



Susanne Gerhardt-Szép¹, Michael Kastratovic¹, Tugba Zahn², Bernhard Zahn³, Peter Ottl⁴, Karin Ronge¹

Zelluläre Verträglichkeit xylometazolinhydro- chloridhaltiger gingivaler Retraktionsmedien



PD Dr. Susanne Gerhardt-Szép

*Cytotoxic potential of
HCl-xylometazoline-based gingival
retraction solutions*

Warum Sie diesen Beitrag lesen sollten? / Why should you read this article?

Es wird zunehmend die Anwendung von xylometazolinhydrochloridhaltigen Lösungen als Retraktionsmedien empfohlen. Doch gibt es in der Literatur keine Angaben darüber, wie diese mit direktem Gewebekontakt angewendet wirken.

Xylometazoline solutions are increasingly recommended as gingival retraction astringents. But there is no information on how this agent acts when applied in direct tissue contact.

Einleitung: In der Zahnmedizin werden zur gingivalen Retraction Adstringenzen (ACGRA) und Vasokonstringenzen (VEGRA) verwendet. Während ACGRAs lokale Effekte aufweisen, gehören zu den VEGRAs Sympathomimetica, die entweder selektiv an den alpha(α)-beziehungsweise an α - und beta(β)-Adenorezeptoren angreifen. α VEGRAs aus der Gruppe der xylometazolinhydrochloridhaltigen (XYLO-)Präparate werden aktuell wegen ihrer im Vergleich zu ACGRAs verbesserten blutstillenden Eigenschaften als Retraktionsmedien empfohlen, doch liegen bis dato keine Studien über deren Zytotoxizität vor.

Material und Methode: Ziel der vorliegenden Studie war es, die zelluläre Verträglichkeit von 2 unterschiedlichen XYLO-Präparaten (*Otriven* und *MAOT* aus der Eigenherstellung), die sich in ihrer chemischen Zusammensetzung unterscheiden, unter Verwendung von Primärzellkulturen humaner Gingiva, die bei chirurgischen Eingriffen entnommen wurden, in 4 verschiedenen Kontrollinterventionsgruppen vergleichend zu untersuchen. Für die Studie wurden Fibroblasten ($4,5 \times 10^{-5}$ pro ml) verwendet, die sich zwischen der 11. und 14. Passage befanden. Die Inkubationszeit mit den

Introduction: In dentistry, astringent agents (ACGRA) and vaso-constrictive agents (VEGRA) are used for gingival retraction. While ACGRAs are associated with local effects, VEGRAs include sympathomimetics which act selectively either on alpha(α)- or on α - and beta(β)-adenoreceptors. α VEGRAs from the group of xylometazoline hydrochloride (XYLO)-containing preparations are currently recommended as retraction media due to their improved styptic properties as compared to ACGRAs, but there are no studies of their cytotoxicity available at this time.

Materials and Methods: The aim of the present study was to investigate in comparative tests the cytotoxic potential of 2 different XYLO preparations (*Otriven* and *MAOT* from in-house production) differing in chemical composition using primary cell cultures of human gingiva obtained during surgical interventions in 4 different control intervention groups. Fibroblast (4.5×10^{-5} per ml) from cell transfers 11 to 14 were used in the study. The time of incubation with the preparations was 10 minutes. Reactions to the tested preparations were determined based on EN ISO standard 7405:1997 with regard to pathological cell changes 24 and

¹ Poliklinik für Zahnerhaltung, Carolinum Zahnärztliches Universitäts-Institut gGmbH, Goethe-Universität Frankfurt am Main

² Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik, Carolinum Zahnärztliches Universitäts-Institut gGmbH, Goethe-Universität Frankfurt am Main

³ Zahnarztpraxis, Wiesenbornstr. 10, 61350 Bad Homburg

⁴ Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik, Stempelstr. 13, 18057 Rostock

Peer-reviewed article: eingereicht: 16.09.2014, revidierte Fassung akzeptiert: 27.04.2015

DOI 10.3238/dzz.2016.0038-0050

Präparaten betrug 10 min. Reaktionen auf die zur Anwendung gekommenen Präparate wurden angelehnt an die EN ISO-Norm 7405:1997 im Hinblick auf pathologische Zellveränderungen 24 und 48 h nach Inkubation der Versuchsansätze im Begasungsbrutschrank bei 37 °C und einer Luftfeuchtigkeit von ~95 % sowie bei einem 4,0%igen CO₂-Luftgehalt ermittelt. Dabei wurden 4 verschiedene Präparatekonzentrationen mit direktem Gewebekontakt histomorphologisch und metrisch hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Parameter der normalen, veränderten und toten Zellen untersucht und der Zellkontrolle gegenübergestellt. Die Anzahl der untersuchten Proben betrug n = 160, die statistische Auswertung erfolgte mittels des Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Tests bei einem p-Wert < 0,05.

Ergebnisse: Zwischen den untersuchten XYLO-Präparaten konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Sie wiesen jedoch signifikant mehr normale und weniger veränderte Zellen auf, als das untersuchte αβVEGRA-Präparat (*Gingival Retraktionsflüssigkeit*). MAOT als Kombinationspräparat (αVEGRA und ACGRA) schnitt zuzüglich beim Parameter tote Zellen signifikant besser ab, als das untersuchte αβVEGRA-Retraktionsmedium. Die histomorphologischen Befunde untermauern die Ergebnisse.

Schlussfolgerung: Unter der Limitation der vorliegenden Studie scheinen beide XYLO-Präparate hinsichtlich der ermittelten Toxizitätsparameter prinzipiell als Retraktionsmedien geeignet. Weitere zukünftige Untersuchungen, die beispielsweise die physiologischen Leistungen der Zellen, Darreichungsformen ohne Konservierungsmittel, welche mit protektiven Zusatzstoffen versehen sind, und verschiedene Einwirkzeiten der Präparate thematisieren, sind jedoch entscheidend für eine definitive Beurteilung. (Dtsch Zahnärztl Z 2016; 71: 38–50)

Schlüsselwörter: Zellen; Toxizität; Retraktionsmedien; Adstringenzen; Vasokonstringenzen; Gingiva; humane Gingivafibroblasten

Einleitung

In der Zahnmedizin werden Methoden zur gingivalen Retraction in verschiedenen Situationen angewendet. Diese Techniken des Weichgewebsmanagements können in mechanische, chemische, chirurgische Anwendungen oder eine Kombination dieser 3 Varianten unterteilt werden [27]. Dabei verfolgt die Retraction, die mit einer temporären Verdrängung der Gingiva einhergeht, das Ziel einer vertikalen und horizontalen Verdrängung des Gewebes und der Trockenhaltung der Zahnoberfläche [4]. Es werden verschiedene chemische Substanzen im Zusammenhang mit gingivalen Retractionstechniken verwendet. Die verwendeten Retractionsmidien sollen möglichst effektiv in

der Anwendung sein [35]. Des Weiteren müssen sie sowohl lokal als auch systemisch sicher sein; die Effekte sollen nach der Anwendung über einen kurzen Zeitraum reversibel sein und keine permanente Verdrängung des gingivalen Gewebes zurücklassen [19]. In einer aktuellen Übersichtsarbeit, die Publikationen zu Retractionsmidien aus den Jahren 1970 bis 2013 thematisiert, wurde festgestellt, dass zu den am häufigsten verwendeten Medien Aluminiumchloride und Eisensulfate zählen. Für die praktische Anwendung werden pro Zahn 0,3–0,5 ml des jeweiligen Substrates und eine Applikationsdauer von 3–10 min empfohlen. Etwai-ge Entzündungsreaktionen sollen innerhalb der folgenden 7–10 Tage reversibel sein [34].

48 hours after incubation of the test samples in a gas-supplied incubator at 37 °C and a relative humidity of ~95 % and a CO₂ content in the air of 4.0 %. In the test, 4 different concentrations of the preparations directly contacting tissue were tested by histomorphology and measurements for parameters of normal, changed, and dead cells and compared to the cell control. The number of tested samples was n = 160 and the statistical analysis involved the Kruskal-Wallis multiple-comparison Z-value test at a p value < 0.05.

Results: No significant difference between the tested XYLO preparations was detected. However, they showed significantly more normal and fewer changed cells than the tested αβVEGRA preparation (*Gingival Retraction Fluid*). In addition, MAOT, a combination preparation (αVEGRA and ACGRA), showed significantly better results with regard to the dead cells parameter as compared to the tested αβVEGRA retraction medium. The histomorphological findings corroborated these results.

Conclusion: Within the limitations of this study, it appears that the use of both XYLO preparations as retraction media might be a future option based on the toxicity parameter findings. Further studies in the future investigating, for example, the physiological performance of the cells, forms of administration without preservative supplemented with protective additives, and various times of exposure to the preparations, will be crucial for a definitive conclusion to be made.

