

**Wirkung von Chlorhexidin auf Fibroblasten nach Kontakt mit  
parodontopathogenen Bakterien**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae dentariae  
(Dr. med. dent.)

Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Von  
Maika Schwerd  
geboren am 03.07.1982 in Leipzig

**Gutachter:**

1. PD. Dr. S. Eick, Jena
2. Prof. Dr. E. Glockmann, Jena
3. Prof. Dr. Th. Hoffmann, Dresden

**Tag der öffentlichen Verteidigung:** 02.09.2008

## Abkürzungsverzeichnis

A. actinomycetemcomitans	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
Abb.	Abbildung
AG	Antigen
AK	Antikörper
ATCC	American type culture collection
Aqua dest	bidestiliertes Wasser
Chx	Chlorhexidin
DMEM	Dulbecco modified essential medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immuno-sorbant-assay
FCS	fetales Kälberserum
IL	Interleukin
KBE	Kolonie bildende Einheiten
kDa	Kilo Dalton
MTT	Diphenyltetrazoliumbromid
OD	optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline
P. gingivalis	Porphyromonas gingivalis
PDGF	Platelet derived growth factor
PMN	Polymorphkernige Granulozyten
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1 Definition und Klassifikation parodontaler Erkrankungen	3
2.2 Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis	4
2.3 Parodontopathogene Bakterien	5
2.3.1 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	5
2.3.2 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	7
2.4 Funktion der Zytokine bei Parodontopathien	9
2.4.1 Interleukin-6	10
2.4.2 Interleukin-8	11
2.5 Therapie entzündlicher Parodontalerkrankungen	11
2.5.1 Wirkungsweise und Anwendungen von Chlorhexidin	12
2.5.2 Weitere Mundspüllösungen	15
<b>3. Zielstellung</b>	<b>16</b>
<b>4. Material und Methoden</b>	<b>17</b>
4.1 Vorbereitende Arbeiten	17
4.1.1 Anzucht der Zellen	17
4.1.2 Bakterienstämme	18
4.1.3 Infektion der Fibroblasten	18
4.2 Versuchsdurchführung	19
4.2.1 Untersuchung der antibakteriellen Wirksamkeit	21
4.2.2 Ermittlung von Interleukin-6 und Interleukin-8 mittels ELISA aus den Überständen	22
4.2.3 Bestimmung der Zytotoxizität durch MTT-Nachweis	24
4.2.4 Bestätigung der zytotoxischen Wirkung mittels Trypanblau- Exclusion-Test	25

<b>5. Ergebnisse</b>	<b>26</b>
5.1 Antimikrobielle Aktivität	26
5.1.1 Planktonische Bakterien <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	26
5.1.2 Adhärenente Bakterien <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	28
5.1.3 Planktonische Bakterien <i>Porphyromonas gingivalis</i>	30
5.1.4 Adhärenente Bakterien <i>Porphyromonas gingivalis</i>	31
5.2 Freisetzung der Zytokine	32
5.2.1 Interleukin-6-Freisetzung	33
5.2.2 Interleukin-8-Freisetzung	38
5.3 Zytotoxizität	43
5.3.1 MTT-Nachweis	43
5.3.2 Trypanblau-Exclusion-Test	46
<b>6. Diskussion</b>	<b>47</b>
6.1 Methodik	47
6.2 Antimikrobielle Aktivität	49
6.3 Freisetzung der Zytokine	52
6.4 Zytotoxizität	54
<b>7. Schlussfolgerungen</b>	<b>58</b>
<b>8. Literatur und Quellenverzeichnis</b>	<b>60</b>
<b>9. Anhang</b>	<b>74</b>
<b>10. Lebenslauf</b>	<b>85</b>
<b>11. Danksagung</b>	<b>86</b>
<b>12. Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>87</b>

## **1. Zusammenfassung**

Die adjuvante Anwendung von Chlorhexidin zur Plaquekontrolle und Gingivitisprävention gilt als Goldstandard in der parodontalen Therapie. Ziel der vorliegenden Studie war es, die Wirkung von chlorhexidinhaltigen Mundspüllösungen auf die Interaktion von parodontopathogenen Bakterien der Spezies *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* mit humanen gingivalen Fibroblasten zu prüfen. Schwerpunkt der Untersuchungen sollten hierbei die antimikrobielle Aktivität, die Beeinflussung der Freisetzung der inflammatorischen Interleukine IL-6 und IL-8 aus infizierten und nicht-infizierten Fibroblasten und die mögliche zytotoxische Wirkung sein.

Im ersten Teilversuch wurden Gingivafibroblasten mit *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384, *A. actinomycetemcomitans* Y4, *P. gingivalis* M5-1-2 und *P. gingivalis* ATCC 33277 infiziert, und nach einminütiger Exposition mit den 13 Testlösungen für eine, sechs und 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Untersucht wurden sieben im Handel erhältliche Chlorhexidinpräparate mit Konzentrationen zwischen 0,06% und 1,0%, vier frisch hergestellte Lösungen aus 20% Chlorhexidin und sterilem Leitungswasser sowie zwei chlorhexidinfreie Mundspüllösungen. Es wurde die Zahl der koloniebildenden Einheiten planktonischer und adhärenter Bakterien bestimmt. Im zweiten Teilversuch erfolgte mittels ELISA die Ermittlung der Freisetzung von IL-6 und IL-8 aus den Überständen des Zellkulturmediums. Die Zytotoxizität wurde mit Hilfe des MTT-Nachweises ermittelt, und mit dem Trypanblau-Exclusion-Test bestätigt.

In der vorliegenden Studie wiesen alle geprüften Chlorhexidinlösungen eine gute antimikrobielle Wirksamkeit gegen parodontopathogene Bakterien in Interaktion mit Gingivafibroblasten auf. Die frisch hergestellten Lösungen waren in jeder Konzentration den im Handel erhältlichen Präparaten deutlich überlegen. Ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration, ergänzenden Zusätzen und der Wirksamkeit bestand nicht. Als deutlich schlechter erwiesen sich die antimikrobiellen Eigenschaften der auf der Wirkung von Aminfluorid/Zinnfluorid beziehungsweise Thymol, Menthol und Eukalyptol beruhenden Präparate Meridol und Listerine. Der keimabtötende Effekt war gegenüber *P. gingivalis* ausgeprägter als gegen *A. actinomycetemcomitans*, so dass anhaltende Verminderungen der Keimzahlen für *A. actinomycetemcomitans* in der Mundhöhle im Gegensatz zu *P. gingivalis*

mit einer einmal-täglichen Mundspülung durch keine der 13 getesteten Lösungen zu erreichen wären.

Mundspüllösungen verändern die Freisetzung von Zytokinen aus Gingivafibroblasten. Im Vergleich zu den Kontrollen waren bei Anwendung auf mit *A. actinomycetemcomitans* infizierten Zellen verminderte IL-6 und IL-8-Werte messbar. Die Testlösungen unterdrückten die von *A. actinomycetemcomitans* induzierte Freisetzung von Zytokinen. Die gemessenen höheren Interleukinspiegel bei Infektionen mit *P. gingivalis* lassen sich durch einen Hemmeffekt des Chlorhexidins auf die Proteasen von *P. gingivalis*, die IL-6 und IL-8 spalten können, erklären. Beeinflusst werden diese Ergebnisse durch die zytotoxischen Wirkungen der Lösungen auf orale Gingivafibroblasten, die bei allen Mundspüllösungen nachgewiesen werden konnten. Die zytotoxische Wirkung stieg mit der Erhöhung der Konzentration.

Die In-vitro-Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen die Notwendigkeit auf, die Art und Dauer der Anwendung der Mundspüllösungen in der Mundhöhle einzuschränken. Die Behandlung gesunder parodontaler Verhältnisse im Sinne der Prophylaxe durch die getesteten zellschädigenden Mundspüllösungen erscheint fragwürdig, und sollte unter strenger Indikationsstellung erfolgen. Eine gründliche mechanische Plaquerreduktion sowie die Vermeidung von parodontitisbegünstigenden Faktoren sollte Vorrang besitzen.

In der Therapie entzündlicher Parodontalerkrankungen kann eine adjuvante Anwendung von Chlorhexidin zur Elimination von parodontopathogenen Bakterien beitragen, jedoch sollte eine Kurzzeitanwendung von niedrig konzentrierten Lösungen bevorzugt werden.

## **2. Einleitung**

Die Parodontitis hat sich in den letzten Jahrzehnten zur Volkskrankheit in den Industrienationen entwickelt. Neben den zahnmedizinisch relevanten Folgen weisen aktuelle Untersuchungen auch auf Zusammenhänge zwischen entzündlichen Parodontalerkrankungen und pathologischen systemischen Veränderungen hin. So wurden ein erhöhtes Endokarditisrisiko (Lockhart 2000), vermehrte Arteriosklerose (Scannapieco et al. 2003), und eine Häufung von Herzinfarkten (Kaisare et al. 2007) und Schlaganfällen (Okuda et al. 2004) als direkte und indirekte Auswirkungen bei Parodontitispatienten beobachtet. Der Prophylaxe und Therapie der parodontalen Erkrankungen kommt daher eine entscheidende und immer größer werdende Bedeutung zu.

### **2.1 Definition und Klassifikation parodontaler Erkrankungen**

Als Parodontopathien werden die entzündlichen Erkrankungen des Zahnhalteapparates bezeichnet. Klinisch wird die Parodontitis durch folgende Symptome charakterisiert: Pathologische und entzündete Zahnfleischtaschen, Alveolarknochenabbau und Verlust des Attachments (Page und Schröder 1982, Van der Velden 2005). Andere Ansätze gehen von der Parodontitis als Syndrom, nicht als Erkrankung aus, da allgemein anerkannte explizite Kriterien für Parodontitis nicht festgelegt sind, und eine scharfe Trennung zwischen den verschiedenen Parodontitisformen nicht möglich ist (Baelum und Lopez 2003).

Zur wissenschaftlichen Einordnung der Ätiologie, Pathogenese und Behandlung sowie zur Verständigung im klinischen Gebrauch entstand als Ergebnis des „International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions“ 1989 die aktuell verwendete Klassifikation der Parodontalerkrankungen (Armitage 1999). Diese gilt seit Oktober 1999 und beinhaltet folgende Unterteilungen:

- 1) gingivale Erkrankungen
- 2) chronische Parodontitis
- 3) aggressive Parodontitis
- 4) Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen
- 5) nekrotisierende Parodontalerkrankungen
- 6) Abszesse des Parodonts
- 7) Parodontitis im Zusammenhang mit endodontischen Läsionen
- 8) entwicklungsbedingte oder erworbene Deformitäten oder Zustände



## **2.2 Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis**

In der subgingivalen Plaque sind über 400 Bakterienarten präsent (Paster et al. 2001). Diese stellen in ihrer Gesamtheit eine notwendige und regulierende Komponente für die parodontale Gesundheit dar (Roberts und Darveau 2002). Die Entstehung und der Verlauf von entzündlichen Parodontalerkrankungen ist durch das Vorherrschen einer kleinen Gruppe gramnegativer, anaerober oder mikroaerophiler Bakterien in der subgingivalen Region bedingt (Page und Kornman 1997). Dazu gehören nach der Definition des World Workshop Of Clinical Periodontics 1996 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Tannerella forsythia*. Im Biofilm findet im Laufe von parodontalen Entzündungen ein Wandel von grampositiven, aeroben, fakultativ fermentativen Bakterien hin zu den beschriebenen parodontopathogenen Mikroorganismen statt.

Neben dieser mikrobiellen Komponente existieren Risikofaktoren wie Tabakkonsum (Page and Kornman 1997, Ojima et al. 2006), Diabetes mellitus (Tan et al. 2006) und Osteoporose (Kaye 2007), die das Auftreten und die klinische Ausprägung der Erkrankung bestimmen. Einige systemische Erkrankungen wie Agranulozytose oder das Chediak-Higashi-Syndrom sind durch Defekte in der Funktion der neutrophilen Granulozyten mit dem Auftreten von Parodontitis assoziiert. Auch beim Down-Syndrom und dem Papillon-Lefevre-Syndrom ist eine Prädisposition zur Parodontitis vorhanden (Nualart Grollmus et al. 2007). Nibali et al. (2007) wiesen nach, dass der genetische Polymorphismus durch Variationen der Gewebsstruktur, der Antikörperproduktion, und der Entzündungsmediatorbereitstellung eine große Rolle bei der Wirtsantwort und Progression der Parodontitis spielt.

Die Vorstufe der Parodontitis ist immer eine Gingivitis – eine reversible Entzündung des Zahnfleisches ohne Attachmentverlust. Sie ist klinisch durch Rötung, Schwellung, Blutung und Formveränderungen der Gingiva sowie die Erhöhung der Sulkussflüssigkeitsfließrate gekennzeichnet (Academy Report 1999). Histopathologisch lässt sich die Gingivitis in drei Stadien einteilen (Payne et al. 1975): die initiale Läsion ist als akute entzündliche Gewebsantwort auf die bakteriellen Reize mit Infiltration von neutrophilen Granulozyten charakterisiert. Vaskuläre Veränderungen, Epithelreaktionen und Kollagenabbau finden statt. Die Aktivierung des Komplement- und Kininsystems ist zu beobachten (Attström und Egelberg 1970, Hellden und Lindhe 1973). In der frühen Läsion infiltrieren lymphoide Zellen, vor allem T-Lymphozyten, in das Gewebe, während in der Phase der etablierten Läsion B-Lymphozyten und Plasmazellen dominieren. Durch die verschiedenen bakteriellen

Virulenzfaktoren kommt es zur Aktivierung von Makrophagen und Fibroblasten; das lokale Immunsystem und die Zytokinausschüttung werden angeregt. Bei Beseitigung des bakteriellen Biofilms sind diese Vorgänge vollständig reversibel.

Bleiben die schädigenden bakteriellen Einflüsse bestehen, etabliert sich im weiteren Verlauf eine Parodontitis (Wolff et al. 1994). Dabei wird neben dem aggressiven und chronischen Verlauf zwischen einer lokalisiert und einer generalisiert auftretenden Form unterschieden.

Die Merkmale der aggressiven Parodontitis sind die allgemeine klinische Gesundheit des Patienten, eine rasch fortschreitende Gewebedestruktion, das Patientenalter zwischen der Pubertät und 35 Jahren und die auffällige familiäre Häufung (Kamma et al. 2004). Leitkeim für den mikrobiologischen Nachweis ist *A. actinomycetemcomitans* (Fine et al. 2006, Schacher et al. 2007).

Die chronische Parodontitis kann grundsätzlich in jedem Alter auftreten, Schwere und Prävalenz nehmen jedoch mit steigender Anzahl der Lebensjahre zu. Es tritt subgingivaler Zahnstein auf, die Progression ist langsam, es können jedoch Aktivitätsschübe vorkommen. Das Auftreten von *P. gingivalis* ist mit dieser Form der Erkrankung assoziiert (Holt und Ebersole 2005).

## **2.3 Parodontopathogene Bakterien**

Parodontopathogene Mikroorganismen weisen drei charakteristische Eigenschaften auf, die ihre Virulenz begründen: Sie kolonisieren den gingivalen Sulkus, umgehen antibakterielle Abwehrmechanismen des Wirtes und produzieren gewebedestruierende Substanzen. Zu den wichtigsten Erregern der Parodontitis gehören *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis*.

### **2.3.1 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* wurde erstmals im Jahr 1912 von Klinger als Begleitkeim der Aktinomykose isoliert. Er ist ein kleines, wenig bewegliches, gramnegatives, mikroaerophiles, saccharolytisches Stäbchen, das in der Kultur Kolonien mit einem typischen Stern- oder Zigarrenmuster im Zentrum ausbildet. Neueste Studien erbrachten die genetische Zugehörigkeit des bisher als *Actinobacillus actinomycetemcomitans* bezeichneten Keimes in die neue Gruppe *Aggregatibacter*, zu der auch *Haemophilus aphrophilus* und *Haemophilus*

segneis gehören. Die Spezies *Aggregatibacter* ist unabhängig von Faktor X und zeigt variable Abhängigkeiten vom Faktor V für das Wachstum *in vitro* (Norskov-Lauritsen und Kilian 2006).

Der Keim wird basierend auf verschiedenen Oberflächenpolysacchariden in sechs Serotypen (a-f) mit jeweils unterschiedlichen Ausprägungen der Virulenzfaktoren eingeteilt (O'Brien-Simpson et al. 2006). Klinische, mikrobiologische und immunologische Studien zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Infektion mit *A. actinomycetemcomitans* und dem Auftreten der lokalisierten aggressiven Parodontitis (Fine et al. 2006, Schacher et al. 2007), wobei der Serotyp b als der vorherrschende Serotyp bei erkrankten Patienten identifiziert werden konnte (Zambon et al. 1983, Yang et al. 2005). Die Elimination des Keimes aus den parodontalen Taschen ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Therapie dieser Patienten (Zambon 1985).

Die pathogenen Eigenschaften des Keimes sind durch eine Reihe von Virulenzfaktoren bedingt. Leukotoxin, ein 116 kDa schweres Protein aus der Familie der repeats-in-toxine (RTX-Toxine), verursacht eine Veränderung der Zellwandpermeabilität von T-Zellen, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und polymorphkernigen Leukozyten. Andere an der Entzündung beteiligte Zelltypen wie Endothelzellen, Fibroblasten oder Thrombozyten sind gegen das Leukotoxin resistent (Sanderink und Bengel 1995). In hohen Konzentrationen bindet das Leukotoxin unspezifisch an Zellmembranen, wo es über die Bildung von Poren einen schnellen Kalziumeinstrom bewirkt und ATP-Verlust zur Nekrose der Zelle führt. Geringere Konzentrationen des Leukotoxins aktivieren über die Bindung an spezifischen Oberflächenproteinen und einen dadurch verursachten unkontrollierten Natriumeinstrom die Apoptose der Zelle (O'Brien-Simpson et al. 2006). Durch proteolytische Spaltung mit Hilfe von aus *P. gingivalis* freigesetzten Gingipainen erfolgt eine Inaktivierung des Leukotoxins (Johansson et al. 2000). Auch *Prevotella* Spezies sind zum enzymatischen Abbau dieses Virulenzfaktors in der Lage. Das von *A. actinomycetemcomitans* synthetisierte Leukotoxin ist ein potentes zytotoxisches Antigen, das in der Lage ist, Immunzellen abzutöten. Es resultiert die Dysregulation der Immunantwort, Gewebszerstörung und fortschreitende Entzündung.

Weitere Virulenzfaktoren sind extrazelluläre proteolytische Enzyme, die unter anderem Fibrinogen und Kollagen Typ-I hydrolysieren können, sowie Hitzeschockproteine und Fimbrien (Wang et al. 1999, Nakano et al. 1995, Saito et al. 1993). Fimbrientragende *A.*

actinomycetemcomitans-Stämme haben eine höhere Affinität zu Epithelzellen (Rosan et al. 1988) und können durch rezeptorvermittelte Endozytose (Fives-Taylor et al. 1995) leichter in die Zellen eindringen und sich so der Immunreaktion entziehen. Des Weiteren besitzt *A. actinomycetemcomitans* als Antigen fungierende äußere Membranproteine, die die Produktion proinflammatorischer Zytokine induzieren können (Tani et al. 1997). Knochenresorptionsinduzierende Faktoren, saure und alkalische Phosphatasen, Fibroblastentoxine und epitheliale Toxine unterstützen die Gewebeerstörung (Zambon et al. 1985).

### 2.3.2 Porphyromonas gingivalis

Die Gattung *Porphyromonas* wurde im Jahr 1986 von den Bacteroidaceae abgegrenzt (Mayrand 1988). Zu ihr gehören – neben anderen – die im oralen Milieu vorkommenden Spezies *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, und *P. asaccharolyticus*, die für Zahnabszesse, Gingivostomatitis, Parodontitis und Infektionen des tiefen Respirationstraktes verantwortlich sind (Kayser et al. 2001). Es handelt sich um gramnegative, obligat anaerobe, unbewegliche, nicht-fermentative Stäbchen. Die bedeutende Rolle des Bakteriums wird durch Studien von Person et al. (1994) unterstrichen, der eine Abnahme des Schweregrades der Parodontitis im Tierversuch nach Immunisierung gegen *P. gingivalis* nachweisen konnte. Das Vorhandensein seines Antigens in der Zahnplaque korreliert mit fortschreitendem Knochenabbau (Chaves et al. 2000).

*P. gingivalis* bildet mit *Treponema denticola* und *T. forsythia* den roten Komplex, dessen Vorhandensein auf ein weit fortgeschrittenes Organisationslevel des bakteriellen Biofilms bei progressiver chronischer Parodontitis hinweist (Holt und Ebersole 2005). Dies erklärt sich durch das benötigte sauerstoffarme, substratreiche Umfeld mit Bindungsstellen für die Koaggregation des Keimes, welches durch vorangehende Keimbesiedlung des Wirtes entsteht. *P. gingivalis* bindet dabei an *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola*, *Treponema medium* und *Tanarella forsythia* (Lamont und Jenkinson 2000). Selten kann *P. gingivalis* bei parodontal Gesunden, Zahnlosen oder Kindern isoliert werden (Dahlén 1993). Typisch für die Infektion mit *P. gingivalis* ist der stechende Geruch, der durch die bakterielle Produktion von Sulfiden, Methylmercaptan und Dimethylsulfiden hervorgerufen wird (Nakano et al. 2002).

Das Bakterium besitzt ein großes Repertoire an Virulenzfaktoren. Die Produktion von Fimbrien, Hämagglutininen, Proteasen, extrazellulären membrangebundenen Vesikeln,

Lipopolysacchariden, und einer Polysaccharidkapsel ermöglichen die Kolonisation von *P. gingivalis* im Parodontium und verursachen die Zerstörung von Zahnhalteapparat und Knochen (Cutler et al. 1995). Verschiedene Stämme differieren in der Expression der Virulenzfaktoren (Baker et al. 2000), korrelierend zu ihrer genotypischen Ausstattung (Eick et al. 2002), wobei jeder Patient nur Träger eines Klons ist (Teapaisan et al. 1996).

Zur Anheftung in der Mundhöhle verfügt *P. gingivalis* über Fimbrien auf der Zelloberfläche, die an prolinreiche Proteine des Speichels (Amano et al. 1998), Epithelzellen (Weinberg et al. 1997), Fibroblasten, Hämoglobin, extrazelluläre Matrix, Mukosa, orale Mikroorganismen binden können (Lamont und Jenkinson 2000) und als Virulenzfaktoren fungieren. Das Bakterium exprimiert zwei verschiedene Fimbrienmoleküle, die als Major- und Minor-Fimbrien bezeichnet werden und deren Vorhandensein Einfluss auf die Entwicklung der parodontalen Erkrankung hat. *P. gingivalis*-Fimbrien induzieren die Expression von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  in Makrophagen und stehen im Verdacht, ein kausaler Faktor der alveolaren Knochenresorption im Tiermodell zu sein (Amano et al 2004). Die adhäsiven Fähigkeiten steigen mit der Anzahl der Fimbrien, so dass fimbrienreiche Stämme wie *P. gingivalis* ATCC 33277 eine besonders feste Bindung eingehen können (Hongo et al. 2007).

*P. gingivalis* verfügt über fünf verschiedene Hämagglutinine und interagiert mit humanem Hämoglobin durch spezifische Bindungsstellen auf der Bakterienoberfläche. Dies dient als erster Schritt der Aufnahme von Eisen (Amano et al. 1995), und unterstützt die Kolonisation des Keimes durch Bindungen zwischen Bakterium und humanen Zellen (Lamont und Jenkinson 1998).

Toxische bakterielle Stoffwechselprodukte wie Schwefelwasserstoff, Ammoniak und Fettsäuren führen zur Unterbrechung der Gewebeintegrität (Holt und Bramanti 1991). Unterstützt wird dies durch verschiedene sezernierte Enzyme wie Kollagenasen, Fibrinolysin, und Phospholipase A, die aktiv den Zahnhalteapparat zerstören. Der größte Anteil der proteolytischen Aktivität wird jedoch den Cysteinproteinasen, in der Literatur als Gingipaine bezeichnet, zugeschrieben. Diese Proteasen, die sowohl zellassoziiert als auch in vom Bakterium abgegebener Form auftreten, haben die Fähigkeit, extrazelluläre Matrixbestandteile wie Fibrinogen, Fibronectin, Laminin und Kollagen Typ III, IV und V zu binden und diese abzubauen (Pike et al. 1996). Genetisch lassen sich lysinspezifische, kodiert durch das *kgp* -Gen und argininspezifische Proteinase, kodiert durch das *rgpA*-Gen und das *rgpB*- Gen unterscheiden (Pavloff et al. 1997). Die Wirkungen sind sehr vielfältig: Gingipaine

beeinflussen Komplementfaktoren über Veränderungen der Opsonierung und Phagozytose, aktivieren Matrix-Metall-Proteinasen, dysregulieren die Produktion proinflammatorischer Zytokine, aktivieren Kallikrein/Kinin mit Erhöhung der Sulkusflüssigkeitsfließrate, verändern Thrombinfreisetzung, Knochenresorption und Blutungstendenz (Potempa et al. 2000).

Gegenüber der Phagozytose durch polymorphkernige Granulozyten soll *P. gingivalis* durch Lipopolysaccharide und Polysaccharide als Bestandteile der Bakterienkapsel resistent sein (Cutler et al. 1995). Die Persistenz des Keimes in Epithelzellen bietet Schutz vor Abwehrmechanismen des Immunsystems, Wirkung von Antibiotika, sichert die nutritive Versorgung und ist einer der Schlüsselfaktoren für das Unterhalten einer chronischen Infektion durch *P. gingivalis* (Lantz 1996, Eick et al. 2002).

#### **2.4 Funktion der Zytokine bei Parodontopathien**

Immunreaktionen des Wirtes dienen der Abwehr von Infektionen und dem Schutz vor daraus resultierenden Schädigungen. Zytokine sind essentieller Bestandteil einer funktionierenden Immunabwehr, können aber bei unkontrollierter und überschießender Freisetzung zerstörend und krankheitsfördernd wirken (Kelso 2000). Entzündliche Parodontalerkrankungen sind charakterisiert durch die Migration von polymorphkernigen Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und Mastzellen, sowie Osteoblasten und Osteoklasten (Silva et al. 2007). Zytokine ermöglichen als Mediatoren die Kommunikation zwischen den unterschiedlichen Zelltypen. Sie wirken schon in kleinsten Konzentrationen und regulieren nach Bindung an spezifische Zytokinrezeptoren über verschiedene Signaltransduktionswege die Transkription von Genen. Die über 50 bekannten Zytokine werden in die Klassen Interferone, Interleukine, Tumornekrosefaktoren und Wachstumsfaktoren eingeteilt.

Besonders bedeutsam für die Pathogenese entzündlicher parodontaler Erkrankungen sind dabei die so genannten inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ . Zytokine sind an vielen Vorgängen der Gingivitis- und Parodontitisentstehung beteiligt: An der Adhäsion der Leukozyten an Endothelien, an Chemotaxis, der Aktivierung immunkompetenter Zellen, der Differenzierung von B-Zellen in antikörperproduzierende Plasmazellen sowie über anabole und katabole Effekte auf Osteoblasten (Hughes et al. 2006) am Knochen- und Attachmentverlust (Deschner 2000).

### 2.4.1 Interleukin-6

IL-6 ist ein multifunktionelles Zytokin, welches von lymphoiden und nicht-lymphoiden Zellen produziert wird (Hirano und Kishimoto 1990). Es wird häufig bei Parodontitis nachgewiesen, und ist ein wichtiger Mediator zur Beeinflussung von Signalen im Zytokin-Netzwerk entzündlicher Reaktionen (Naruishi et al. 1999), wobei die Hauptfunktion in der Induktion der Antikörperproduktion besteht (Akira 1990). In der Literatur wird es unter verschiedenen Synonymen beschrieben. Namen wie BCDF (B cell differentiation factor), IL-HP1 (Interleukin-Haematopietin-1), Cytotoxic T-cell differentiation factor, oder THCGF (thymocyte growth factor) machen die Vielzahl der Funktionen des Proteins deutlich.

Das Interleukin wird von verschiedenen Zelltypen produziert. Hauptquellen sind In-vivo stimulierte Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Makrophagen, T- und B-Lymphozyten, Mastzellen, Gliazellen und Keratinozyten sind ebenfalls in der Lage, IL-6 nach entsprechender Stimulation zu exprimieren (Okada und Murakami 1998).

Fünf verschiedene Formen mit einer Molekülmasse zwischen 21,5 kDa und 28,5 kDa, die sich hauptsächlich durch posttranslatorische Prozesse wie Glycolysierung oder Phosphorylierung unterscheiden, werden von diesen Zellen gebildet. In Fibroblasten wird die Synthese durch Interferon- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PDGF und Virusinfektionen stimuliert. Diese verschiedenen Induktoren erklären sich durch zahlreiche regulatorische Elemente des IL-6 Gens, die eine Beeinflussung der Expression ermöglichen. Aus verschiedenen Zellen isoliertes IL-6 zeigt eine Mikroheterogenität am N-Terminus.

Der IL-6-Rezeptor wird bei T-Zellen, mitogenaktivierten B-Zellen, peripheren Monozyten und einigen Tumorzellen gefunden. Neben der membranständigen Rezeptorform existiert eine lösliche Rezeptorvariante, durch die auch Gingivafibroblasten zu Zielzellen für IL-6 werden können (Naruishi et al. 1999). Es gibt zwei Rezeptorformen mit unterschiedlicher Affinität zum Liganden. An der Signaltransduktion sind sowohl Proteinkinase C als auch Adenylat-Cyclasen beteiligt.

IL-6 ist ein pleiotrop wirkendes Zytokin. Es beeinflusst die antigenspezifische Immunantwort und inflammatorische Reaktionen. Als physiologischer Hauptfaktor induziert es die Akute-Phase-Reaktion (Heinrich 1990). In vitro und auch In-vivo wirkt es als Differenzierungsfaktor

für B-Zellen und Aktivierungsfaktor für T-Zellen. Zusammen mit IL-2 kann es die Umwandlung von T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen anregen (Gemsa 1991). Nach Aktivierung durch IL-4 ist IL-6 in der Lage, die Reifung der B-Zellen zu immunglobulinsezernierenden Plasmazellen zu induzieren (Kikutani et al. 1985). Neben diesen immunregulatorischen Eigenschaften hat IL-6 direkte katabole Wirkungen auf den Knochen, indem es die Anzahl der Osteoklasten und deren Vorläuferzellen erhöht, die Knochenresorption stimuliert und die Knochenbildung hemmt (Lowik et al. 1989, Ohasaki et al. 1992).

