahlreduktion von 23-35 %. Zu erklären ist dies einerseits durch die Korrelation der beiden Parameter. Wenn weniger lebende Zellen vorhanden sind, wird auch weniger Kollagen gebildet. Jedoch fällt die Reduktion des produzierten Kollagens bei den behandelten Zellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe deutlicher aus als die Zellzahlreduktion. Es ist denkbar, dass die Fibroblasten, die die CHX-Spülung überlebt haben, anschließend einen reduzierten Stoffwechsel aufweisen. Dieses Ergebnis korreliert mit den Studienergebnissen von Mariotti und Rumpf (1999), welche CHX bei einer starken Verdünnung von 0,00009 % anwandten. Auch wenn diese Konzentration die Proliferation von Fibroblasten nicht mehr verringerte, wurde die Kollagen- und Non-Kollagen-Proteinproduktion auf 65 bzw. 57 % reduziert. Somit wird deutlich, dass in den Stoffwechsel der Fibroblasten eingegriffen wird, auch wenn diese weiter wachsen. Dies ist kritisch, wenn man bedenkt, dass gerade nach der Parodontose-Behandlung das Attachment zwischen Zahn und Gingivaepithel wiederhergestellt und von den PDL- und gingivalen Fibroblasten extrazelluläres Bindegewebe produziert werden muss (Meyer 1986; Egelberg 1987). Möglicherweise ist dies der Grund, warum bei der Parodontitistherapie die Methodik der OSFMD keine signifikant besseren Ergebnisse liefern kann als die konventionelle Herangehensweise (Apatzidou 2006).

Es wird deutlich, dass der Kollagennachweis ein wichtiger Parameter ist, denn allein die Zellzahl zu bestimmen, ließe keine Aussage über die mögliche Art der Schädigung der hGF durch CHX zu.

Die Reduktion des produzierten Kollagens und der Zellzahl wurde von der CHX-Mundspüllösung unabhängig von der Einwirkzeit und der CHX-Konzentration bewirkt. Auch in einer anderen Studie gab es in der zytotoxischen Wirkung einer 0,2%igen CHX-Mundspüllösung keinen signifikanten Unterschied zwischen den Einwirkzeiten von 1, 5 und 15 min (Zyba 2011). Jedoch zeigen die vorliegenden Versuchsergebnisse, dass tendenziell eine höhere Konzentration und eine längere Einwirkzeit ohne statistische Signifikanz zu einer stärkeren zytotoxischen Wirkung auf die hGF führt. Die Zellen, welche mit der 0,12%igen Lösung behandelt worden waren, zeigten immer etwas weniger Beeinträchtigung als die Gruppen, welche mit der 0,2%igen Mundspülung kontaminiert worden waren. Bei einer Einwirkzeit von 1 min waren die zytotoxischen Auswirkungen geringer als nach 5 min Behandlung. Im direkten Vergleich der Lösung-Einwirkzeit-Kombinationen an allen Messtagen, ergab sich nur zwischen 0,12 % CHX für 1 min und 0,2 % CHX für 5 min ein signifikanter Unterschied. Dass die Konzentration sowie auch die Einwirkzeit einen Effekt haben, lässt sich auch in aktuellen Publikationen finden (Babich et al. 1995; Patel et al. 2006). Dagegen postulieren andere Forschungsgruppen, dass die Konzentration der chlorhexidinhaltigen Lösung zwar entscheidend ist, aber die Einwirkzeit keine Auswirkung auf deren Zytotoxizität hat (Mariotti und Rumpf 1999; Flemingson et al. 2008).

Bei der Fragestellung nach der Regenerationsfähigkeit bzw. dem zeitlichen Verlauf der unterschiedlichen Messtage, kommt diese Untersuchung zu dem Ergebnis, dass es initial durch die zytotoxische Wirkung zu einem Absinken der Zellzahl und des produzierten Kollagens kommt. Zwei Tage später sind etwas höhere Messwerte zu verzeichnen als zuvor. Nach fünf Tagen sind die gemessenen Zellzahlen wieder geringer. Die Kollagen-Werte fallen nicht wieder ab, sie steigen aber auch nicht weiter an. Daraus könnte man ableiten, dass es im *in-vitro*-Versuchsdesign nach drei Tagen zu einer Art Regeneration der Zellen kommt. Die hGF scheinen jedoch insgesamt zu sehr geschädigt sind, sodass es am 5. Tag nicht wie in der Kontrollgruppe zu einer weiteren Proliferation und ansteigenden Bildung von Kollagen kommt.

Eine andere Studiengruppe weist auf, dass es auch 3 Tage nach der Behandlung mit CHX keine Regeneration bei hGF gibt, da es zu keiner weiteren Proliferation kommt (Babich et al. 1995). Allerdings waren diese Zellen über einen für den klinischen Gebrauch unrealistischen Zeitraum von 24 Stunden mit CHX behandelt worden. Auch bei Pucher und Daniel (1992) führte die 1-stündige Behandlung mit 0,005%igem CHX und die Kontamination mit 0,12%igem CHX für 30 s dazu, dass die Proliferation der hGF komplett unterbunden wurde. An den darauffolgenden 7

Tagen kam es zu keinerlei Regeneration. Wenn sie die Zellen mit einer geringen Konzentration von 0,002 % CHX 1 Stunde lang kontaminiert hatten, kam es zu einer nur sehr geringen Erholung. Jedoch muss gesagt werden, dass die Studiengruppe die Versuche zwar jeweils in dreifacher Bestimmung durchgeführt, aber insgesamt nur dreimal wiederholt hatte.

Dass sich die hGF in der vorliegenden Studie drei Tage nach der Behandlung erholt haben und am fünften Tag die Zellzahl und die Kollagenproduktion wieder sinkt bzw. stagniert, könnte auch an dem *in-vitro*-Versuchsaufbau liegen. Vielleicht kommt es im Mund, unter für die Zellen perfekten Bedingungen, zu einer weiter fortschreitenden Regeneration. Insgesamt lässt sich darlegen, dass in der vorliegenden *in-vitro*-Studie die hGF in der Lage waren, von der initial toxisch wirkenden Spülung mit dem oralen Antiseptikum in einem gewissen Maß zu regenerieren. Um jedoch daraus Schlüsse auf das Regenerationspotential dieser Zellen *in vivo* ziehen zu können, müssten, gerade auch auf Grund des oben erwähnten komplexen Aufbaus der humanen Gingiva, weitere Untersuchungen *in vivo* folgen.