Keywords: cells; toxicity; retraction medium; astringent; vasoconstrictor; gingiva; human gingival fibroblasts

Aufgrund ihrer Wirksamkeit werden die Retractionsmidien in sogenannte Adstringenzen (ACGRA = astringent-based conventional gingival retraction agents) und Vasokonstringenzen (VEGRA = vasoconstrictor experimental gingival retraction agents) eingeteilt [21, 22]. Während ACGRAS Mittel sind, die beim Auftreffen auf die Gingiva durch Eiweißfällung austrocknend, blutstillend und entzündungshemmend wirken, handelt es sich bei den VEGRAS um Substanzen, die zu einer Gefäßverengung führen. Der Gruppe der ACGRAS werden beispielsweise Aluminiumchloride, Aluminiumsulfate und eisensulfathaltige Präparate zugeordnet. Zur VEGRA-Gruppe gehören Sympathomimetica, die entweder selektiv an den alpha(α)- bzw. an alpha- und beta(αβ)-

Laufende Nummer	Präparat	Chemische Gruppe	Studiengruppe	Hersteller	Lotnr.	Zusammensetzung	pH-Wert
1	Astringedent®	ACGRA	K 1a	Ultradent Products, South Jordan, Utah, USA	122199	Eisensulfat (15,5 %)	6,3
2	Gingiva Liquid®	ACGRA	K 2a	Roeko, Langeland, Deutschland	2435/09.99/1	Aluminiumchlorid-Hexahydrat (10 %)	6,5
3	Gingival Retraktionsflüssigkeit®	αβVEGRA	K 3	Sigma Dental Systems GmbH, Jarplund-Weding, Deutschland	1669318	S-Epinephrinhydrochlorid (8 %), Zinkchlorid, Benzalkohol, Natriumsulfite, Natriumphosphat, Natriumchlorid, Zinkchlorid	6,3
4	Mallebrin®	ACGRA	K 4b	Firma Krewel Meuselbach GmbH, Eitorf, Deutschland	7291/295	Aluminiumchlorat (25,5 %), Macrogol, Saccharin-Natrium	6,2
5	MAOT	αVEGRA+ACGRA	I 2	Eigenherstellung	7291/295 und 601755694	Mischung zwischen Nr. 4 und Nr. 7 (Verhältnis 1:1)	6,4
6	Orbat®	ACGRA	K 4a	lege artis Pharma GmbH Co KG, Dettenhausen, Deutschland	2842-497	Aluminiumchlorat (20 %)	6,5
7	Otriven®	αVEGRA	I 1	Firma Novartis Consumer Health GmbH, München, Deutschland	601755694	Xylometazolinhydrochlorid (0,1 %), Benzalkoniumchlorid, Edetinsäure, Dinatriumsalz, Natriumchlorid, Natriumhydrogensulfat	6,6
8	Racestyptine®	ACGRA	K 2b	Firma Spécialitées Septodont, Saint-Maur-des-Fossés Cedex, Frankreich	5800310100	Aluminiumchlorid 25 %, 8-Hydroxychinolinsulfat, hydroalkoholischer Excipients	6,2
9	ViscoStat®	ACGRA	K 1b	Ultradent Products, South Jordan, Utah, USA	2203/286	Eisensulfat (20 %)	6,1

Tabelle 1 Die in der Studie verwendeten Retraktionsmittel von A-V mit deren jeweiligen Zuordnung zu den Kontroll- bzw. Interventionsgruppen (ACGRA = astringent-based conventional gingival retraction agents, VEGRA = vasoconstrictor experimental gingival retraction agents, K = Kontrollgruppe, I = Interventionsgruppe) inklusive der dazugehörigen pH-Werte

Table 1 The retraction agents used in the study (A-V) with their respective assignment to the control or intervention groups (ACGRA = astringent-based conventional gingival retraction agents, VEGRA = vasoconstrictor experimental gingival retraction agents, K = control group, I = intervention group), including the associated pH values

Adenorezeptoren angreifen. Zu den α VEGRAs zählen Epinephrinpräparate, zu α VEGRAs Imidazol-Derivate (wie beispielsweise Tetryzolin, Oxymetazolin).

Eine Umfrage aus dem Jahr 2011 unter 510 Zahnärzten in Deutschland ergab, dass von den meisten Behandlern zur Retraction eisensulfathaltige Präparate (41 %), gefolgt von Aluminiumchloriden (15,3 %) und Aluminiumchloraten (10 %) verwendet werden, um vor allem bei der Abdrucknahme, beim Applizieren von Kompositrestaurationen, bei Zahnpräparationen und auch bei Zementierungsmaßnahmen eine blutungsarme Trockenlegung des Arbeitsgebietes zu ermöglichen [30]. Zu den verbliebenen sonstigen Präparaten, die von den Behandlern benutzt werden, gehören beispielsweise H_2O_2 und epinephrinhaltige Retraktionsmittel [29, 30]. Obwohl die Anwendungshäufigkeit von epinephrinhaltigen Präparaten in den letzten 30 Jahren von 55 % auf 14 % gesunken ist, wird in der Literatur häufig von Zwischenfällen („epinephrine Syndrome“) berichtet [1, 22, 24]. Diese können mit einem Kollaps, einer Tachykardie bzw. Dyspnoe einhergehen, und in wenigen Fällen sogar fatale Auswirkungen haben [9, 22]. In zahlreichen In-vitro-Zellstudien wurde auf zytotoxische Reaktionen bei der Verwendung beider Retraktionsmedienarten (ACGRA und VEGRA) hingewiesen [3, 5, 12, 16, 18, 26]. Die Studien wurden unter stark inhomogenen Bedingungen durchgeführt, sowohl bezüglich der verwendeten Zellart (Gingivafibroblasten, Keratinocyten, Knochenzellen, Hamster-Lungenfibroblasten) als auch bezüglich der untersuchten Messparameter (normale Zellen, tote Zellen, oxireduktive mitochondriale Funktion) und Methoden (histomorphometrische Ansätze, MTT-Test), sodass vergleichende Interpretationen schwierig sind [6, 10, 12, 13, 18, 26, 28, 37].

Alternativ zu epinephrinhaltigen Medien (α VEGRAs) wurden 1991 erstmalig Präparate aus der Gruppe der α VEGRAs verwendet und an V-79-Fibroblasten getestet mit dem Ergebnis, dass diese Präparatgruppe als wesentlich effektiver und sicherer als Epinephrin eingestuft wurde [2, 12, 22]. Tetryzolin konnte zudem eine verbesserte Wirkungsweise im Vergleich zu ACGRAs nachgewiesen werden. Sie gelten als vielversprechende Alternativen, wobei über In-vivo-An-

wendungen bis dato nicht berichtet wurde [22]. Tetryzolinpräparate (beispielsweise *Visine*) werden allerdings wegen der eventuell auftretenden reaktiven Hyperämie in manchen Ländern (Schweiz) nicht mehr vertrieben.

In der aktuellen Literatur wird zunehmend die intraorale Anwendung von sogenannten xylometazolinhydrochloridhaltigen Lösungen (beispielsweise *Otriven*) als Retraktionsmedien wegen der verbesserten blutstillenden Eigenschaften besonders im Rahmen von digitalen Abformungen empfohlen [29]. Aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung gehören sie ebenfalls zu den α VEGRAs. Die Wirkung tritt schnell ein und hält bis zu 12 h an. Doch gibt es bislang in der Literatur keine Angaben darüber, wie xylometazolinhaltige Lösungen, allein oder als Kombinationspräparat mit direktem Gewebekontakt in unterschiedlichen Konzentrationen angewendet, im Vergleich zu herkömmlichen Retraktionsagenzien wirken.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die zelluläre Verträglichkeit einer xylometazolinhydrochloridhaltigen Lösung in ihrer Reinform (Interventionsgruppe 1: *Otriven*) bzw. als Kombinationspräparat (Interventionsgruppe 2: Mischung aus *Mallebrin* und *Otriven*) gegenüber 7 verschiedenen herkömmlichen Retraktionslösungen (Kontrollinterventionsgruppen), die sich in ihrer chemischen Zusammensetzung unterscheiden, unter Verwendung von Primärzellkulturen menschlicher Gingiva mit einer dazugehörigen Zellkontrollgruppe vergleichend zu untersuchen. Dabei wurden verschiedene Präparatekonzentrationen mit einer Inkubationszeit von 10 min nach 24 und 48 h sowohl deskriptiv als auch analytisch hinsichtlich ihrer Wirkung auf menschliche Gingivafibroblasten untersucht. Die Forschungsfragen der Studie lauteten hierbei:

1. Gibt es einen Unterschied zwischen den beiden Interventionsgruppen (I1, I2) hinsichtlich der ermittelten Parameter?
2. Gibt es einen Unterschied zwischen allen untersuchten Präparaten in Bezug auf ihre möglicherweise toxische Wirkung auf den Fibroblastenrasen? Die erste Nullhypothese ($H_{1,0}$) besagt, dass zwischen den beiden Interventionsgruppen (I1 und I2) kein Unter-

schied festzustellen ist. Die dazugehörige Alternativhypothese ($H_{1,A}$) geht davon aus, dass I2 eine geringere Toxizität aufweist als I1.