#### 2.4.2 Interleukin-8

IL-8 wurde erstmals als chemotaktischer Faktor für neutrophile Granulozyten beschrieben. Im Gegensatz zu anderen Zytokinen weist es eine Spezifität zu diesen Zellen auf, und hat nur schwache Effekte auf andere Blutzellen. Das Interleukin fördert die Chemotaxis und Aktivierung der Neutrophilen in entzündlich veränderten Geweben. Die Reaktion der neutrophilen Granulozyten auf IL-8 ist gekennzeichnet durch Migration der Zellen, Freisetzung von Granulae und anderen intra- und extrazellulären Veränderungen. Auch die Chemotaxis humaner gingivaler Fibroblasten wird abhängig von der Höhe der IL-8 Freisetzung gefördert (Yoshimura et al. 1987). IL-8 wird von Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, und Endothelzellen sezerniert. Stimulierende Faktoren sind dabei IL-1 und TNF- $\alpha$  (Bickel 1993, Otake et al. 1993).

Der IL-8 Rezeptor ist ein Dimer aus Glykoproteinen (59 kDa und 67 kDa). Er wird auf einer Vielzahl von Zellen gefunden, auch solchen, die nicht sensibel für IL-8 sind. Dies erklärt sich aus der Tatsache, dass der Rezeptor nicht spezifisch für IL-8 ist, sondern ebenfalls IL-8 verwandte Faktoren (MGSA, GRO, MIP-2) bindet. Die Dichte der Rezeptoren variiert stark, bei Neutrophilen beträgt sie 20 000 Rezeptoren/ Zelle, auf T- Lymphozyten nur 300/ Zelle. Die Signaltransduktion erfolgt G-Protein assoziiert.

### **2.5 Therapie entzündlicher Parodontalerkrankungen**

Es existieren verschiedene Ansätze der Therapie, die das gemeinsame Ziel verfolgen, die Ursache zu eliminieren, den parodontalen Zusammenbruch zu unterbrechen und den Zahnverlust zu verhindern. Die Wiederherstellung der Gesundheit, Funktion und Ästhetik der



beteiligten Strukturen und Gewebe wird angestrebt. Dazu gehören Gingiva, parodontales Ligament, Zement und Alveolarknochen. Fehlen von Entzündungszeichen wie Rötung, Schwellung, Schmerz oder Blutung bei Sondierung sowie ein funktionales Attachmentlevel, geringe oder keine Rezession und ein stabiles Knochenniveau kennzeichnen eine erfolgreiche Therapie (Academy Report 2001). Mikrobiologisch wird die Reduktion oder Elimination der pathogenen Spezies mit Erhalt der Standortflora angestrebt (Teles et al. 2006).

Einzelnen oder kombiniert können eingesetzt werden:

- Konservative, nicht chirurgische Behandlung
- Chirurgische Therapie
- Lokale und systemische antibakterielle Chemotherapie.

Zur medikamentösen Keimzahlreduktion können Antibiotika wie Amoxicillin, Doxycyclin, Clindamycin oder Metronidazol appliziert werden. Alleiniger Antibiotikaeinsatz ist jedoch zur vollständigen Elimination der Infektion nicht ausreichend (Eick und Pfister 2004, Walter und Weiger 2006). Aufgrund der möglichen Resistenzbildung bleibt der Antibiotikaeinsatz auf Problempatienten beschränkt.

Andere antibakterielle plaque- und entzündungshemmende chemische Verbindungen in Form von Mundspüllösungen sind kommerziell erhältlich und für einen größeren Patientenkreis geeignet; neben Chlorhexidin gehören Triclosan und ätherische Öle ebenso in diese Gruppe wie Verbindungen von Fluoriden mit Metallionen oder Aminen. Chlorhexidin hat unter diesen die größten antimikrobiellen, Antiplaque- und Antigingivitis-Effekte (Brex et al. 1992).

### 2.5.1 Wirkungsweise und Anwendung von Chlorhexidin

Bei der Auswahl antimikrobieller Agenzien für die Prävention und Therapie parodontaler Erkrankungen sollten nach Lang und Brex (1986) folgende Faktoren berücksichtigt werden: 1. Spezifität, 2. Effektivität, 3. Substantivität, 4. Sicherheit und 5. Stabilität. Chlorhexidin gilt dabei als Goldstandard in der unspezifischen Hemmung des Wachstums und der Biofilmbildung aller Mundhöhlenkeime.

Das Bisbiguanid Chlorhexidindigluconat ist ein synthetisches, kationisches Detergenz und nimmt in der Zahnheilkunde eine herausragende Position ein. Als Diglukonatsalz ist es in

Wasser und Alkohol gut löslich. Nach seiner Entdeckung 1954 wurden erste systematische klinische Untersuchungen zum plaquehemmenden Effekt von Løe und Schiött (1970) durchgeführt.

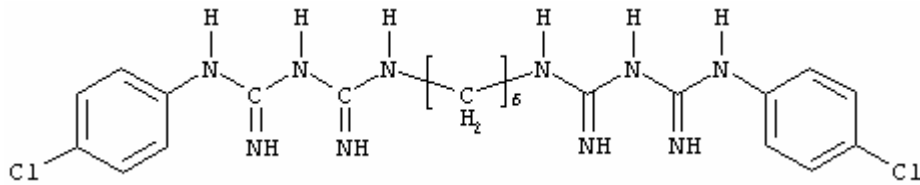


Abb. 1: Strukturformel Chlorhexidin

Chlorhexidin ist gegen grampositive und gramnegative Mikroorganismen, Pilze wie *Candida albicans* (Ellepolá 2001) und, zumindest in vitro, gegen einige Viren der Mundhöhle wirksam (Park und Park 1989).

Die Wirkung beruht auf der Bindung des kationischen Chlorhexidinmoleküls an anionische Sulfat-, Phosphat- und Carboxylatgruppen und tritt so in Wechselwirkung mit den anionischen Glyko- und Phosphoproteinen der oralen Schleimhäute und des Pellikels, von wo es in den folgenden acht bis zwölf Stunden in aktiver Form wieder abgegeben wird (Schiött 1973). Außerdem liegt eine Absorptionsneigung an das Hydroxylapatit vor. Die Anlagerung des Chlorhexidins vermindert die Eiweißpräzipitation an der Zahnoberfläche im Zuge der Pellikelausbildung durch das Besetzen der anionischen Gruppen in den Makromolekülen der Speichelglykoproteine. Auch an Oberflächen einiger Bakterien wie *P. gingivalis* bindet Chlorhexidin, verändert die Struktur der äußeren Membran und reduziert die Adhärenzfähigkeit (Grenier 1996). Somit wird der Plaquebildung als dominantem Faktor bei der Entstehung der Gingivitis und Parodontitis effektiv vorgebeugt.

Chlorhexidin wirkt auf die Bakterienzelle durch drei Mechanismen: einer Absorption an die Zellwand mit Störungen des Elektronentransportes, der Zerstörung der Permeabilitätsschranke und in höheren Konzentrationen durch Eindringen in die Zelle und einer Präzipitation des Zytoplasmas mit der Folge des Zelltodes. In hohen Konzentrationen (1%) ist die Wirkung bakterizid, in niedrigen Konzentrationen bakteriostatisch. Eine selektive Beeinflussung wie durch Antibiotika mit der Möglichkeit der Resistenzbildung ist durch die unspezifische Wirkung auf Bakterien weitgehend ausgeschlossen.

Anwendung findet Chlorhexidin in der Parodontologie aufgrund seiner hohen Wasserlöslichkeit vor allem als Spüllösung, aber auch als Gelzubereitung. Einsatzgebiete sind die Gingivitisbehandlung, die Behandlung parodontal erkrankter Patienten, präoperative Spülungen zur Reduktion von krankheitsverursachenden Keimen sowie intra- und postoperative Applikationen zur Infektionsprophylaxe. Faveri et al. (2006) wiesen auf die guten klinischen Effekte von kombiniertem Scaling/Rootplaning mit Chlorhexidinspülungen hin. Auch im Recall zur Stabilisierung postoperativer Ergebnisse wird Chlorhexidin mit Erfolg verwendet (Heinz et al. 1999). Noiri et al. (2003) zeigten in Studien, dass Chlorhexidin die Vitalität einiger parodontopathogener Bakterien im Biofilm stärker reduziert als vergleichsweise angewendete Antibiotika. Die Konzentration der gebrauchsfertigen Handelspräparate liegt dabei zwischen 0,06% und 0,2% in Lösungen und bei maximal 1,0% in Gelen.

Bei langfristigem Gebrauch von Chlorhexidin stellen sich lokale Nebenwirkungen ein. Ästhetisch beeinträchtigende Verfärbungen an den Zähnen werden am häufigsten beobachtet, bedingt durch Bindung der zweiten kationischen Gruppe an Farbstoffe aus Kaffee, Wein, Tabak sowie andere Nahrungs- und Genussmittel. Das Ausmaß der Farbablagerungen korreliert mit der Häufigkeit der verursachenden Nahrungsmittel sowie mit der Chlorhexidinkonzentration in den verwendeten Spüllösungen (Eley 1999). Chlorhexidin bindet auch an die Geschmacksknospen der Zunge mit der Folge der Blockade spezifischer Rezeptoren, was zu reversiblen Geschmacksirritationen führt. Vor allem der saure und bittere Bereich ist betroffen. Auch hier ist die Irritation mengen- und konzentrationsabhängig (Gent et al. 2002). Schleimhauterosionen konnten in klinisch-experimentellen Studien nur bei gleichzeitig intensivem Zähneputzen beobachtet werden, und wurden daher als chlorhexidinunabhängige mechanische Traumatisierungen gewertet (Almqvist und Luthman 1988).

Dennoch weisen einige In-vitro-Versuche auf zytotoxische Wirkungen des Chlorhexidins auf humane gingivale Zellen hin, die von der Dauer der Exposition mit Chlorhexidin und der Zusammensetzung der Testlösungen abhängig sind. Werden die Zellen eine, 24 oder 72 Stunden einer chlorhexidinhaltigen Lösung ausgesetzt, treten irreversible Schädigungen auf (Babich et al. 1995). Vermindert werden die zellschädigenden Eigenschaften nach Aussagen dieser Untersuchungen durch die Zugabe von Lecithin und Albumin zu den Lösungen.

Systemische Nebenwirkungen treten extrem selten auf, da nur 0,3% des in einer üblichen Spüllösung enthaltenen Chlorhexidins durch die Schleimhäute resorbiert wird. Über Galle und Faeces wieder ausgeschieden, bleibt ein Verschlucken ohne Folgen. An Ratten wurde bei oraler Gabe von 2g/kg Körpergewicht pro Tag eine Mortalitätsrate von 20% beobachtet. In weiteren Tierversuchen konnte Chlorhexidin bei oraler Anwendung zu keinem Zeitpunkt im Serum nachgewiesen werden (Winrow 1973).

### 2.5.2 Weitere Mundspüllösungen

Alternativ zu Chlorhexidin finden oft Meridol und Listerine Anwendung zur Prophylaxe und zur adjuvanten Therapie von entzündlichen Parodontalerkrankungen. Meridol enthält als aktive Bestandteile Zinnfluorid/Aminfluorid. Untersuchungen wiesen eine gute antimikrobielle Wirksamkeit gegen parodontopathogene Bakterien (Ziermann et al. 1993) sowie eine klinische signifikante Reduktion der Plaquebildung durch Spülungen mit Meridol nach (Brex et al 1990). Bei langfristiger Anwendung wurde eine verstärkte Zahnsteinbildung beobachtet (Hagedorn et al. 2000). Diese ist jedoch geringer als bei vergleichbarem Gebrauch von Chlorhexidin (Brex et al. 1993).

Spülungen mit der Eucalyptol/Thymol/Menthol enthaltenden Lösung Listerine führten in Studien zu langanhaltender Verminderung der Zahl anaerober und gramnegativer oraler Bakterien (Fine et al. 2005) und somit zur Plaquereduktion (Pan et al. 2000, Riep et al. 1999, Charles et al. 2001) und Gingivitisprävention (Ross et al. 1989). In-vitro Studien zeigten eine höhere Wirksamkeit von Listerine im Vergleich zu Meridol (Pan et al. 1999).

Neben Listerine gibt es Studien zu weiteren als Mundspüllösungen verwendbaren ätherischen Ölen. Teebaumöl (*Melaleuca alternifolia*) zeigt eine starke antibakterielle Wirkung gegenüber parodontopathogenen Bakterien sowie eine Hemmung der Adhäsion von *P. gingivalis* (Takarada et al. 2004). Jedoch werden klinische Parameter durch Teebaumöl kaum positiv beeinflusst (Arweiler et al. 2000).

Auch das in vielen Mundhygieneprodukten enthaltene Triclosan weist eine im Vergleich zu Chlorhexidin nur sehr schwache antimikrobielle Aktivität auf (Welk et al. 2005). Eine Hemmung der Plaquebildung und Gingivitisentstehung kann durch diese Verbindung allein nicht erreicht werden (Lang et al. 2002).

### **3. Zielstellung**

Chlorhexidin findet weltweit in der Plaquekontrolle und Gingivitisprävention Anwendung. Dabei kommen verschiedenste Mundspüllösungen, die sich in Konzentration, Zubereitungsform und Zusätzen unterscheiden, zum Einsatz. Eine repräsentative Auswahl dieser Lösungen sowie im Handel weit verbreitete chlorhexidinfreie Zubereitungen sollten in ihren Wirkungen in dieser In-vitro Studie untersucht werden.

Die Untersuchung der antibakteriellen Wirksamkeit von Mundspüllösungen gegen die Infektion gingivaler Fibroblasten war erster Schwerpunkt der Arbeit. Getestet wurde die Abhängigkeit der antimikrobiellen Aktivität von Zeit, Konzentration und Zusammensetzung der Mundspüllösungen auf die parodontopathogenen Stämme *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384, *A. actinomycetemcomitans* Y4, *P. gingivalis* ATCC 33277 und *P. gingivalis* M5-1-2.

Des Weiteren sollte die Beeinflussung der Immunantwort des Wirtes durch die Anwendung von Chlorhexidin und anderen Mundspüllösungen ermittelt werden. Die Untersuchung der Freisetzung der inflammatorischen Interleukine IL-6 und IL-8 aus infizierten und nicht-infizierten Fibroblasten nach Kontakt mit Chlorhexidin und den Vergleichslösungen sollte Aussagen über deren Auswirkungen auf die Entzündungsreaktion ermöglichen.

Als unerwünschte Wirkungen von Chlorhexidin sind vor allem Verfärbungen der Zähne und Geschmacksirritationen bekannt. Zytotoxische Eigenschaften des Chlorhexidins auf humane Gingivafibroblasten wurden bisher nicht nachgewiesen. In der vorliegenden Studie sollten deshalb verschiedene Tests zur Ermittlung einer möglichen zytotoxischen Wirkung der Mundspüllösungen durchgeführt werden. Diese sollen im Zusammenhang mit den anderen untersuchten Parametern Grundlage einer Empfehlung zur Art und Dauer der Anwendung von Mundspüllösungen sein.

## **4. Material und Methoden**

### **4.1 Vorbereitende Arbeiten**

#### 4.1.1 Anzucht der Zellen

Für die Versuche wurden primäre Gingivafibroblasten verwendet, die von einem parodontal gesunden Patienten stammen, dem der retinierte Weisheitszahn entfernt worden war. Diese wurden mit DMEM Zellkulturmedium (Gibco Invitrogen Cooperation, UK) und 10% fetalem Kälberserum bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Passagen der Zellen erfolgten regelmäßig in zwei Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany), wenn unter dem Mikroskop ein dichter Zellrasen (Monolayer) zu erkennen war. Alle Versuche wurden zwischen der vierten und der achten Passage durchgeführt.

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Zellkulturflaschen dem Brutschrank entnommen, um unter dem Mikroskop die Bildung der Monolayer zu überprüfen. Für einen Versuchsansatz wurde jeweils eine Flasche verwendet. Das Nährmedium wurde entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Zum Ablösen der Fibroblasten von der Oberfläche der Zellkulturflaschen wurden sie mit 1 ml 5% EDTA Trypsinlösung (BioChrom AG, Berlin, Deutschland) benetzt und für zehn Minuten zurück in den Inkubator gestellt. Die im nächsten Schritt zugegebenen 20 ml DMEM mit FCS hoben die Wirkung des Trypsins auf und die abgelösten Zellen konnten zusammen mit dem Medium abgesaugt und verteilt werden.

Die Verteilung für den Nachweis der antimikrobiellen Wirksamkeit der Lösungen erfolgte auf 1½ 24 Well Gewebekulturplatten (Fa Greiner®, Frickenhausen, Deutschland) zu je 500 µl pro Well, so dass die Fibroblasten auf 36 Wells aufgebracht wurden.

Um über den MTT-Test die Zelltoxizität nachzuweisen, wurden die Fibroblasten mit 30 ml DMEM mit FCS aufgenommen und zu je 150 µl auf zwei Mikrotiterplatten mit 96 Wells (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) mit Flachboden pipettiert.

Für den Trypanblau Test wurden die Fibroblasten ebenfalls in den oben geschilderten Arbeitsschritten gewaschen und vom Plattenboden abgelöst. Die Zellen einer Gewebekulturflasche wurden mit 12 ml des FCS-haltigen Nährmediums zu je 500 µl pro Well auf eine 24-Wellplatte verteilt.

Anschließend kamen die Platten für 24 Stunden in den Inkubator.

#### 4.1.2 Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384, *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* ATCC 33277 als Laborstämme sowie *P. gingivalis* M5-1-2 als klinisches Isolat wurden am Vortag des Versuches auf Schaedler-Agar (Oxoid®, mit 8% Schafblut) überimpft. Die *Aggregatibacter*-Stämme wurden bei 37°C unter Zugabe von 5% Kohlendioxid inkubiert. Bei *P. gingivalis* erfolgte die Anzucht anaerob mittels des AnaeroGen-Systems (Oxoid Limited, Hampshire, England). Zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns befanden sich die Bakterienstämme damit in einer logarithmischen Wachstumsphase.

Für alle Versuchsansätze wurde eine Bakteriendichte von OD 640 nm = 0,1 verwendet, was einer Keimkonzentration von  $10^8$  Keimen/ml entsprach. Der überimpfte Stamm des zu untersuchenden Erregers wurde mittels eines sterilen Wattestäbchens (Nerbe Plus, Winsen/Luhe, Deutschland) in ein das Medium 199 (Gibco Invitrogen Cooperation, UK) enthaltendes Kunststoffröhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) gegeben. Es folgte die Konzentrationseinstellung der Suspension am Photometer (Ultrospec 2000 Pharmacia Biotech) nach Eichung mit dem reinen Medium 199.

#### 4.1.3 Infektion der Fibroblasten

Nach Entfernen des Mediums von den Zellkulturplatten wurde mit PBS gewaschen, und 1 ml einer Mischung der Bakteriensuspension mit DMEM im Verhältnis 1:4 beziehungsweise DMEM mit reinem Medium 199 in der gleichen Verdünnung auf die Zellen gegeben. Dabei wurden je 24-Wellplatte vier Spalten infiziert und zwei mit der bakterienfreien Lösung benetzt.

Für die Zeiteinheiten von einer, sechs und 18 Stunden resultierte so je eine halbe Wellplatte mit zwei infizierten Wells pro getesteter Konzentration und einem Well ohne Bakterien zur Kontrolle.

## 4.2 Versuchsdurchführung

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in vier Teilversuchen ermittelt:

- Untersuchung der antibakteriellen Wirksamkeit des Chlorhexidins
- Ermittlung von IL-6 und IL-8 mittels ELISA aus den Überständen
- Bestimmung der Zytotoxizität des Chlorhexidins auf Fibroblasten durch MTT-Nachweis
- Bestätigung der zytotoxischen Wirkung mittels Trypanblau Exclusion Test

Abb. 2: Tabelle 1: Übersicht der getesteten Lösungen

<b>Produkt</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Zusätze</b>	<b>Hersteller</b>
Chlorhexamed® + Fluorid Lösung	0,06% Chx +250 ppm Fluorid	Aqua, Sorbitol, Alcohol, Peg- 40, Hydrogenated Castor Oil, Aroma, Sodium Fluoride, Sodium Saccharin, Methylparaben, Propylparaben	GlaxoSmith -Kline Consumer healthcare, Brühl
Chlorhexamed® Fluid	0,1% Chx	Ethanol, Glycerol, Macrogol- Glycerol- hydroxystearat, Aromastoffe, Farbstoff E 124, Wasser, enthält 7,2% Alcohol	GlaxoSmith -Kline Consumer healthcare, Brühl
Curasept® Mundspüllösung	0,12% Chx	A.D.S. (Anti-Discoloration-System ) Aqua, Xylitol, Peg- 40 Hydrogenated Castor Oil, Propylene, Glicol, Poloxamer 407, Ascorbic Acid, Sodium Benzoate, Sodium Metabisulfite, Sodium Citrate, C.I. 42090	Curaden healthcare S.R.L.- Milano
Oral B® Chlorhexidin Mundspüllösung	0,12% Chx	Aqua, Alcohol, Glycerin, Peg-40 Sorbitan Diisostearate, Aroma, Sodium Saccharin, Cl 42051	Gillette Gruppe Deutschland GmbH& Co. oHG, Kronberg



Curasept® Mundspüllösung	0,2% Chx	Aqua, Xylitol, Propylene, Glicol, Peg-40 Hydrogenated Castor Oil, Ascorbic Acid, Aroma, Poloxamer 407, Sodium Metabisulfite, Sodium Citrate, C.I. 42090	Curaden healthcare S.R.L.- Milano
Meridol® Chlorhexidin Mundspüllösung	0,2% Chx + 250 ppm Natriumfluorid	Aqua, Glycerin, Sorbitol, Aroma, Peg-40, Hydrogenated Castor Oil, Citric Acid, CI 42051	Gaba GmbH Lörrach
Chlorhexamed® Gel	1,0% CHX Levomenthol, Pfefferminzöl	2- Propanol, Hyprollose, Natriumacetat, Macrogolglycerol, Hydroxystearat, gereinigtes Wasser	GlaxoSmith -Kline Consumer healthcare, Brühl
Listerine® Zahn und Zahnfleisch- schutz	Eucalyptol, Thymol, Menthol	Aqua, Alcohol, Sorbitol, Methyl Salicylate, Sodium Fluorid, Propylalcohol, Poloxamer 407, Benzoic Acid, Saccharin Sodium, Sodium Benzoate, Aroma, CI 42053, CI 47005	Pfizer Consumer Healthcare GmbH, Karlsruhe
Meridol® Mundspüllösung	Aminfluorid und Zinnfluorid	Aqua, Xylitol, PVP, Peg- 40, Hydrogenated Castor Oil, Olaflur, Aroma, Stannous Fluoride, Sodium Saccharin, CI 42051	Gaba GmbH Lörrach
Chlorhexidin	0,06% Chx	steriles Leitungswasser	frisch hergestellt
Chlorhexidin	0,1% Chx	steriles Leitungswasser	frisch hergestellt
Chlorhexidin	0,2% Chx	steriles Leitungswasser	frisch hergestellt
Chlorhexidin	1,0% Chx	steriles Leitungswasser	frisch hergestellt

#### 4.2.1 Untersuchung der antibakteriellen Wirksamkeit

Der Entnahme des Mediums von den Wells folgte die Zugabe von je 500 µl Testlösung. In der ersten Reihe befanden sich zur Kontrolle bei jedem Versuchsdurchlauf 500 µl steriles Leitungswasser, in den übrigen drei Reihen die jeweiligen Lösungen. Getestet wurden gebrauchsfertige Handelspräparate, frisch aus 20% Chlorhexidin und sterilem Leitungswasser hergestellte Lösungen mit einem Chlorhexidingehalt von 0,06% bis 1,0%, sowie Meridol und Listerine (Abb.2 Tabelle 1). Um Mundbedingungen zu simulieren verblieb jede Lösung für jeweils eine Minute bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> auf den Fibroblasten (Abb.2). Abschließend wurden die Wirkstofflösungen abgesaugt und die Wells mit je 1 ml DMEM aufgefüllt.

Nach Ablauf von einer, sechs und 18 Stunden wurden 10 µl des Nährmediums aus den infizierten Wells auf Schaedler-Agar gespatelt. Der Überstand aller Wells für jede Zeiteinheit wurde entnommen, bei 14 000 U/min für vier Minuten zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415c, Sarstedt, Nürmbrecht), wobei die enthaltenen Zellen sich am Boden des Eppendorfgefäßes (Sarstedt, Nürmbrecht) absetzten und 750 µl des zellfreien Mediums abpipettiert und zur späteren Interleukinbestimmung mittels ELISA eingefroren wurden.

Dreimaliges Waschen mit PBS entfernte die planktonischen Bakterien von den Zellen. Die Zugabe von 1 ml Aqua dest pro Well und die Aufbewahrung der Platten im Brutschrank für 15 Minuten führte zur Zerstörung der Fibroblasten und zur Freisetzung der adhärennten einschließlich möglicher internalisierter Keime. Je 100 µl dieses bakterienhaltigen Aqua dest wurden auf Schaedler Agar ausgespatelt und zusammen mit den ersten Platten bebrütet.

Für *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 und *A. actinomycetemcomitans* Y4 konnten nach sieben Tagen mit 5% Kohlendioxid im Brutschrank die Bakterienzahlen durch Auszählen der koloniebildenden Einheiten ermittelt werden, für *P. gingivalis* ATCC 33277 und *P. gingivalis* M5-1-2 nach ca. zehn Tagen bei anaerober Bebrütung (Abb. 2).

Die Versuchsansätze erfolgten immer in Doppelbestimmung.

#### 4.2.2 Ermittlung von Interleukin-6 und Interleukin-8 mittels ELISA aus den Überständen

Die ELISA Sandwich Technik (HU IL8 Cytoset CHC 1304, HU IL6 Cytoset CHC 1264, Biosource Europe, S.A., Belgien) verwendet zwei Antikörper, die beide spezifisch an definierten Stellen an das nachzuweisende Antigen binden. Vom ersten Antikörper (Coating AK) wurden 100 µl je Well in einer Verdünnung mit PBS von 1:1000 auf die 96er Mikrotiterplatte (Nunc A/S, Dänemark) gegeben und dort gebunden, nachdem die Platte mit PBS einmal gewaschen worden war. Die Platte wurde abgedeckt und für 12 Stunden bei 8°C inkubiert.

Am Versuchstag erfolgte das Absaugen der Coating Antikörper und das Ausklopfen der Platte, bevor 200 µl Blockinglösung (40 g Rinderserumalbumin /1 PBS) je Well zugegeben und diese wieder bedeckt wurden. Eine Inkubation von zwei Stunden bei Raumtemperatur schloss sich an, bevor auch die Blockinglösung wieder abgesaugt und ausgeklopft werden konnte. Die beschichtete Platte wurde nun zweimal mit 200 µl und einmal mit 400 µl je Well einer Waschlösung (9,0 g NaCl, 1 ml Tween 20 ad 1000 ml, pH 7,4) behandelt.

Standards wurden durch Verdünnungsreihen mit Standardpuffer (4,0 g Rinderserumalbumin /1 PBS) hergestellt, so dass Verdünnungen der Konzentrationen 10 000 pg/ml zu 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, und 15,625 entstanden. Von den vorbereiteten Standards sowie den Proben wurden 100 µl in die Wells pipettiert, bevor 50 µl des Detektions-Antikörpers zugegeben wurden und sich eine Inkubation unter Abdeckung unter andauerndem Schütteln für zwei Stunden bei Raumtemperatur anschloss. Dieser zweite Antikörper band nun ebenfalls das Antigen und es entstand ein AK-AG-AK-Komplex.

Die Lösungen wurden von den Wells abgesaugt und, wie schon beschrieben, gewaschen. Bevor die Mikrotiterplatte wieder bedeckt und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert wurde, erfolgte die Zugabe von 100 µl Streptavidin-Horseradish-Conjugate. Durch erneutes Absaugen und Waschen wurden überschüssige Antikörper entfernt und danach 100 µl TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Liquid Substrate System for ELISA, Sigma) zugegeben und der Versuchsansatz für 60 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur unbedeckt inkubiert.

Das Enzym spaltete dabei vom farblosen Nitrophenylphosphat den Phosphatrest ab und es entstand schwach gelbes p-Nitrophenol. Die Farbintensität war dabei der Konzentration des

entstandenen Nitrophenols und damit der Konzentration des zu bestimmenden Antigens in der Probe proportional.

Nach Zugabe von 50 µl der Stopplösung (0,5 NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) konnten die Mikroplatten bei 450 nm (Referenzfilter 650 nm) gelesen werden (easy WIN fitting Version V6.1, Tecan). Die Berechnung der Interleukinkonzentrationen erfolgte mittels der zum Gerät gehörigen Software im Vergleich mit einer gleichzeitig angefertigten Standardkurve.

Alle Interleukinbestimmungen erfolgten doppelt aus zwei unabhängigen Versuchsreihen.