Parallel wurde an allen Tagen unter einem Auflichtmikroskop die Auswirkung der Mundspüllösung auf die hGF beobachtet. Dabei konnte in dieser Studie festgestellt werden, dass sich die Zellen nach der Behandlung mit den Mundspüllösungen teilweise ablösen oder ihre Form ändern. Auch in anderen *in-vitro*-Studien wurde aufgezeichnet, dass mit 1- oder 2%igem CHX behandelte hGF im elektronenmikroskopischen Bild nicht mehr flach ausgebreitet an Wurzeloberflächen anhaften, sondern abgerundet und in der Zahl vermindert erscheinen (Cline und Layman 1992). Wenn Odontoblasten mit einer sehr niedrig konzentrierten CHX-Lösung behandelt worden sind, runden sie sich ebenso bis zur vollständigen Ablösung ab (Brito de Souza 2007). Desgleichen berichteten Pucher und Daniel (1992), dass sich PDL-Zellen nach der Kontamination mit CHX abrunden und ablösen. Es wird also deutlich, dass CHX nicht nur den Stoffwechsel der Zellen verändert, sondern auch eine Veränderung der Zell-Morphologie bewirkt.

Trotzdem ist es von Interesse zu klären, warum sich die Anwendung von CHX in laboratorischen Studien als stark zytotoxisch erweist und es im klinischen Gebrauch wenige Auswirkungen gibt. Ist der stabilere Zellverbund und die Schutzfunktion des Epithels der einzige Grund (Pucher und Daniel 1992)? Ein weiterer entscheidender Faktor könnte sein, wie oben bereits angesprochen, dass CHX in der Mundhöhle an die vorhandenen Proteine, zum Beispiel des Speichels und aber auch an Bakterien gebunden vorliegt und somit weniger zytotoxisch auf die Fibroblasten einwirkt (Hjeljord et al. 1973). Außerdem ist es denkbar, dass das in dieser Studie aufge-

zeigte Regenerationspotential der hGF *in vivo* ausgeprägter und in einem anderen Umfang möglich ist als in einem *in-vitro*-Versuchsaufbau.

Es müssen weitere spezielle Untersuchungen stattfinden, um zu klären, inwiefern chlorhexidinhaltige Mundspüllösungen *in vivo* den Mundschleimhautzellen in der Mundhöhle zusetzen, inwieweit dort eine Regeneration möglich ist und ob die durch CHX reduzierte Kollagenproduktion der hGF dessen positive Wirkung limitiert.

5.4 Empfehlung für die Praxis

Wie die Ergebnisse zeigen, wirkt CHX *in vitro* zunächst zytotoxisch auf die Zellen des Parodonts. Dennoch wird es aufgrund der zahlreichen *in-vivo*-Studien, welche seine Wirksamkeit und positiven Effekte in der Therapie belegen, benötigt. Gerade bei intermaxillär fixierten, geistig und körperlich behinderten Patienten oder aber in bestimmten Situationen, wie bei der Behandlung mit festsitzenden kieferorthopädischen Geräten, oraler Candidiose oder rezidivierenden aphtösen Ulzerationen sollte CHX unter strenger Indikationsstellung Anwendung finden (Addy und Moran 1997). Auf ein anderes Antiseptikum auszuweichen, ist nicht empfehlenswert, da mehrere Studiengruppen zu dem Ergebnis kamen, dass CHX-Mundspüllösungen den Zinn- und Aminfluorid oder ätherische Öle enthaltenden Lösungen wie Meridol® oder Listerine® in der antibakteriellen Effektivität überlegen sind (Brex et al. 1990; Brex et al. 1993). Über die Wirksamkeit der neuen alkoholfreien Listerine Zero®-Formel im Vergleich zu jener der CHX-Lösungen liegen bisher noch keine Studien vor. Antibiotika können aufgrund ihrer begrenzten spezifischen Wirkspektren, der möglichen Entwicklung von Resistenzen und der systemischen Nebenwirkungen im Rahmen der allgemeinen Parodontitistherapie nicht als Alternative herangezogen werden. Sie sollten lediglich bei der refraktären Parodontitis (Slots und Rams 1990) und nur in Kombination mit der Kürettage (Herrera et al. 2008) Anwendung finden.

Vor allem jedoch in der Parodontitistherapie oder periooperativ sollte die Einwirkzeit, wenn möglich, verkürzt werden. Die getestete Mundspüllösung zudem in der geringeren Konzentration von 0,12 % anzuwenden, führt zu einer ausreichenden Wirksamkeit (Ramberg et al. 1996). Sie kann sogar weiter verdünnt werden, denn auch niedrige Konzentrationen wie 0,01%iges oder 0,025%iges CHX hemmen die Plaque-Bildung. Zum Beispiel konnte in einer *in-vitro*-Studie gezeigt werden, dass eine chlorhexidinhaltige Mundspüllösung auch verdünnt gegen *Streptococcus sobrius* wirkt (Dogan et al. 2003) und mit einer Verdünnung von 1/320 zuverlässig 28 *Streptococcus aureus* Bakterienstämme abtötet (Nascimento et al. 2008). Laut Cumming und Loe (1973) hat eine Verdünnung und damit ein höheres Spülvolumen

den Vorteil, dass mehrmals gespült wird. Auch wenn dies jeweils lediglich 30 s oder kürzer andauert, ist es wirkungsvoller, als wenn ein volle Minute lang mit wenig Volumen gespült wird. Ein weiterer Nutzen einer Verdünnung ist, dass der Geschmack sich verbessert und Verfärbungen minimiert werden.

Ferner sollte die Anwendung so weit als möglich auf eine kurze Dauer beschränkt werden, um mögliche zytotoxische Effekte zu reduzieren. Gerade während der Wundheilung nach einer Parodontitis-Therapie werden Mundschleimhautzellen, welche nicht in ihrer Funktion beeinträchtigt sind, benötigt. Die vorliegende sowie weitere Studien (Pucher und Daniel 1992; Mariotti und Rumpf 1999) lassen darauf schließen, dass CHX auf diese Zellen zytotoxisch wirkt.