Die zweite Nullhypothese ($H_{2,0}$) besagt, dass zwischen den untersuchten Präparaten kein Unterschied festzustellen ist. Die Alternativhypothese ($H_{2,A}$) geht davon aus, dass unterschiedliche Wirkungen der Präparate festzustellen sind.

Material und Methode

Geprüfte Präparate

In der vorliegenden Studie wurden die in Tabelle 1 aufgelisteten Medien untersucht. Ein Präparat gehört zur Gruppe der α VEGRAs (Interventionsgruppe 1: *Otriven* als Vertreter der Xylometazolinhydrochloride), bei der Interventionsgruppe 2 handelt es sich um ein Kombinationspräparat (α VEGRAs + ACGRA), das speziell für diese Studie hergestellt wurde (*MAOT* bestehend aus *Mallebrin* und *Otriven* im Verhältnis 1:1). Den beiden Interventionsgruppen wurden 5 Kontrollgruppen gegenübergestellt:

- Interventionsgruppe 1: Xylometazolinhydrochlorid (I1)
- Interventionsgruppe 2: Mischung aus Xylometazolinhydrochlorid und Aluminiumchlorat (I2)
- Kontrolle 1: Eisensulfat in den Konzentrationen 15,5 % (K1a) und 20,0 % (K1b)
- Kontrolle 2: Aluminiumchlorid in den Konzentrationen 10,0 % (K2a) und 25,0 % (K2b)
- Kontrolle 3: Epinephrinhydrochlorid (K3)
- Kontrolle 4: Aluminiumchlorat in den Konzentrationen 20,0 % (K4a) und 25,5 % (K4b).

Ebenfalls als Vergleich diente die Kontrollgruppe 5 (Zellkontrolle) ohne jegliche Intervention. Im Rahmen eines Vorversuches wurden bei allen Präparaten (2 μ l Präparat pro 1 ml Nährmedium) inklusive des verwendeten Nährmediums 24 h nach Inkubation im Begasungsbrutschrank (CO_2 -Inkubator Heraeus BBD 6220, Hanau, Deutschland) bei 37 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % sowie bei einem 4,0%igen CO_2 -Luftgehalt pH-Messungen (Calci-matic No. 761, Firma Knick, Berlin, Deutschland) durchgeführt.

Laufende Nummer	Präparat (Anzahl Proben)	Konzentrationsstufe	Mischungsansatz (µl/ml)	Reaktion nach 24 h	Reaktion nach 48 h
	ZELLKONTROLLE (n = 16)			sehr schöner, fast dichter Fibroblastenrasen mit langen schlanken Zellen und vielen Mitosen (Abb. 1)	schöner, weitgehend dichter Fibroblastenrasen mit langen, schlanken Zellen und vielen Mitosen
1.	Astringedent (n = 16)	I	0,5–1,0	deutliche Ausflockung im Medium, Fibroblasten weitgehend normal aussehend, zum Teil etwas spindelförmige Mitosen vorhanden	normal erscheinender Fibroblastenrasen, etwas weniger dicht als Zellkontrolle, Ausflockung zum Teil auf der Zelloberfläche
		II	2,0–3,0	Fibroblastenrasen deutlich weniger dicht, Fibroblasten erscheinen weitgehend normal, Ausflockungen schwimmen im Überstand, Vakuolen treten auf	trotz starker Ausfällung weitgehend normaler Fibroblastenrasen
		III	4,0–5,0	Ausfällung im Überstand, Fibroblastenrasen nicht sehr dicht, auch vakuolisiert, zum Teil lang und schlank, zum Teil etwas plump und dreieckig, verzweigte Ausläufer und Retraktionsformen	nicht sehr dichter, weitgehend normal erscheinender Fibroblastenrasen, zum Teil kommt Vakuolisierung vor
		IV	6,0–7,0	Abkugelungen im Fibroblastenrasen kommen vor, unter der starken Ausfällung keine Zellen erkennbar	vitaler, nicht ganz dichter Fibroblastenrasen, Zellen granuliert
2.	Gingiva Liquid (n = 16)	I	0,5–1,0	weitgehend normaler Fibroblastenrasen, Abkugelungen im Fibroblastenrasen kommen vor, auch Retraktionsfäden, Mitose ebenfalls vorhanden	normal erscheinender Fibroblastenrasen, fast wie Zellkontrolle, eventuell nicht so dicht, Abkugelungen kommen vor
		II	2,0–3,0	Fibroblastenrasen weniger dicht, etwas mehr Abkugelung, Trübung des Mediums, Mitose noch vorhanden	eventuell etwas weniger dicht, einige Fibroblasten leicht retrahiert, leichte Ausflockung
		III	4,0–5,0	starke Ausfällung, Fibroblastenrasen weitgehend normal erscheinend, einige tote Fibroblasten kommen vor	ähnlich Zellkontrolle, zum Teil leichte Retraktion, tote Fibroblasten im Fibroblastenrasen kommen vor, Vakuolisierung ebenfalls
		IV	6,0–7,0	starke Ausfällung, weitgehend normal erscheinender Fibroblastenrasen, einige Vakuolen vorhanden	normal erscheinender Fibroblastenrasen, einige Fibroblasten vakuolisiert, auch granuliert
3.	Gingival Retraktionsflüssigkeit (n = 16)	I	0,1–0,2	ähnlich Zellkontrolle, keine Ausfällungen, leichte Retraktionserscheinungen vorhanden (Retraktionsfäden)	weitgehend wie Zellkontrolle, Zelltrümmer im Überstand, lange tote Fibroblasten im Überstand
		II	0,3–0,4	Fibroblastenrasen nicht so dicht wie Zellkontrolle, Fibroblasten zum Teil am Abkugeln, zum Teil nicht mehr lang und schlank, sondern leicht verzweigt, Abkugelungen im Fibroblastenrasen und im Überstand kommen vor, normale Fibroblasten noch vorhanden	ein Teil des Fibroblastenrasens noch weitgehend normal erscheinend mit vitalen Fibroblasten, ein großer Teil der Fibroblasten schwimmt abgestorben im Überstand
		III	0,5	alle Fibroblasten abgekugelt (Abkuglung, Potozytose), ca. 80 % Zelltod, einige Fibroblasten (ca. 20 %) bereits am Abrunden, Dreiecksform, kleiner Zellkern, nur ein Nukleoli, leichte Farbänderung des Mediums (Abb. 2)	100 % Zelltod

		IV	1,0	100 % Zelltod, Fibroblasten zum Teil nicht abgekugelt, sondern wie fixiert, Retraktionsfäden, Kernpyknose, stärkere Farbänderung des Mediums	100 % Zelltod
4.	Mallebrin (n = 16)	I	0,5–1,0	wenige Abkugelungen im Fibroblastenrasen, Trübung des Mediums	Abkugelungen und Ausflockungen im Überstand
		II	2,0–3,0	Fibroblasten ganz leicht retrahiert, Ausflockung vorhanden	ähnlich Zellkontrolle, einige ganz leicht runde Fibroblasten vorhanden, Mitose vorhanden, Ausflockung
		III	4,0–5,0	starke Ausfällung auf nicht sehr dichtem Fibroblastenrasen, Fibroblasten erscheinen weitgehend normal und schlank, zum Teil leicht retrahiert, Abkuglung kommen vor, Mitosen ebenfalls	ähnlich Zellkontrolle, eventuell nicht so dicht
		IV	6,0–7,0	starke Ausfällung, dicht auf normal erscheinendem, aber nicht genau beurteilbarem Fibroblastenrasen, tote Zellen kommen vor	Ausfällung „klebt“ auf Fibroblastenrasen, Fibroblasten zum Teil leicht granuliert, tote Fibroblasten kommen vor
5.	MAOT (n = 16)	I	0,5–1,0	weitgehend normaler Fibroblastenrasen, Abkugelungen im Zellrasen, Trübung des Mediums, Mitosen	Abkugelungen und Ausflockungen im Überstand
		II	2,0–3,0	fast wie Zellkontrolle, starke Ausfällung im Überstand, Fibroblasten sehr schlank	nicht so dicht wie Zellkontrolle, leichte Retraktionsfäden, stärkere Ausflockung
		III	4,0–5,0	starke Ausfällung, Fibroblastenrasen nicht so dicht wie Zellkontrolle, Fibroblasten weitgehend normal erscheinend, weniger Mitosen, Abkugelungen kommen vor, auch tote bzw. vakuolisierte Fibroblasten (Abb. 3)	normal erscheinender nicht so dichter Fibroblastenrasen mit normalen Zellen, Ausfällung, tote bzw. vakuolisierte Fibroblasten im Fibroblastenrasen kommen vor
		IV	6,0–7,0	Fibroblastenrasen erscheint insgesamt leicht retrahiert, Vakuolisierung und einzelne tote Fibroblasten kommen vor	ähnlich Zellkontrolle, Fibroblasten jedoch granuliert, einige vakuolisiert, weniger Mitosen
6.	Orbat (n = 16)	I	0,5–1,0	fast wie Zellkontrolle, zum Teil leichte Retraktionen einzelner Zellen mit Ausflockungen im Überstand	wie Zellkontrolle, Ausflockung im Überstand
		II	2,0–3,0	fast wie Zellkontrolle, starke Ausfällung im Überstand, Fibroblasten sehr schlank	nicht so dicht wie Zellkontrolle, leichte Retraktionsfäden, stärkere Ausflockung
		III	4,0–5,0	Fibroblastenrasen fast wie Zellkontrolle, leichte Retraktion vorhanden, wenige Abkugelungen kommen vor, Ausfällung	ähnlich Zellkontrolle, Fibroblasten wirken schlanker (leichte Retraktion), wenige tote Fibroblasten im Fibroblastenrasen kommen vor, Ausflockung
		IV	6,0–7,0	Ausfällung, Fibroblastenrasen weitgehend wie Zellkontrolle erscheinend, leichte Retraktion und stark vakuolisierte Fibroblasten kommen vor	weitgehend wie Zellkontrolle, Fibroblasten lang und schlank, leichte Retraktionen und Vakuolisierung kommen vor, lange Zellausläufer ebenfalls
7.	Otriven (n = 16)	I	0,5–1,0	weitgehend normal erscheinender Fibroblastenrasen, jedoch kommen Abkugelungen im Fibroblastenrasen vor, kaum Trübung des Mediums. (Abkuglung, Retraktionsfäden), Mitosen vorhanden	Abkugelungen und Ausflockungen im Überstand