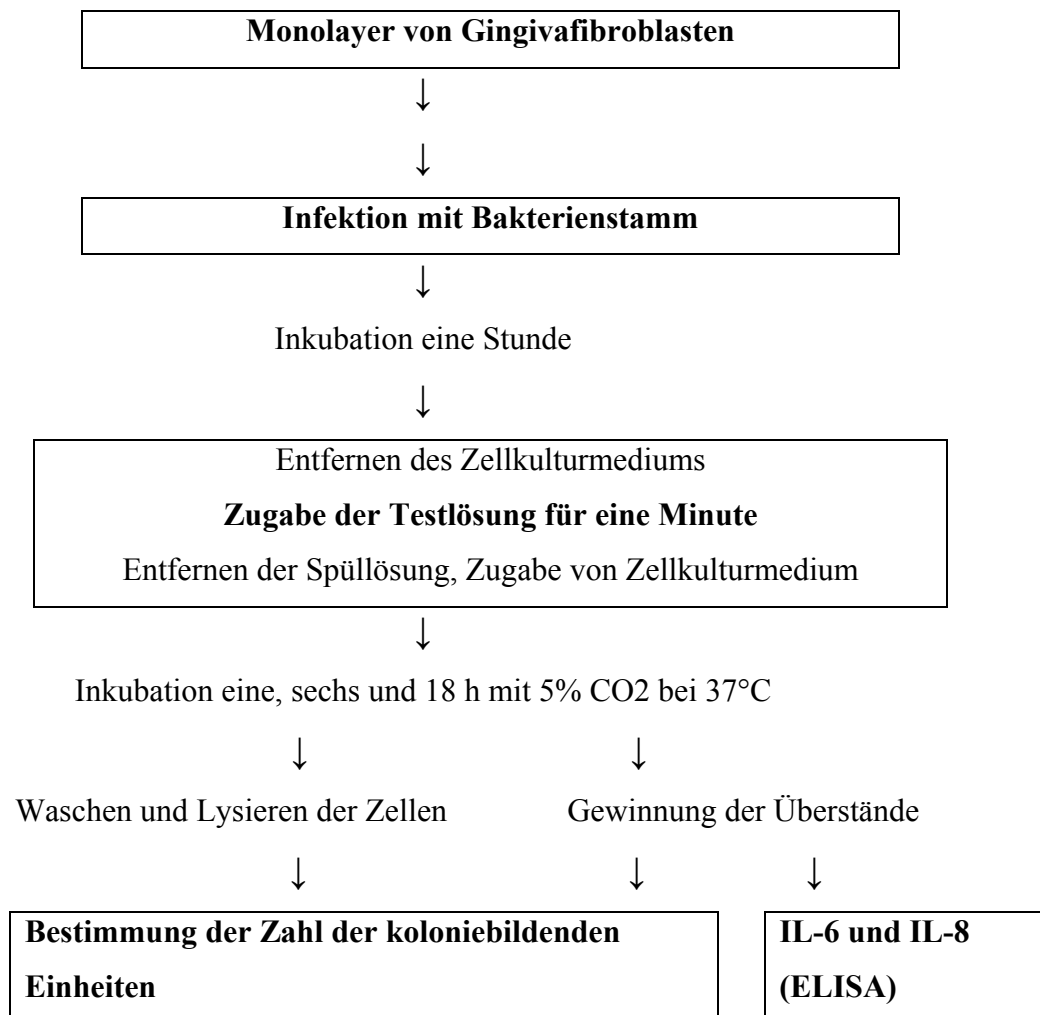


Abb. 3: Versuchsablauf zur Bestimmung der antibakteriellen Wirksamkeit der Testlösungen und der Interleukinfreisetzung (Teilversuch 4.2.1 und 4.2.2)

#### 4.2.3 Bestimmung der Zelltoxizität durch MTT- Nachweis

Als Assay für die Toxizität diente zunächst der MTT-Test. Es handelt sich um einen kalorimetrischen Test, der auf der Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5 Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu lila Formazankristallen durch zelluläre Dehydrogenasen beruht. Da diese in den Mitochondrien lokalisierten Enzyme nur bei lebenden Zellen aktiv sind, dient die Umwandlung von MTT als Maß für die metabolische Aktivität der Zellen und somit der Toxizität der getesteten Lösungen.

Die auf den Mikrotiterplatten als Monolayer vorliegenden Fibroblasten wurden zweimal mit 300 µl PBS gewaschen. Ein Drittel der Zellen wurde mit PBS, die anderen zwei Drittel jeweils mit einer auf OD= 0,1 eingestellten Bakteriensuspension der Stämme *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 und *P. gingivalis* ATCC 33277 zu 20 µl benetzt und mit Nährmedium 80 µl DMEM aufgefüllt. Da sich nach dem ersten Versuch kein signifikanter Unterschied zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen bezüglich der Zelltoxizität zeigte, wurde auf die Bakterienbesiedlung bei den anschließenden MTT-Nachweisen verzichtet.

Nach einer Stunde Inkubation im Brutschrank erfolgte die Zugabe von 100 µl Testlösung (Tabelle 1) – beziehungsweise zur Kontrolle steriles Leitungswasser – für je eine Minute bei 37°C. Die Lösungen wurden abgesaugt und nach dem Hinzufügen von 100 µl DMEM für eine, sechs und 18 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Als nächstes wurden 20 µl MTT Lösung (0,5% in PBS gelöst) zugegeben und nochmals drei Stunden inkubiert. Zur Extraktion des wasserunlöslichen Formazansalzes dienten 20 µl einer 3%igen SDS Lösung und Isopropanol 0,04 N- HCl 100µl. Nach Inkubation über 30 Minuten konnte ein Farbumschlag beobachtet werden.

Die Absorption des entstandenen Formazans wurde spektrophotometrisch (Easy WIN screening, Version V6.1, Tecan) bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt. Pro geprüfter Substanz, Zeiteinheit und Bakterienstamm wurden jeweils vier unabhängige Bestimmungen durchgeführt.

#### 4.2.4 Bestätigung der zytotoxischen Wirkung mittels Trypanblau-Exclusion-Test

Zusätzlich zur Bestimmung der mitochondrialen und somit metabolischen Aktivität der Zellen durch den MTT- Nachweis wurde als Farbstoffausschlusstest der Trypanblau Exclusion Test angefertigt. Er beruht darauf, dass vitale Zellen impermeabel für Trypanblau sind, während tote Zellen durch den sauren Diazofarbstoff Tryptopanblau durchgängig blau gefärbt werden. Die vorbereiteten Fibroblasten wurden vom DMEM befreit und je Well 500 µl der Testlösungen für eine Minute bei 37°C zugegeben. Getestet wurden 0,1%, 0,2% und 1,0%ige Chlorhexidinkonzentrationen, die mit sterilem Leitungswasser frisch hergestellt worden waren. Als Kontrolle diente ebenfalls steriles Leitungswasser. Danach wurden die Zellen wieder mit 1 ml DMEM bedeckt und bei 37°C inkubiert.

Nach einer, sechs und 18 Stunden wurde je 1/3 der Wells mit PBS gespült, die Zellen mit 100 µl EDTA/Trypsinlösung vom Boden gelöst und mit 400 µl Medium 199 aufgenommen. Vier Minuten zentrifugieren bei 14 000 U/min führten zum Absetzen der Zellen im Eppendorfgefäß. Das Anfärben der Zellen erfolgte nach Entfernung des Überstandes mit einer Lösung aus 2 µl Trypanblau gelöst in PBS.

Die Zellen wurden in einer Neubauer Zählkammer (Blaubrand®) mikroskopisch ausgezählt und der Anteil der angefärbten Fibroblasten an der Gesamtzellenzahl rechnerisch bestimmt. Der Versuch erfolgte als Doppelbestimmung.

## 5. Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Resultate der Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität nach einminütiger Spülung der infizierten Fibroblasten mit den verschiedenen Chlorhexidin-Konzentrationen und den chlorhexidinfreien Lösungen zusammengefasst. Diese beziehen sich auf die Wirkung gegen *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384, *A. actinomycetemcomitans* Y4 (in den Diagrammen gelb unterlegt), *P. gingivalis* ATCC 33277, und *P. gingivalis* M5-1-2 (in den Diagrammen grau unterlegt). Zudem erfolgt die Darstellung der Interleukinfreisetzung aus Fibroblasten nach Infektion mit diesen Keimen. Die Ergebnisse des MTT-Nachweises und des Trypanblau Tests zur Zelltoxizität der Chlorhexidinlösungen gegenüber infizierten und nichtinfizierten Fibroblasten werden dargestellt und erläutert.

### 5.1 Antimikrobielle Aktivität

Die Diagramme geben die Anzahl der koloniebildenden Einheiten nach einminütiger Spülung mit den untersuchten Lösungen und Inkubation bei 37°C in den Intervallen eine, sechs und 18 Stunden wieder. Dargestellt ist die Anzahl planktonischer und adhärenter Bakterien bezogen auf die vier getesteten Bakterienstämme.

#### 5.1.1 Planktonische Bakterien *A. actinomycetemcomitans*

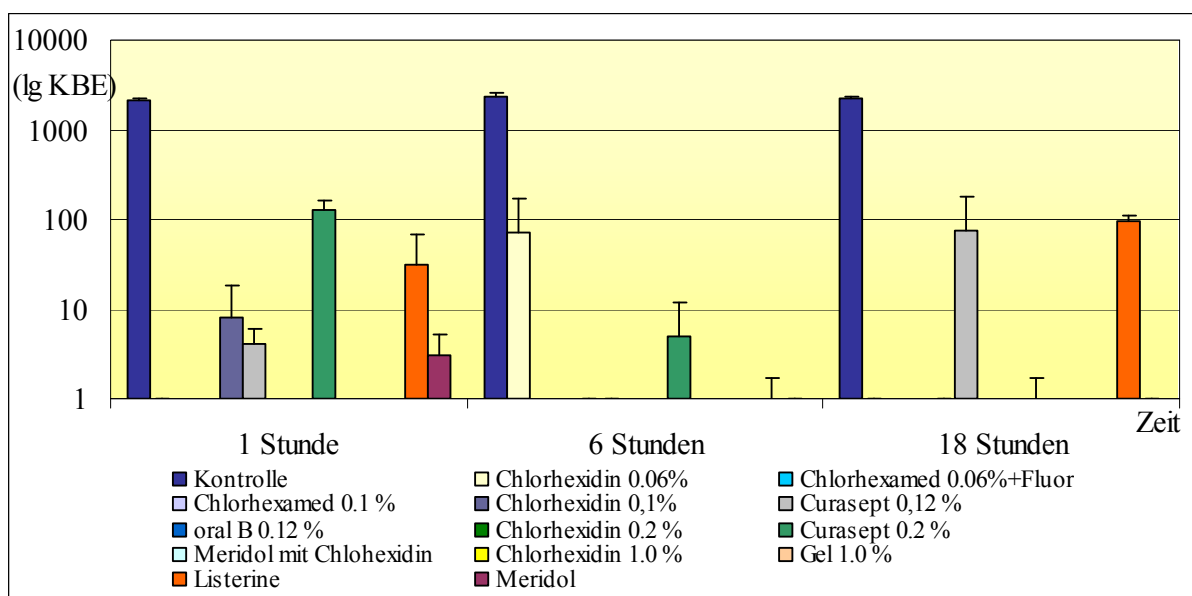


Abb. 4: Wirkung der Mundspüllösungen auf die Zahl der planktonischen Bakterien *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384

Die Kontrollen nach einer, sechs und 18 Stunden zeigten durchschnittlich 2209 KBE planktonischer Bakterien des Stammes *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 (Abb. 4). Der Kontakt mit den Mundspüllösungen führte zur deutlichen Reduktion der Keimzahlen in Abhängigkeit von den eingesetzten Lösungen. Mit Chlorhexidin 0,06%, Oral B, Chlorhexidin 0,2% und Meridol mit Chlorhexidin und 1%igem Gel konnte eine komplette Abtötung der Keime erreicht werden. Die geringste Wirkung besaß die Spülung mit Curasept, sowohl in der 0,12%igen als auch in der 0,2%igen Zubereitung.

Bei den chlorhexidinfreien Präparaten war Meridol Listerine überlegen, und erreichte nach einer Stunde eine Verringerung der mittleren Keimzahl auf drei KBE. Nach sechs Stunden waren bei beiden Testreihen keine Bakterien anzüchtbar, nach 18 Stunden stieg bei der Listerinelösung die Zahl auf 94 an, während bei Meridol kein Wiederanstiegen der Keimzahlen zu beobachten war.

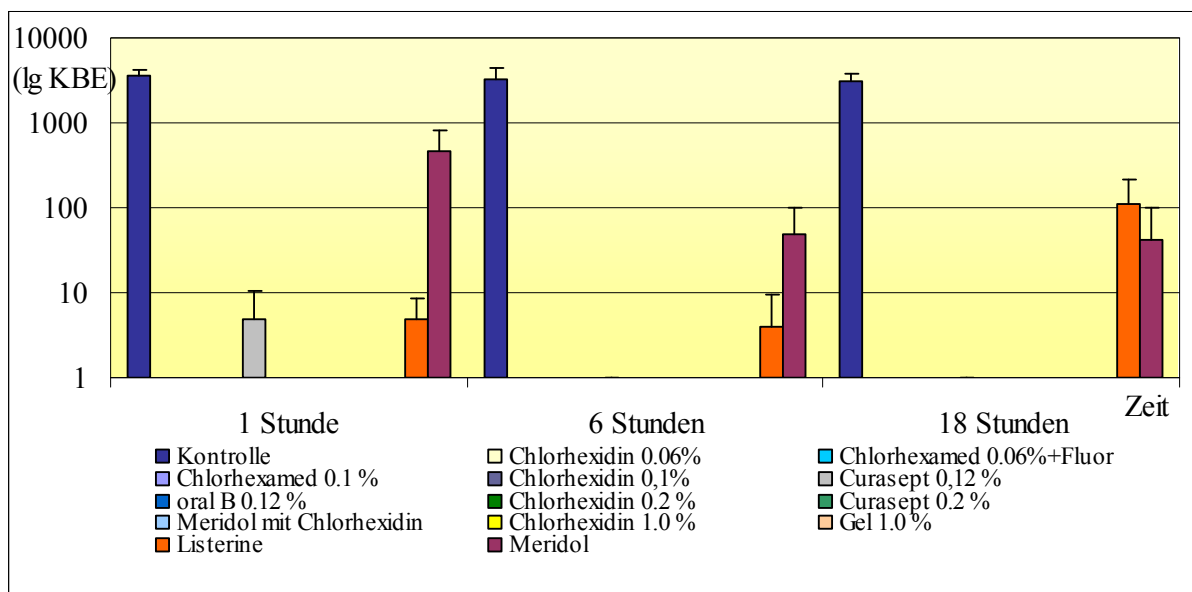


Abb. 5: Wirkung der Mundspüllösungen auf die Zahl der planktonischen Bakterien *A. actinomycetemcomitans* Y4

Anders war dies für die planktonischen Bakterien des Stammes *A. actinomycetemcomitans* Y4 (Abb. 5). Ausgehend von den Kontrollwerten, die zwischen 3074 und 3676 KBE lagen, erreichten alle Chlorhexidin- Konzentrationen, bis auf 0,12% Curasept, schon nach einer Stunde eine 100%ige antimikrobielle Wirksamkeit. Schlechter war die antibakterielle Wirksamkeit von Listerine und Meridol. Listerine reduzierte die Zahl der KBE der planktonischen *A. actinomycetemcomitans* Y4 nach einer Stunde auf durchschnittlich fünf; nach 18 Stunden hatte sich deren Zahl jedoch wieder auf 110 erhöht. Meridol erreichte nach



einer Stunde nur eine Senkung der Zahl KBE auf 465, nach sechs und 18 Stunden sanken die Zahlen aber auf 48 KBE bzw. 41 KBE und somit unter die Werte von Listerine.

### 5.1.2 Adhärenzte Bakterien *A. actinomycetemcomitans*

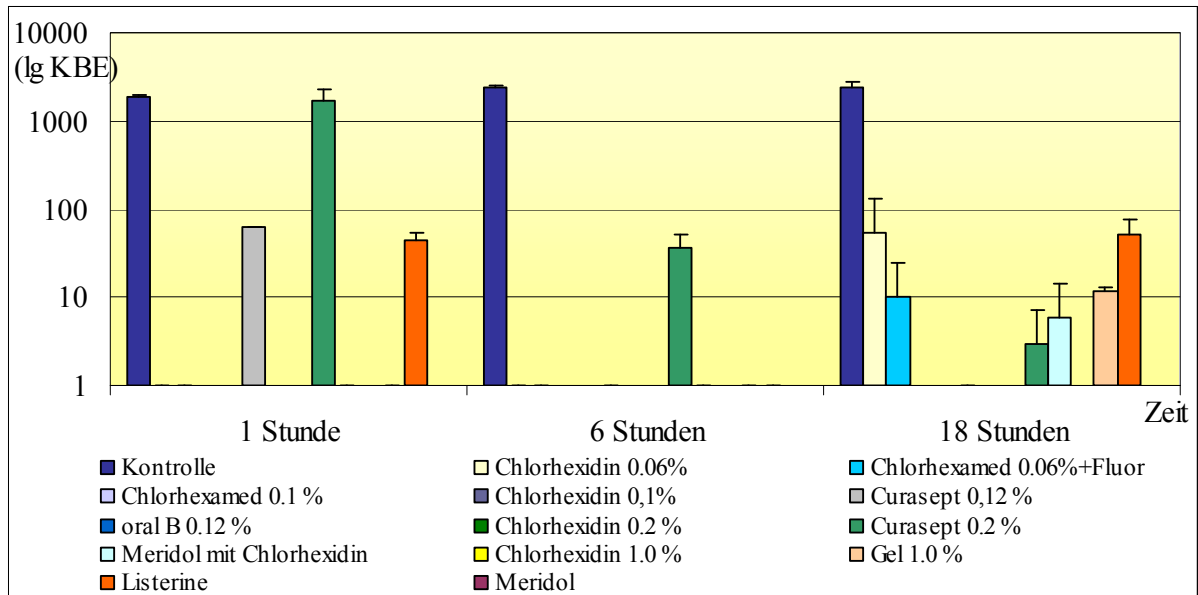


Abb. 6: Wirkung der Mundspüllösungen auf die Zahl der adhärenzten Bakterien *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384

Auch das Diagramm der adhärenzten Bakterien des Stammes *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 (Abb. 6) zeigt ausgehend von durchschnittlich 2230 KBE der Kontrolle die sehr gute antimikrobielle Wirksamkeit der Chlorhexidinlösungen – sowohl der frisch mit sterilem Leitungswasser hergestellten als auch der im Handel erhältlichen Präparate. Im Bereich bis sechs Stunden nach einminütiger Zugabe des Wirkstoffes war bei fast allen Lösungen außer den Curasept-Produkten ein Absinken der Bakterienzahlen auf Null zu verzeichnen. Nach 18 Stunden waren die antibakteriellen Werte für Konzentrationen zwischen 0,1% und 0,2% am höchsten, sowohl niedrigere als auch höhere Konzentrationen führten zum Anstieg der Keimzahlen. Meridol zeigte hier eine 100%ige antibakterielle Wirksamkeit, die Anwendung von Listerine konnte diesen sehr guten Effekt nur im Intervall von sechs Stunden erreichen.

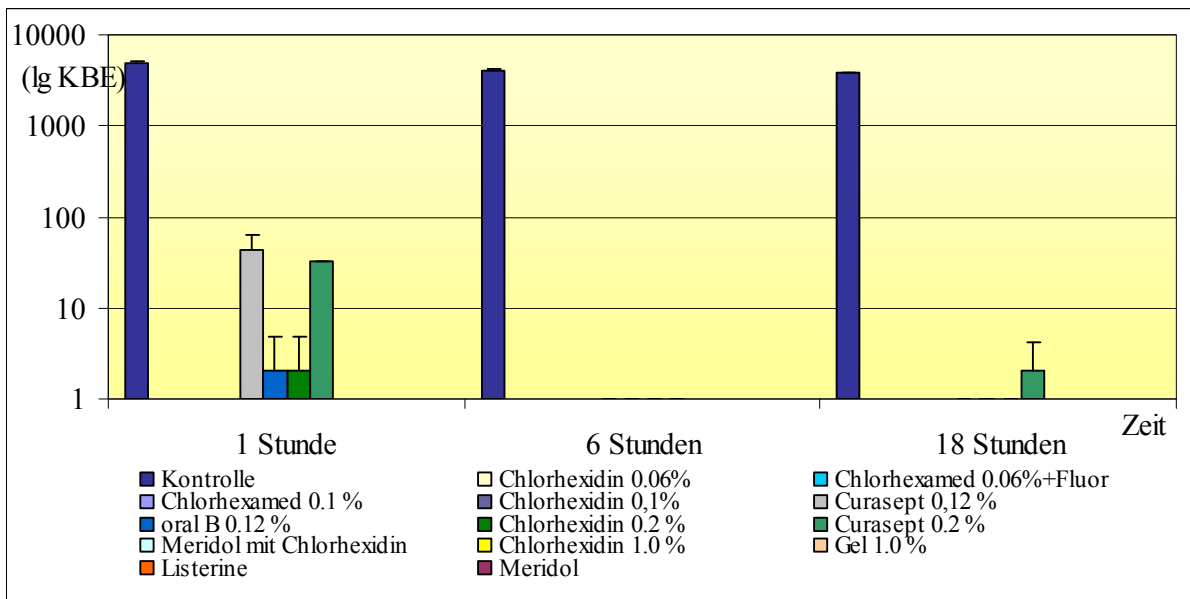


Abb. 7: Wirkung der Mundspüllösungen auf die Zahl der adhärenen Bakterien *A. actinomycetemcomitans* Y4

Sehr gute antimikrobielle Eigenschaften bewiesen die Chlorhexidinlösungen bei Tests mit adhärenen *A. actinomycetemcomitans* Y4 Keimen (Abb. 7). In den Kontrollen lag die Zahl der KBE stets bei 5000. Nach einer Stunde waren jedoch nur bei Curasept, Oral B und Chlorhexidin 0,2% geringe Bakterienzahlen nachweisbar. Koloniebildende Einheiten waren nach sechs und 18 Stunden nur noch nach der Spülung mit Curasept 0,2% vorhanden.

Listerine und Meridol töteten alle adhärenen *A. actinomycetemcomitans* Y4 Bakterien ab.

### 5.1.3 Planktonische Bakterien *Porphyromonas gingivalis*

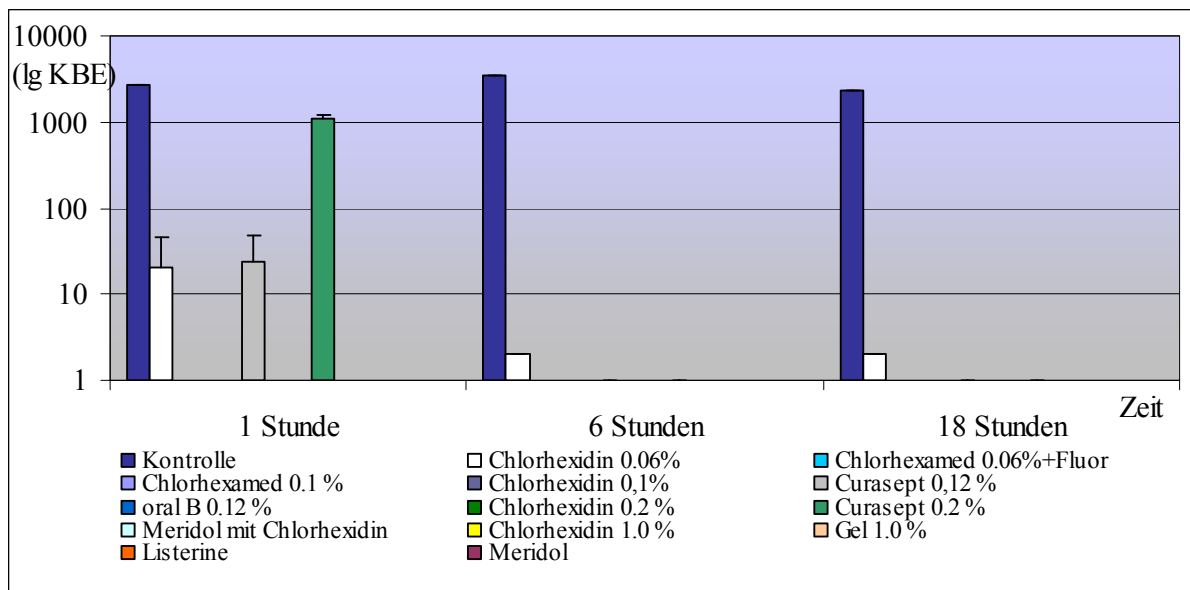


Abb. 8: Wirkung der Mundspüllösungen auf die Zahl der planktonischen Bakterien *P. gingivalis* ATCC 33277

Der Einfluss einer einminütigen Chlorhexidinspülung auf die *P. gingivalis* Stämme zeigte sich für die planktonischen Bakterien in einer ausgeprägten Verminderung der Zahl der KBE durch fast alle getesteten Lösungen. Die Kontrollen betragen hier im Durchschnitt 2 826 KBE. Während die Curasept 0,12% und 0,2% Spüllösungen nach einer Stunde eine Reduktion der Bakterienzahlen für *P. gingivalis* ATCC 33277 (Abb. 8) um 98,9% beziehungsweise 59,6% erreichten, waren die anderen Lösungen (bis auf Chlorhexidin 0,06%) in der Lage, die Bakterien vollständig zu eliminieren. Nach sechs und 18 Stunden waren nur für die Kontrolle und frisch hergestelltes 0,06%iges Chlorhexidin noch planktonische Bakterien anzüchtbar. Keimfreie Bedingungen lagen auch nach Spülung der infizierten Zellen mit Listerine und Meridol für alle untersuchten Zeitabschnitte vor.

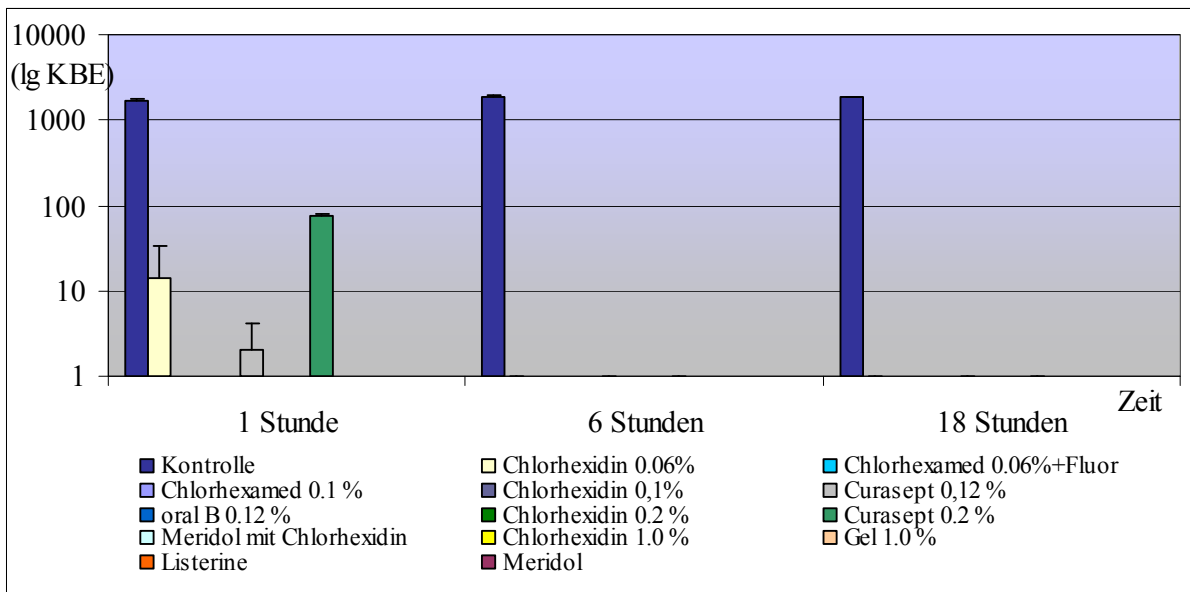


Abb. 9: Wirkung der Mundspüllösungen auf die Zahl der planktonischen Bakterien *P. gingivalis* M5-1-2

Noch deutlicher wurde die gute antimikrobielle Wirksamkeit für den *P. gingivalis* M5-1-2-Stamm (Abb. 9). Von im Durchschnitt 1787 KBE der Kontrolle waren nach einer Stunde nur noch 14 KBE bzw. 2 KBE der Testreihen Chlorhexamed 0,06% und Curasept 0,2% anzüchtbar. Nach Ablauf von sechs bzw. 18 Stunden erreichten alle getesteten Lösungen eine 100%ige Keimfreiheit. Dies traf auch für Listerine und Meridol zu.

#### 5.1.4 Adhärenzte Bakterien *Porphyromonas gingivalis*

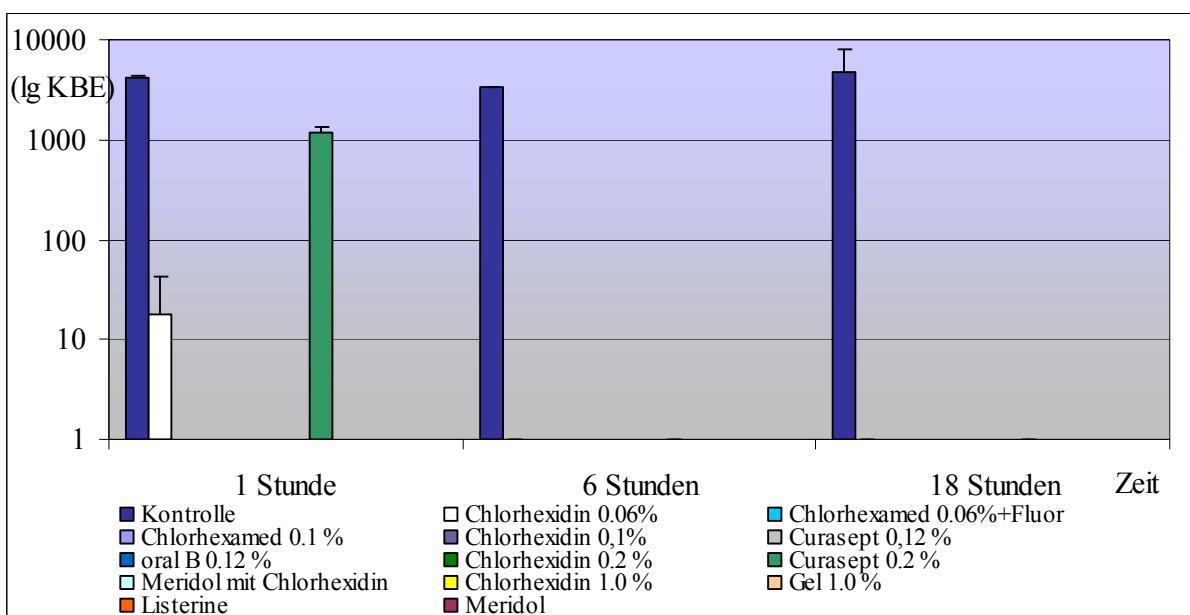


Abb. 10: Wirkung der Mundspüllösungen auf die Zahl der adhärenzten Bakterien *P. gingivalis* ATCC 33277

Die Ergebnisse der Versuche mit adhärenen *P. gingivalis* ATCC 33277 (Abb. 10) wie auch den adhärenen *P. gingivalis* M5-1-2 (Abb. 11) ähnelten sich sehr stark. Als Kontrolle waren für *P. gingivalis* ATCC 33277 im Mittel 4112 KBE anzüchtbar. Nach einer Stunde waren nur noch 5 KBE nach Spülung mit 0,06% Chlorhexidin zu finden, wogegen die Zahl der KBE nach Behandlung der Keime mit Curasept 0,2% noch bei 1184 lag. Alle anderen Lösungen erreichten eine vollständige Abtötung der Bakterien schon nach der ersten Stunde.