5.6 Schlussfolgerung

1. Die Behandlung von humanen Gingivafibroblasten mit den chlorhexidinhaltigen Mundspüllösungen CURASEPT ADS 220® und ADS 210® bewirkt *in vitro* eine zeit- und konzentrationsunabhängige Abnahme der Zellzahl und eine Abnahme des gebildeten Kollagens. Ohne statistische Signifikanz geschieht dies umso mehr, je höher die CHX-Konzentration ist und je länger die Lösung einwirkt.
2. Von dieser initial toxischen Wirkung scheinen sich die humanen Gingivafibroblasten in einem gewissen Umfang erholen zu können. Nach drei Tagen in chlorhexidinfreier Umgebung steigen die Kollagenmenge und die Zellzahl wieder etwas an, nach fünf Tagen sind die Kollagenwerte nicht mehr gestiegen und ist die Zellzahl wieder niedriger als zwei Tage zuvor. Dieser Verlauf ist für die Cellometer-Zellzahl-Messung signifikant.
3. Anhand der in dieser *in-vitro*-Studie ermittelten Resultate kann angenommen werden, dass chlorhexidinhaltige Mundspüllösungen einen negativen Effekt auf die Kollagenproduktion der Fibroblasten der humanen Gingiva haben. Auch wenn die Zellen *in vitro* ein Regenerationspotential aufzuweisen scheinen, hat die klinische Anwendung von niedrig dosiertem CHX über einen kürzeren Zeitraum mutmaßlich weniger Auswirkungen auf die Zellen.

6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser *in-vitro*-Studie war es, die Wirkung von zwei alkoholfreien chlorhexidinhaltigen Mundspüllösungen auf Fibroblasten der menschlichen Mundschleimhaut in Abhängigkeit von der Zeit der Einwirkung, der CHX-Konzentration und dem Messzeitpunkt zu untersuchen. Der Gehalt an CHX beträgt die von dem Hersteller angebotenen 0,12 (Curasept ADS 212) bzw. 0,2 % (Curasept ADS 220). Als Kontrolle wurde mit PBS, einer nachgewiesenermaßen pH-neutralen nicht zytotoxischen Lösung behandelt. Wie vom Hersteller empfohlen, wurden die verwendeten Zellen in dem speziell für die jeweilige Zelllinie entwickelten Medium (Fibroblast Growth Medium, Provitro GmbH) bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Beim Umsetzen der Zellen in die nächsten Kulturflaschen wurden die fertigen Lösungen verwendet und vor den Versuchen die Zellen in 12-Well-Platten ausgesät.

Ob und in welchem Ausmaß die Mundspülungen toxisch auf die Mundschleimhautzellen wirken, wurde durch Messung ihrer Kollagenproduktion mittels eines *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) und der Zellzahlbestimmung mit Hilfe eines Cellometer™ Auto T4s untersucht. Es sollte die optimale Einwirkzeit der oralen CHX-Antiseptika auf die Mundschleimhaut bestimmt werden, deshalb wurden die Fibroblasten mit jeder Lösung jeweils 1 min und 5 min behandelt. Weiterhin wurde der zeitliche Verlauf der Kollagenproduktion und der Zellzahl untersucht. Die Fragestellung lautete, ob und nach welcher Zeit die Zellen sich von einem vermutlich zytotoxischen Agens erholen können bzw. sie ihren Stoffwechsel wieder aufnehmen. Deshalb wurde 1 Tag, 3 und 5 Tage nach dem Einwirken der Mundspüllösungen die Zellernte vorgenommen und die Zellzahl mittels optischer Zellzählung im Cellometer™ Auto T4 erfragt. Die Zellüberstände wurden parallel eingefroren und später der kommerzielle ELISA (Procollagen-Type-I-C-Peptide EIA Kit der Firma Takara) zur Bestimmung der von den Mundschleimhautzellen produzierten Kollagen-I-Menge durchgeführt. Zellzahlbestimmung und ELISA erfolgten jeweils als Doppelbestimmung und für jeden Parameter wurde der Versuch 12 Mal durchgeführt. Mit Hilfe von ANOVA mit Bonferroni-Korrekturen für multiple Vergleiche wurden die ermittelten Werte analysiert.

Die Resultate der vorliegenden *in-vitro*-Untersuchung stimmen überein mit vorherigen Studien. Die CHX-haltige Mundspüllösung senkt zeit- und konzentrationsunabhängig die Zellzahl und die produzierte Kollagen-Menge im Vergleich zu den mit der Kontrolllösung PBS behandelten Zellen. Es zeigt sich jedoch die Tendenz, dass die Lösung mit 0,12 % CHX weniger Auswirkungen hat als diejenige mit 0,2 % CHX.

Des Weiteren wird deutlich, dass eine Einwirkzeit von 5 Minuten mehr Auswirkungen hat als wenn die Zellen nur 1 Minute lang gespült wurden. Besonders stark fällt in dieser Untersuchung die Reduktion des produzierten Kollagens aus, welches laut ELISA-Messung für Prokollagen bei den behandelten Zellen gegenüber der Kontrollgruppe um 50 % verringert ist. Dies könnte der Grund sein, warum die von Qui-rynen et al. (1995) eingeführte Methodik der OSFMD bei der Parodontitistherapie keine signifikant besseren Ergebnisse liefert als die konventionelle Herangehensweise (Apatzidou 2006).

In jedem Fall ergibt sich hieraus die Empfehlung, jeweils eine wenn möglich verkürzte Einwirkzeit und Anwendungsdauer zu wählen und von den getesteten Mundspüllösungen Curasept ADS 212 anzuwenden, da diese geringere Konzentration klinisch ebenfalls ausreichend wirksam ist (Ramberg et al. 1996).