		II	2,0–3,0	scheinbar wie Zellkontrolle, keine Ausflockung, Fibroblastenrasen eventuell weniger dicht	fast wie Zellkontrolle, eventuell nicht so dicht, wenige tote Fibroblasten im Überstand, keine Ausflockung
		III	4,0–5,0	Fibroblastenrasen ähnlich wie Zellkontrolle, wenige Abkugelungen kommen vor, tote Fibroblasten im Fibroblastenrasen kommen vor, Vakuolisierung einzelner Fibroblasten (Abb. 4)	ähnlich Zellkontrolle, Zelltrümmer und Abkugelungen im Überstand kommen vor, leichte Granulation
		IV	6,0–7,0	keine Ausfällung, normal erscheinende Fibroblastenrasen, scheinbar nicht so dicht wie Zellkontrolle, Zellen zum Teil retrahiert, Retraktionsfäden und Vakuolisierung kommen vor	weitgehend wie Zellkontrolle, Fibroblasten lang und schlank, leichte Retraktionen und Vakuolisierung kommen vor, lange Zellausläufer ebenfalls
8.	Racestyptine (n = 16)	I	0,5–1,0	normaler Fibroblastenrasen, Mitosen vorhanden, einige Abkugelungen im Fibroblastenrasen, leichte Trübung des Mediums	fast wie Zellkontrolle, leichte Ausflockung im Medium
		II	2,0–3,0	Fibroblastenrasen etwas weniger dicht, Potocytose und Abkugelungen vereinzelt vorhanden, Mitose positiv, Ausflockung, vakuolierte Fibroblasten	nicht ganz so dicht wie Zellkontrolle, vakuolierte Fibroblasten vorhanden
		III	4,0–5,0	starke Ausfällung, Fibroblastenrasen nicht so dicht wie Zellkontrolle, Fibroblasten meist normal erscheinend, leicht retrahiert, Abkuglung und tote Fibroblasten im Fibroblastenrasen vorhanden, auch stark vakuolierte (tote) Fibroblasten kommen vor	Fibroblastenrasen zum Teil normal erscheinend, zum Teil am Degenerieren, Fibroblasten stark vakuoliert, plumpe Zellform, Retraktion, tote Fibroblasten, Abkuglung
		IV	6,0–7,0	sehr starke Ausfällung, Fibroblasten größtenteils abgekugelt bzw. am Abkugeln, vitale plumpe Fibroblasten noch vorhanden, ein Teil eines fast normal erscheinenden Fibroblastenrasens noch vorhanden	normal erscheinender Fibroblastenrasen, lange schlanke leicht retrahierte Fibroblasten, einige vakuoliert bzw. granuliert, Retraktionsfäden kommen vor, Abkugelungen kommen vor, Retraktionsspuren, Fibroblasten zum Teil verzweigt
9.	ViscoStat (n = 16)	I	0,5–1,0	deutliche Ausflockung im Medium, Fibroblasten weitgehend normal aussehend, zum Teil etwas spindelförmige Mitosen vorhanden	normal erscheinender Fibroblastenrasen, etwas weniger dicht als Zellkontrolle, Ausflockung zum Teil auf der Zelloberfläche
		II	2,0–3,0	Fibroblasten zum Teil nicht mehr lang und schlank, teilweise etwas plump, starke Ausfällung, zum Teil leichte Retraktionserscheinungen	trotz starker Ausfällung weitgehend normaler Fibroblastenrasen, vakuolierte Fibroblasten kommen vor
		III	4,0–5,0	eine dicke Schicht liegt auf Petriboden, Fibroblasten nicht erkennbar	dichter Fibroblastenrasen, alle Zellen vital dreieckig und granuliert, Mitosen vorhanden, Fibroblasten zum Teil mit Vakuolen
		IV	6,0–7,0	Abkugelungen im Fibroblastenrasen kommen vor, unter der starken Ausfällung keine Zellen erkennbar	vitaler, nicht ganz dichter Fibroblastenrasen, Zellen granuliert, auch vakuoliert, zum Teil lang und schlank, zum Teil etwas plump und dreieckig, auch verzweigte Ausläufer kommen vor, Retraktionsformen

Tabelle 2 Die beobachteten Zellreaktionen jeweils 24 bzw. 48 h nach Versuchsansatz in verschiedenen Konzentrationsstufen (I-IV) der untersuchten Retraktionsmedien

Table 2 The observed cell responses each 24 or 48 hours after experimental approach in various concentration levels (I-IV) of the examined retraction agents

Modell der Zellzüchtung

Die Prüfung der zytotoxischen Wirkung der verschiedenen Präparate erfolgte *in vitro* anhand der von Heidemann und Lampert entwickelten Methode [8, 32]. Als Ausgangsmaterial wurde menschliche Gingiva verwendet, welche bei chirurgischen Eingriffen gewonnen wurde. Die Patienten erteilten ihre Einwilligung zur Entnahme des Gewebes und Verwendung zu Forschungszwecken. Im weiteren Versuchsablauf wurde das Gewebe stets anonymisiert verarbeitet. Die Explantate verblieben für eine Nacht im Kühlschrank bei 4 °C. Anschließend wurden die Gewebesteile mit 4 °C gekühlter Hank's Balanced Salt Solution (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) und Antibiotikazusatz (Grüenthal, Deutschland) 2 Mal gewaschen, um sie von Blut-, Fett- und Granulationsresten zu reinigen. Mit einem Skalpell (Aeskulap, Tuttlingen, Deutschland) wurde die Probe in mehrere ca. 1 mm³ große Stücke zerteilt und zum Antrocknen auf sterile und oberflächenbehandelte Polystyrolpetrischalen von 60 mm Durchmesser (60 × 15) (Falcon, Becton & Dickinson, Franklin Lakes, England) mit Entlüftungsnoppen aufgebracht. Nach Anheftung der Proben durch 1- bis 2-minütiges Antrocknen bei Raumtemperatur wurden je Kulturgefäß 5 ml Nährmedium, bestehend aus 720 ml Aqua inieciabilia (Braun, Melsungen, Deutschland), 100 ml Hank's Balanced Salt Solution (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 10 ml BME Aminosäuren (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland), 10 ml L-Glutamin 200 mM (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 10 ml MEM (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 100 ml Newborn Calfserum (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 27,5 ml NaHCO₃ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben. Da Gewebesteile aus der Mundhöhle nicht steril zu gewinnen sind, wurden dem Nährmedium Antibiotika: 1 ml Penicillin (Grüenthal, Deutschland), 1 ml Streptomycin (Fatol, Deutschland) und 10 ml Amphotericin B (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) zugesetzt, um unter möglichst keimarmen Bedingungen zu arbeiten. In einem Begasungsbrutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37 °C mit 4%igem CO₂-Luftgehalt und hoher Luftfeuchtigkeit (ca. 95 %) wurden die Petrischalen inkubiert. Zur Sub-