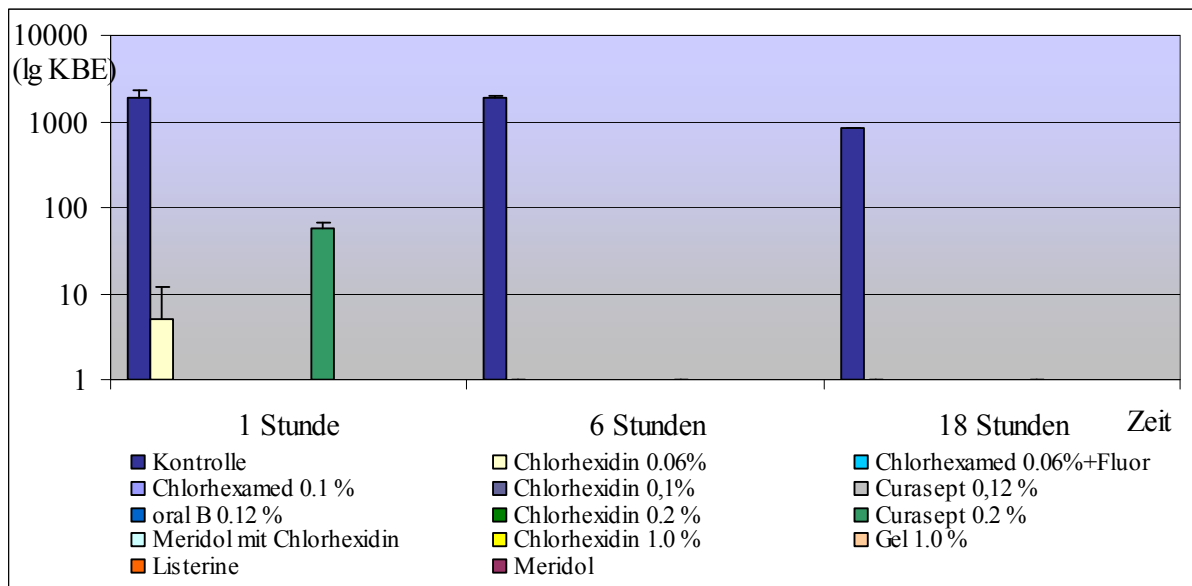


Abb. 11: Wirkung der Mundspüllösungen auf die Zahl der adhärenen Bakterien *P. gingivalis* M5-1-2

1546 KBE waren in der Kontrolle der adhärenen Keime *P. gingivalis* M5-1-2 im Durchschnitt anzuzüchten. Im ersten Intervall von einer Stunde waren noch geringe Zahlen koloniebildender Einheiten nach Spülung mit 0,06% Chlorhexidin (5 KBE) und 0,2% Curasept (58 KBE) zu finden. Nach Ablauf von sechs Stunden waren für alle getesteten Lösungen keine Bakterien mehr nachweisbar und auch nach 18 Stunden stieg deren Zahl nicht wieder an.

## 5.2 Freisetzung der Zytokine

Die vorliegenden Ergebnisse zur Freisetzung von Interleukinen aus infizierten und nicht-infizierten Fibroblasten wurden mit Hilfe eines konventionellen Sandwich-Enzym-Immunesays (ELISA) ermittelt. Die Diagramme zeigen die Menge des freigesetzten IL-6 und IL-8 in pg/ml nach einminütiger Chlorhexidinspülung in Abhängigkeit von der Zeit. Die

dargestellten Zeitintervalle entsprechen wie bei der Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität einer, sechs und 18 Stunden.

### 5.2.1 Interleukin-6-Freisetzung

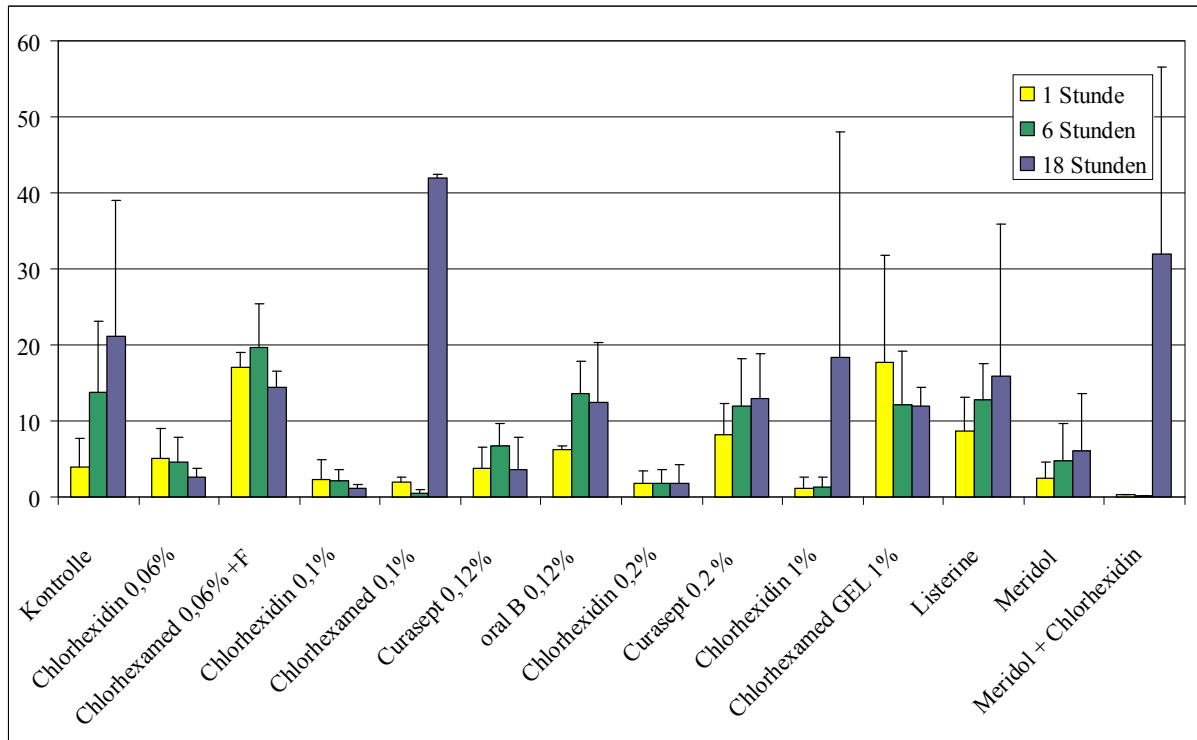


Abb. 12: Wirkung der Mundspüllösungen auf die Interleukin-6-Freisetzung nicht infizierter Fibroblasten

Die Kontrolle der IL-6-Freisetzung aus nicht infizierten Gingivafibroblasten (Abb. 12) zeigte ein Ansteigen der Werte von 3,9 pg/ml nach einer und 13,8 pg/ml nach sechs Stunden mit dem maximalen Wert von 21,1 pg/ml nach 18 Stunden. Nach einer Stunde war die freigesetzte Menge IL-6 bei Chlorhexamed 0,06%+Fluor und Chlorhexamed Gel 1% mit 17,03 pg/ml und 17,57 pg/ml am höchsten. Chlorhexamed 0,06%+Fluor führte auch nach sechs Stunden mit 19,67 pg/ml zum höchsten IL-6-Spiegel, während Oral B mit 13,59 pg/ml an zweiter Stelle deutlich darunter lag. Nach 18 Stunden wurden die höchsten Werte gemessen: Chlorhexamed 0,1% führte zu Anstieg der IL-6-Freisetzung auf 41,90 pg/ml, Meridol mit Chlorhexidin auf 31,99 pg/ml. Listerine führte zu messbar höheren Interleukinwerten als Meridol.

Im Vergleich zur Kontrolle waren die Gesamtmengen sezernierter Mediatoren über eine, sechs und 18 Stunden bei den mit Chlorhexidin gespülten Zellen geringer, nur bei Chlorhexamed 0,06%+Fluor, Chlorhexamed Gel 1% und Listerine war die Summe der je

Zeiteinheit messbaren Interleukine größer. Durch Chlorhexidin 0,06%, Chlorhexidin 0,1%, Curasept 0,12% und Chlorhexidin 0,2% wurde die Freisetzung von IL-6 unterdrückt. Oral B, Curasept und Listerine hatten kaum Einfluss auf die Menge des sezernierten IL-6. Generell stieg die Freisetzung von IL-6 mit jedem Zeitintervall und war von der Konzentration des Chlorhexidins in den Lösungen unabhängig.

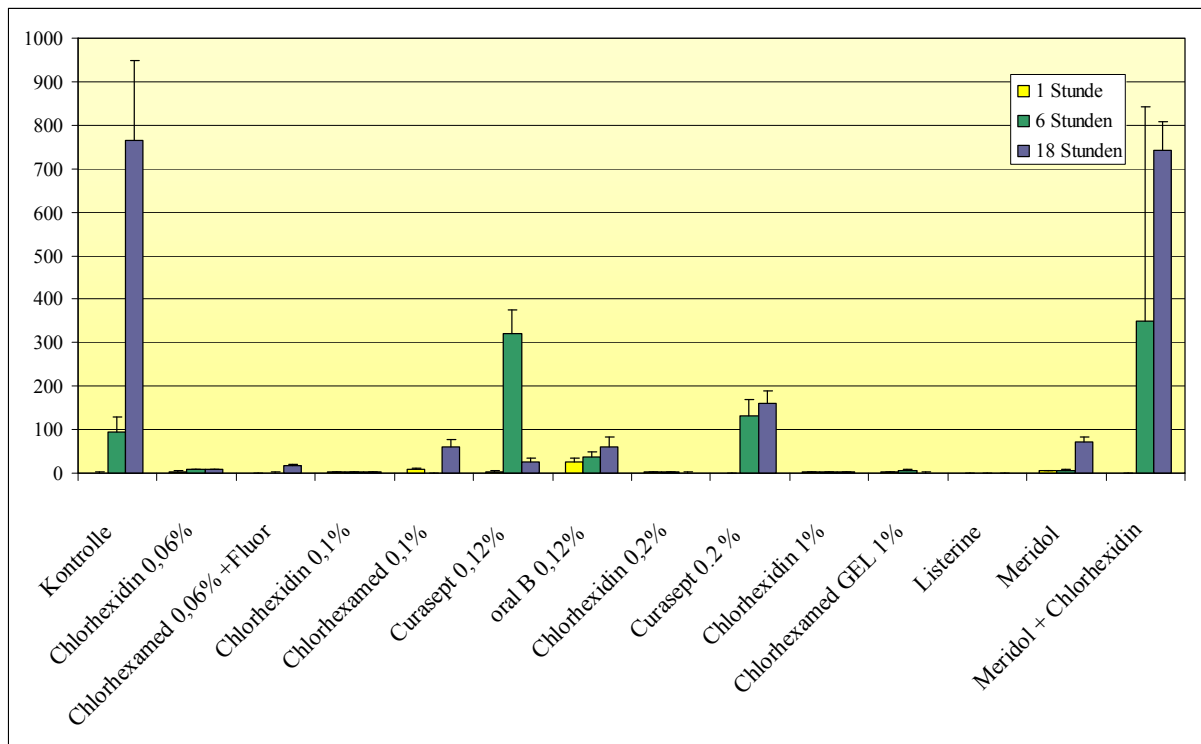


Abb. 13: Wirkung der Mundspüllösungen auf die Interleukin-6-Freisetzung *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 infizierter Fibroblasten

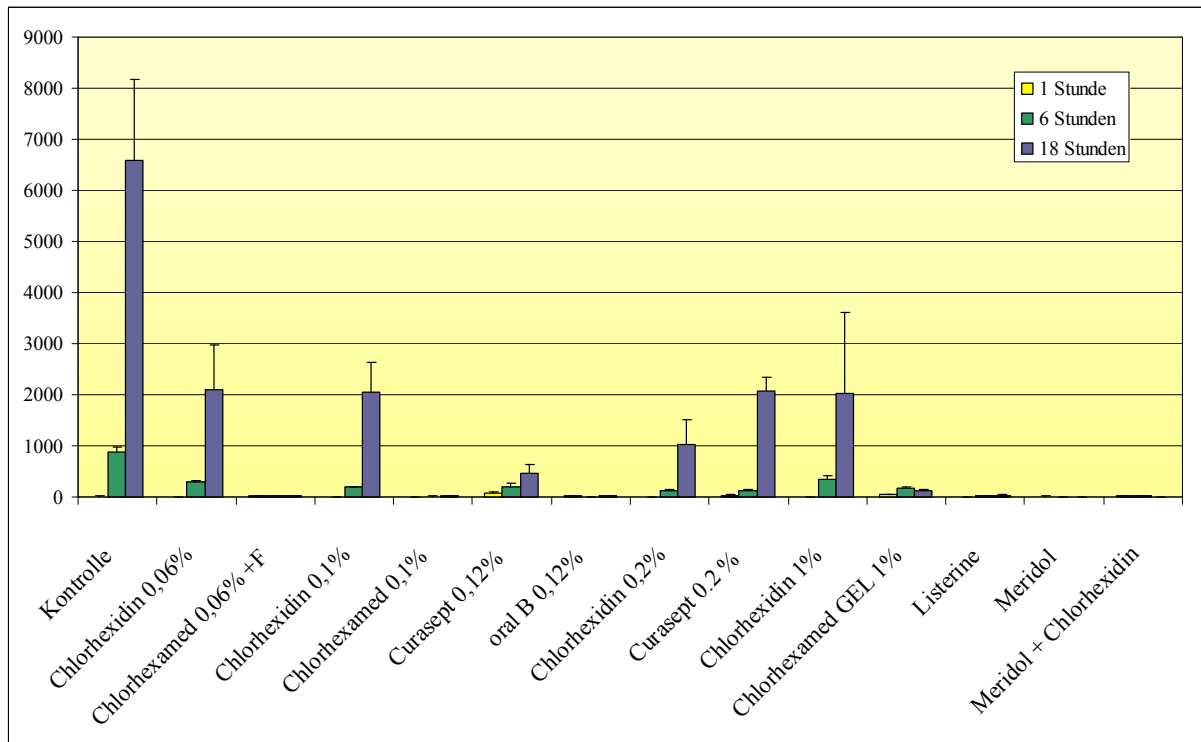


Abb. 14: Wirkung der Mundspüllösungen auf die Interleukin-6-Freisetzung  
A. actinomycetemcomitans Y4 infizierter Fibroblasten

Die Infektion der Fibroblasten mit *A. actinomycetemcomitans* induzierte eine massiv vermehrte Freisetzung von IL-6, verglichen mit den nichtinfizierten Zellen war für die Kontrolle die Freisetzung um den Faktor 36,3 für *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 (Abb. 13) beziehungsweise sogar um den Faktor 313,2 für *A. actinomycetemcomitans* Y4 (Abb. 14) erhöht.

Im Verlauf der 18 Stunden ließ sich durch die Infektion mit den Keimen ohne Zugabe von Mundspüllösungen ein deutlicher Anstieg des einstündigen Wertes von 0,9 pg/ml auf 763,7 pg/ml bei *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 und von 6,7 pg/ml auf 6578,0 pg/ml bei *A. actinomycetemcomitans* Y4 feststellen.

Chlorhexidin unterdrückte die *A. actinomycetemcomitans*-induzierte vermehrte Freisetzung von IL-6. So war zwar eine Erhöhung der gemessenen Werte nach einer, sechs und 18 Stunden zu notieren, wobei Curasept 0,12%, Curasept 0,2% und Meridol mit Chlorhexidin die Freisetzung des IL-6 *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 infizierter Zellen am stärksten förderten, jedoch wurden die hohen Werte der Kontrolle von den anderen Mundspüllösungen nicht einmal annähernd erreicht. Die Kontrolle für *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 nach 18 Stunden betrug 763 pg/ml, während der Mittelwert der IL-6 Freisetzung aller chlorhexidingspülten Zellen mit 83,6 pg/ml deutlich darunter lag.



Bei Infektion mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 lagen die Werte der Kontrolle nach 18 Stunden mit 6578 pg/ml weit über dem Durchschnitt der Testlösungen (689,8 pg/ml nach 18 Stunden). Hier führten Chlorhexidin 0,06%, Chlorhexidin 0,1%, Curasept 0,2% und Chlorhexidin 1% nach einer, sechs und 18 Stunden zum größten Anstieg der Messwerte.

Interessanterweise führte im Gegensatz zu den mit *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 infizierten Zellen die Spülung mit Meridol mit Chlorhexidin bei *A. actinomycetemcomitans* Y4 nicht zur Erhöhung, sondern zur starken Absenkung der IL-6-Freisetzung. Ein besonders starkes Absinken der Entzündungsmediatorfreisetzung war auch nach Spülung mit Listerine und Meridol zu beobachten.

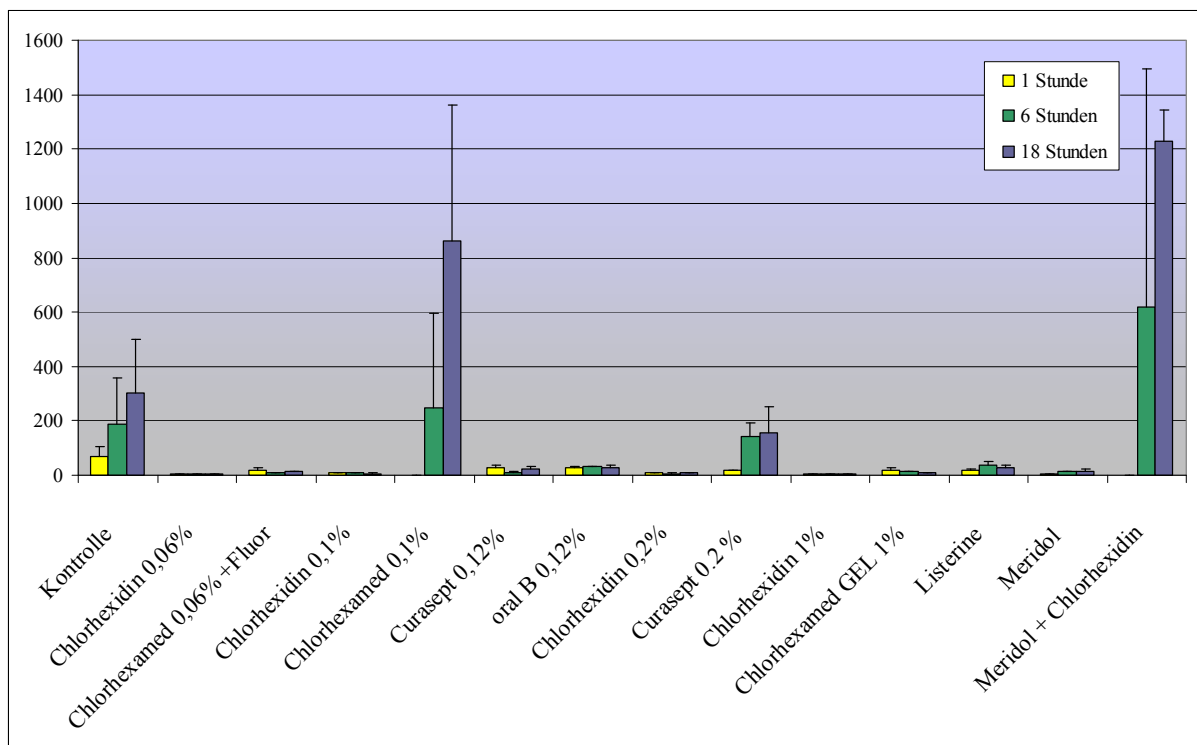


Abb. 15: Wirkung der Mundspüllösungen auf die Interleukin-6-Freisetzung *P. gingivalis* ATCC 33277 infizierter Fibroblasten

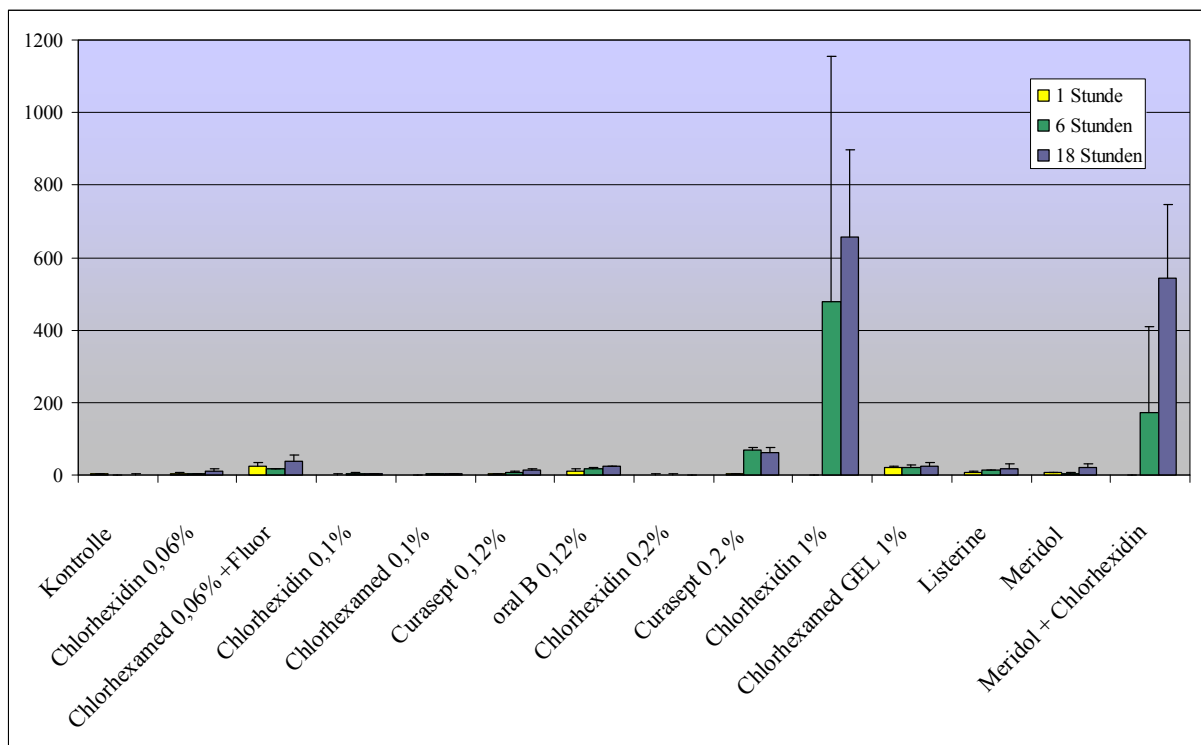


Abb. 16: Wirkung der Mundspüllösungen auf die Interleukin-6-Freisetzung *P. gingivalis* M5-1-2 infizierter Fibroblasten

Die Kontrollen zeigten nach 18 Stunden die maximalen Werte 304,7 pg/ml für *P. gingivalis* ATCC 33277 und 1,46 pg/ml für *P. gingivalis* M5-1-2. Die Kontrolle nichtinfizierter Zellen lag bei 21,1 pg/ml im gleichen Zeitintervall. Der Einfluss der Infektion äußerte sich somit bei *P. gingivalis* ATCC 33277 durch eine vermehrte IL-6-Freisetzung, bei *P. gingivalis* M5-1-2 dagegen durch eine verminderte Menge freigesetzten Interleukins verglichen mit nichtinfizierten Zellen.

Die Spülung mit den Testlösungen senkte nach einer Stunde die Menge der freigesetzten Interleukine aus mit *P. gingivalis* ATCC 33277 infizierten Fibroblasten auf Werte unterhalb der Kontrolle, zwischen 0,21 pg/ml nach Spülung mit Chlorhexamed 0,1% und 28,46 pg/ml nach Behandlung mit Curasept 0,12% (Abb. 15).

Nach sechs und 18 Stunden steigerten Chlorhexamed 0,1% und Meridol mit Chlorhexidin die Freisetzung von IL-6 am stärksten. Chlorhexamed 0,1% vervielfachte die Freisetzung um das 4100-fache auf 863,9 pg/ml im Zeitraum von einer bis 18 Stunden, Meridol mit Chlorhexidin verursachte eine Steigerung von 0,28 auf 1226,5 pg/ml, was dem 4378-fachen entspricht. Alle anderen Testlösungen führten auch nach sechs und 18 Stunden zu Werten, die unter der Kontrolle der mit *P. gingivalis* ATCC 33277 infizierten Zellen lagen.

Ausgehend von den niedrigen Mengen nachweisbaren IL-6 der Kontrolle bei *P. gingivalis* M5-1-2 (Abb. 16) zeigte sich nach einer Stunde noch keine deutliche Veränderung. Die Werte lagen zwischen 0,08 pg/ml (Chlorhexamed 0,1%) und 24,57 pg/ml (Chlorhexamed 0,06%). Nach sechs und 18 Stunden jedoch stieg bei allen Lösungen die IL-6-Freisetzung an. Besonders deutlich wurde dies an den mit Chlorhexidin 1,0% und Meridol mit Chlorhexidin behandelten Fibroblasten, die einen Anstieg der IL-6-Freisetzung mit maximalen Werten von 655,45 pg/ml bzw. 542,05pg/ml nach 18 Stunden erkennen ließen.

Listerine und Meridol veränderten die Interleukinfreisetzung kaum, das Maximum lag für den Test mit Listerine bei 38,4 pg/ml (*P. gingivalis* ATCC 33277) und für Meridol bei 19,9 pg/ml (*P. gingivalis* M5-1-2).

### 5.2.2 Interleukin-8-Freisetzung

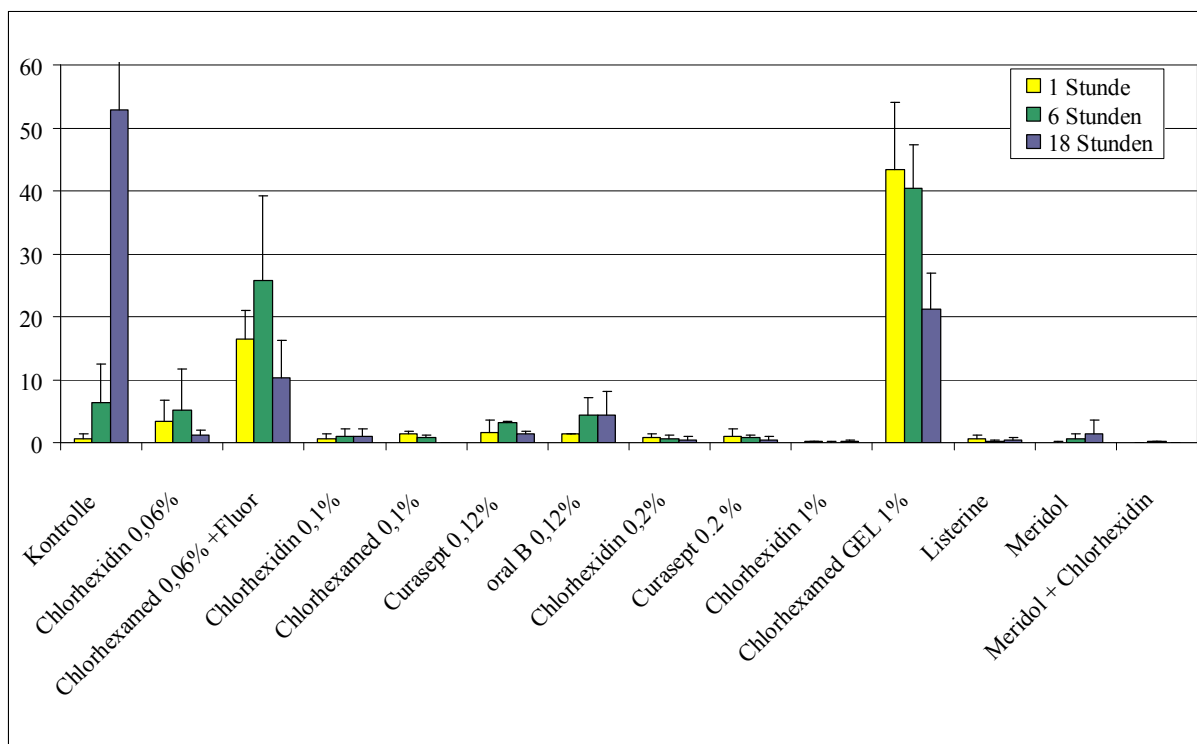


Abb. 17: Wirkung der Mundspüllösungen auf die Interleukin-8-Freisetzung nicht infizierter Fibroblasten

Die Kontrollwerte der IL-8-Freisetzung der nichtinfizierten Fibroblasten betragen 0,64 pg/ml, 6,38 pg/ml nach einer und sechs Stunden, und stiegen dann auf 52,9 pg/ml nach 18 Stunden an. Nach Zugabe der Testlösungen zu den Zellen sank die Menge des freigesetzten IL-8 deutlich, teilweise (Chlorhexamed 0,1% und Meridol mit Chlorhexidin) bis unter die Nachweisgrenze ab. Typische zeitliche Verläufe waren dabei nicht zu erkennen.