Zu der Möglichkeit, dass sich die Zellen in chlorhexidinfreier Umgebung wieder erholen, ergab sich, dass nachdem die Werte bei der ersten Messung einen Tag nach der Behandlung im Vergleich zur Ausgangsmessung abgesunken waren, am dritten Tag die Zellzahl signifikant wieder angestiegen war und am fünften Tag die Zellzahl wieder signifikant gesunken und die produzierte Kollagenmenge gleich geblieben war. Die Werte der Kontrolle wurden jedoch nicht wieder erreicht. Trotzdem kann angenommen werden, dass sich hGF *in vitro* drei Tage nach der Spülung mit CHX bis zu einem gewissen Grad erholen können. Diese Erkenntnis lässt jedoch noch keinen Schluss auf das Regenerationspotential dieser Zellen *in vivo* zu. Es müssen weitere spezielle Untersuchungen folgen.

Insgesamt lässt sich erkennen, dass CHX in Mundspüllösungen initial nicht nur auf Bakterien, sondern auch auf die wichtigen Zellen der Mundschleimhaut, deren uneingeschränkte Funktion zum Beispiel für die Wundheilung erforderlich ist, toxisch wirkt. Momentan kann noch nicht auf CHX als Antiseptikum verzichtet werden, jedoch muss die Risiko-Nutzen-Relation bewertet werden, und es sollte nicht unbedenklich jederzeit und in beliebiger Konzentration angewandt werden.

7 Abkürzungsverzeichnis

A.a.c.	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
Abb.	Abbildung
ALP	alkalische Phosphatase
ANOVA	analysis of variance
AP	Aggressive Parodontitis
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	aqua destillata / destilliertes Wasser
C	Celsius
Ca ⁺⁺	Calcium-Ionen
CHX	Chlorhexidin
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	Chronische Parodontitis
CPC	Cetylpyridiniumchlorid
Cr	Chrom
DMSO	Dimethylsulfoxid
E-Cup	Eppendorf-Cup
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fa.	Firma
FCS	fetales Kälberserum
F.n.	Fusobacterium nucleatum
FMSRP	<i>full-mouth scaling and root planing</i>
g	Erdschwerebeschleunigung
hGF	humane Gingivafibroblasten
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
IL-β, 1, 6, 8	Interleukine
LDH	Lactatdehydrogenase
Log	Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharid
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
min	Minute

MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Nm	Nanometer
OSFMD	<i>one-stage full-mouth disinfection</i>
P	Signifikanzwert
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDL-Zellen	Parodontalligamentzellen
P.g.	Porphyromonas gingivalis
PGE2	Prostaglandin E2
P.i.	Prevotella intermedia
PIP	Propeptide
PI	Plaque-Index
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVP-Jod	Povidon-Jod
r	Korrelationskoeffizient
r ²	Bestimmtheitsmaß
rpm	<i>revolutions per minute</i> / Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
Tab.	Tabelle
TNF- α	Tumornekrose Faktor α
XTT	Tetrazoliumchlorid
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromol
%	Prozent
%ig	prozentig

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Mundspüllösungen Curasept ADS 220® und 212®	20
Tab. 2 Inhalt und Anwendungsgebiet des Lysis-Puffers.....	24
Tab. 3 Inhaltsstoffe des Fibroblast Growth Mediums.....	25
Tab. 4 Inhalt und Eigenschaften des Passage-Kit 2.....	27
Tab. 5 Inhalt der Cryo-Solution	28
Tab. 6 Inhalt und Anwendungsgebiete des ProkollagenTyp I c-Peptide EIA Kit.....	32
Tab. 7 Verdünnungsreihe der Prokollagen-Standards für die Standardkurve.....	33
Tab. 8 Zellzahl-Mittelwerte [Zellzahl · 10 ⁵ pro ml] mit Standardabweichungen.....	38
Tab. 9 P-Werte der dreifaktoriellen ANOVA der logCellometer-Werte.....	41
Tab. 10 T-Tests für die verschiedenen Messtage der Cellometermessung.....	42
Tab. 11 Kollagen-Mittelwerte [ng Kollagen/ml] mit Standardabweichungen.....	43
Tab. 12 P-Werte der dreifaktoriellen ANOVA der logELISA-Werte.....	47
Tab. 13 P-Werte der zweifaktoriellen ANOVA der logELISA-Werte.....	47
Tab. 14 T-Tests für die verschiedenen Messtage der ELISA-Messung.....	48
Tab. 15 Mittelwerte aller Ergebnisse nach Einwirkzeit sortiert.....	50
Tab. 16 Mittelwerte aller Ergebnisse nach Lösung sortiert.....	51
Tab. 17 p-, r- und r ² -Werte der Korrelationsanalyse	52

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Strukturformel von Chlorhexidin.....	3
Abb. 2 Veranschaulichung eines Sandwich-ELISAs.....	19
Abb. 3 Versuchsablauf der Studie.....	22
Abb. 4 Das Fibroblast Growth Medium von Provitro.....	25
Abb. 5 Zugabe des Fibroblast Growth Mediums in die Zellkulturflaschen.....	26
Abb. 6 Diagramm zur Veranschaulichung des Versuchsverlaufs.....	29
Abb. 7 Beispielhafte Einteilung einer 12-Well-Platte.....	29
Abb. 8 Das Cellometer™ Auto T4 von Nexcelom.....	31
Abb. 9 Programmoberfläche des Cellometer™ Auto T4 von Nexcelom.....	31
Abb. 10 Mikroskopisches Bild: hGF 2 Tage nach Aussaat.....	36
Abb. 11 Mikroskopisches Bild: hGF konfluent gewachsen.....	36
Abb. 12 Mikroskopisches Bild: Abgelöste Fibroblasten aus Versuch 4.....	37
Abb. 13 Mikroskopisches Bild: Leicht abgerundete Fibroblasten aus Versuch 1.....	37
Abb. 14 Säulendiagramm der mittleren Zellzahlen nach 1 Tag.....	38
Abb. 15 Säulendiagramm der mittleren Zellzahlen nach 3 Tagen.....	39
Abb. 16 Säulendiagramm der mittleren Zellzahlen nach 5 Tagen.....	40
Abb. 17 Mittlere Zellzahl aller Lösungen und Einwirkzeiten.....	41
Abb. 18 Darstellung der T-Tests sowie aller logCellometer-Werte	42
Abb. 19 Säulendiagramm der mittleren Kollagen-Werte nach 1 Tag.....	44
Abb. 20 Säulendiagramm der mittleren Kollagen-Werte nach 3 Tagen.....	45
Abb. 21 Säulendiagramm der mittleren Kollagen-Werte nach 5 Tagen.....	45
Abb. 22 Mittlere Kollagenproduktion aller Lösungen und Einwirkzeiten	46
Abb. 23 Darstellung aller logELISA-Werte.....	48
Abb. 24 Einfluss der Einwirkzeit auf die Zellzahl.....	50
Abb. 25 Einfluss der Einwirkzeit auf die Kollagenproduktion.....	50
Abb. 26 Einfluss der CHX-Konzentration auf die Zellzahl.....	51
Abb. 27 Einfluss der CHX-Konzentration auf die Kollagenproduktion.....	51
Abb. 28 Darstellung der Korrelation zwischen Kollagen- und Zellzahlwerten.....	52