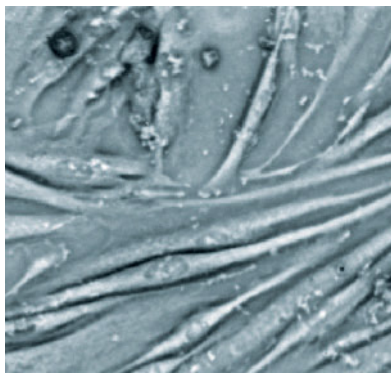


Abbildung 1 Zellkontrolle, 24 h nach Versuchsansatz: sehr schöner, fast dichter Fibroblastenrasen mit langen, schlanken Zellen und Mitosen, 250fache Vergrößerung

Figure 1 Cell control, 24 hours of experimental approach: very nice, almost dense fibroblast lawns with long, slender cells and mitotic figures, 250-fold magnification

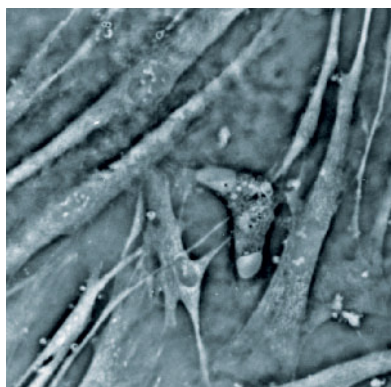


Abbildung 3 MAOT, 4,0 µl/ml, 24 h nach Versuchsansatz: normal erscheinender, nicht so dichter Fibroblastenrasen mit normalen Zellen, Ausfällung, tote bzw. vakuolierte Fibroblasten im Fibroblastenrasen kommen vor, 250fache Vergrößerung

Figure 3 MAOT, 4.0 µl/ml, 24 hours after experimental approach: normal appearing, not as dense fibroblast lawns with normal cells, precipitation, dead or vacuolated fibroblasts, 250-fold magnification

kultivierung beziehungsweise zum Passagieren konfluenter Fibroblastenzellrasen, respektive zur Verdünnung der Rasendichte, kam folgende Trypsin-Lösung zum Einsatz: Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco, Paisley, Schottland) und 0,2 g EDTA pro Liter modifizierte Puck's Salzlösung (Gibco, Paisley, Schottland).

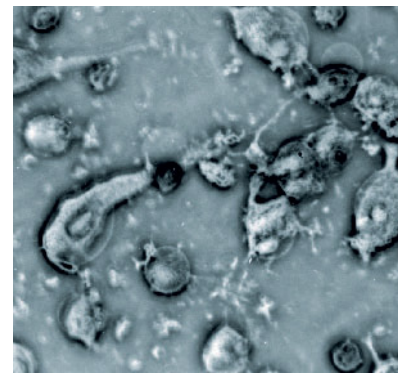


Abbildung 2: Gingival Retraktionsflüssigkeit, 0,40 µl/ml, 24 h nach Versuchsansatz: alle Fibroblasten abgekugelt (Potocytose), 80%iger Zelltod, einige Fibroblasten (20%) bereits am abrunden, 250fache Vergrößerung

Figure 2 Gingival Retraktionsflüssigkeit, 0.40 µl/ml, 24 hours after experimental approach: all fibroblasts spherical (potocytosis), an 80% cell death, some fibroblasts (20%) already on rounding, 250-fold magnification

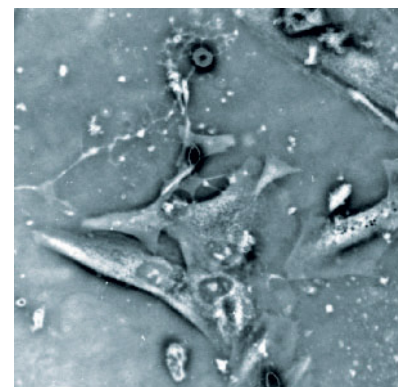


Abbildung 4: Otriven, 4,0 µl/ml, 24 h nach Versuchsansatz: tote Fibroblasten kommen im Fibroblastenrasen vor, Vakuolisierung einzelner Fibroblasten, mehr Abkugelungen im Überstand, 250fache Vergrößerung

Figure 4 Otriven, 4.0 µl/ml, 24 hours after experimental approach: dead fibroblasts are found in fibroblasts lawn, vacuolation of individual fibroblasts, more detachments in the supernatant, 250-fold magnification

(Tab. 1–5, Abb. 1–4: S. Gerhardt-Szép)

Im Rahmen der panoptischen Färbung nach Pappenheim wurden außerdem folgende Lösungen eingesetzt: Ringer-Lösung (Gibco, Paisley, Schottland), May-Grünwald-Lösung (Gibco, Paisley, Schottland) und verdünnte Giemsa-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland).

Für die Studie wurden Fibroblasten verwendet, die sich zwischen der 11. und 14. Passage befanden. Im Mittel wurden $4,5 \times 10^{-5}$ Fibroblasten pro ml (jeweils 5 ml pro Petrischale) eingesät. Die gleichmäßige Zellaussaat wurde bei 100facher Vergrößerung überprüft und bilddokumentiert. Die Vorinkubation der Zellen betrug 24 h. Dabei wurde Wert darauf gelegt, dass kein konfluenter Zellrasen vorlag, um ein weiteres Wachstum zu ermöglichen. Die Kontrolle der erfolgreichen Vorinkubation wurde anhand der Parameter Zellform, Wachstum und Zelldichte vorgenommen.

Hauptversuch

In den Versuchen wurde von den auf ihre biologische Verträglichkeit zu prüfenden Retraktionslösungen 0,1 bis 7,0 $\mu\text{l/ml}$ auf die gut gewachsenen, 24 h alten und mit Nährmedium bedeckten Fibroblastenkulturen appliziert. Die Inkubationszeit mit den Präparaten betrug im Mittel 10 min. Reaktionen auf die zur Anwendung gekommenen Retraktionsmittel wurden angelehnt an die EN ISO-Norm 7405:1997 im Hinblick auf pathologische Zellveränderungen 24 und 48 h nach Inkubation der Versuchsansätze im Begasungsbrutschrank (CO_2 -Inkubator Heraeus BBD 6220, Hanau, Deutschland) bei 37 °C und einer Luftfeuchtigkeit von ~95 % sowie bei einem 4,0%igen CO_2 -Luftgehalt ermittelt. Pro untersuchtem Präparat (in μl) wurden 2 verschiedene Mischungsansätze mit dem Nährmedium (in ml) jeweils doppelt angelegt (I: 0,5–1,0 $\mu\text{l/ml}$; II: 2,0–3,0 $\mu\text{l/ml}$; III: 4,0–5,0 $\mu\text{l/ml}$; IV: 6,0–7,0 $\mu\text{l/ml}$). Zur Unterscheidung zwischen natürlichen und toxikologisch bedingten, degenerativen Zellveränderungen wurden jedem Mischungsansatz (I-IV) außerdem 4 Zellkontrollen (ohne Zugabe von Retraktionsmitteln) gegenübergestellt. Eine Zellkontrolle wurde zu Versuchsbeginn fixiert, gefärbt und ausgewertet, um den Ausgangszustand zu dokumentieren. So wurden sowohl nach 24 als auch nach 48 h jeweils 72 Petrischalen evaluiert. Zusätzlich der Zellkontrollen ($n = 16$) wurden insgesamt 160 (72 + 72 + 16) Proben bewertet. Hinsichtlich der im Vorfeld festgelegten 4 Konzentrationsstufen musste beim Präparat Gingival Retraktionsflüssigkeit hiervon abgewichen werden: Da

Laufende Nummer	Präparat	Stabw.	Min.	Max.	Median	Signifikant zu Nr.
1	Astringedent®	14	890	939	912	3
2	Gingiva Liquid®	23	836	926	895	k.S.
3	Gingival Retraktionsflüssigkeit®	31	0	916	693	1, 4–7, 10
4	Mallebrin®	38	836	980	922	3
5	MAOT	25	874	952	910	3
6	Orbat®	39	838	960	916	3
7	Otriven®	44	837	972	901	3
8	Racestyptine®	45	808	954	884	k.S.
9	ViscoStat®	31	823	934	890	k.S.
10	Zellkontrolle	36	842	951	922	3

Tabelle 3 Anzahl der normalen Zellen (normale Fibroblasten, Ruhekern, Mitose, Phagozytose) der untersuchten Retraktionsmittel (Stabw. = Standardabweichung; Min. = Minimum; Max. = Maximum, k.S. = keine Signifikanz)

Table 3 Number of normal cells (normal fibroblasts, resting nucleus, mitosis, phagocytosis) of the examined retraction agents (Stabw. = standard deviation; Min. = minimum; Max. = maximum, k.S. = not significant)

bereits bei der 1. Stufe mit 0,5–1,0 $\mu\text{l/ml}$ in 80–100 % der Zelltod feststellbar war, wurden die Konzentrationsstufen nach unten korrigiert und final zwischen 0,1–1,0 $\mu\text{l/ml}$ definiert. Die Veränderungen der Zellkulturen wurden während des laufenden Versuchs mit einem Phasenkontrastmikroskop (DMIL, Leica, Solms, Deutschland) bei 100- bis 250facher Vergrößerung evaluiert und dokumentiert.