Im Gegensatz dazu stieg die Freisetzung von IL-8 bei den mit Chlorhexamed 0,06%+ Fluor und Chlorhexamed Gel 1,0% versetzten Zellen. Maximalwerte waren 25,82 pg/ml nach Spülung mit Chlorhexamed 0,06%+Fluor nach sechs Stunden und 43,46 pg/ml nach Kontakt mit Chlorhexamed Gel 1,0% nach Ablauf einer Stunde. Die Höchstwerte der Kontrolle wurden zu keiner Zeit und von keiner der getesteten Lösungen erreicht.

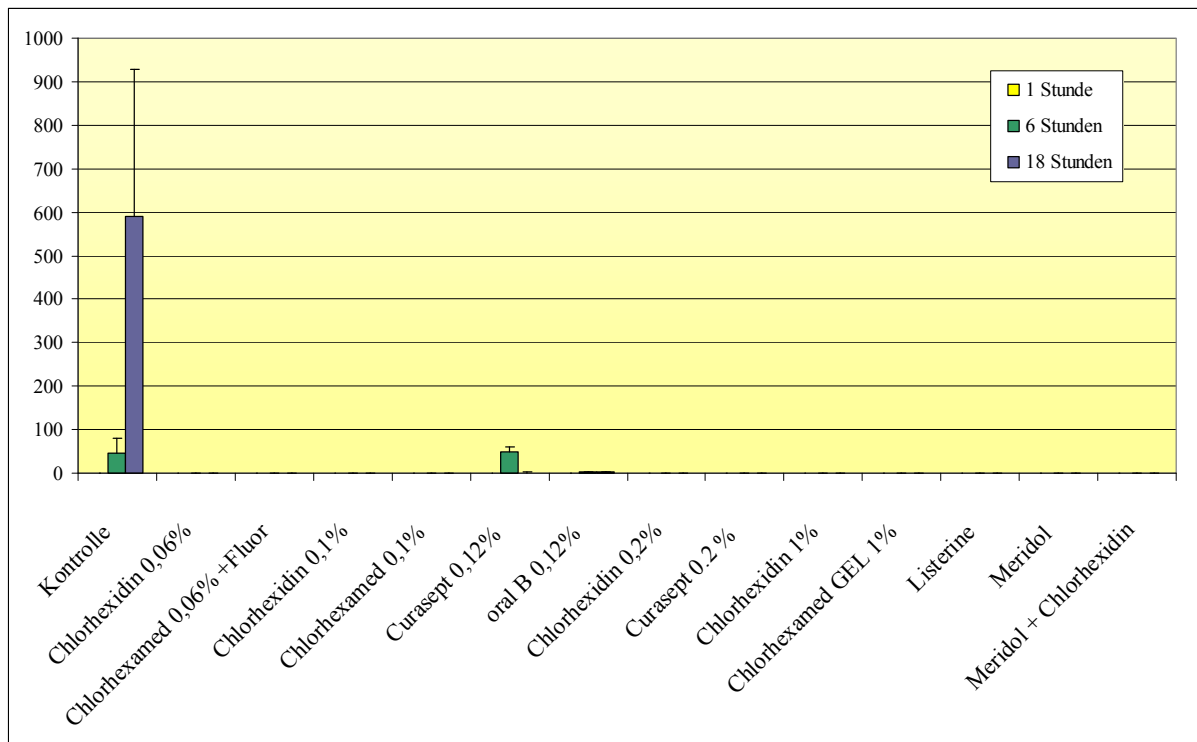


Abb. 18: Wirkung der Mundspüllösungen auf die Interleukin-8-Freisetzung der Fibroblasten nach Infektion mit *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384

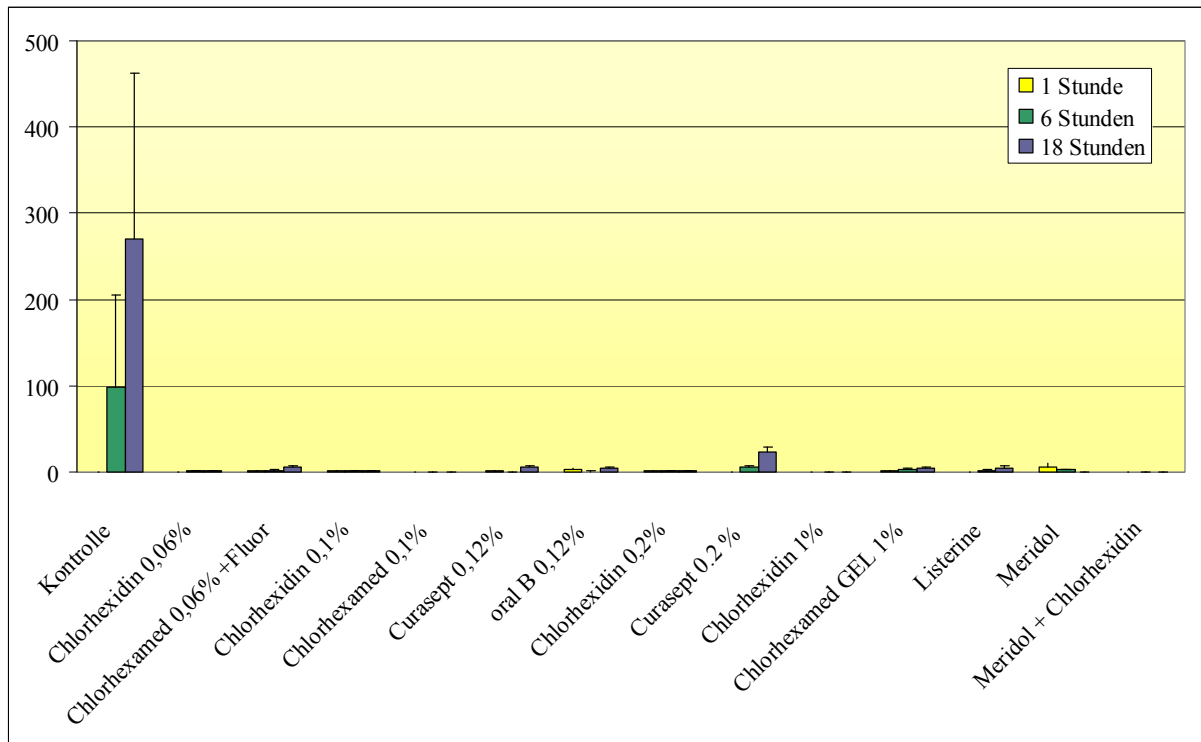


Abb. 19: Wirkung der Mundspüllösungen auf die Interleukin-8-Freisetzung der Fibroblasten nach Infektion mit *A. actinomycetemcomitans* Y4

Wie schon für die Freisetzung von IL-6 aus gingivalen Fibroblasten nachgewiesen (Abb. 12), erhöhte die Infektion mit *A. actinomycetemcomitans* auch die Menge des nachweisbaren IL-8 (Abb. 18 und Abb. 19). Im Versuchsansatz mit *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 (Abb. 18) ergab die Kontrolle mit sterilem Leitungswasser eine Freisetzung von 0,41 pg/ml nach einer, 45,9 pg/ml nach sechs und 598,3 pg/ml IL-8 nach 18 Stunden. Diese Steigerung der Nachweismenge nach sechs Stunden war auch bei der Infektion mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 zu beobachten (Abb. 19), wobei die Werte 0,32 pg/ml, 98,5 pg/ml und 270,1 pg/ml für die Zeitintervalle von einer, sechs und 18 Stunden betragen. *A. actinomycetemcomitans* verursachte also die Freisetzung der doppelten IL-8-Menge.

Nach Spülung der Fibroblasten mit den Testlösungen wurde eine stark verminderte IL-8-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. So waren nach einer Stunde die Werte noch im Bereich der Kontrolle, und lagen in den Zeitintervallen sechs und 18 Stunden deutlich darunter. Mit *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 infizierte Zellen gaben IL-8 Mengen ab, die zwischen nicht mehr nachweisbar bei Chlorhexidin 1,0% und 1,98 pg/ml (Oral B 0,12%) lagen. Auffällig hoch war mit 48,51 pg/ml der Wert für Curasept 0,12% nach sechs Stunden, der sich aber nach 18 Stunden mit 0,87 pg/ml wieder im Bereich des Durchschnitts (1,51 pg/ml) der ermittelten Werte befand.

Die Ergebnisse zur IL-8-Freisetzung nach Spülung der mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 infizierten gingivalen Fibroblasten bestätigten diese Beobachtungen. Auch hier wurden nach einer Stunde Werte gemessen, die im Bereich der Kontrolle lagen, sie stiegen jedoch nach sechs und 18 Stunden im Gegensatz zur Kontrolle nicht an. Hier lagen die ermittelten Werte zwischen 0 pg/ml (Chlorhexamed 0,1%) und 5,824 pg/ml (Curasept 0,12%). Ebenso fiel bei dieser *A. actinomycetemcomitans* Y4 Testreihe das Ergebnis für Curasept 0,2% nach 18 Stunden auf. Dieses lag mit 23,37 pg/ml IL-8 deutlich über dem Mittelwert der Testlösungen mit 2,34 pg/ml.

Listerine und Meridol führten zu mit den Chlorhexidinlösungen vergleichbaren Ergebnissen. Es konnte weder bei *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 noch bei *A. actinomycetemcomitans* Y4 ein typischer Zeitverlauf der IL-8-Freisetzung dokumentiert werden.

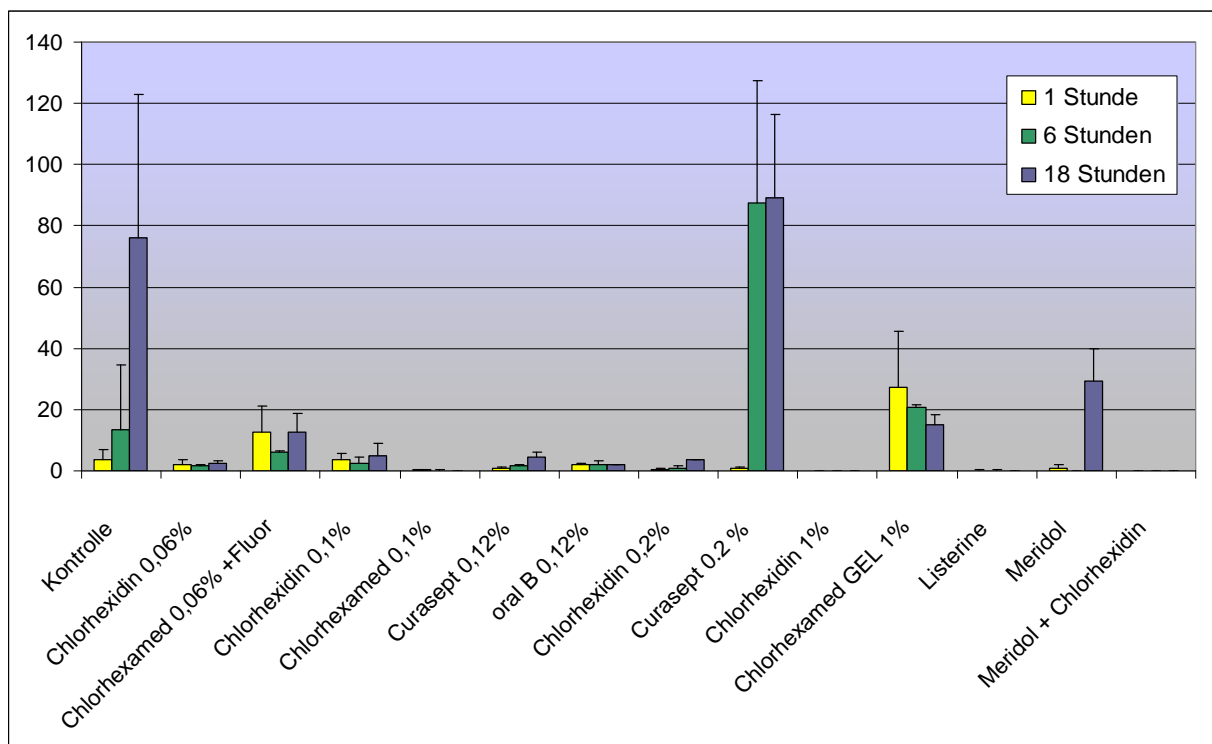


Abb. 20: Wirkung der Mundspüllösungen auf die Interleukin-8-Freisetzung der Fibroblasten nach Infektion mit *P. gingivalis* ATCC 33277

Ein anderes Bild ergab sich bei der Betrachtung der IL-8-Freisetzung durch *P. gingivalis* ATCC 33277 (Abb. 20). Im Vergleich der Kontrollen waren die Interleukinmengen nichtinfizierter (52,87 pg/ml nach 18 Stunden) und infizierter Fibroblasten (75,96 pg/ml nach 18 Stunden) sehr ähnlich, der Einfluss der Infektion auf die IL-8-Freisetzung war somit gering.

Die Spülung der Zellen mit Curasept 0,2% (Maximum 89,31 pg/ml) und Chlorhexamed Gel 1,0% (Maximum 27,3 pg/ml) erhöhte die Interleukinfreisetzung, die anderen Chlorhexidinlösungen senkten die Ergebnisse auf sehr geringe Werte, zum Teil bis auf Null ab (Chlorhexidin 1,0%, Chlorhexamed 0,1%). Im Vergleich der Mittelwerte der einzelnen Zeitabschnitte konnte ein leichter Anstieg der IL-8-Freisetzung von 3,93 pg/ml nach einer Stunde auf 9,49 pg/ml nach sechs und 12,6 pg/ml nach 18 Stunden beobachtet werden.

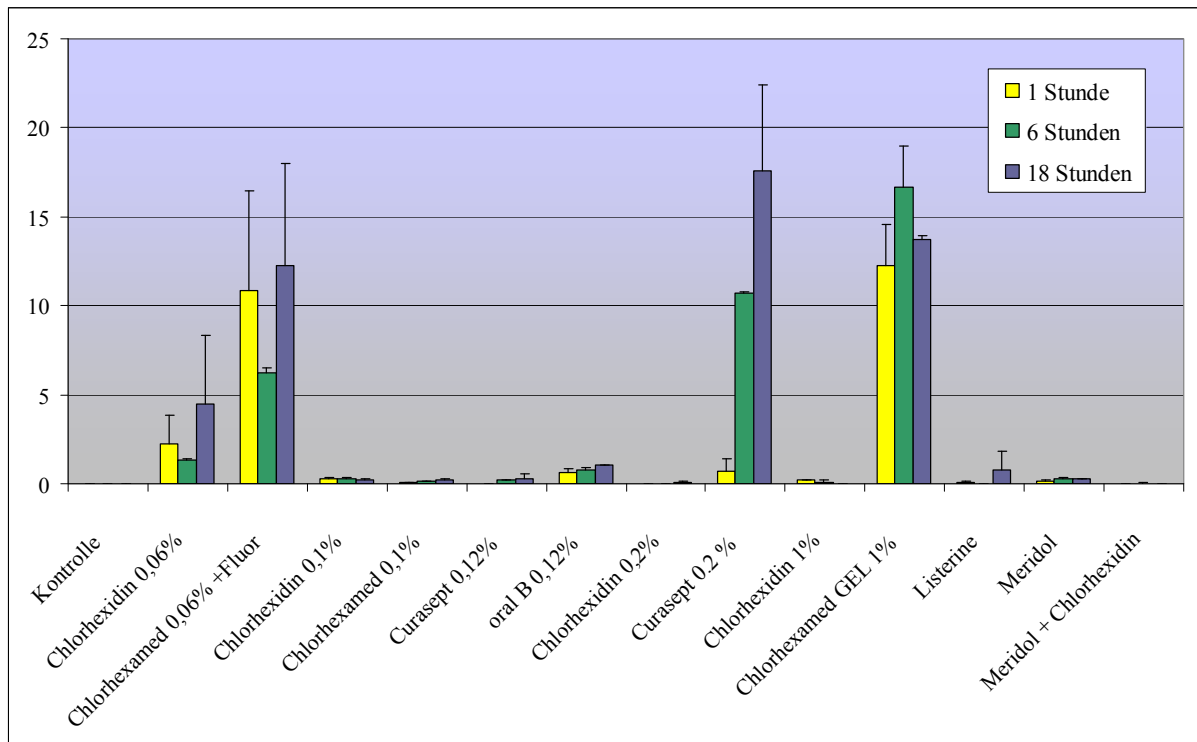


Abb. 21: Wirkung der Mundspüllösungen auf die Interleukin-8-Freisetzung der Fibroblasten nach Infektion mit *P. gingivalis* M5-1-2

Einen starken Einfluss hatte die Infektion der gingivalen Fibroblasten mit *P. gingivalis* M5-1-2 auf die Freisetzung von IL-8: Hier konnte in der Kontrolle kein IL-8 nachgewiesen werden (Abb. 21).

Chlorhexidin führte zum Anstieg der IL-8-Freisetzung der Zellen. Diese war am deutlichsten bei den Versuchen mit 0,06% Chlorhexamed (Maximum 12,24 pg/ml), Curasept 0,2% (Maximum 17,56 pg/ml) nach 18 Stunden und Chlorhexidin Gel 1,0% (Maximum 16,68 pg/ml) nach sechs Stunden zu beobachten. Die gemittelten Werte nach einer, sechs und 18 Stunden zeigen mit 2,11 pg/ml, 2,83 pg/ml und 3,92 pg/ml einen leichten Anstieg der Sekretion je Zeiteinheit, trotzdem blieben die Mengen des freigesetzten IL-8 deutlich unter denen der *P. gingivalis* ATCC 33277- Tests.

Die Werte für Listerine und Meridol waren mit den Chlorhexidinlösungen vergleichbar. Sie lagen zwischen 0 und 0,75 pg/ml (Listerine) und 0 und 0,9 pg/ml (Meridol) bei den beiden untersuchten *P. gingivalis* Stämmen. Als Ausnahme konnte für Meridol nach 18 Stunden der Wert 29,25 pg/ml bei *P. gingivalis* ATCC 33277 gemessen werden.

## **5.3 Zytotoxizität**

### 5.3.1 MTT-Nachweis

Die Untersuchung der Zytotoxizität erfolgte mittels MTT-Nachweis für infizierte und nicht infizierte Zellen nach Kontakt mit den Spüllösungen. Die Dauer des Kontaktes der Zellen mit den chlorhexidinhaltigen und chlorhexidinfreien Lösungen betrug eine Minute. Dargestellt ist in den Diagrammen die spektrometrische Absorption des entstandenen Formazans bei 562 nm als Nachweis der enzymatischen und somit metabolischen Aktivität. Diese ist ein Maß für die Vitalität der Zellen. Zur Kontrolle der Werte erfolgte eine Trypanblau-Färbung mit Ermittlung der Zahl der vitalen und avitalen Zellen.

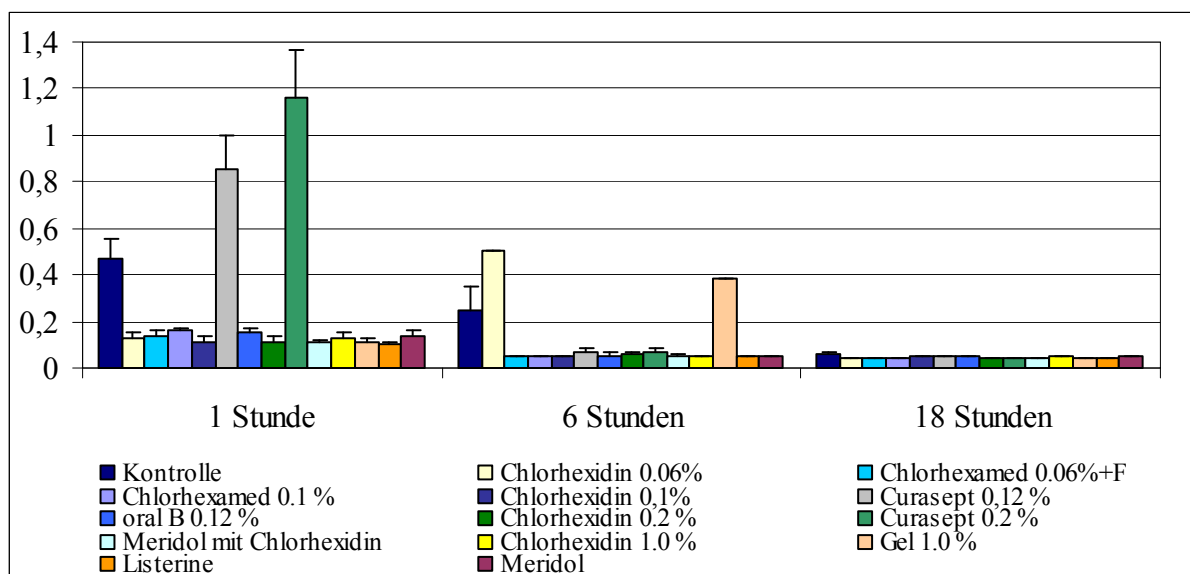


Abb. 22: MTT-Nachweis nicht infizierter Fibroblasten 1, 6 und 18 Stunden nach Anwendung der Mundspüllösungen. Absorption bei 562 nm.

Die Kontrolle nichtinfizierter Zellen betrug nach einer Stunde 0,47 und sank dann auf 0,25 nach sechs und 0,06 nach 18 Stunden ab. Im Verlauf von einer, sechs und 18 Stunden war auch nach Kontakt der Zellen mit den Testlösungen eine nach jedem Zeitintervall geringere Absorption messbar. Schon nach einer Stunde fiel die metabolische Aktivität aller Lösungen auf im Durchschnitt 0,3 und sank im Verlauf von sechs und 18 Stunden weiter auf 0,11 und



0,044. Im Gegensatz dazu lagen die Ergebnisse der Curaseptlösungen 0,12% mit 0,85 und 0,2% mit 1,16 deutlich über der Kontrolle und stellten somit die höchsten im Test ermittelten Werte dar.

Nach sechs Stunden waren die mit Chlorhexidin 0,06% und Gel 1% gespülten Zellen mit Werten von 0,5 und 0,38 die metabolisch aktivsten. Hier zeigte sich eine größere Absorption als bei den Kontrollen mit sterilem Leitungswasser. Alle weiteren Lösungen führten zu Werten zwischen 0,05 und 0,07.

Unterschiede in der Absorption waren nach Ablauf von 18 Stunden kaum noch erkennbar. Alle Mundspüllösungen hatten die enzymatische Aktivität der Zellen auf ein einheitlich sehr niedriges Niveau von im Mittel 0,05 gesenkt. Auffällig war dabei, dass auch das als Kontrolle verwendete sterile Leitungswasser zum Absinken der Werte führte.

Die MTT-Werte der mit Listerine oder Meridol gespülten Zellen unterschieden sich nicht von denen der Chlorhexidinlösungen.

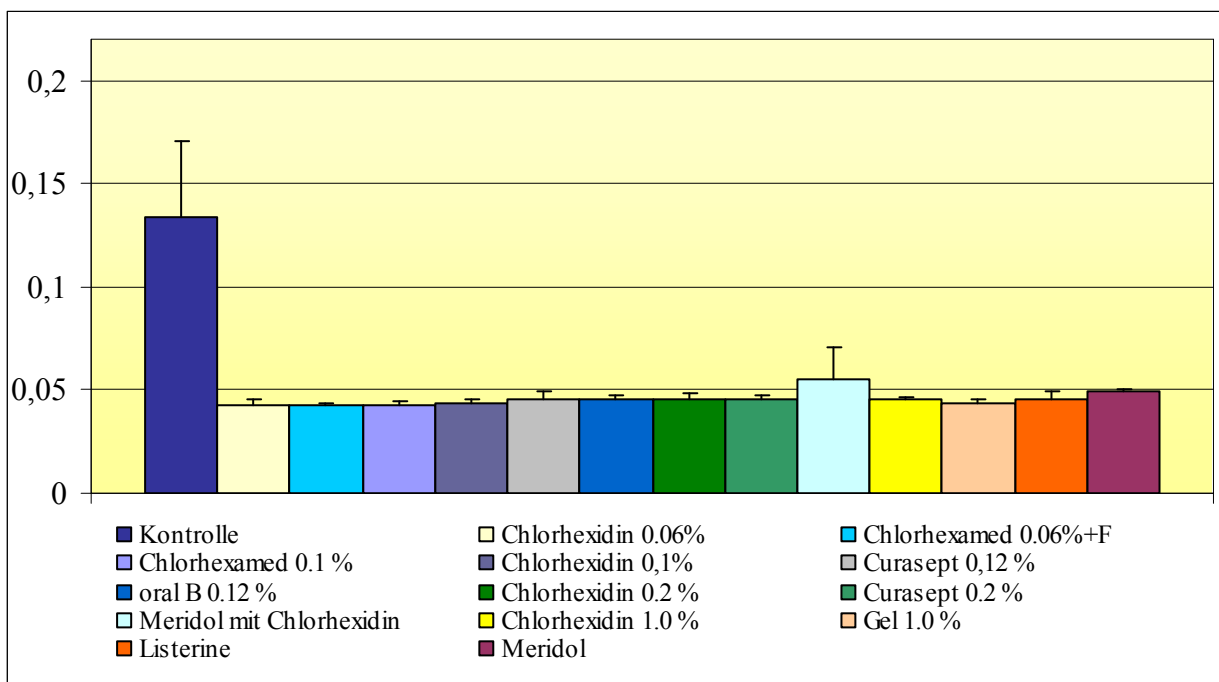


Abb. 23: MTT-Nachweis von mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 infizierten Fibroblasten 18 Stunden nach Zugabe der Mundspüllösungen (Absorption bei 562 nm).

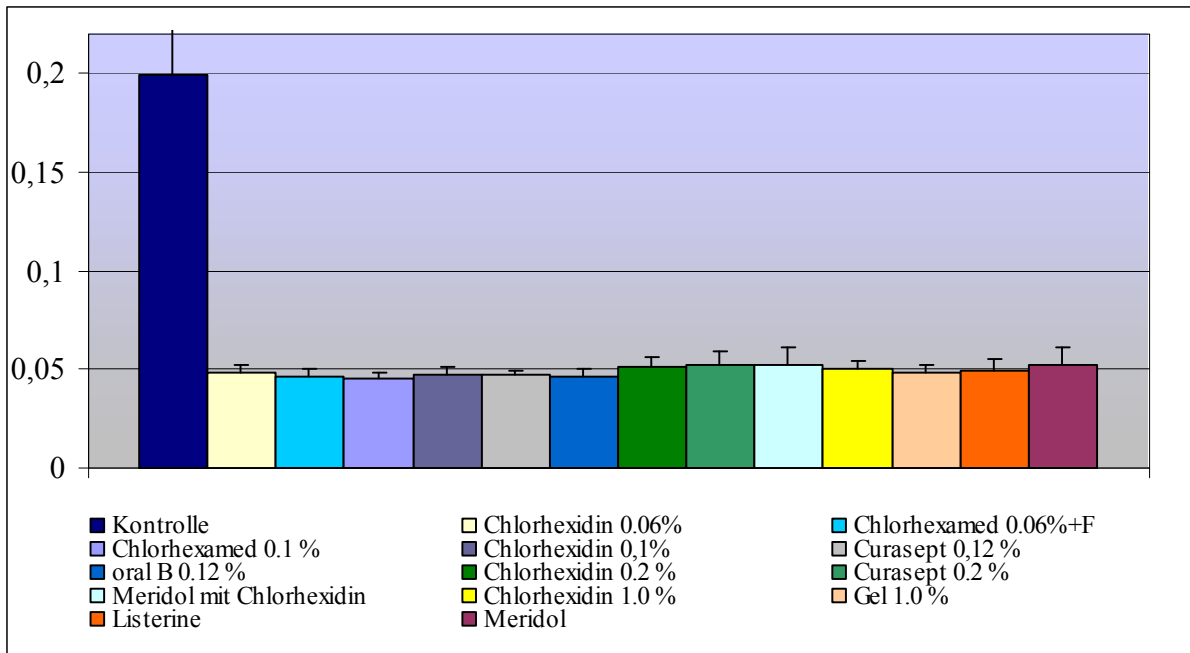


Abb. 24: MTT-Nachweis von mit *P. gingivalis* M5-1-2 infizierter Fibroblasten 18 Stunden nach Zugabe der Mundspüllösungen (Absorption bei 562 nm).

Die Wirkungen der Lösungen auf infizierte und nichtinfizierte Zellen bezüglich der Zelltoxizität unterschieden sich kaum. Lediglich der Absorptionskoeffizient für die Kontrolle betrug 0,2 für *A. actinomycetemcomitans* Y4 und 0,134 für *P. gingivalis* M5-1-2, und lag somit etwas höher als bei den nichtinfizierten Zellen. Es ergaben sich ähnliche Ergebnisse nach Infektion der Zellen mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 (Abb. 23) und *P. gingivalis* M5-1-2 (Abb. 24) nach Ablauf von 18 Stunden: die Chlorhexidinlösungen senkten den Wert um 62,7% (*A. actinomycetemcomitans* Y4) bzw. 75% (*P. gingivalis* M5-1-2) auf durchschnittlich 0,05. Dabei gab es keinen Unterschied zwischen Handelspräparaten, frisch mit Leitungswasser hergestellten Lösungen, den verschiedenen Konzentrationen sowie Listerine und Meridol.