10 Literaturverzeichnis

- Addy M (1977): "Hibitane in the treatment of aphthous ulceration." J Clin Periodontol 4(5): 108-16.
- Addy M, Moran J (1983): "Comparison of plaque accumulation after topical application and mouth rinsing with chlorhexidine gluconate." J Clin Periodontol 10(1): 69-71.
- Addy M, Moran J (1997): "Clinical indications for the use of chemical adjuncts to plaque control: chlorhexidine formulations." Periodontol 2000 15: 52-4.
- Addy M, Moran J, Newcombe R, Warren P (1995): "The comparative tea staining potential of phenolic, chlorhexidine and anti-adhesive mouthrinses." J Clin Periodontol 22(12): 923-8.
- Apatzidou D A (2006): "One stage full-mouth disinfection--treatment of choice?" J Clin Periodontol 33(12): 942-3.
- Arweiler N B, Netuschil L, Reich E (2001): "Alcohol-free mouthrinse solutions to reduce supragingival plaque regrowth and vitality. A controlled clinical study." J Clin Periodontol 28(2): 168-74.
- Axelsson P, Lindhe J (1987): "Efficacy of mouthrinses in inhibiting dental plaque and gingivitis in man." J Clin Periodontol 14(4): 205-12.
- Babich H, Borenfreund E (1991): "Cytotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined with the neutral red cell viability assay." Appl Environ Microbiol 57(7): 2101-3.
- Babich H, Wurzbarger B J, Rubin Y L, Sinensky M C, Blau L (1995): "An in vitro study on the cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to human gingival cells." Cell Biol Toxicol 11(2): 79-88.
- Bassetti C, Kallenberger A (1980): "Influence of chlorhexidine rinsing on the healing of oral mucosa and osseous lesions." J Clin Periodontol 7(6): 443-56.
- Bergqvist-Karlsson A (1988): "Delayed and immediate-type hypersensitivity to chlorhexidine." Contact Dermatitis 18(2): 84-8.
- Bhandari M, Adili A, Schemitsch E H (2001): "The efficacy of low-pressure lavage with different irrigating solutions to remove adherent bacteria from bone." J Bone Joint Surg Am 83-A(3): 412-9.
- Bolanowski S J, Gescheider G A, Sutton S V (1995): "Relationship between oral pain and ethanol concentration in mouthrinses." J Periodontal Res 30(3): 192-7.

Bollen C M, Mongardini C, Papaioannou W, Van Steenberghe D, Quirynen M (1998): "The effect of a one-stage full-mouth disinfection on different intra-oral niches. Clinical and microbiological observations." *J Clin Periodontol* 25(1): 56-66.

Bonesvoll P (1977): "Oral pharmacology of chlorhexidine." *J Clin Periodontol* 4(5): 49-65.

Bonesvoll P (1978): "Retention and plaque-inhibiting effect in man of chlorhexidine after multiple mouth rinses and retention and release of chlorhexidine after toothbrushing with a chlorhexidine gel." *Arch Oral Biol* 23(4): 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(4): 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(11): 1025-9.

Bonesvoll P, Lokken P, Rolla G, Paus P N (1974 b): "Retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses." *Arch Oral Biol* 19(3): 209-12.

Boyce S T, Warden G D, Holder I A (1995): "Cytotoxicity testing of topical antimicrobial agents on human keratinocytes and fibroblasts for cultured skin grafts." *J Burn Care Rehabil* 16(2 Pt 1): 97-103.

Brayer W K, Mellonig J T, Dunlap R M, Marinak K W, Carson R E (1989): "Scaling and root planing effectiveness: the effect of root surface access and operator experience." *J Periodontol* 60(1): 67-72.

Brex M C, Liechti T, Widmer J, Gehr P, Lang N P (1989): "Histological and clinical parameters of human gingiva following 3 weeks of chemical (chlorhexidine) or mechanical plaque control." *J Clin Periodontol* 16(3): 150-5.

Brex 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(5): 292-7.

Brex M, Macdonald L L, Legary K, Cheang M, Forgay M G (1993): "Long-term effects of Meridol and chlorhexidine mouthrinses on plaque, gingivitis, staining, and bacterial vitality." *J Dent Res* 72(8): 1194-7.

- Brennan S S, Foster M E, Leaper D J (1986): "Antiseptic toxicity in wounds healing by secondary intention." *J Hosp Infect* 8(3): 263-7.
- Breslin P A, Tharp C D (2001): "Reduction of saltiness and bitterness after a chlorhexidine rinse." *Chem Senses* 26(2): 105-16.
- Brito de Souza L (2007): "Cytotoxic effects of different concentrations of chlorhexidine." *Am J Dent* 20: 400-404.
- Buchmann R, Nunn M E, Van Dyke T E, Lange D E (2002): "Aggressive periodontitis: 5-year follow-up of treatment." *J Periodontol* 73(6): 675-83.
- Cabral C T, Fernandes M H (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(2): 155-64.
- Cannell J S (1981): "The use of antimicrobials in the mouth." *J Int Med Res* 9(4): 277-82.
- Carlin V, Matsumoto M A, Saraiva P P, Artioli A, Oshima C T, Ribeiro D A (2011): "Cytogenetic damage induced by mouthrinses formulations in vivo and in vitro." *Clin Oral Investig* 16(3): 813-20.
- Case D E (1977): "Safety of Hibitane. I. Laboratory experiments." *J Clin Periodontol* 4(5): 66-72.
- Cervone F, Tronstad L, Hammond B (1990): "Antimicrobial effect of chlorhexidine in a controlled release delivery system." *Endod Dent Traumatol* 6(1): 33-6.
- Charles C A, Amini P, Gallob J, Shang H, McGuire J A, Costa R (2012): "Antiplatelet and antigingivitis efficacy of an alcohol-free essential-oil containing mouthrinse: a 2-week clinical trial." *Am J Dent* 25(4): 195-8.
- Charles C H, Mostler K M, Bartels L L, Mankodi S M (2004): "Comparative antiplatelet and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial." *J Clin Periodontol* 31(10): 878-84.
- Ciancio S (1994): "Expanded and future uses of mouthrinses." *J Am Dent Assoc* 125 Suppl 2: 29S-32S.
- Cline N V, Layman D L (1992): "The effects of chlorhexidine on the attachment and growth of cultured human periodontal cells." *J Periodontol* 63(7): 598-602.
- Crouch S P, Kozlowski R, Slater K J, Fletcher J (1993): "The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity." *J Immunol Methods* 160(1): 81-8.