Um eine gleichmäßige Schicht der Zellkulturen an den fixierten und gefärbten Präparaten unter dem Mikroskop erkennen zu können, wurde auf die Petrischale ein Tropfen Immersionsöl (Leica-Immersionsöl, Leica, Wetzlar, Deutschland) gegeben. Zur Verbesserung der optischen Verhältnisse wurde außerdem ein Deckglas (Menzel-Deckgläser, Gerhard-Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) aufgelegt. Es wurden zytopathologische Veränderungen am Zytoplasma (Granulation, Vakuolisierung, Potozytose), am Zell-

kern (Karyolyse, Karyorhexis, Kernpyknose) und am Gesamtzellrasen (Reaktion der Rasenränder, Ausbildung von Retraktionsfäden, Adhäsionsverlust, Degenerationen, gekennzeichnet durch Zerfall des losgelösten Plasmas) evaluiert. Die Zählung der Zellen erfolgte mit einem Universal-Kondensator im Hellfeld, wobei der Phasenmikroskopring entfernt wurde. Zur Dokumentation wurden über den am Mikroskop befestigten Tubus (Fluovet, Leica, Solms, Deutschland) Fotografien angefertigt. Zur Ermittlung der Rate normaler oder veränderter und toter Fibroblasten wurden je Petrischale 1.000 Zellen nach folgenden Kriterien ausgezählt: Unter dem Parameter „normale Zellen“ wurden normale Fibroblasten, das Vorhandensein von Ruhekernen, Mitosen und Phagozytose (Vakuolen, Granulationen) zusammengefasst. „Veränderte Zellen“ wiesen große Kerne, Doppelkerne, Kernanomalien, Kernverformungen und Kernsprössungen auf. Zudem waren

Laufende Nummer	Präparat	Mittelwert	Stabw.	Min.	Max.	Median	Signifikant zu Nr.
1	Astringedent®	58	12	38	76	59	3
2	Gingiva Liquid®	74	19	45	119	73	k.S.
3	Gingival Retraktionsflüssigkeit®	402	326	60	942	252	1, 4-7, 9, 10
4	Mallebrin®	47	29	6	110	46	3
5	MAOT	52	25	17	91	57	3
6	Orbat®	52	37	7	126	52	3
7	Otriven®	62	38	6	116	64	3
8	Racestyptine®	78	34	25	136	75	k.S.
9	ViscoStat®	68	23	36	128	66	3
10	Zellkontrolle	62	24	33	106	55	3

Tabelle 4 Anzahl der veränderten Zellen (großer Kern, Doppelkern, Kernanomalie, Potocytose, Granulation) der untersuchten Retraktionsmittel (Stabw. = Standardabweichung; Min. = Minimum; Max. = Maximum, k.S. = keine Signifikanz)

Table 4 Number of modified cells (large nucleus, dual nucleus, nucleus anomaly, potocytosis, granulation) of the examined retraction retraction agents (Stabw. = standard deviation; Min. = minimum; Max. = maximum, k.S. = not significant)

Granulationen, Abschnürungen von Plasmateilen aus dem Zytoplasma (Potocytose) erkennbar. „Tote Zellen“ waren charakterisiert durch Abrundungen, Abkugelungen, Kernzerfall (Karyorhexis und Karyolyse), Pyknose (Zellkerne mit zahlreichen Chromatinkörnchen bei schrumpfendem Volumen zu Beginn des Kernzerfalls) und durch ein Zytoplasma ohne Kern [32].

Die statistisch ermittelten Daten wurden mittels des Kruskal-Wallis Multiple-Comparison Z-Value Tests unter Verwendung des Programms PASS11 (NCSS, Kaysville, Utah, USA) bei einem p-Wert < 0,05 evaluiert.

Ergebnisse

Der ermittelte pH-Wert des Nährmediums lag bei 6,9. Die verwendeten Präparate wiesen pH-Werte zwischen 6,1 und 6,8 auf, wobei die beiden xylometazolinhydrochloridhaltigen Mittel mit

6,4 und 6,6 nahe beieinander lagen. Direkt nach der Zugabe von Astringedent, Gingiva Liquid, MAOT, Racestyptine und ViscoStat konnte eine Trübung des Nährmediums beobachtet werden. Diese verschwand nach der Inkubationszeit von 24 h. Die einzelnen ermittelten pH-Werte sind in Tabelle 1 dargestellt.

Die Ergebnisse des deskriptiven Teils bezüglich der beobachteten Zellveränderungen nach 24 und 48 h sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die beiden xylometazolinhydrochloridhaltigen Mittel weisen ähnliche histomorphologischen Befunde auf. Auffällig sind die Beobachtungen bezüglich des Präparates *Gingival Retraktionsflüssigkeit* (GS): Ab der Konzentrationsstufe III sind 80 % der Zellen abgestorben, die sich auch nach 48 h nicht regenerieren. Auch bei ViscoStat und Racestyptine sind ab der Konzentrationsstufe III tote und vakuolierte Fibroblasten erkennbar, die jedoch nach 48 h ihr Regenerationspotenzial entfalten. Die Abbildun-

gen 1–4 weisen auf typische Zellveränderungen im jeweiligen Kontext hin. Die Ergebnisse der ermittelten Parameter hinsichtlich der normalen, veränderten und toten Zellen sind in den Tabellen 3–5 dargestellt. Zwischen den beiden xylometazolinhydrochloridhaltigen Mitteln lassen sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der ermittelten Parameter feststellen. Die signifikant höchste Anzahl an toten Zellen weist *Gingival Retraktionsflüssigkeit* auf, wobei bei *Otriven*, *Racestyptine* und *ViscoStat* kein statistisch zu ermittelnder Unterschied zu *GS* festzustellen ist. Auch beim Parameter der veränderten Zellen weist *GS* die statistisch signifikant höchste Anzahl auf, mit Ausnahme von *Gingiva Liquid* und *Racestyptine*. Die niedrigste Anzahl an normalen Zellen weist ebenfalls *GS* auf mit einer statistisch ermittelbaren Signifikanz zu allen anderen Präparaten, außer zu *Gingiva Liquid*, *Racestyptine* und *ViscoStat*.

Beantwortung der Forschungsfragen

1. Zwischen den beiden untersuchten Interventionsgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die 1. Nullhypothese gilt damit als angenommen.
2. Gegenüber der Kontrollgruppe 3 (K3) hingegen wiesen beide Interventionsgruppen signifikante Unterschiede bezüglich der Parameter „normale Zellen“ und „veränderte Zellen“ auf. Hinsichtlich „toter Zellen“ konnte lediglich zwischen der Interventionsgruppe 2 (I2) und K3 eine statistische Signifikanz eruiert werden. Die Kontrollgruppe 3 (K3) hingegen wies hinsichtlich des Parameters „tote Zellen“ signifikante Unterschiede zu allen anderen Gruppen auf, ausgenommen I1, K2b und K1b. Ein ebenfalls ähnliches Verhalten der K3 in Bezug auf den Parameter „veränderte Zellen“ war, bis auf die Ausnahmen K1a, K2a, K2b und der Zellkontrolle, feststellbar. Statistisch signifikante Unterschiede ließen sich auch im Vergleich K3 zu K1a, K4b, I2, K4a, I1 und zur Zellkontrolle bezüglich des Parameters „normale Zellen“ evaluieren. Die 2. Nullhypothese wird somit verworfen und die dazugehörige Alternativhypothese angenommen.