### 5.3.2 Trypanblau-Exclusion-Test

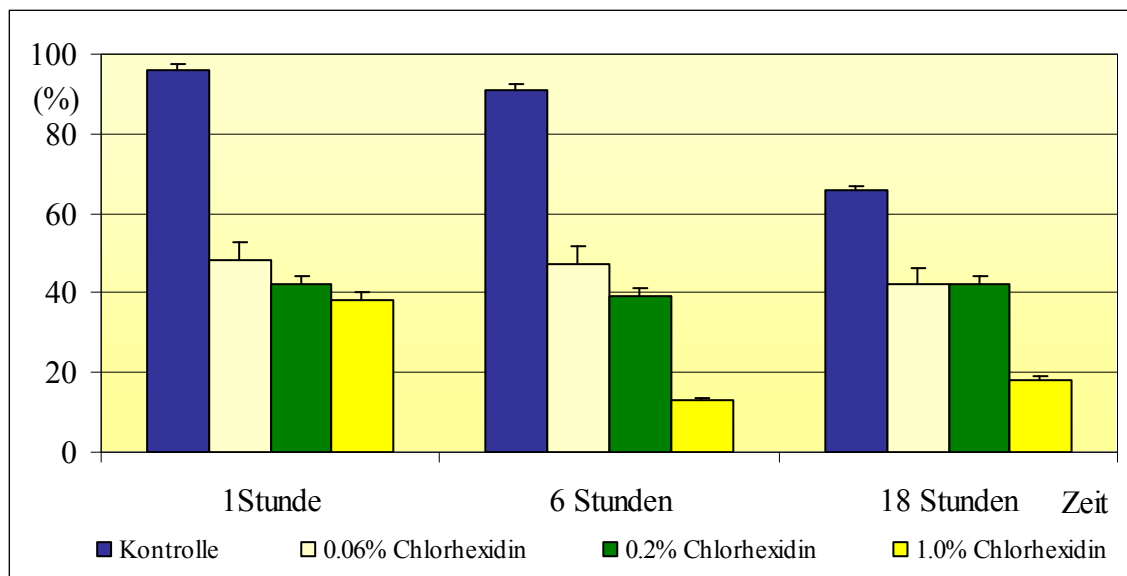


Abb. 25: Trypanblau-Exclusion-Test. Dargestellt ist die Anzahl der vitalen Zellen nach Behandlung mit den Chlorhexidinspüllösungen und Inkubation für 1, 6 und 18 Stunden.

Repräsentativ für die verschiedenen Konzentrationen wurden hier die niedrigste verwendete Chlorhexidin-Konzentration, eine mittlere und die am höchsten konzentrierte Lösung auf ihre Zytotoxizität untersucht. In der Kontrollreihe waren nach einer Stunde 96% der Zellen vital, nach sechs Stunden 91% und nach Ablauf von 18 Stunden noch 66%. Bei den Tests mit Chlorhexidin wurde deutlich, dass eine Korrelation zwischen der verwendeten Konzentration und der Anzahl der vitalen Zellen besteht. So betrug die Zahl der vitalen Fibroblasten nach Spülung mit sterilem Leitungswasser im Durchschnitt über eine, sechs und 18 Stunden 84,3%, nach Anwendung von 0,06%igem Chlorhexidin waren es nur 45,6%. Bei der mittleren Konzentration 0,2% Chlorhexidin waren im Mittel 41% der Zellen vital, bei Anwendung von 1,0%iger Lösung betrug deren Anteil nur noch 23%.

Die Zeit nach der Exposition der Zellen mit Chlorhexidin hatte im Versuch nur geringe Auswirkungen auf die Anzahl vitaler Zellen. 18 Stunden nach einminütigem Chlorhexidin-Kontakt der Fibroblasten war die jeweils größte Schädigung der Fibroblasten messbar. Im Durchschnitt waren nur noch 36,3% der Zellen vital, was aber bei Betrachtung des gemittelten Wertes für die ersten beiden Zeitintervalle 38,3% vitaler Zellen vernachlässigbar erscheint.

## **6. Diskussion**

In diesem Kapitel werden die Methodik und die Ergebnisse der Versuche zur antimikrobiellen Wirksamkeit, zur Interleukinfreisetzung und zur Zelltoxizität zusammengefasst, erläutert und im Zusammenhang mit aktueller Literatur interpretiert.

### **6.1 Methodik**

Im ersten Teilversuch sollten die antimikrobiellen Eigenschaften von Chlorhexidin auf zwei der wichtigsten pathogenen Erreger der Parodontitis getestet werden. Nach der Definition des World Workshop of Clinical Periodontics 1996 gehört zu diesen Bakterien neben *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* auch *Tannerella forsythia*, der in die vorliegende Studie jedoch nicht einbezogen wurde. Grund dafür ist die Fokussierung auf *A. actinomycetemcomitans* – den Keim, dessen Auftreten mit der aggressiven Parodontitis in Zusammenhang steht (Fine et al. 2006, Schacher et al. 2007) sowie auf *P. gingivalis*, welcher für den Unterhalt chronischer parodontaler Entzündungsreaktionen verantwortlich gemacht wird (López 2000).

Gegenübergestellt wurden der *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384-Stamm, ein Vertreter des Serotypes c, der vor allem bei parodontal gesunden Patienten gefunden wird, und *A. actinomycetemcomitans* Y4, zum Serotyp b zählend, der bei erkrankten Patienten zu finden ist (Yang et al. 2005). Bei den *P. gingivalis* Stämmen wurde der Laborstamm *P. gingivalis* ATCC 33277 und das klinische Isolat *P. gingivalis* M5-1-2 ausgewählt und verglichen.

Das Epithel der Mundschleimhaut und der Gingiva ist ein mehrschichtiges Plattenepithel, das überwiegend aus Keratinozyten besteht, in die vereinzelt Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen eingelagert sind. Für die vorliegende Studie wurden Fibroblasten als die Produzenten des Stützgerüsts ausgewählt. Diese Zellen produzieren Kollagen, ein fibrilläres Protein, welches das Gerüst der extrazellulären Matrix im Bindegewebe bildet, stützt, und somit die Gewebeintegrität gewährleistet. Außerdem findet man Glykoproteine, Proteoglykane, Glykosaminoglykane und, darin eingebettet, Bindegewebe. Die im Versuch verwendeten Fibroblasten lagen im Gegensatz zu dieser komplexen Konstruktion als Monolayer vor. Weiterführende Untersuchungen könnten zur besseren Anpassung an die

Verhältnisse in der Mundhöhle mit Multilayer-Schichten durchgeführt werden (Dongari-Bagtzoglou und Kashleva 2006).

Um bei allen Versuchsansätzen vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, wurde mit Zellen eines Probanden aus einer Entnahmestelle zwischen der vierten und achten Passage gearbeitet. Absolute Aussagen erschwert die Heterogenität der Eigenschaften in den Zelllinien humaner Gingivafibroblasten. Von verschiedenen Individuen, unterschiedlichen Stellen sowie von kranken oder gesunden Geweben entnommene orale Fibroblasten können in ihrer Zellmorphologie, dem proliferativen Potential (Hakkinen und Larjava 1992, Larjava et al. 1989) und ihrer Antwort auf Zytokine (Irwin et al. 1991) differieren.

Im Versuch wurde eine Minute mit den verschiedenen Testlösungen gespült, um eine möglichst realistische Dauer der intraoralen Anwendung mit Mundspüllösungen zu simulieren. Die Schaffung von mundähnlichen Bedingungen wurde durch die Inkubation während dieser Zeit bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> unterstützt, die auch im Verlauf der Intervalle von einer, sechs und 18 Stunden beibehalten wurde. Der Verlauf der Höhe der untersuchten Parameter (antimikrobielle Wirkung, Interleukinfreisetzung, Zytotoxizität) im Verlauf dieser Zeiteinheiten ist auch intraoral bei einmal täglich durchgeführter Spülung anzunehmen.

Zur Kontrolle diente bei allen Versuchen steriles Leitungswasser, da sich im Vorversuch zeigte, dass eine vergleichsweise Spülung der Fibroblasten mit destilliertem Wasser zur deutlich erhöhten Nachweisbarkeit von IL-6 und IL-8 führte. Versuchsweise verwendete physiologische Kochsalzlösung erwies sich als Kontrolle nicht akzeptabel, da es beim Kontakt mit Chlorhexidin zur Ausfällung der Salze kam und die Herstellung einer homogenen Lösung nicht möglich war.

Zytokine sind essentiell für die Funktion der Immunabwehr. Der zweite Teilversuch beschäftigte sich deshalb mit dem Nachweis der Freisetzung der Entzündungsmediatoren IL-6 und IL-8, die neben IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  als inflammatorische Zytokine besonders bedeutsam für die Pathogenese entzündlicher parodontaler Erkrankungen sind (Takashiba et al. 2003). Mittels ELISA, beruhend auf der Bindung des Interleukins an spezifische Antikörper und Detektion eines zweiten gebundenen Antikörpers im AK-AG-AK-Komplex, konnte ein qualitativer und quantitativer Nachweis geführt werden.

Abschließend erfolgte eine Untersuchung der zytotoxischen Wirkung der Mundspüllösungen. Da die zellschädigenden Wirkungen der Chlorhexidinexposition über eine, 24 und 72 Stunden bekannt ist (Babich et al. 1995), wurden die Zellen den Mundspüllösungen nur für eine Minute ausgesetzt. Studien belegen des Weiteren die ausgeprägte Zytotoxizität von *P. gingivalis*, ausgehend von einer 24-stündigen Exposition der Zellen mit den Bakterien (Johansson et al. 1996). Im vorliegenden Versuch konnte die Beeinflussung der Ergebnisse durch diesen Keim jedoch minimiert werden. Dies war durch eine Kontrolle mit sterilem Leitungswasser und nichtinfizierten Zellen möglich, so dass zwischen bakterienbedingter und auf Chlorhexidin zurückzuführender Zytotoxizität unterschieden werden konnte.

Als Assay für die Toxizität diente zunächst der MTT-Test zum Nachweis der mitochondrialen und somit metabolischen Aktivität der Zellen. Getestet wurden alle Lösungen unter keimfreien Bedingungen sowie nach Infektion der Zellen mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 und *P. gingivalis* M5-1-2, um den möglichen Einfluss bakterieller Zellschädigung beurteilen zu können. Zur Bestätigung der Aussagen über die Zelltoxizität wurde als Farbstoffausschlusstest der Trypanblau-Exclusion-Test angefertigt, der definitive Aussagen über die Vitalität der Zellen zulässt. Repräsentativ für die verschiedenen Konzentrationen wurden die niedrigste verwendete Chlorhexidinkonzentration, eine mittlere und die am höchsten konzentrierte Lösung auf ihre Zytotoxizität untersucht. Auf die Bakterienbesiedlung der Zellen wurde beim Trypanblau-Exclusion-Test verzichtet, da beim MTT-Test nachgewiesen werden konnte, dass die Infektion mit *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* im vorliegenden Versuchsaufbau einen zu vernachlässigenden Einfluss auf die zytotoxische Wirkung der Mundspüllösungen ausübt.

## **6.2 Antimikrobielle Aktivität**

In der vorliegenden Studie war nach Anwendung aller Mundspüllösungen eine deutliche Reduktion der Keimzahlen, bei einigen bis zur Keimfreiheit, nachweisbar.

Die besten Ergebnisse in den *A. actinomycetemcomitans*-Versuchen erzielten die Spülungen mit frisch aus sterilem Leitungswasser und 20% Chlorhexidin hergestellten Lösungen sowie dem 1%igen Gel. Am wenigsten effizient zeigte sich die Wirkung von Curasept, sowohl in der 0,12%igen als auch in der 0,2%igen Chlorhexidinzusammensetzung. Die

chlorhexidinfreien Präparate konnten die guten Werte der Chlorhexidinlösungen nicht erreichen, wobei Meridol zur größeren Keimreduktion im Vergleich mit Listerine führte. Die überlegene antibakterielle Wirkung von Chlorhexidin gegenüber Meridol und Listerine wurde durch in-vivo-Studien bestätigt (Brex et al. 1990).

Es wurden stammspezifische Unterschiede in der Wirksamkeit der Mundspüllösungen deutlich: Die antibakterielle Aktivität gegen den *A. actinomycetemcomitans* Y4 war deutlich höher als gegen den *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384-Stamm. Diese unterschiedliche Effizienz in der antimikrobiellen Wirksamkeit von Chlorhexidin, Meridol und Listerine gegenüber *A. actinomycetemcomitans*-Stämmen wurde in anderen Studien bestätigt (Fine et al. 2001, Thrower et al. 1997). Dies ist als positiver selektiver Effekt zu werten, da mit *A. actinomycetemcomitans* Y4 der bei aggressiver Parodontitis isolierbare Serotyp b stärker reduziert wurde als der bei gesunden Patienten nachzuweisende Serotyp c.

Unterschiede in der Wirksamkeit der getesteten Lösungen in Bezug auf planktonische und adhärente Keime bestanden in den Versuchen nicht.

Bei der Betrachtung der KBE der einzelnen Zeitintervalle von einer, sechs und 18 Stunden konnten typische Verläufe nachgewiesen werden: So fiel nach einer Stunde die Zahl der Bakterien stark ab, erreichte nach sechs Stunden den minimalen Wert und stieg dann bis zur 18. Stunde wieder deutlich an. Zurückgeführt werden kann dieser Verlauf auf die Substantivität des Chlorhexidins: Durch ausgeprägte anionische Eigenschaften haftet Chlorhexidin lange an Schleimhäuten, Zähnen und bakteriellen Biofilmen. Schon Schiött konnte 1973 die bakteriostatischen Eigenschaften einer 0,2%igen Chlorhexidinlösung In-vivo über einen Zeitraum von bis zu zwölf Stunden beobachten. Bis zum Ende von 18 Stunden ist die Substantivität jedoch nicht ausreichend, so dass im letzten Intervall die höchsten Zahlen koloniebildender Einheiten gezählt werden konnten.

Bei der Untersuchung der antimikrobiellen Wirksamkeit gegen *P. gingivalis* zeigte sich ein sehr einheitliches Bild: Alle Lösungen, ausgenommen Curasept 0,12% und 0,2%, waren in der Lage, die Bakterien bereits nach einer Stunde vollständig zu eliminieren. Nach sechs und 18 Stunden waren mit einer Ausnahme keine Keime mehr nachweisbar. Auch Listerine und Meridol erreichten diese sehr gute Wirksamkeit.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die antibakterielle Aktivität der getesteten Lösungen gegen die mikroaerophile Spezies *A. actinomycetemcomitans* geringer ist als gegen den Anaerobier *P. gingivalis*. Für die In-vivo-Anwendung folgt, unter Einbeziehung des zeitlichen antimikrobiellen Verlaufes, dass eine anhaltende Reduktion der Keimzahlen für *A. actinomycetemcomitans* in der Mundhöhle im Gegensatz zu *P. gingivalis* mit einer Mundspülung einmal am Tag nicht zu erreichen ist.

Diese deutlich bessere antimikrobielle Wirksamkeit des Chlorhexidins gegen *P. gingivalis* könnte mit der Wirkung von Chlorhexidin auf die Adhärenz des Bakteriums an den Zellen korrelieren. Es ist bekannt, dass Chlorhexidin die Haftungsfähigkeit von *P. gingivalis* an Epithelzellen und Erythrozyten beeinflusst, und die durch *P. gingivalis* bedingte Hämagglutination deutlich hemmt (Grenier 1996). Die Untersuchungen legen nahe, dass es zur Zellbindung des Chlorhexidins kommt, was die strukturelle Ausformung der äußeren Membran verändert und die Adhärenz reduziert. Eine höhere antimikrobielle Wirksamkeit der getesteten Lösungen gegen adhärente *P. gingivalis*-Keime im Vergleich zu den planktonischen Bakterien wurde jedoch im Versuch nicht nachgewiesen.

Des Weiteren ist die Wirkung des Chlorhexidins nicht linear konzentrationsbezogen. Hohe Chlorhexidinkonzentrationen in den Mundspüllösungen zeigten in der vorliegenden Studie keine verbesserten antimikrobiellen Effekte verglichen mit den Testlösungen, die einen niedrigeren Chlorhexidinanteil enthielten.

Die nachgewiesene höhere Wirksamkeit der frisch hergestellten gegenüber den im Handel erhältlichen Präparate könnte auf dem Fehlen von Zusätzen beruhen, die die Wirksamkeit beeinflussen. So bewirken alkoholfreien Chlorhexidinlösungen zugesetzte Stoffe keine verbessernden Effekte, sondern schlechtere Antiplaqueeigenschaften und vermehrte Verfärbungen der Zunge (Bascones et al. 2005). Zusätze waren dabei Natrium-Fluoride und Cetylpyridinium-Chloride. Auch der Vergleich von alkoholhaltigen mit alkoholfreien Chlorhexidinzubereitungen zeigte keine besseren Werte in der Wirksamkeit der äthanolhaltigen Lösungen. Die alkoholhaltigen Zubereitungen Listerine, Oral B und die Chlorhexamed-Produkte haben keine erhöhte antimikrobielle Aktivität. Studien von Leyes-Borrajo et al. (2002) bestätigen diese Beobachtung. Besonders deutlich werden die zusatzbedingten, konzentrationsunabhängigen Unterschiede in der Wirksamkeit bei den Curaseptprodukten: Die höhere Konzentration von 0,2% erzielt die schlechteren



antimikrobiellen Wirkungen im Vergleich zur 0,12%igen Rezeptur. Diese wiederum erreicht die Wirksamkeit frisch zubereiteter, zusatzfreier und niedriger konzentrierter Lösungen nicht.

Die Ergebnisse der In-vitro-Studien können wegen der vielfältigen Einflussfaktoren jedoch nicht unmittelbar auf die In-vivo-Situation übertragen werden. Im klinischen Gebrauch ist die antimikrobielle Wirksamkeit durch die absolut am Wirkort vorhandene Chlorhexidinmenge beeinflusst (Løe und Schiött 1970), die mit der Art der Anwendung variiert. So scheint die Applikation mittels supragingivaler Irrigation aufgrund der besseren Penetration in die parodontale Tasche gegenüber der Verwendung als Mundspüllösung vorteilhaft zu sein (Flemming 1993). Auch die Anwendung höherer Volumina niedrig konzentrierter Chlorhexidinlösungen bedingt bessere Plaqueinhibition und verminderte Zahnsteinanlagerung im Vergleich zur Spülung mit kleinen Mengen des hochkonzentrierten Wirkstoffes (Cumming and Løe 1973). Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass etablierte Biofilme signifikant die Resistenz der darin enthaltenen Keime gegen Chlorhexidin erhöhen (Jacquelin et al. 1992). Man kann jedoch davon ausgehen, dass Substanzen, die in-vitro keine Wirkung aufweisen, auch In-vivo keine Wirkung haben werden (Addy 2003).

### **6.3 Freisetzung der Zytokine**

Jeder Entzündungsvorgang beeinflusst das Muster der Interleukinfreisetzung. Von infizierten Parodontien wird mehr IL-6 sezerniert, so dass die IL-6 Werte in der Sulkusflüssigkeit erkrankter Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht sind (Mogi et al. 1999). Diese Vorgänge werden durch verschiedene Einflüsse modifiziert: in dieser Studie induzierte die Infektion mit *A. actinomycetemcomitans* eine massiv vermehrte Freisetzung der Interleukine aus Gingivafibroblasten. Somit können andere Untersuchungen bestätigt werden, die zeigten, dass *A. actinomycetemcomitans* sowie einzelne Oberflächenantigene des Keimes vermehrt IL-6 und IL-8 aus humanen Gingivafibroblasten freisetzen (Sfakianakis et al. 2001, Patil et al. 2006, Tani et al. 1997, Dongari-Bagtzoglou und Ebersole 1996). Nach anderen Untersuchungen hemmen Polysaccharide der *A. actinomycetemcomitans*-Kapsel die IL-6 und IL-8 Produktion gingivaler Fibroblasten (Ohguchi et al. 2003). Die Bereitstellung dieser Faktoren ist notwendig für die Produktion des humanen Anti-*A. actinomycetemcomitans*-Immunglobulin G (Tanaka et al. 2006).

Die Spülung mit den Testlösungen verursachte im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche Reduktion der IL-6 und IL-8 Nachweisbarkeit bei mit *A. actinomycetemcomitans* infizierten Zellen. Dies und das Ansteigen der Interleukinwerte mit nachlassender Chlorhexidinwirkung nach 18 Stunden deutet darauf hin, dass Chlorhexidin die Freisetzung von Zytokinen hemmt. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Studien überein, die zeigten, dass durch Spülung gingivaler Fibroblasten mit Chlorhexidin die Proteinproduktion massiv gehemmt wird. Dieses Phänomen ist auch bei niedrigsten Konzentrationen nachweisbar, die keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen haben (Mariotti und Rumpf 1999). Unterstützt wird der Wiederanstieg der Interleukinfreisetzung durch die nachgewiesene nachlassende antibakterielle Wirksamkeit des Chlorhexidins nach 18 Stunden, woraus eine höhere Keimzahl in diesem Zeitintervall resultiert.

Infektionen mit *P. gingivalis* führen zu starken Veränderungen der Immunantwort des Wirtes (Hamada und Watanabe 2002). Mit *P. gingivalis*-spezifischen Lipopolysacchariden, Membranproteinen oder Polysacchariden stimulierte humane Gingivafibroblasten produzieren höhere Interleukinspiegel als Vergleichszellen (Kent et al. 1999, Steffen et al. 2000). Demgegenüber bewirken proteolytische Aktivitäten der Gingipaine einen Abbau des IL-6 durch Spaltung der für die Funktion essentiellen C-terminalen Region (Krüttgen et al. 1990). In der direkten Umgebung der infizierten Plaque resultiert daraus ein verminderter Interleukinspiegel, dagegen ist der IL-6 Spiegel 6 mm peripher der parodontalen Tasche erhöht (McGee et al. 1998). Zusätzlich ist bekannt, dass die Cysteinproteasen von *P. gingivalis* zur Proteolyse des IL-6 Rezeptors führen (Oleksy et al. 2002).

Gingipaine sind ebenfalls in der Lage IL-8 zu spalten. Infizierte Fibroblasten exprimieren noch die mRNA des Interleukins, das IL-8 aber wird schon während der Sekretion inaktiviert (Zhang et al. 1999). Im vorliegenden Versuch führte die Infektion mit *Porphyromonas gingivalis* zu stark verminderten, teilweise nicht mehr innerhalb der Nachweisgrenzen liegenden Mengen von IL-6 und IL-8.

Dagegen war nach Spülung mit den Testlösungen eine, wenn auch im Vergleich zu *A. actinomycetemcomitans* geringe Menge sezernierten IL-6 und IL-8 vorhanden. Dieser Effekt könnte durch eine Hemmung der keimspezifischen IL-6 und IL-8 spaltenden Proteasen durch Chlorhexidin bedingt sein. Aktuelle Studien belegen, dass Chlorhexidin ein effektiver Inhibitor der Gingipaine ist. Gesteigert wird diese Hemmung der Enzyme noch durch das

Vorhandensein von Zink (II) (Cronan et al. 2006). Enzymaktivitätsverändernde Wirkungen von Chlorhexidin sind auch schon aus Experimenten mit Kollagenasehemmungen bei *P. gingivalis* infizierten Fibroblasten bekannt (Houle et al. 2003).

Der Verlauf der Interleukinfreisetzung nach Kontakt mit parodontopathogenen Keimen ist im Gesamtversuch betrachtet speziesspezifisch und für alle Lösungen ähnlich: nach 18 Stunden waren die höchsten IL-6 und IL-8 Werte messbar. Im allgemeinen bestanden keine Korrelationen zwischen Interleukinnachweisbarkeit und Chlorhexidinkonzentration, Zusammensetzung oder Zubereitungsform. Nach 1,0% Chlorhexamed-Gel und Curasept 0,2% wurden in den Versuchsansätzen mit *P. gingivalis* erhöhte IL-8 Werte nachgewiesen. Ähnliches war für Meridol mit Chlorhexidin in Bezug auf die IL-6-Freisetzung auffällig.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse ist zu beachten, dass In-vivo neben pathogenen Bakterien auch Faktoren wie Medikamente, Nikotin, Hormone und Lipopolysaccharide die Freisetzung von IL-6 und IL-8 aus humanen Gingivafibroblasten beeinflussen (Tipton et al. 2003a, Almasri et al. 2007, Wendell und Stein 2001, Gornstein et al. 1999). Therapeutische Eingriffe wie das Scaling haben ebenfalls Auswirkungen auf den Interleukinspiegel (Forner et al. 2006).

Modifizierend für die Interleukinfreisetzung könnte auch ein zytotoxischer Effekt der Mundspüllösungen sein. Eine solche Beeinflussung der Interleukinfreisetzung durch zytotoxische Eigenschaften wurde für die IL-6 und IL-8 Produktion aus humanen gingivalen Fibroblasten nach Kontakt mit Myrrheöl (*Commiphora molmol*) nachgewiesen (Tipton et al. 2003b).

#### **6.4 Zytotoxizität**

Chemische Verbindungen, die die Fähigkeit besitzen Zellen zu töten, werden als zytotoxisch bezeichnet. In-vitro-Untersuchungen ergaben, dass Chlorhexidin bereits in niedrigen Konzentrationen eine Hemmwirkung auf die Proliferation von Fibroblastenkulturen ausübt (Pucher und Daniel 1992) und die Produktion von Kollagen- und Nichtkollagenproteinen reduziert (Mariotti und Rumpf 1999). Störungen der Wundheilung konnten dagegen in klinischen Studien nicht bestätigt werden. Chlorhexidinspülungen bei der Nachsorge

parodontalchirurgischer Eingriffe führten vielmehr zu einem schnelleren Abklingen der Entzündung und zu reduzierten Taschentiefen (Sanz et al. 1989, Kozlovsky et al. 2007).

Bei humanen dermalen Fibroblasten setzt Chlorhexidin schon in Konzentrationen von 0,001% Mechanismen in Gang, die zum ATP-Verlust der Zelle führen und somit den Zelltod verursachen (Hidalgo und Dominguez 2001). Humane Gingivafibroblasten reagieren nach einer, 24 und 72-stündiger Chlorhexidinexposition mit dem Tod der Zelle (Babich et al. 1995). Auch zellschädigende Effekte des Chlorhexidins auf andere Zellen sind bekannt. Aktuelle Studien wiesen massive zytotoxische Wirkungen chlorhexidinhaltiger Mundspüllösungen auf humane Osteoblasten nach (Patel et al. 2006, Cabral und Fernandes 2007).

Im Versuch konnte eine Zytotoxizität aller Mundspüllösungen auf Gingivafibroblasten erwiesen werden. Die ermittelte zytotoxische Wirkung des Chlorhexidins wurde nicht von der Infektion mit *A. actinomycetemcomitans* oder *P. gingivalis* beeinflusst. Eine Verminderung der metabolischen Aktivität um durchschnittlich 90% nach 18 Stunden nach Einsatz der Mundspüllösungen im Vergleich zur Kontrolle zeigt diese zellschädigende Chlorhexidinwirkung eindrucksvoll. Auch das zur Kontrolle eingesetzte sterile Leitungswasser veränderte die nachgewiesenen enzymatischen Vorgänge der Zellen leicht, was als Stressreaktion der Zellen zu werten sein könnte.

Poggi et al. (2003) wiesen für alkoholhaltige Mundspüllösungen zellschädigende Wirkungen auf Fibroblasten nach. Dazu gehörten dosis- und zeitabhängige Hemmungen der Zelladhäsion, die Verminderung der Vitalität und Veränderungen der zytoskeletalen Strukturen und zytoplasmatischen Organellen der Fibroblasten. Ein Einfluss des Alkohols konnte durch die ermittelten Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden, die Zytotoxizität der alkoholhaltigen und der alkoholfreien Zusammensetzungen war gleich. Listerine und Meridol führten zu Ergebnissen, die im Bereich der Werte der Chlorhexidinlösungen lagen.

Die Abhängigkeit der Zellschäden von den verwendeten Konzentrationen wurde bei der Auswertung des Trypanblau-Exclusion-Tests deutlich. So sank die Zahl der vitalen Fibroblasten von 100 nach Spülung mit sterilem Leitungswasser im Durchschnitt aller Zeitintervalle auf 84,3, nach Anwendung von 0,06% Chlorhexidin auf 46 Zellen, 41 Zellen bei 0,2% und nur noch 23 vitale Fibroblasten bei 1,0% Chlorhexidin. Daraus folgt, dass mit

Erhöhung der Wirkstoffkonzentration die zytotoxischen Eigenschaften des Chlorhexidins zunehmen.

Zur Untersuchung des Zeitpunktes der Schädigung der Fibroblasten wurde die Zahl der vitalen Zellen nach einer, sechs und 18 Stunden ermittelt. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Reduktion der vitalen Zellzahl nach einer Stunde. In den Intervallen sechs und 18 Stunden ergab sich nur eine geringe weitere Verminderung der Zellzahl. Die Schädigung scheint also bei der direkten Exposition der Zellen mit Chlorhexidin aufzutreten und sich nach dessen Entfernen nur in geringem Maß fortzusetzen. Dies bestätigen Studien, die zeigten, dass humane Gingivafibroblasten nach zweistündiger Chlorhexidinexposition auch über 48 Stunden in chlorhexidinfreier Umgebung die Schädigung nicht kompensieren konnten (Babich et al. 1995).

Plauekontrolle ist die wichtigste Methode zur Prävention von parodontalen Erkrankungen. Gründliche mechanische Plaue-reduktion sowie die Vermeidung von parodontitisbegünstigenden Faktoren sollten dabei an erster Stelle stehen. Adjuvante Anwendung von antibakteriellen Mundspüllösungen ist in Studien als effektiv nachgewiesen und in der vorliegenden Untersuchung bestätigt worden. Aufgrund der zytotoxischen Wirkungen auf Fibroblasten sollte die Behandlung gesunder parodontaler Verhältnisse im Sinne der Prophylaxe durch die getesteten zellschädigenden Mundspüllösungen in Frage gestellt werden, und unter strenger Indikationsstellung erfolgen. Eingeschränkte physische oder mentale Fähigkeiten, Zustände nach Operationen in der Mundhöhle, intermaxilläre Fixation oder kieferorthopädische Situationen, in denen eine ausreichende Mundhygiene unmöglich ist, können die Anwendung von antibakteriellen Substanzen in Form von Spüllösungen erforderlich machen.

In der Therapie entzündlicher Parodontalerkrankungen ist Chlorhexidin ergänzend zur mechanischen Entfernung des Biofilms jedoch kaum wegzudenken: als Alternativen überzeugen Antibiotika durch ihr begrenztes spezifisches Wirkspektrum, systemische Nebenwirkungen und die Möglichkeit der Resistenzentwicklung nicht. Ihre Anwendung ist auf Problempatienten beschränkt. Andere Mundspüllösungen auf der Basis von Zinnfluorid/Aminfluorid oder ätherischen Ölen erreichen nicht die antibakterielle Potenz des Chlorhexidins. Durch Kurzzeitanwendung niedrig konzentrierter Chlorhexidinspülungen

können die antimikrobiellen Eigenschaften des Chlorhexidins genutzt und die zytotoxischen Effekte auf Gingivafibroblasten reduziert werden.