Cumming B R, Loe H (1973): "Optimal dosage and method of delivering chlorhexidine solutions for the inhibition of dental plaque." *J Periodontal Res* 8(2): 57-62.

Dabija-Wolter G, Sapkota D, Cimpan M R, Neppelberg E, Bakken V, Costea D E (2012): "Limited in-depth invasion of *Fusobacterium nucleatum* into in vitro reconstructed human gingiva." *Arch Oral Biol* 57(4): 344-51.

Damour O, Hua S Z, Lasne F, Villain M, Rousselle P, Collombel C (1992): "Cytotoxicity evaluation of antiseptics and antibiotics on cultured human fibroblasts and keratinocytes." *Burns* 18(6): 479-85.

Davies G E, Francis J, Martin A R, Rose F L, Swain G (1954): "1:6-Di-4'-chlorophenyldiguanidohexane (hibitane); laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency." *Br J Pharmacol Chemother* 9(2): 192-6.

Demke R (2012): "Plaque inhibition: the science and application of oral rinses." *Dent Today* 31(2): 96-101; quiz 101, 95.

Diegelmann R F, Bryson G R, Flood L C, Graham M F (1990): "A microassay to quantitate collagen synthesis by cells in culture." *Anal Biochem* 186(2): 296-300.

Doan L, Piskoun B, Rosenberg A D, Blanck T J, Phillips M S, Xu F (2011): "In vitro antiseptic effects on viability of neuronal and Schwann cells." *Reg Anesth Pain Med* 37(2): 131-8.

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(4): 212-6.

Dynes J J, Lawrence J R, Korber D R, Swerhone G D, Leppard G G, Hitchcock A P (2006): "Quantitative mapping of chlorhexidine in natural river biofilms." *Sci Total Environ* 369(1-3): 369-83.

Eberhard J, Jepsen S, Jervoe-Storm P M, Needleman I, Worthington H V (2008): "Full-mouth disinfection for the treatment of adult chronic periodontitis." *Cochrane Database Syst Rev* (1): CD004622.

Egelberg J (1987): "Regeneration and repair of periodontal tissues." *J Periodontal Res* 22(3): 233-42.

Eldridge K R, Finnie S F, Stephens J A, Mauad A M, Munoz C A, Kettering J D (1998): "Efficacy of an alcohol-free chlorhexidine mouthrinse as an antimicrobial agent." *J Prosthet Dent* 80(6): 685-90.

- Eley B M (1999): "Antibacterial agents in the control of supragingival plaque--a review." *Br Dent J* 186(6): 286-96.
- Faria G, Celes M R, De Rossi A, Silva L A, Silva J S, Rossi M A (2007): "Evaluation of chlorhexidine toxicity injected in the paw of mice and added to cultured I929 fibroblasts." *J Endod* 33(6): 715-22.
- Fleischer H C, Mellonig J T, Brayer W K, Gray J L, Barnett J D (1989): "Scaling and root planing efficacy in multirooted teeth." *J Periodontol* 60(7): 402-9.
- Flemingson, Emmadi P, Ambalavanan N, Ramakrishnan T, Vijayalakshmi R (2008): "Effect of three commercial mouth rinses on cultured human gingival fibroblast: an in vitro study." *Indian J Dent Res* 19(1): 29-35.
- Flotra L (1973): "Different modes of chlorhexidine application and related local side effects." *J Periodontal Res Suppl* 12: 41-4.
- Frank M E, Gent J F, Hettinger T P (2001): "Effects of chlorhexidine on human taste perception." *Physiol Behav* 74(1-2): 85-99.
- Gabler W L, Roberts D, Harold W (1987): "The effect of chlorhexidine on blood cells." *J Periodontal Res* 22(2): 150-5.
- 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(3): 437-9.
- Gent J F, Frank M E, Hettinger T P (2002): "Taste confusions following chlorhexidine treatment." *Chem Senses* 27(1): 73-80.
- Gjeramo P (1975): "Some aspects of drug dynamics as related to oral soft tissue." *J Dent Res* 54 Spec No B: B44-56.
- Gjeramo P, Bonesvoll P, Rolla G (1974): "Relationship between plaque-inhibiting effect and retention of chlorhexidine in the human oral cavity." *Arch Oral Biol* 19(11): 1031-4.
- Goldschmidt P, Cogen R, Taubman S (1977): "Cytopathologic effects of chlorhexidine on human cells." *J Periodontol* 48: 212-215.
- Greenstein G (2004): "Efficacy of full-mouth disinfection vs quadrant root planing." *Compend Contin Educ Dent* 25(5): 380-2, 384-6, 388 passim.
- Greenwell H (2001): "Position paper: Guidelines for periodontal therapy." *J Periodontol* 72(11): 1624-8.
- Grenier D (1996): "Effect of chlorhexidine on the adherence properties of *Porphyromonas gingivalis*." *J Clin Periodontol* 23(2): 140-2.