Laufende Nummer	Präparat	Stabw.	Min.	Max.	Median	Signifikant zu Nr.
1	Astringedent®	6	20	40	29	3
2	Gingiva Liquid®	7	11	40	30	3
3	Gingival Retraktionsflüssigkeit®	43	23	152	57	1, 2, 4-6, 10
4	Mallebrin®	15	1	54	29	3
5	MAOT	14	11	77	30	3
6	Orbat®	10	9	39	25	3
7	Otriven®	12	13	57	31	k.S.
8	Racestyptine®	14	15	63	36	k.S.
9	ViscoStat®	23	21	101	37	k.S.
10	Zellkontrolle	13	11	48	22	3

Tabelle 5: Anzahl der toten Zellen (Abrundungen, Abkugelungen, Kernzerfall, Pyknose, Zytoplasma ohne Kern) der untersuchten Retraktionsmittel (Stabw. = Standardabweichung; Min. = Minimum; Max. = Maximum, k.S. = keine Signifikanz)

Table 5 Number of dead cells (rounded, spherical, nuclear decay, pyknosis, cytoplasm without nucleus) of the examined retraction agents (Stabw. = standard deviation; Min. = minimum; Max. = maximum, k.S. = not significant)

Diskussion und Schlussfolgerung

Zellkulturmodelle dienen der initialen Prüfung der unspezifischen Zytotoxizität und damit der biologischen Charakterisierung dentaler Werkstoffe [36]. Methoden, die prinzipiell zur Ermittlung der Zytotoxizität angewendet werden, können in 3 Gruppen untergliedert werden: 1. Beobachtungen (Kenntlichmachung morphologischer Zellveränderungen), 2. Bestimmung der Membranzintegrität (Freisetzung von intrazellulären Stoffen, Farbstoffen beziehungsweise Membranbestandteilen und Aufnahme von Farbstoffen durch tote Zellen) und 3. Bestimmung physiologischer Leistungen (aktive Aufnahme von Stoffen durch die Zelle als Maß für ihre Vitalität, Reduktionsvermögen lebender Zellen, Proteingehalt als Maß für die Zellzahl, Enzyme und Substrate als Maß für den Stoffwechsel lebender Zellen) [11]. Zur In-vitro-Analyse der zytotoxischen

Eigenschaften von Retraktionsmedien werden in der Literatur konventionelle histomorphologische Beobachtungen bzw. biochemische Ansätze zur Bestimmung physiologischer Leistungen durchgeführt (beispielsweise mittels MTT-Wachstumshemmungstests). Eine Differenzierung mittels MTT, ob die Zellen nekrotisch verändert oder beispielsweise in Apoptose übergegangen sind, ist dabei nicht möglich. Mittels histomorphologischer Studien, wie bei der vorliegenden, sind diese Differenzierungen jedoch evaluierbar.

Zwei wichtige Instrumente zur Untersuchung und Bewertung der toxikologischen Eigenschaften von Medizinprodukten stellen die Normenreihe EN ISO 10993 und die EN ISO 7405 dar. Beschreibt Erstgenannte die Möglichkeiten der toxikologischen Testung für alle Medizinprodukte, so konzentriert sich die EN ISO 7405 ausschließlich auf die „Präklinische Beurteilung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkun-

de verwendeten Medizinprodukten“. Die in dieser Studie praktizierte Anlehnung an die EN ISO 7405:1997 und damit die beobachteten Zellveränderungen 24 und 48 h nach Inkubation der Versuchsansätze, erschienen essenziell wichtig für die Beurteilung der toxischen Auswirkungen der untersuchten Retraktionsmedien. Nur so war das Regenerationspotenzial der Zellen nach Substratkontakt ersichtlich. Diese zeitlichen Vorgaben lassen sich in der aktualisierten Version der EN ISO 7405:2008/A1:2013 nicht mehr auffinden.

Viele Autoren bevorzugten in diesem Kontext primäre Gingivafibroblasten, denn sie gelten im Vergleich zu den Dauerzelllinien als zielortnahe Zellen und sind somit wesentlich besser verifizierbar [8, 15, 33]. Humane Gingivafibroblasten wurden in aktuellen Studien, in denen ACGRAs und VEGRAs zur Evaluation kamen, verwendet [22, 25]. Diese belegen, dass VEGRAs im Vergleich zu ACGRAs weniger unerwünschte Nebenwirkungen an den Zähnen und am Zahnhalteapparat verursachen [24, 26]. Doch sind speziell bei der Verwendung von epinephrinhaltigen Retraktionsmedien (α VEGRAs) allein oder in Kombination mit Fäden selbst bei niedrigen Konzentrationen klinische Nebenwirkungen beobachtet worden, wodurch ihr Einsatz fragwürdig erscheint [1, 17, 20, 22]. Die Autorengruppe von Bowles schlug 1991 alternativ die Anwendung von α VEGRAs vor [2]. Vergleichende Studien belegten, dass Tetrahydrozolinhydrochlorid ($C_{13}H_{17}ClN_2$) und Oxymetazolinhydrochlorid ($C_{16}H_{25}ClN_2O$), beide aus der Gruppe der Imidazoline und der α VEGRAs, geringere zytotoxische Effekte auslösen als epinephrinhaltige Retraktionspräparate [22, 25]. Dies kann auch von der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden, denn das verwendete Xylometazolinhydrochlorid ($C_{16}H_{25}ClN_2$, Präparat: *Otriven*), ebenfalls aus der Gruppe der Imidazoline, erwies sich als statistisch signifikant verschieden gegenüber Epinephrin (Gingival Retraktionsflüssigkeit).

Xylometazolin (XYLO) ist ein α -Sympathomimeticum, das zur systemischen (Behandlung des anaphylaktischen Schocks) oder zur lokalen Vaso- konstriktion eingesetzt werden kann. Es dockt an dieselben Rezeptoren an wie Adrenalin. Innerhalb der vorliegenden Studie zeigte das Medium *Otriven* eine

niedrige Anzahl von veränderten und toten Zellen. Histologisch präsentierte sich ein weitgehend normaler Fibroblastenrasen. Mit Zunahme der Konzentration zeigte sich ein vergleichbares histologisches Ergebnis wie bei *Mallebrin*. Hinzu kam, dass die veränderten Fibroblasten leicht granuliert und wenig vaskulisiert waren. Das Präparat *MAOT* (eigene Studienmischung aus *Mallebrin* und *Otriven*) hatte bei der Anzahl der veränderten Zellen den zweitniedrigsten Wert. Histologisch ähnelte das Ergebnis dem Präparat *Orbat*. Das Medium *Gingival Retraktionsflüssigkeit* als Vertreter der α VEGRAs zeigte bei den verwendeten Untersuchungsparametern im Vergleich zu den anderen Substanzen im Mittelwert die größte Anzahl an veränderten und toten Zellen. Die Verwendung von Adrenalin als Retraktionsmedium wird in der Literatur kontrovers diskutiert [35]. In einer neueren Humanstudie verglich Csillag verschiedene Adrenalin-konzentrationen und stellte fest, dass eine 0,001%ige Adrenalinlösung die Sulcusflüssigkeitsproduktion und eine hyperämische Reaktion hemmte, ohne lokale und systemische Nebenwirkungen aufzuweisen [3]. Zinkchlorid ist als Auslöser für pathogene Zellveränderungen bekannt. In Untersuchungen an Hunden wurde beispielsweise bestätigt, dass mit Zinkchlorid imprägnierte Retraktionsfäden (mit Konzentrationen von 8 % und 40 %) Nekrosen und irreversible Gewebeschädigungen zur Folge hatten [35]. Aus diesem Grund erscheint Zinkchlorid für die Gingivaretraktion klinisch nicht empfehlenswert [35].

Studien zu XYLO-haltigen Retraktionsmedien sind aktuell in der Literatur nicht auffindbar, jedoch ist deren Anwendung auch im Vergleich zu Oxy-metazolin (OXY) in der Ophthalmologie gut untersucht [14]. Bei diesen beiden Strukturanalogen konnte ein unterschiedliches Penetrationsverhalten zugunsten von XYLO festgestellt werden. Erklärlich ist dies vor allem durch die höhere Lipophilie und die etwas geringere Molekülmasse ($Mr_{OXY} = 296,8$) von XYLO ($Mr_{XYLO} = 280,8$). Zudem geht man davon aus, dass XYLO neben dem parazellulären auch dem transzellulären Transportprozess folgt. Der Zusatz des parazellulären Enhancers EDTA erhöht beispielsweise die Permeabilität der Membran für das hydrophilere und damit in erster Linie parazellulär permeierende OXY um ein Vielfaches [14]. Auch der Zusatzstoff Benzalkoniumchlorid als Konservierungsmittel wird im Sinne einer Potenzierung der zytotoxischen Eigenschaften diskutiert [14, 31]. Der Verzicht dieses Zusatzstoffes bringt bei XYLO eine Erhöhung von 38 % bis auf 85 % Zellwachstum. Bei einer Zugabe von Dexpanthenol steigt das Zellwachstum sogar auf 89 %. Dies lässt sich mit den protektiven Eigenschaften des Zusatzes erklären [31].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass unter der Limitation der vorliegenden Studie die Verwendung xylometazolinhydrochloridhaltiger (α VEGRA) Präparate sowohl in Reinform (*Otriven*) als auch in der Mischform mit einem Aluminiumchlorat (*MAOT*) vergleichbare Zytotoxizitäts-

daten lieferte, wie konventionelle ACGRAs.

Sie schnitten hinsichtlich der Parameter „normale“ und „veränderte“ Zellen signifikant besser ab, als das untersuchte α VEGRA-Präparat (*Gingival Retraktionsflüssigkeit*). *MAOT* wurde zudem beim Parameter „tote“ Zellen signifikant besser beurteilt, als das verwendete α VEGRA.