## **7. Schlussfolgerungen**

Mundspüllösungen weisen eine gute antimikrobielle Wirksamkeit gegen parodontopathogene Bakterien in Interaktion mit Gingivafibroblasten auf.

Frisch aus 20% Chlorhexidin und sterilem Leitungswasser hergestellte Lösungen sind in jeder Konzentration den im Handel erhältlichen Präparaten überlegen. Fertigpräparate enthalten Zusätze wie Alkohol, Aromastoffe und Farbstoffe, die die antimikrobielle Aktivität beeinflussen. Die auf der Wirkung von Thymol/Mentol/Eukalyptol beziehungsweise Aminfluorid/Zinnfluorid basierenden Lösungen Listerine und Meridol wiesen geringere antimikrobielle Eigenschaften als die Chlorhexidinlösungen auf.

Es besteht kein linearer Zusammenhang zwischen Chlorhexidinkonzentration und Wirksamkeit. Die antimikrobiellen Eigenschaften von Chlorhexidin gegenüber *P. gingivalis* sind deutlich ausgeprägter als gegenüber *A. actinomycetemcomitans*. Dies könnte Folge einer chlorhexidinbedingten Verminderung der Adhärenz des Anaerobiers an den Zellen sein.

Der keimreduzierende Effekt von Chlorhexidin gegenüber *A. actinomycetemcomitans* besteht nur kurzzeitig, während *P. gingivalis* offensichtlich vollständig abgetötet wird. Eine anhaltende Reduktion der Keimzahlen für *A. actinomycetemcomitans* in der Mundhöhle ist somit durch eine einmal-tägliche Mundspülung nicht zu erreichen. Die Anwendung von Mundspüllösungen zur Verringerung der Keimzahlen von *P. gingivalis* im Intervall von 24 Stunden ist dagegen ausreichend.

Die Freisetzung von Zytokinen aus Gingivafibroblasten wird von Mundspüllösungen beeinflusst. Eine von *A. actinomycetemcomitans* induzierte vermehrte Freisetzung von Zytokinen wird unterdrückt. Die chlorhexidinbedingte Hemmung der Proteasen von *P. gingivalis* reduziert die Spaltung von IL-6 und IL-8, woraus eine erhöhte Nachweisbarkeit resultiert. Außerdem könnte die zytotoxische Wirkung der Mundspüllösungen einen Einfluss auf die Freisetzung von IL-6 und IL-8 aus Gingivafibroblasten haben.

Mundspüllösungen wirken zytotoxisch. Die zellschädigenden Effekte treten bei Kontakt der Zellen mit Chlorhexidin auf, und sind konzentrationsabhängig. Die von Lang und Brex (1986) geforderten Eigenschaften antimikrobieller Agenzien zur Prävention und Behandlung

parodontaler Erkrankungen – nämlich 1. Spezifität, 2. Effektivität, 3. Substantivität, 4. Sicherheit und 5. Stabilität – können somit von Chlorhexidin nur teilweise erfüllt werden. Aufgrund der zytotoxischen Wirkung sollte ihr Einsatz als „Goldstandard“ in der Parodontologie kritisch geprüft werden. Mundspüllösungen sind zur Prophylaxe der Parodontitis nur in Ausnahmefällen geeignet. In der adjuvanten Therapie entzündlicher Parodontalerkrankungen können einmal-tägliche Spülungen mit niedrig konzentrierten Lösungen die zytotoxischen Effekte reduzieren. Von einer Chlorhexidin- Langzeitanwendung sollte abgesehen werden.



## **8. Literatur und Quellenverzeichnis**

1. Academy Report. 1999. Pathogenesis of Periodontal Diseases. *J Periodontol*, 70: 457-470.
2. Academy Report. 2001. Guidelines for Periodontal Therapy Position Paper. *J Periodontol*, 72: 1624-1628.
3. Addy M. 2003. The use of antiseptics in periodontal disease. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP (eds.) *Clinical periodontology and implant dentistry*, 4<sup>th</sup> edition, Blackwell, Munksgaard, p. 464-493.
4. Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. 1990. Biology of multifunctional cytokines IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J*, 4: 2860-2867.
5. Almasri A, Wisithphrom K, Windsor LJ, Olson B. 2007. Nicotine and lipopolysaccharide affect cytokine expression from gingival fibroblasts. *J Periodontol*, 78: 533-541.
6. Almqvist H, Luthman J. 1988. Gingival and mucosal reactions after intensive chlorhexidine treatment with or without oral hygiene measures. *Scand J Dent Res*, 96: 557-560.
7. Amano A, Kuboniwa M, Kataoka K, Tazaki K, Inoshita E, Nagata H, Tamagawa H, Shizukuishi S. 1995. Binding of hemoglobin by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett*, 134: 63-67.
8. Amano A, Nakagawa I, Okahashi N, Hamada N. 2004. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J Periodontal Res*, 39: 136-142.
9. Amano A, Shizukuishi S, Horie H, Kimura S, Morisaki I, Hamada S. 1998. Binding of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to proline-rich glycoproteins in parotid saliva via a domain shared by major salivary components. *Infect Immun*, 66: 2072-2077.
10. Armitage GC. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 4: 1-6.
11. Armitage GC. 2003. Position Paper Diagnosis of Periodontal Diseases. *J Periodontol*, 74: 1237-1247.
12. Arweiler NB, Donos N, Netuschil L, Reich E, Sculean A. 2000. Clinical and antibacterial effect of tea tree oil--a pilot study. *Clin Oral Investig*, 4: 70-73.
13. Attström R, Egelberg J. 1970. Emigration of blood neutrophils and monocytes into the gingival crevices. *J Periodontal Res*, 5: 48-55.
14. Babich H, Wurzbürger BJ, Rubin YL, Sinensky MC, Blau L. 1995. An in vitro study on the cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to human gingival cells. *Cell Biol Toxicol*, 2: 79-88.

15. Baker PJ, Wilson ME. 1989. Opsonic IgG antibody against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, 4: 98-105.
16. Baelum V, Lopez R. 2003. Defining and classifying periodontitis: need for a paradigm shift? *Eur J Oral Sci*, 3: 280-281; author reply 282-283.
17. Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Roopenian DC. 2000. Heterogeneity of *Porphyromonas gingivalis* strains in the induction of alveolar bone loss in mice. *Oral Microbiol Immunol*, 15: 27-32.
18. Baldo BA, Pham NH, Zhao Z. 2001. Chemistry of drug allergenicity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 1: 327-335.
19. Bascones A, Morante S, Mateos L, Mata M, Poblet J. 2005. Influence of additional active Ingredients on the effectiveness of non-alkoholic chlorhexidine mouthwashes: a randomized controlled trial. *J Periodontol*, 76: 1469-1475.
20. Bickel M. 1993. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol*, 64: 456-460.
21. Bramanti TE and Holt SC. 1991. Roles of porphyrins and host iron transport proteins in regulation of growth of *Porphyromonas gingivalis* W50. *J Bacteriol*, 173: 7330-7339.
22. Brex M, Brownstone E, MacDonald L, Gelskey S, Cheang M. 1992. Efficacy of Listerine, Meridol and chlorhexidine mouthrinses as supplements to regular tooth cleaning measures. *J Clin Periodontol*, 19: 202-207.
23. Brex M, Macdonald LL, Legary K, Cheang M, Forgay MG. 1993. Long-term effects of Meridol and chlorhexidine mouthrinses on plaque, gingivitis, staining, and bacterial vitality. *J Dent Res*, 72: 1194-1197.
24. 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: 292-297.
25. Cabral CT, Fernandes MH. 2007. In vitro comparison of chlorhexidine and povidone-iodine on the long-term proliferation and functional activity of human alveolar bone cells. *Clin Oral Investig*, 2: 155-164.
26. Charles CH, Mostler KM, Bartels LL, Mankodi SM. 2004. Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial. *J Clin Periodontol*, 31: 878-884.
27. Charles CH, Sharma NC, Galustians HJ, Qaqish J, McGuire JA, Vincent JW. 2001. Comparative efficacy of an antiseptic mouthrinse and an antiplaque/antigingivitis dentifrice. A six-month clinical trial. *J Am Dent Assoc*, 132: 670-675.
28. Chaves ES, Jeffcoat MK, Ryerson CC, Snyder B. 2000. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus*

- actinomycetemcomitans in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. *J Clin Periodontol*, 27: 897-903.
29. Cronan CA, Potempa J, Travis J, Mayo JA. 2006. Inhibition of *Porphyromonas gingivalis* proteinases (gingipains) by Chlorhexidine: Synergistic effect of Zn(II). *Oral Microbiol Immunol*, 21: 212-217.
  30. Cumming BR, L oe H. 1973. Optimal dosage and method of delivering chlorhexidine solutions for the inhibition of dental plaque. *J Periodontal Res*, 8: 57–62.
  31. Cutler CW, Kalmar JR, Genco CA. 1995. Pathogenetic strategies of the oral anaerobe, *Porphyromonas gingivalis*. *Trends Microbiol*, 3: 45- 51.
  32. Dahl en GG. 1993. Black-pigmented gram-negative anaerobes in periodontitis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 6: 181–192.
  33. Deschner J. 2000. Zytokine und ihre Bedeutung f ur die parodontale Destruktion, Diagnostik und Therapie. *ZMK*, 6: 316-323.
  34. Dongari-Bagtzoglou AI, Ebersole JL. 1996. Production of inflammatory mediators and cytokines by human gingival fibroblasts following bacterial challenge. *J Periodontal Res*, 31: 90-98.
  35. Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H. 2006. Development of a highly reproducible three-dimensional organotypic model of the oral mucosa. *Nat Protoc*, 1: 2012-2018.
  36. Eick S, Pfister W. 2004. Efficacy of antibiotics against periodontopathogenic bacteria within epithelial cells: an in vitro study. *J Periodontol*, 75: 1327-1334.
  37. Eick S, R odel J, Einax JW, Pfister W. 2002. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with KB cells: comparison of different clinical isolates. *Oral Microbiol Immunol*, 17: 201–208.
  38. Eick S, Reißmann A, R odel J, Schmidt KH, Pfister W. 2006. *Porphyromonas gingivalis* survives within KB cells and modulates inflammatory response. *Oral Microbiol Immunol*, 21: 231–237.
  39. Eley BM. 1999. Antibacterial agents in the control of supragingival plaque- a review. *Br Dent J*, 186: 286-296.
  40. Ellepola AN, Samaranayake LP. 2001. Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. *Oral Dis*, 7: 11-17.
  41. Ezzo PJ, Cutler CW. 2003. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontol 2000*, 32: 24-35.
  42. Faveri M, Gursky LC, Feres M, Shibli JA, Salvador SL, Figueiredo LC. 2006. Scaling and root planing and chlorhexidine mouthrinses in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, placebo- controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*, 33: 819-828.

43. Feng Z, Weinberg A. 2006. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontol* 2000, 40: 50-67.
44. Fine DH, Furgang D, Barnett ML. 2001. Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against isogenic planktonic and biofilm forms of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol*, 28: 697-700.
45. Fine DH, Furgang D, Sinatra K, Charles C, McGuire A, Kumar LD. 2005. In vivo antimicrobial effectiveness of an essential oil-containing mouth rinse 12 h after a single use and 14 days' use. *J Clin Periodontol*, 32: 335-340.
46. Fine DH, Kaplan JB, Kachlany SC, Schreiner HC. 2006. How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a model for infectious diseases. *Periodontol* 2000, 42: 114–157.
47. Fives-Taylor P, Meyer D, Mintz K. 1995. Characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* invasion of and adhesion to cultured epithelial cells. *Adv Dent Res*, 9: 55-62.
48. Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP and Brisette C. 1999. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol*, 20: 136-167.
49. Flemming TF. 1993. Supragingivale Irrigation zur Unterstützung der Gingivitis- und Parodontitistherapie. *Parodontologie*, 4: 259-272.
50. Forner L, Nielsen CH, Bendtzen K, Larsen T, Holmstrup P. 2006. Increased plasma levels of IL- 6 in bacteremic periodontitis patients after scaling. *J Clin Periodontol*, 33: 724-729.
51. Gemsa D, Kalden JR, Resch K. Hrsg. 1991. 3.Auflage. *Immunologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag: 268.
52. Genco RJ, Kornman K, Williams R, Offenbacher S, Zambon JJ, Ishikawa I, Listgarten M, Michalowicz B, Page R, Schenkein H, Slots J and Sokransky SS. 1996. Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol*, 1: 926-932.
53. Gent JF, Frank ME, Hettinger TP. 2002. Taste confusions following chlorhexidine treatment. *Chem Senses*, 27: 73-80.
54. Gornstein RA, Lapp CA, Bustos-Valdes SM, Zamorano P. 1999. Androgens Modulate Interleukin- 6 Production by Gingival Fibroblasts in Vitro. *J Periodontol*, 70: 604-609.
55. Grenier D. 1996. Effect of chlorhexidine on the adherence properties of *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Periodontol*, 23: 140- 142.
56. Gründemann LJ, Timmerman MF, Ijzerman Y, Van der Weijden GA. 2000. Stain, plaque and gingivitis reduction by combining chlorhexidine and peroxyborate. *J Clin Periodontol*, 27: 9–15.

57. Gutiérrez-Venegas G, Kawasaki-Cardenas P, Garcés CP, Roman-Alvárez P, Barajas-Torres C, Contreras-Marmolejo LA. 2007. Actinobacillus actinomycetemcomitans adheres to human gingival fibroblasts and modifies cytoskeletal organization. *Cell Biol Int*, 31:1063-1068.
58. Haffajee AD, Socransky SS. 2005. Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontol* 2000, 38: 9-12.
59. Hagedorn B, Willershausen B, Ernst CP, Wehse T, Schimmel M. 2000. A comparative study of 2 fluoride-based mouthrinses. *Quintessence Int*, 31: 125-128.
60. Häkkinen L, Larjava H. 1992. Characterization of fibroblast clones from periodontal granulation tissue in vitro. *J Dent Res*, 71: 1901–1907.
61. Hamada N, Watanabe K, Arai M, Hiramane H, Umemoto T. 2002. Cytokine production induced by a 67-kDa fimbrial protein from Porphyromonas gingivalis. *Oral Microbiol Immunol*, 197- 200.
62. Hart TC, Shapira L, Van Dyke TE. 1994. Neutrophil defects as risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol*, 65: 521-529.
63. Heinz B, Kermanie MA, Jepsen S. 1999. Der Einsatz von Chlorhexidin in der Zahnheilkunde. *Parodontologie*, 4: 297-318.
64. Heinrich PC. 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*, 269 (Suppl): 51-66.
65. Helldén L, Lindhe J. Enhanced emigration of crevicular leukocytes by factors in human dental plaque. 1973. *Scand J Dent Res*, 81: 123-129.
66. Hennessey TD. 1977. Antibacterial properties of hibitane. *J Clin Periodontol*, 4: 36-48.
67. Hidalgo E, Dominguez C. 2001. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. *Toxicol In Vitro*, 15: 271-276.
68. Hirano T, Kishimoto T. 1990. Handbook of Experimental Pharmacology Peptide Growth Factors and Their Receptors. Ed. Sporn MB, Roberts AB. Berlin. Springer 95: 633- 665.
69. Holt SC, Bramanti TE. 1991. Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2: 177-281.
70. Holt SC, Ebersole JL. 2005. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, Tanerella forsythia: “The red complex”, a prototype polybacterial pathogenetic consortium in periodontitis. *Periodontol* 2000, 38: 72-122.
71. Hongo H, Takano H, Morita M. 2007. Dense fimbrial meshwork enhances Porphyromonas gingivalis adhesiveness: a scanning electron microscopic study. *J Periodontal Res*, 42: 114-118.

72. Houle MA, Grenier D, Plamondon P, Nakayama K. 2003. The collagenase activity of *Porphyromonas gingivalis* is due to arg- Gingipain. *FEMS Microbiol Lett*, 221: 181-185.
73. Hughes FJ, Turner W, Belibasakis G, Martuscelli G. 2006. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontol 2000*, 41: 48-72.
74. Irwin CR, Schor SL, Ferguson MW. 1991. Expression of EGF-receptors on epithelial and stromal cells of normal and inflamed gingiva. *J Periodontal Res*, 26: 388–394.
75. Jacquelin LF, Carquin J, Le Magrex E, Choisy C. 1992. Comparison of the activity against *Streptococcus mutans* of a chlorhexidine- based antiseptic as a suspension or as a biofilm. *Pathol Biol*, 40: 518-522.
76. Johansson A, Bergenholtz A, Holm SE. 1996. Strong cytotoxicity to human gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. *J Periodontal Res*, 31: 477–482.
77. Johansson A, Hånström L, Kalfas S. 2000. Inhibition of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leucotoxicity by bacteria from the subgingival flora. *Oral Microbiol Immunol*, 15: 218-225.
78. Kamma JJ, Nakou M, Gmür R, Baehni PC. Microbiological profile of early onset/ aggressive periodontitis patients. 2004. *Oral Microbiol Immunol*, 19: 314–321.
79. Kaisare S, Rao J, Dubashi N. 2007. Periodontal disease as a risk factor for acute myocardial infarction. A case-control study in Goans highlighting a review of the literature. *Br Dent J*, 3: 144-145.
80. Kaye EK. 2007. Bone health and oral health. *J Am Dent Assoc*, 138: 616-9.
81. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM. 2001. *Medizinische Mikrobiologie*. 10. Auflage. Stuttgart- New York: Georg Thieme Verlag: 332.
82. Kelso A. 2000. Cytokines and their receptors: an overview. *Ther Drug Monit*, 22: 40-43.
83. Kent LW, Rahemtulla F, Michalek SM. 1999. Interleukin (IL)-1 and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide stimulation of IL-6 production by fibroblasts derived From healthy or periodontally diseased human gingival tissue. *J Periodontol*, 70: 274-282.
84. Kesavalu L, Holt SC, Ebersole JL. 1998. Virulence of a polymicrobial complex, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*, in a murine model. *Oral Microbiol Immunol*, 13: 373–377.
85. Kikutani H, Taga T, Akira S, Kishi H, Miki Y, Saiki O, Yamamura Y and Kishimoto T. 1985. Effect of B cell differentiation factor (BCDF) on biosynthesis and secretion of immunoglobulin molecules in human B cell lines. *J Immunol*, 134: 990- 995.
86. Klinger R. 1912. Untersuchungen über menschliche Aktinomykose. *Centralblatt Bacteriol*, 62: 191-200.

87. Kono Y, Beagley KW, Fujihashi K, McGhee JR, Taga T, Hirano T, Kishimoto T and Kiyono H. 1991. Cytokine regulation of localized inflammation. Induction of activated B cells and IL-6-mediated polyclonal IgG and IgA synthesis in inflamed human gingiva. *J Immunol*, 146: 1812-1821.
88. Kozlovsky A, Artzi Z, Hirshberg A, Israeli-Tobias C, Reich L. 2007. Effect of local antimicrobial agents on excisional palatal wound healing. A clinical and histomorphometric study in rats. *J Clin Periodontol*, 34: 164-171.
89. Krüttgen A, Rose-John S, Dufhues G, Bender S, Lütticken C, Freyer P, Heinrich PC. 1990. The three carboxy-terminal amino acids of human interleukin-6 are essential for its biological activity. *FEBS Lett*, 273: 95–98.
90. Lamont RJ, Oda D, Persson RE, Persson GR. 1992. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with gingival epithelial cells maintained in culture. *Oral Microbiol Immunol*, 7: 364-367.
91. Lamont RJ, Jenkinson HF. 1998. Live below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62: 1244-1263.
92. Lamont RJ, Jenkinson HF. 2000. Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*, 15: 341-349.
93. Lang NP, Brex MC, 1986. Chlorhexidine digluconate-an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. *J Periodontal Res*, 21: 74–89.
94. Lang NP, Sander L, Barlow A, Brennan K, White DJ, Bacca L, Bartizek RD, McClanahan SF. 2002. Experimental gingivitis studies: effects of triclosan and triclosan-containing dentifrices on dental plaque and gingivitis in three-week randomized controlled clinical trials. *J Clin Dent*, 13: 158-166.
95. Lantz MS. 1996. New insights into mechanisms of bacterial pathogenesis in periodontitis. *Curr Opin Periodontol*, 3: 10-18.
96. Larjava H, Heino J, Kahari VM, Krusius T, Vuorio E. 1989. Characterization of one phenotype of human periodontal granulation tissue fibroblasts. *J Dent Res*, 68: 20–25.
97. Leyes Borrajo JL, Garcia Varela L, Lopez Castro G, Rodriguez- Nunez I, Garcia Figueroa M, Gallas Torreira M. 2002. Efficacy of chlorhexidine mouthrinses with and without alcohol: a clinical study. *J Periodontol*, 73: 317-321.
98. Lockhart PB. 2000. The risk for endocarditis in dental practice. *Periodontol 2000*, 23: 127-135.
99. Loe H, Schiott CR. 1970. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaques and gingivitis in man. *J Periodontol Res*, 5: 79-83.
100. López NJ. 2000. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia* in progressive adult periodontitis. *J Periodontol*, 71: 48-54.

101. Lowik CWGM, Van der Pluijm G, Bloys H, Hoekman K, Bijvoet OL, Aarden LA. 1989. Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein (PLP) stimulate interleukin-6 production by osteogenic cells: a possible role of interleukin-6 in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 162: 1546-1552.
102. Machtei EE, Hausmann E, Dunford R, Grossi S, Ho A, Davis G, Chandler J, Zambon J, Genco RJ. 1999. Longitudinal study of predictive factors for periodontal disease and tooth loss. *J Clin Periodontol*, 26: 374-380.
103. Mariotti AJ, Rumpf DA. 1999. chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non collagen protein production. *J Periodontol*, 70: 1443- 1448.
104. Mayrand D, Holt CC. 1988. Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol Rev*, 52: 134-152.
105. McGee JM, Tucci MA, Edmundson TP, Serio CL, Johnson RB. 1998 The relationship between concentrations of proinflammatory cytokines within gingiva and the adjacent sulcular depth. *J Periodontol*, 69: 865–871.
106. Meyer DH, Fives- Taylor PM. 1997. The role of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of periodontal disease. *Trends Microbiol*, 5: 224-228.
107. Mintz KP, Fives-Taylor PM. 1999. Binding of the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to extracellular matrix proteins. *Oral Microbiol Immunol*, 14: 109-116.
108. Mogi M, Ootogoto J, Ota N, Inagaki H, Minami M and Kojima K. 1999. Interleukin 1 beta, interleukin 6, beta 2-microglobulin, and transforming growth factor-alpha in gingival crevicular fluid from human periodontal disease. *Arch Oral Biol*, 44: 535-539.
109. Nakano Y, Inai Y, Yamashita Y, Nagaoka S, Kusuzaki-Nagira T, Nishihara T, Okahashi N, Koga T. 1995. Molecular and immunological characterization of a 64-kDa protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol*, 10: 151-159.
110. Nakano Y, Yoshimura M, Koga T. Correlation between oral malodor and periodontal bacteria. *Microbes Infect*, 2002, 4: 679-683.
111. Naruishi K, Takashiba S, Chou HH, Arai H, Nishimura F, Murayama Y. 1999. Role of soluble interleukin-6 receptor in inflamed gingiva for binding of interleukin-6 to gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*, 34: 296-300.
112. Netuschil L, Weiger R, Preisler R, Brex M. 1995. Plaque bacteria counts and vitality during chlorhexidine, meridol and listerine mouthrinses. *Eur J Oral Sci*, 103: 355-361.
113. Nibali L, Ready DR, Parkar M, Brett PM, Wilson M, Tonetti MS, Griffiths GS. 2007. Gene polymorphisms and the prevalence of key periodontal pathogens. *J Dent Res*, 86: 416-420.



114. Noiri Y, Okami Y, Narimatsu M, Takahashi Y, Kawahara T, Ebisu S. 2003. Effects of Chlorhexidine, Minocycline, and Metronidazole on *Porphyromonas gingivalis* Strain 381 in Biofilms. *J Periodontol*, 1647-1651.
115. Nørskov-Lauritsen N, Kilian M. 2006. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56: 2135-2146.
116. Nualart Grollmus ZC, Morales Chávez MC, Silvestre Donat FJ. Periodontal disease associated to systemic genetic disorders. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 12: 211-215.
117. O'Brien-Simpson NM, Veith PD, Daspher SG, Reynolds EC. Antigens of bacteria associated with periodontitis. 2004. *Periodontol* 2000, 35: 101-134.
118. Odake H, Koizumi F, Hatakeyama S, Furuta I, Nakagawa H. 1993. Production of cytokines belonging to the interleukin-8 family by human gingival fibroblasts stimulated with interleukin-1 beta in culture. *Exp Mol Pathol*, 58: 14-24.
119. Ohguchi Y, Ishihara Y, Ohguchi M, Koide M, Shirozu N, Naganawa T, Nishihara T, Noguchi T. 2003. Capsular polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* inhibits IL-6 and IL-8 production in human gingival fibroblast. *J Periodontal Res*, 38: 191-197.
120. Ojima M, Hanoika T, Tanaka K, Inishita E, Aoyama H. 2006. Relationship between smoking status and periodontal conditions: findings from national databases in Japan. *J Periodontal Res*, 41: 573-579.
121. Okada H, Murakami S. 1998. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9: 248-266.
122. Okuda K, Kato T, Ishihara K. 2004. Involvement of periodontopathic biofilm in vascular diseases. *Oral Dis*, 1: 5-12.
123. Oleksy A, Banbula A, Bugno M, Travis J, Potempa J. 2002. Proteolysis of interleukin-6 receptor (IL-6R) by *Porphyromonas gingivalis* cysteine proteinases (gingipains) inhibits interleukin-6-mediated cell activation. *Microb Pathog*, 32: 173-81.
124. Page RC, Kornman KS. 1997. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000, 14: 9-11.
125. Page RC, Schroeder H. 1982. Periodontitis in man and other animals. A comparative review. Basel, Karger. 1-330.
126. Pan P, Barnett ML, Coelho J, Brogdon C, Finnegan MB. 2000. Determination of the in situ bactericidal activity of an essential oil mouthrinse using a vital stain method. *J Clin Periodontol*, 27: 256-261.

127. Pan PH, Finnegan MB, Sturdivant L, Barnett ML. 1999. Comparative antimicrobial activity of an essential oil and an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse in vitro. *J Clin Periodontol*, 26: 474-476.
128. Park JB, Park NH. 1989. Effect of chlorhexidine on the in vitro and in vivo herpes simplex virus infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 67: 149-153.
129. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*, 183: 3770-3783.
130. Patel P, Ide M, Coward P, Di Silvio L. 2006. The effect of a commercially available chlorhexidine mouthwash product on human osteoblast cells. *Eur J Prosthodont Restor Dent*, 14: 67-72.
131. Patil C, Rossa C Jr, Kirkwood KL. 2006. Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide induces interleukin-6 expression through multiple mitogen-activated protein kinase pathways in periodontal ligament fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol*, 21: 392-398.
132. Pavloff N, Pemberton PA, Potempa J, Chen WC, Pike RN, Prochazka V, Kiefer MC, Travis J, Barr PJ. 1997. Molecular cloning and characterization of Porphyromonas gingivalis lysine-specific gingipain. A new member of an emerging family of pathogenic bacterial cysteine proteinases. *J Biol Chem*, 272: 1595-1600.
133. Payne WA, Page RC, Ogilvie AL, Hall WB. 1975. Histopathologic features of the initial and early stages stages of experimental gingivitis in man. *J Periodontal Res*, 10: 51-64.
134. Person GR, Engel D, Whitney C, Darveau R, Weinberg A, Brunsvolt M, Page RC. 1994. Immunization against Porphyromonas gingivalis inhibits progression of experimental periodontitis in nonhuman primates. *Infect Immunol*, 62: 1026-1031.
135. Pike RN, Potempa J, McGraw W, Coetzer TH, Travis J. 1996. Characterization of the binding activities of proteinase-adhesion complexes from Porphyromonas gingivalis. *J Bacteriol*, 178: 2876-2882.
136. Poggi P, Rodriguez Y, Baena R, Rizzo S, Rota MT. 2003. mouthrinses with alcohol: cytotoxic effects on human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol*, 74: 623-629.
137. Potempa J, Banbula A, Travis J. 2000. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontol 2000*, 24: 153-192.
138. Pucher JJ, Daniel JC. 1992. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. *J Periodontol*, 6: 526-532.
139. Quirynen M, Avontroodt P, Peeters W, Pauwels M, Coucke W, Van Steenberghe D. 2001. effect of different chlorhexidin formulations in mouthrinses on de novo plaque formation. *J Clin Periodontol*, 28: 1127-1136.