- Haanen C, Vermes I (1995): "Apoptosis and inflammation." *Mediators Inflamm* 4(1): 5-15.
- Hassell T M (1993): "Tissues and cells of the periodontium." *Periodontol* 2000 3: 9-38.
- Heitz-Mayfield L J (2005): "How effective is surgical therapy compared with nonsurgical debridement?" *Periodontol* 2000 37: 72-87.
- Hellden L, Lundgren D, Heyden G (1974): "Effect of chlorhexidine gluconate on granulation tissue." *J Periodontal Res* 9(4): 255-9.
- Herrera D (2013): "Chlorhexidine mouthwash reduces plaque and gingivitis." *Evid Based Dent* 14(1): 17-8.
- Herrera D, Alonso B, Leon R, Roldan S, Sanz M (2008): "Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm." *J Clin Periodontol* 35(8 Suppl): 45-66.
- Hidalgo E, Dominguez C (2001): "Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity." *Toxicol In Vitro* 15(4-5): 271-6.
- Hjeljord L G, Rolla G, Bonesvoll P (1973): "Chlorhexidine-protein interactions." *J Periodontal Res Suppl* 12: 11-6.
- Holtzhauer M: "Enzym-Immunsorbent-Test", in: *Biochemische Labormethoden; Springer Labor Manuel*, Berlin Heidelberg New York, 1997.
- Houle M A, Grenier D, Plamondon P, Nakayama K (2003): "The collagenase activity of *Porphyromonas gingivalis* is due to Arg-gingipain." *FEMS Microbiol Lett* 221(2): 181-5.
- Ishikawa S, Iwasaki K, Komaki M, Ishikawa I (2004): "Role of ascorbic acid in periodontal ligament cell differentiation." *J Periodontol* 75(5): 709-16.
- Kent L W, Dyken R A, Rahemtulla F, Allison A C, Michalek S M (1996): "Effect of in vitro passage of healthy human gingival fibroblasts on cellular morphology and cytokine expression." *Arch Oral Biol* 41(3): 263-70.
- Kinane D F, Papageorgakopoulos G (2008): "Full mouth disinfection versus quadrant debridement: the clinician's choice." *J Int Acad Periodontol* 10(1): 6-9.
- Koshy G, Corbet E F, Ishikawa I (2004): "A full-mouth disinfection approach to nonsurgical periodontal therapy--prevention of reinfection from bacterial reservoirs." *Periodontol* 2000 36: 166-78.

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(2): 164-71.

Kuyyakanond T, Quesnel L B (1992): "The mechanism of action of chlorhexidine." *FEMS Microbiol Lett* 79(1-3): 211-5.

Lander P E, Newcomb G M, Seymour G J, Powell R N (1986): "The antimicrobial and clinical effects of a single subgingival irrigation of chlorhexidine in advanced periodontal lesions." *J Clin Periodontol* 13(1): 74-80.

Lang N P, Tan W C, Krahenmann M A, Zwahlen M (2008): "A systematic review of the effects of full-mouth debridement with and without antiseptics in patients with chronic periodontitis." *J Clin Periodontol* 35(8 Suppl): 8-21.

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(4): 181-8.

Leung A K (1986): "Ethyl alcohol ingestion in children. A 15-year review." *Clin Pediatr (Phila)* 25(12): 617-9.

Leyes Borrajo J L, Garcia V L, Lopez C G, Rodriguez-Nunez I, Garcia F M, Gallas T M (2002): "Efficacy of chlorhexidine mouthrinses with and without alcohol: a clinical study." *J Periodontol* 73(3): 317-21.

Lindhe J, Heyden G, Svanberg G, Löe H, Schiott C R (1970): "Effect of local applications of chlorhexidine on the oral mucosa of the hamster." *J Periodontal Res* 5(3): 177-82.

Lindl T, Lewandowski B, Schreyogg S, Staudte A (2005): "An evaluation of the in vitro cytotoxicities of 50 chemicals by using an electrical current exclusion method versus the neutral red uptake and MTT assays." *Altern Lab Anim* 33(6): 591-601.

Löe H, Schiott C R (1970): "The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man." *J Periodontal Res* 5(2): 79-83.

Lorenz K (2008): "Chlorhexidin-Mundspüllösungen." *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 63 (4): 274-280.

Lorenz K, Bruhn G, Heumann C, Netuschil L, Brex M, Hoffmann T (2006): "Effect of two new chlorhexidine mouthrinses on the development of dental plaque, gingivitis, and discolouration. A randomized, investigator-blind, placebo-controlled, 3-week experimental gingivitis study." *J Clin Periodontol* 33(8): 561-7.

Lucarotti M E, White H, Deas J, Silver I A, Leaper D J (1990): "Antiseptic toxicity to breast carcinoma in tissue culture: an adjuvant to conservation therapy?" *Ann R Coll Surg Engl* 72(6): 388-92.

Mariotti A (1993): "The extracellular matrix of the periodontium: dynamic and interactive tissues." *Periodontol* 2000 3: 39-63.

Mariotti A J, Rumpf D A (1999): "Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production." *J Periodontol* 70(12): 1443-8.

McCullough M J, Farah C S (2008): "The role of alcohol in oral carcinogenesis with particular reference to alcohol-containing mouthwashes." *Aust Dent J* 53(4): 302-5.

Meyer J R (1986): "The regenerative potential of the periodontal ligament." *J Prosthet Dent* 55(2): 260-5.

Mosmann T (1983): "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.

Muller G, Kramer A (2008): "Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity." *J Antimicrob Chemother* 61(6): 1281-7.

Nascimento A P, Tanomaru J M, Matoba-Junior F, Watanabe E, Tanomaru-Filho M, Ito I Y (2008): "Maximum inhibitory dilution of mouthwashes containing chlorhexidine and polyhexamethylene biguanide against salivary *Staphylococcus aureus*." *J Appl Oral Sci* 16(5): 336-9.

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(2): 67-72.

Peterkofsky B, Diegelmann R (1971): "Use of a mixture of proteinase-free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins." *Biochemistry* 10(6): 988-94.

Pingoud A, Urbanke C: "Enzyme linked immunosorbent assay", in: *Arbeitsmethoden der Biochemie*; Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1997.

Plagmann H-C, in: *Lehrbuch der Parodontologie*; Hanser Fachbuch, München, 1998.