Basierend auf der Literatur erscheint es empfehlenswert, für zukünftige Studien Darreichungsformen zu präferieren, die auf die Zugabe von Konservierungsmitteln (beispielsweise Benzalkoniumchlorid) verzichten. Zudem könnten zukünftig auch andere Zellarten (beispielsweise Epithelzellen) und Kombinationen von diversen Nachweismethoden thematisiert werden, die unterschiedliche biologische Endpunkte (beispielsweise Enzymaktivitäten, Membranintegrität, Stoffwechselleistungen) erfassen. DZZ

Interessenkonflikt: Die Autoren erklären, dass kein Interessenkonflikt im Sinne der Richtlinien des International Committee of Medical Journal Editors besteht.

Korrespondenzadresse

PD Dr. Susanne Gerhardt-Szép, MME
Poliklinik für Zahnerhaltung
Carolinum Zahnärztliches Universitäts-
Institut gGmbH
Goethe-Universität Frankfurt am Main
Theodor-Stern Kai 7, Haus 29
60596 Frankfurt am Main
s.szep@em.uni-frankfurt.de

Literatur

- Bader JD, Bonito AJ, Shugars DA: A systematic review of cardiovascular effects of epinephrine on hypertensive dental patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 93: 647–653
- Bowles WH, Tardy SJ, Vahadi A: Evaluation of new gingival retraction agents. *J Dent Res* 1991; 70: 1447–1449
- Csillag M, Nyiri G, Vag J, Fazekas A: Dose-related effects of epinephrine on human gingival blood flow and crevicular fluid production used as a soaking solution for chemo-mechanical tissue retraction. *J Prosthet Dent* 2007; 97: 6–11
- Donovan TE, Chee WW: Current concepts in gingival displacement. *Dent Clin North Am* 2004; 48: 433–444
- Fazekas A, Csempesz F, Csabai Z, Vag J: Effects of pre-soaked retraction cords on the microcirculation of human gingival margin. *Oper Dent* 2002; 27: 343–348
- Feng J, Aboyoussif H, Weiner S, Singh S, Jandinsky J: The effect of gingival retraction procedures on periodontal indices and crevicular fluid cytokine levels: a pilot study. *J Prosthodont* 2006; 15: 108–112
- Heidemann D, Lampert F: Cell culture of human gingival epithelium. *Dtsch Zahnärztl Z* 1978; 33: 29–32
- Heidemann D: Die Bestimmung der Biokompatibilität von zahnärztlichen Materialien anhand primärer Zellen. In: Kettel W (Hrsg): *Deutscher Zahn-*
- ärztekalender 1982. Carl Hanser Verlag, München, Wien 1982, 109–113
- Hilley MD, Milam SB, Gierschke AH, Giovannitti JA: Fatality associated with combined use of halothane and gingival retraction cord. *Anesthesiology* 1984; 60: 587–588
- Jeanson BG, Boggess WS, Lemon RR: Ferric sulfate haemostasis: effect on osseous wound healing II with curettage and irrigation. *J Endod* 1993; 19: 174–176
- Jelinek A: In-vitro-Toxizität grenzflächenaktiver Substanzen: Wirkung auf Zellmembran, mitochondriale Funktion und Apoptose. Dissertationsschrift der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-

- Luther-Universität Halle-Wittenberg (2001)
12. Kopac I, Bastista U, Cvetko E, Marion L: Viability of fibroblasts in cell culture after treatment with different chemical retraction agents. *J Oral Rehabil* 2002; 29: 98–104
 13. Kopac I, Sterle M, Marion L: Electron microscopic analysis of the effects of chemical retraction agents on cultured rat keratinocytes. *J Prosth Dent* 2002; 87: 51–56
 14. Krase S: Einfluss Formulierungsparametern auf die nasale Verfügbarkeit von Natriumcromoglicat, Xylometazolinhydrochlorid und Oxymetazolinhydrochlorid. Dissertationsschrift der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin (2003)
 15. Lehmann F, Leyhausen G, Geurtsen W: Cytotoxic alterations in different fibroblast cultures caused by matrix monomers. *J Dent Res* 1993; 72: 219, Abstr. No. 929
 16. Liu J, Zhang XM, Hao PJ, Hui M, Yu NY: Comparison of cytotoxicity between chemical retraction agents on human gingival fibroblasts in vitro. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2009; 27: 202–205
 17. Liu C, Huang F, Yang L, Chou L, Chou M, Chanh Y: Cytotoxic effects of gingival retraction cords on human gingival fibroblasts in vitro. *J Oral Rehab* 2004; 31: 368–372
 18. Lodetti G, D'Abrosca F, Fontana P: Set up of in vitro methods able to detect the safety of astringent Liquids. *Minerva Stomatol* 2004; 53: 361–367
 19. Malbaker A: Gingival retraction – techniques and materials: A review. *Pakistan Oral & Dental Journal* 2010; 30: 545–551
 20. Nowakowska D, Panek H, Nowakowska M, Nowakowska A: Gingival retraction – survey results of Polish dentists. Part 1. Method, materials and chemical retraction agent preferences. Part 2. Clinical habits related to retraction procedures. *Protet Stomatol* 2006; 56: 352–366
 21. Nowakowska D: Classification of chemical retraction agents. *Protet Stomatol* 2008; 58: 202–208
 22. Nowakowska D, Saczko J, Kulbacka J, Choromanska A, Raszewski Z: Cytotoxic potential of vasoconstrictor experimental gingival retraction agents – in vitro study on primary human gingival fibroblasts. *Folia Biol (Praha)* 2012; 58: 37–43
 23. Nowakowska D, Panek H, Bogucki ZA: Current insight on the security of epinephrine use in gingival margin retraction procedures from review in vivo studies. *J Environ Stud* 2009; 18: 515–520
 24. Nowakowska D: The impact of retraction astringents on gingival margins tissues from literature review of in vivo studies. *Protect Stomatol* 2009; 59: 119–124
 25. Nowakowska D, Saczko J, Biezunska-Kusiak K et al.: The influence of retraction agents on cytoskeleton reorganization and oxidative stress in primary gingival fibroblasts (HGFs). *Arch Oral Biol* 2014; 8: 341–348
 26. Nowakowska D, Saczko J, Kulbacka J, Choromanska A: Dynamic oxidoreductive potential of astringent retraction agents. *Folia Biol (Praha)* 2010; 56: 263–268
 27. Phatale S, Marawar PP, Byakod G, Lagdive SB, Kalburge JV: effect of retraction materials on gingival health: A histopathological study. *J Indian Soc Periodontol* 2010; 14: 35–39
 28. Ravik J: Zytotoxische Eigenschaften von Retraktionsmitteln, In-vitro-Studie an humanen Gingivafibroblasten. Dissertationsschrift der Medizinischen Fakultät Frankfurt am Main, Goethe-Universität Frankfurt am Main (2006)
 29. Rinke S, Rödiger M: Integration der digitalen Abformung in ein restauratives Behandlungskonzept. *Digital Dentistry* 2014; 1: 6–14, http://www.zwp-online.info/archiv/pub/sim/dd/2014/dd0114/dd0114_06_14_rinke.pdf (letzter Zugriff am 19.08.2014)
 30. Schomaker-Massing S: Vergleichende Untersuchung zur Anwendung von lokal wirksamen Hämostyptica in der zahnärztlichen Praxis im Bereich der konservativen und prothetischen Behandlungsspektren. Dissertationsschrift der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (2011), http://www.diss.fu-berlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FU-DISS_derivate_00000009801/Schomaker-Massing.pdf?hosts= (letzter Zugriff am 19.08.2014)
 31. Sikora C: Einfluss von Rezepturverbesserungen auf die Zytotoxizität von Nasalia. Dissertationsschrift der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald (2003)
 32. Szep S, Kunkel A, Ronge K, Heidemann D: Die zelluläre Verträglichkeit moderner zahnärztlicher Komposite in humanen Gingivafibroblastenkulturen. *Dtsch Zahnärztl Z* 2000; 56: 598–602
 33. Tardy SJ, Bowles WH, Chambless LA: Clinical evaluation of Visine as a gingival retraction agent. *J Dent Res* 1990; 69: 250
 34. Tarighi P, Khoroushi M: A review on common chemical hemostatic agents in restorative dentistry. *Dent Res J* 2014; 11: 423–8
 35. Tosches NA, Salvi GE: Methoden der gingivalen Retraction. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2009; 119: 121–129
 36. Wiegand A, Casoar C, Becker K, Werner C, Attin T: In-vitro-Untersuchung zur Zytotoxizität von Self-Etch-Adhäsivsystemen. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2006; 116: 614–621
 37. Woycheschin FF: An evaluation of the drugs used for gingival retraction. *J Prosthet Dent* 1964; 14: 769–776