140. Riep BG, Bernimoulin JP, Barnett ML. 1999. Comparative antiplaque effectiveness of an essential oil and an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse. *J Clin Periodontol*, 26: 164-168.
141. Roberts FA, Darveau RP. 2002. Beneficial bacteria of the periodontium. *Periodontol* 2000, 30: 40-50.
142. Rosan B, Slots J, Lamont RJ, Listgarten MA, Nelson GM. 1988. Actinobacillus actinomycetemcomitans fimbriae. *J Dent Res*, 67: 179.
143. Ross NM, Charles CH, Dills SS. 1989. Long-term effects of Listerine antiseptic on dental plaque and gingivitis. *J Clin Dent*, 1: 92-95.
144. Ruffler C, Strübig W. 1994. Untersuchung zur Beeinflussung der Keratinisation der Gingiva durch Chlorhexidin- Gel. *Oralprophylaxe*, 16: 136-139.
145. Ruppert M, Schlagenhaut U. 2004. Chlorhexidin in der Zahnheilkunde. Eine Übersicht. *Sonderdruck Parodontologie Quintessenz*, 55: 55-65.
146. Saito A, Hosaka Y, Nakagawa T, Yamada S, Okuda K. 1993. Relative avidity of serum immunoglobulin G antibody for the fimbria antigen of Actinobacillus actinomycetemcomitans in patients with adult periodontitis. *Infect Immun*, 61: 332-334.
147. Sanderik R, Bengel W. 1995. Mikrobiell bedingte Destruktion im marginalen Parodont-eine Übersicht. *Parodontologie*, 97-105.
148. Sandros J, Papapanou P, Dahlén G. 1993. Porphyromonas gingivalis invades oral epithelial cells in vitro. *J Periodontal Res*, 28: 386.
149. Sanz M, Newman MG, Anderson L, Matoska W, Otomo-Corgel J, Saltini C. 1989. Clinical enhancement of post-periodontal surgical therapy by a 0.12% chlorhexidine gluconate mouthrinse. *J Periodontol*, 60: 570-573.
150. Scannapieco FA, Bush RB, Paju S. 2003. Associations between periodontal disease and risk for arteriosclerosis, cardiovascular disease, and stroke. A systematic review. *Ann Periodontol*, 8: 38-53.
151. Schacher B, Baron F, Roßberg M, Wohlfeil M, Arndt R, Eickholz P. 2007. Aggregatibacter actinomycetemcomitans as indicator for aggressive periodontitis by two analysing strategies. *J Clin Periodontol*, 34: 566–573.
152. Schiott CR. 1973. Effect of chlorhexidine on the microflora of the oral cavity. *J Periodontal Res Suppl*, 12: 7-10.
153. Sfakianakis A, Barr CE and Kreutzer D. 2001. Mechanisms of Actinobacillus actinomycetemcomitans-Induced Expression of Interleukin-8 in Gingival Epithel Cells. *J Periodontol*, 72: 1413-1419.
154. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. 2007. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res*, 86: 306-319.

155. Singer RE, Buckner BA. 1981. Butyrate and propionate: important components of toxic dental plaque extracts. *Infect Immun*, 32: 458-463.
156. Skalli O, Schurch W, Seemayer T. 1989. Myofibroblasts from diverse pathologic settings are heterogeneous in their content of actin isoforms and intermediate filament proteins. *Lab Invest*, 60: 275-285.
157. Slots J. 1979. Subgingival microflora and periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 6: 351.
158. Steffen MJ, Holt SC, Ebersole JL. 2000. Porphyromonas gingivalis induction of mediator and cytokine secretion by human gingival fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol*, 15: 172-180.
159. Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. 2004. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol*, 19: 61-64.
160. Takashiba S, Naruishi K, Murayama Y. 2003. Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: fibroblast biology. *J Periodontol*, 74: 103-110.
161. Tan WC, Tay FB, Lim LP. 2006. Diabetes as a risk factor for periodontal disease: current status and future considerations. *Ann Acad Med Singapore*, 35: 571-581.
162. Tanaka S, Fakher M, Barbour SE, Schenkein HA, Tew JG. 2006. Influence of proinflammatory cytokines on Actinobacillus actinomycetemcomitans specific IgG responses. *J Periodontal Res*, 41: 1-9.
163. Tani Y, Tani M, Kato I. 1997. Extracellular 37-kDa antigenic protein from Actinobacillus actinomycetemcomitans induces TNF-alpha, IL-1 beta and IL-6 in murine macrophages. *J Dent Res*, 76: 1538-1547.
164. Teanpaisan R, Douglas CW, Eley AR, Walsh TF. 1996. Clonality of Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia and Prevotella nigrescens isolated from periodontally diseased and healthy sites. *J Periodontal Res*, 31: 423-432.
165. Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. 2006. Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontol 2000*, 42: 180-218.
166. The American Academy of Periodontology. 1996. Epidemiology of Periodontal Disease. *J Periodontol*, 67: 935-945.
167. The American Academy of Periodontology. 1999. The Pathogenesis of Periodontal Diseases (Position Paper) *J Periodontol*, 70: 457-470.
168. Thrower Y, Pinney RJ, Wilson M. 1997. Susceptibilities of Actinobacillus actinomycetemcomitans biofilms to oral antiseptics. *J Med Microbiol*, 46: 425-429.
169. Tipton DA, Flynn JC, Stein SH, Dabbous MKh. 2003a. Cyclooxygenase-2 inhibitors decrease interleukin-1beta-stimulated prostaglandin E2 and IL-6 production by human gingival fibroblasts. *J Periodontol*, 74: 1754-1763.

170. Tipton DA, Lyle B, Babich H, Dabbous MKh. 2003b. In vitro cytotoxic and anti-inflammatory effects of myrrh oil on human gingival fibroblasts and epithelial cells. *Toxicol In Vitro*, 17: 301-310.
171. Van der Velden U. 2005 Purpose and problems of periodontal disease classification. *Periodontol* 2000, 39:13-21.
172. van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. 2002. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol*, 29: 1023-1028.
173. Walter C, Weiger R. 2006. Antibiotics as the only therapy of untreated chronic periodontitis: a critical commentary. *J Clin Periodontol*, 33: 938-939.
174. Wang PL, Shirasu S, Shinohara M, Daito M, Fujii T, Kowashi Y, Ohura K. 1999. Purification and characterisation of a trypsin-like protease from the culture supernatant of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4. 1999. *Eur J Oral Sci*, 107: 147-153.
175. Weinberg A, Belton CM, Park Y, Lamont RJ. 1997. Role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun*, 65: 313-316.
176. Welk A, Splieth CH, Schmidt-Martens G, Schwahn Ch, Kocher T, Kramer A, Rosin M. 2005. The effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse compared with a triclosan rinse and a chlorhexidine rinse on bacterial counts and 4-day plaque re-growth. *J Clin Periodontol*, 32: 499-505.
177. Wendell KJ, Stein SH. 2001 Regulation of cytokine production in human gingival fibroblasts following treatment with nicotine and lipopolysaccharide. *J Periodontol*, 72: 1038-1044.
178. Wilson ME, Genco RJ. 1989. The role of antibody, complement and neutrophils in host defense against *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Immunol Invest*, 18: 187-209.
179. Winrow MJ. 1973. Metabolic studies with radiolabelled chlorhexidine in animals and man. *J Periodontal Res Suppl*, 12: 45-48.
180. Wolff L, Dahlén G, Aepli D. 1994. Bacteria as risk markers for periodontitis. *J Periodontol*, 65: 498-510.
181. Yang HW, Asikainen S, Dogan B, Suda R, Lai CH. 2004. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Serotype b to aggressive Periodontitis: Frequency in Pure Cultured Isolates. *J Periodontol*, 592-599.
182. Yang HW, Huang YF, Chan Y, Chou MY. 2005. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. *Eur J Oral Sci*, 113: 28-33.
183. Yoshie H, Kobayashi T, Galicia HAT, Galicia JC. 2007. The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontol* 2000, 43: 102-132.

184. Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ, Leonard EJ. 1987. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 9233-9237.
185. Zambon JJ. 1985. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Review. *J Clin Periodontol*, 12: 1-20.
186. Zambon JJ, Slots J, Genco RJ. 1983. Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect Immun*, 41: 19-27.
187. Zhang J, Dong H, Kashket S, Duncan MJ. 1999. IL-8 degradation by *Porphyromonas gingivalis* proteases. *Microb Pathog*, 26: 275-280.
188. Zimmermann A, Flores-de-Jacoby L, Pan P, Pan P. 1993. Gingivitis, plaque accumulation and plaque composition under long-term use of Meridol. *J Clin Periodontol*, 20: 346-351.

## 9. Anhang

Tabelle 2 (zu Abb. 4) Wirkung der Mundspüllösungen auf die Zahl der planktonischen Bakterien *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384

<b>Planktonische Bakterien <i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 33384</b>			
	1 Stunde	6 Stunden	18 Stunden
Kontrolle	2077	2336	2216
Chlorhexidin 0.06%	0	71	0
Chlorhexamed 0.06%+Fluor	0	0	0
Chlorhexamed 0.1%	0	0	0
Chlorhexidin 0,1%	8	0	0
Curasept 0,12%	4	0	75
Oral B 0.12%	1	0	1
Chlorhexidin 0.2%	0	0	0
Curasept 0.2%	128	5	1
Meridol mit Chlorhexidin	0	0	0
Chlorhexidin 1.0%	0	0	0
Gel 1.0%	0	0	0
Listerine	32	1	94
Meridol	3	0	0

Tabelle 3 (zu Abb. 5) Wirkung der Mundspüllösungen auf die Zahl der planktonischen Bakterien *A. actinomycetemcomitans* Y4

<b>Planktonische Bakterien <i>A. actinomycetemcomitans</i> Y4</b>			
	1 Stunde	6 Stunden	18 Stunden
Kontrolle	3676	3325	3074
Chlorhexidin 0.06%	0	0	0
Chlorhexamed 0.06%+Fluor	0	0	0
Chlorhexamed 0.1%	0	0	0
Chlorhexidin 0,1%	0	0	0
Curasept 0,12%	5	0	0
Oral B 0.12%	0	0	0
Chlorhexidin 0.2%	1	0	0
Curasept 0.2%	0	0	0
Meridol mit Chlorhexidin	0	0	0
Chlorhexidin 1.0%	0	0	1
Gel 1.0%	0	0	0
Listerine	5	4	110
Meridol	465	48	41

Tabelle 4 (zu Abb. 6) Wirkung der Mundspüllösungen auf die Zahl der adhärenen Bakterien *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 eine, sechs und 18 Stunden nach einminütiger Zugabe der Lösungen

<b>Adhärenente Bakterien</b>			
<b><i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 33384</b>			
	1 Stunde	6 Stunden	18 Stunden
Kontrolle	1885	2386	2435
Chlorhexidin 0.06%	0	0	55
Chlorhexamed 0.06%+Fluor	0	0	10
Chlorhexamed 0.1%	0	1	0
Chlorhexidin 0,1%	0	0	0
Curasept 0,12%	62	0	0
Oral B 0.12%	0	0	0
Chlorhexidin 0.2%	0	0	0
Curasept 0.2%	1706	37	3
Meridol mit Chlorhexidin	0	0	6
Chlorhexidin 1.0%	0	0	0
Gel 1.0%	0	0	12
Listerine	45	1	52
Meridol	1	0	0

Tabelle 5 (zu Abb. 7) Wirkung der Mundspüllösungen auf die Zahl der adhärenen Bakterien *A. actinomycetemcomitans* Y4 eine, sechs und 18 Stunden nach einminütiger Zugabe der Lösungen

<b>Adhärenente Bakterien</b>			
<b><i>A. actinomycetemcomitans</i> Y4</b>			
	1 Stunde	6 Stunden	18 Stunden
Kontrolle	4986	4057	3888
Chlorhexidin 0.06%	0	0	0
Chlorhexamed 0.06%+Fluor	0	0	0
Chlorhexamed 0.1%	0	0	0
Chlorhexidin 0,1%	0	0	0
Curasept 0,12%	43	0	0
Oral B 0.12%	2	0	0
Chlorhexidin 0.2%	2	0	0
Curasept 0.2%	33	0	2
Meridol mit Chlorhexidin	0	0	0
Chlorhexidin 1.0%	0	0	0
Gel 1.0%	0	1	1
Listerine	0	0	1
Meridol	0	0	0



Tabelle 6 (zu Abb.8) Wirkung der Mundspüllösungen auf die Zahl der planktonischen Bakterien *P. gingivalis*. ATCC 33277 eine, sechs und 18 Stunden nach einminütiger Zugabe der Lösungen

<b>Planktonische Bakterien <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277</b>			
	1 Stunde	6 Stunden	18 Stunden
Kontrolle	2695	3464	2320
Chlorhexidin 0.06%	20	2	2
Chlorhexamed 0.06%+Fluor	0	0	0
Chlorhexamed 0.1%	0	0	0
Chlorhexidin 0,1%	0	0	0
Curasept 0,12%	24	0	0
Oral B 0.12%	0	0	0
Chlorhexidin 0.2%	0	0	0
Curasept 0.2%	1088	0	0
Meridol mit Chlorhexidin	0	0	0
Chlorhexidin 1.0%	0	0	0
Gel 1.0%	0	0	0
Listerine	0	0	0
Meridol	0	0	0

Tabelle 7 (zu Abb. 9) Wirkung der Mundspüllösungen auf die Zahl der planktonischen Bakterien *P. gingivalis* M5-1-2 eine, sechs und 18 Stunden nach einminütiger Zugabe der Lösungen

<b>Planktonische Bakterien <i>P. gingivalis</i> M5-1-2</b>			
	1 Stunde	6 Stunden	18 Stunden
Kontrolle	1680	1856	1824
Chlorhexidin 0.06%	14	0	0
Chlorhexamed 0.06%+Fluor	0	0	0
Chlorhexamed 0.1%	0	0	0
Chlorhexidin 0,1%	0	0	1
Curasept 0,12%	2	0	0
Oral B 0.12%	0	0	1
Chlorhexidin 0.2%	0	0	0
Curasept 0.2%	76	0	0
Meridol mit Chlorhexidin	0	0	0
Chlorhexidin 1.0%	0	0	0
Gel 1.0%	0	0	0
Listerine	0	0	0
Meridol	0	0	0

Tabelle 8 (zu Abb. 10) Wirkung der Mundspüllösungen auf die Zahl der adhärenen Bakterien *P. gingivalis* ATCC 33277, eine, sechs und 18 Stunden nach einminütiger Zugabe der Lösungen

<b>Adhärenente Bakterien <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277</b>			
	1 Stunde	6 Stunden	18 Stunden
Kontrolle	4264	3400	4672
Chlorhexidin 0.06%	18	0	0
Chlorhexamed 0.06%+Fluor	0	0	0
Chlorhexamed 0.1%	0	0	0
Chlorhexidin 0,1%	0	0	0
Curasept 0,12%	0	0	0
Oral B 0.12%	0	0	0
Chlorhexidin 0.2%	0	0	0
Curasept 0.2%	1184	0	0
Meridol mit Chlorhexidin	0	0	0
Chlorhexidin 1.0%	0	0	0
Gel 1.0%	0	0	0
Listerine	0	0	0
Meridol	0	0	0

Tabelle 9 (zu Abb. 11) Wirkung der Mundspüllösungen auf die Zahl der adhärenen Bakterien *P. gingivalis* M5-1-2, eine, sechs und 18 Stunden nach einminütiger Zugabe der Lösungen

<b>Adhärenente Bakterien <i>P. gingivalis</i> M5-1-2</b>			
	1 Stunde	6 Stunden	18 Stunden
Kontrolle	1920	1888	832
Chlorhexidin 0.06%	5	0	0
Chlorhexamed 0.06%+Fluor	0	0	0
Chlorhexamed 0.1%	0	0	0
Chlorhexidin 0,1%	0	1	1
Curasept 0,12%	0	0	0
Oral B 0.12%	0	0	0
Chlorhexidin 0.2%	0	0	0
Curasept 0.2%	58	0	0
Meridol mit Chlorhexidin	0	0	0
Chlorhexidin 1.0%	0	0	0
Gel 1.0%	0	0	0
Listerine	0	0	0
Meridol	0	0	0

Tabelle 10 (zu Abb. 12) Wirkung der Mundspüllösungen auf die Interleukin-6-Freisetzung nicht infizierter Fibroblasten. Angaben in pg/ ml.

	1 Stunde	6 Stunden	18 Stunden
<b>Kontrolle</b>	3,97	13,79	21,10
Chlorhexidin 0,06%	5,05	4,60	2,69
Chlorhexamed 0,06% +Fluor	17,03	19,67	14,39
Chlorhexidin 0,1%	2,28	2,20	1,13
Chlorhexamed 0,1%	1,91	0,46	41,90
Curasept 0,12%	3,79	6,75	3,54
Oral B 0,12%	6,24	13,59	12,40
Chlorhexidin 0,2%	1,78	1,87	1,85
Curasept 0.2%	8,18	11,92	12,91
Chlorhexidin 1%	1,17	1,25	18,40
Chlorhexamed GEL 1%	17,67	12,08	11,93
Listerine	8,77	12,83	15,97
Meridol	2,40	4,77	6,03
Meridol + Chlorhexidin	0,31	0,14	31,99

Tabelle 11 (zu Abb. 13) Wirkung der Mundspüllösungen auf die Interleukin-6-Freisetzung A. actinomycetemcomitans ATCC 33384 infizierter Fibroblasten. Angaben in pg/ ml.

	1 Stunde	6 Stunden	18 Stunden
Kontrolle	0,966	94,05	763,666667
Chlorhexidin 0,06%	4,1055	8,918	8,376
Chlorhexamed 0,06% +Fluor	0,57	1,15	17,54
Chlorhexidin 0,1%	2,695	2,692	2,435
Chlorhexamed 0,1%	8,69	0,932	60,41
Curasept 0,12%	3,65	319,9	26,15
Oral B 0,12%	26,15	36,43	58,84
Chlorhexidin 0,2%	2,435	1,8145	1,3585
Curasept 0.2%	0,57	132,9	159,8
Chlorhexidin 1%	1,582	1,582	1,8145
Chlorhexamed GEL 1%	1,64	5,41	1,147
Listerine	0,29	0,19	0,19
Meridol	4,94	6,96	70,29
Meridol + Chlorhexidin	0,2825	349,2605	742

Tabelle 12 (zu Abb. 14) Wirkung der Mundspüllösungen auf die Interleukin-6-Freisetzung *A. actinomycetemcomitans* Y4 infizierter Fibroblasten. Angaben in pg/ ml.

	1 Stunde	6 Stunden	18 Stunden
Kontrolle	6,67	870,67	6578,00
Chlorhexidin 0,06%	0,29	298,00	2087,00
Chlorhexamed 0,06% +Fluor	14,80	29,06	22,38
Chlorhexidin 0,1%	0,29	185,00	2056,00
Chlorhexamed 0,1%	1,38	11,31	16,69
Curasept 0,12%	79,01	207,00	470,90
Oral B 0,12%	12,34	9,91	30,31
Chlorhexidin 0,2%	0,04	122,50	1025,00
Curasept 0.2%	27,21	114,90	2076,00
Chlorhexidin 1%	0,01	343,00	2030,00
Chlorhexamed GEL 1%	46,98	167,60	121,50
Listerine	8,80	20,35	28,00
Meridol	0,00	1,80	1,60
Meridol + Chlorhexidin	21,15	13,49	11,31

Tabelle 13 (zu Abb. 15) Wirkung der Mundspüllösungen auf die Interleukin-6-Freisetzung *P. gingivalis* ATCC 33277 infizierter Fibroblasten. Angaben in pg/ ml.

	1 Stunde	6 Stunden	18 Stunden
Kontrolle	67,38	187,00	304,70
Chlorhexidin 0,06%	3,15	3,18	3,85
Chlorhexamed 0,06% +Fluor	18,42	9,11	12,27
Chlorhexidin 0,1%	8,20	8,89	6,19
Chlorhexamed 0,1%	0,21	247,75	863,90
Curasept 0,12%	28,46	11,12	22,30
Oral B 0,12%	25,25	32,11	25,97
Chlorhexidin 0,2%	9,11	5,48	9,74
Curasept 0.2%	16,74	143,80	156,65
Chlorhexidin 1%	3,08	3,11	2,37
Chlorhexamed GEL 1%	18,14	11,93	8,81
Listerine	17,35	38,40	27,05
Meridol	2,85	11,75	15,65
Meridol + Chlorhexidin	0,28	619,26	1226,50

Tabelle 14 (zu Abb. 16) Wirkung der Mundspüllösungen auf die Interleukin-6-Freisetzung P. gingivalis M5-1-2 infizierter Fibroblasten. Angaben in pg/ ml.

	1 Stunde	6 Stunden	18 Stunden
Kontrolle	2,70	0,00	1,46
Chlorhexidin 0,06%	4,18	3,66	8,85
Chlorhexamed 0,06% +Fluor	24,57	17,73	37,52
Chlorhexidin 0,1%	1,63	2,98	3,38
Chlorhexamed 0,1%	0,08	2,16	4,69
Curasept 0,12%	3,19	7,22	12,12
Oral B 0,12%	11,71	16,64	23,40
Chlorhexidin 0,2%	0,81	1,31	0,87
Curasept 0.2%	2,53	69,31	61,16
Chlorhexidin 1%	0,28	478,07	655,45
Chlorhexamed GEL 1%	19,63	21,25	24,83
Listerine	8,50	14,85	17,70
Meridol	5,65	2,70	19,90
Meridol + Chlorhexidin	0,19	170,22	542,05

Tabelle 15 (zu Abb. 17) Wirkung der Mundspüllösungen auf die Interleukin-8-Freisetzung nicht infizierter Fibroblasten. Angaben in pg/ ml.

	1 Stunde	6 Stunden	18 Stunden
Kontrolle	0,64	6,38	52,87
Chlorhexidin 0,06%	3,35	5,23	1,13
Chlorhexamed 0,06% +Fluor	16,53	25,82	10,37
Chlorhexidin 0,1%	0,67	1,02	1,04
Chlorhexamed 0,1%	1,40	0,78	0
Curasept 0,12%	1,54	3,22	1,48
Oral B 0,12%	1,36	4,39	4,43
Chlorhexidin 0,2%	0,74	0,60	0,39
Curasept 0.2%	1,05	0,82	0,42
Chlorhexidin 1%	0,21	0,09	0,13
Chlorhexamed GEL 1%	43,46	40,36	21,12
Listerine	0,50	0,17	0,43
Meridol	0,07	0,57	1,4
Meridol + Chlorhexidin	0,03	0,14	0

Tabelle 16 (zu Abb. 18) Wirkung der Mundspüllösungen auf die Interleukin-8-Freisetzung der Fibroblasten nach Infektion mit *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384. Angaben in pg/ml.

	1 Stunde	6 Stunden	18 Stunden
Kontrolle	0,412	45,9186667	589,333333
Chlorhexidin 0,06%	0,7305	0,4115	0,41
Chlorhexamed 0,06% +Fluor	0,23	0,59	0,56
Chlorhexidin 0,1%	0,003	0,0005	0,245
Chlorhexamed 0,1%	0,16	0,01	0,02
Curasept 0,12%	0,23	48,51	0,97
Oral B 0,12%	0,59	1,5	1,98
Chlorhexidin 0,2%	0,065	0,092	0,0435
Curasept 0.2%	0,0285	0,023	0,0215
Chlorhexidin 1%	0,02	0	0
Chlorhexamed GEL 1%	0,08	0,36	0,39
Listerine	0	0	0
Meridol	0,02	0,04	0,09
Meridol + Chlorhexidin	0,028	0,0155	0

Tabelle 17 (zu Abb. 19) Wirkung der Mundspüllösungen auf die Interleukin-8-Freisetzung der Fibroblasten nach Infektion mit *A. actinomycetemcomitans* Y4. Angaben in pg/ml.

	1 Stunde	6 Stunde	18 Stunden
Kontrolle	0,32	98,45	270,1
Chlorhexidin 0,06%	0,63	1,046	1,80
Chlorhexamed 0,06% +Fluor	1,21	1,65	5,82
Chlorhexidin 0,1%	1,25	1,34	1,93
Chlorhexamed 0,1%	0,00	0,11	0,08
Curasept 0,12%	1,43	0,47	5,82
Oral B 0,12%	3,52	0,65	5,01
Chlorhexidin 0,2%	0,86	1,55	2,1
Curasept 0.2%	0,00	5,34	23,37
Chlorhexidin 1%	0,43	0,49	0,55
Chlorhexamed GEL 1%	0,85	2,54	4,66
Listerine	0,65	1,8	3,75
Meridol	5,60	2,4	0,2
Meridol + Chlorhexidin	0,02	0,12	0,12

Tabelle 18 (zu Abb. 20) Wirkung der Mundspüllösungen auf die Interleukin-8-Freisetzung der Fibroblasten nach Infektion mit *P. gingivalis* ATCC 33277. Angaben in pg/ ml.

	1 Stunde	6 Stunden	18 Stunden
Kontrolle	3,6325	13,4075	75,96
Chlorhexidin 0,06%	1,875	1,7	2,37
Chlorhexamed 0,06% +Fluor	12,57	6,26	12,47
Chlorhexidin 0,1%	3,65	2,425	5,01
Chlorhexamed 0,1%	0,257	0,149	0
Curasept 0,12%	0,855	1,515	4,42
Oral B 0,12%	1,89	2,07	1,88
Chlorhexidin 0,2%	0,6	0,7	3,73
Curasept 0.2%	0,99	87,42	89,31
Chlorhexidin 1%	0	0,06	0,02
Chlorhexamed GEL 1%	27,295	20,885	15,11
Listerine	0,15	0,15	0,2
Meridol	0,9	0	29,25
Meridol + Chlorhexidin	0,028	0,0295	0,076

Tabelle 19 (zu Abb. 21) Wirkung der Mundspüllösungen auf die Interleukin-8-Freisetzung der Fibroblasten nach Infektion mit *P. gingivalis* M5-1-2. Angaben in pg/ ml.

	1 Stunde	6 Stunden	18 Stunden
Kontrolle	0,00	0	0
Chlorhexidin 0,06%	2,24	1,34	4,47
Chlorhexamed 0,06% +Fluor	10,82	6,27	12,24
Chlorhexidin 0,1%	0,32	0,32	0,22
Chlorhexamed 0,1%	0,07	0,11	0,22
Curasept 0,12%	0,00	0,21	0,30
Oral B 0,12%	0,64	0,78	1,07
Chlorhexidin 0,2%	0,01	0,013	0,1
Curasept 0.2%	0,67	10,71	17,56
Chlorhexidin 1%	0,21	0,09	0
Chlorhexamed GEL 1%	12,22	16,68	13,75
Listerine	0,05	0	0,75
Meridol	0,15	0,25	0,3
Meridol + Chlorhexidin	0,01	0,019	0

Tabelle 20 (zu Abb. 22) MTT-Nachweis nicht infizierter Fibroblasten eine, sechs und 18 Stunden nach Anwendung der Mundspüllösungen. Absorption bei 562 nm.

	1 Stunde	6 Stunden	18 Stunden
Kontrolle	0,47	0,25	0,06
Chlorhexidin 0.06%	0,131	0,5	0,04
Chlorhexamed 0.06%+Fluor	0,14	0,05	0,04
Chlorhexamed 0.1%	0,16	0,05	0,04
Chlorhexidin 0,1%	0,11	0,05	0,05
Curasept 0,12%	0,85	0,07	0,05
Oral B 0.12%	0,15	0,05	0,05
Chlorhexidin 0.2%	0,11	0,06	0,04
Curasept 0.2%	1,16	0,07	0,04
Meridol mit Chlorhexidin	0,11	0,05	0,04
Chlorhexidin 1.0%	0,13	0,05	0,05
Gel 1.0%	0,11	0,38	0,04
Listerine	0,1	0,05	0,04
Meridol	0,14	0,05	0,05

Tabelle 21 (zu Abb. 23) MTT-Nachweis *A. actinomycetemcomitans* Y4 infizierter Zellen 18 Stunden nach Zugabe der Lösungen. Absorption bei 562 nm

Kontrolle	0,134	Chlorhexidin 0.2%	0,046
Chlorhexidin 0.06%	0,043	Curasept 0.2%	0,046
Chlorhexamed 0.06%+Fluor	0,043	Meridol mit Chlorhexidin	0,055
Chlorhexamed 0.1%	0,043	Chlorhexidin 1.0%	0,046
Chlorhexidin 0,1%	0,044	Gel 1.0%	0,044
Curasept 0,12%	0,046	Listerine	0,046
Oral B 0.12%	0,046	Meridol	0,049

Tabelle 22 (zu Abb. 24) MTT-Nachweis *P. gingivalis* M5-1-2 infizierter Zellen 18 Stunden nach Zugabe der Lösungen. Absorption bei 562 nm

Kontrolle	0,199	Chlorhexidin 0.2%	0,051
Chlorhexidin 0.06%	0,048	Curasept 0.2%	0,052
Chlorhexamed 0.06%+Fluor	0,046	Meridol mit Chlorhexidin	0,052
Chlorhexamed 0.1%	0,045	Chlorhexidin 1.0%	0,05
Chlorhexidin 0,1%	0,047	Gel 1.0%	0,048
Curasept 0,12%	0,047	Listerine	0,049
Oral B 0.12%	0,046	Meridol	0,052



Tabelle 23 (zu Abb. 25) Trypanblau-Exclusion-Test. Anzahl vitaler Fibroblasten eine, sechs und 18 Stunden nach einminütiger Zugabe der Lösungen

	1Stunde	6 Stunden	18 Stunden
Kontrolle	96	91	66
0.06% Chlorhexidin	48	47	42
0.2% Chlorhexidin	42	39	42
1.0% Chlorhexidin	38	13	18

## 10. Lebenslauf

Name, Vorname:	Schwerd, Maika
Geburtsname :	Örgel
Geburtsdatum:	03.07 1982
Geburtsort:	Leipzig
Familienstand:	verheiratet
Zeitraum des Schulbesuches:	1989-2001
Schulabschluss:	Abitur, Juni 2001 Robert Schumann Gymnasium Leipzig
Studienbeginn:	Oktober 2001
Hochschule:	Friedrich-Schiller-Universität Jena
Naturwissenschaftliche Vorprüfung:	Sommersemester 2002
Physikum:	Wintersemester 2004
Famulatur auf den Cook-Islands:	Februar bis April 2006
Hochschulabschluss:	Staatsexamen Januar 2007
Approbation als Zahnärztin:	Januar 2007
Promotionsstudentin:	Februar bis Mai 2007
Aktuelle Tätigkeit:	Assistenz Zahnärztin seit 01.05.2007

Jena, den 03.09.2008

.....

## **11. Danksagung**

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

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. habil. W. Pfister und Frau PD. Dr. med. dent. habil. S. Eick vom Institut für medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena für die intensive und persönliche fachliche Betreuung.

Für die Unterstützung bei der Ausführung der praktischen Arbeiten und der Hilfe bei organisatorischen Fragen möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der FSU Jena, und besonders bei Frau C. Ranke bedanken.

Meinen Eltern und meinem Mann Arne danke ich ganz herzlich für die Geduld und die liebevolle Unterstützung die ich in den letzten Jahren durch sie erfahren habe.

## **12. Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Person bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt hat: Frau PD Dr. S. Eick,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 03.09.2008

.....