Poggi P, Rodriguez y Baena R, Rizzo S, Rota M T (2003): "Mouthrinses with alcohol: cytotoxic effects on human gingival fibroblasts in vitro." J Periodontol 74(5): 623-9.

Pucher J J, Daniel J C (1992): "The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro." J Periodontol 63(6): 526-32.

Quirynen M, Bollen C M, Vandekerckhove B N, 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(8): 1459-67.

Quirynen M, Avontroodt P, Peeters W, Pauwels M, Coucke W, van Steenberghe D (2001): "Effect of different chlorhexidine formulations in mouthrinses on de novo plaque formation." J Clin Periodontol 28(12): 1127-36.

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(9): 639-47.

Ramberg P, Furuichi Y, Volpe A R, Gaffar A, Lindhe J (1996): "The effects of antimicrobial mouthrinses on de novo plaque formation at sites with healthy and inflamed gingivae." J Clin Periodontol 23(1): 7-11.

Roche F: "Zellbiologie", in: Technical Tip- Qualität in der Zellkultur, 2010.

Rolla G, Melsen B (1975): "On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine." J Dent Res 54 Spec No B: B57-62.

Rolla G, Løe H, Schiott C R (1970): "The affinity of chlorhexidine for hydroxyapatite and salivary mucins." J Periodontal Res 5(2): 90-5.

Rolla G, Løe H, Schiott C R (1971): "Retention of chlorhexidine in the human oral cavity." Arch Oral Biol 16(9): 1109-16.

Rushton A (1977): "Safety of Hibitane. II. Human experience." J Clin Periodontol 4(5): 73-9.

Saatman R A, Carlton W W, Hubben K, Streett C S, Tuckosh J R, DeBaecke P J (1986): "A wound healing study of chlorhexidine digluconate in guinea pigs." Fundam Appl Toxicol 6(1): 1-6.

Schärfe J (2004): "Elektronische Zellvitalitätsbestimmung, ein Vergleich mit dem klassischen Trypanblau-Assay." BIOSpektrum 3(10): 334-336.

Schroeder H E, in: The Periodontium; Springer, Heidelberg, 1986.

Schwerd M (2008): "Wirkung von Chlorhexidin auf Fibroblasten nach Kontakt mit parodontopathogenen Bakterien " Med. Diss. Jena.

Selbst S M, DeMaio J G, Boenning D (1985): "Mouthwash poisoning. Report of a fatal case." Clin Pediatr (Phila) 24(3): 162-3.

Slots J, Rams T E (1990): "Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages." J Clin Periodontol 17(7 (Pt 2)): 479-93.

Staab W, Gangler P (1982): "Allergic reaction to chlorhexidine gluconate. A case report." Stomatol DDR 32(10): 700-3.

Swierkot K, Nonnenmacher C I, 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(3): 240-9.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995): "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V." J Immunol Methods 184(1): 39-51.

Weller-Fahy E R, Berger L R, Troutman W G (1980): "Mouthwash: a source of acute ethanol intoxication." Pediatrics 66(2): 302-5.

Wennstrom J, Lindhe J (1986): "The effect of mouthrinses on parameters characterizing human periodontal disease." J Clin Periodontol 13(1): 86-93.

Westfelt E, Nyman S, Lindhe J, Socransky S (1983): "Use of chlorhexidine as a plaque control measure following surgical treatment of periodontal disease." J Clin Periodontol 10(1): 22-36.

Winrow M J (1973): "Metabolic studies with radiolabelled chlorhexidine in animals and man." J Periodontal Res Suppl 12: 45-8.

Wittczak T, Dudek W, Walusiak-Skorupa J, Swierczynska-Machura D, Palczynski C (2013): "Chlorhexidine--still an underestimated allergic hazard for health care professionals." Occup Med (Lond).

Young M P, Korachi M, Carter D H, Worthington H V, McCord J F, Drucker D B (2002): "The effects of an immediately pre-surgical chlorhexidine oral rinse on the bacterial contaminants of bone debris collected during dental implant surgery." Clin Oral Implants Res 13(1): 20-9.

Zyba V: "Wirkung von antiseptischen Mundspüllösungen auf die menschlichen Zellen der Mundschleimhaut - Eine in-vitro-Studie", in: Med. Diss. Göttingen, 2011.

Lebenslauf

Am 15.10.1984 wurde ich in Hildesheim als erstes Kind meiner Eltern Wolf-Degenhardt Frisch und Elisabeth Frisch, geb. Boemke, geboren. Vier Jahre darauf folgte mein Bruder Carlo.

Von 1991 bis 1995 besuchte ich die Walldorfschule und von 1995 bis 2004 die Robert-Bosch-Gesamtschule in Hildesheim. Das elfte Schuljahr verbrachte ich in Connecticut (USA) und in Motueka (Neuseeland). Im Juni 2004 erlangte ich die Allgemeine Hochschulreife.

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

Die Approbation zum Zahnarzt wurde mir am 08.12.2009 erteilt. Von Januar 2010 bis zum Juni 2010 war ich als Promotionsstudentin mit meinen experimentellen Versuchen beschäftigt.

Vom 1. Juli 2010 bis zum 29. Februar 2012 war ich als Assistenz Zahnärztin in Salzgitter tätig. Die letzten vier Monate der Assistenzzeit verbrachte ich in Didderse, wo ich seit dem 1. August 2012 als angestellte Zahnärztin tätig bin.

Danksagung

Ich möchte allen danken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. dent. Rainer Mausberg, und Herrn PD. Dr. med. dent. Dirk Ziebolz aus der Poliklinik für Präventive Zahnmedizin, Parodontologie und Kariologie des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Göttinger Georg-August-Universität für die Überlassung des Themas und die ständige exzellente und persönliche Betreuung.

Für die Unterstützung bei der Organisation der praktischen Arbeiten im Zelllabor möchte ich mich ganz herzlich bei den MTAs der Abteilung Präventive Zahnmedizin, Parodontologie und Kariologie Monika Hoch und Gudrun Grzyb bedanken. Ihre Anwesenheit und ihr Engagement war unverzichtbar. Weiterhin bedanke ich mich bei Hans-Joachim Helms und David Ellenberger aus dem Institut für Medizinische Statistik der UMG für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.