Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde „Hans Moral“
Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. dent. Hermann Lang

Kontrollierte Freisetzung von Chlorhexidin aus alginatbasierten Mikropartikeln in der Parodontitistherapie

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin
der Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von
Malte Scholz, geb. 14.05.1984 in Berlin-Kreuzberg
aus Rostock

Jahr der Einreichung: 2019
Jahr der Verteidigung: 2020

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00002758

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Hermann Lang, Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: Prof. Rainer Bader, Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter: Prof. Thomas Hoffman, TU Dresden

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung 6

1.1 Epidemiologie und Definition der Parodontitis 6

1.2 Grundlagen der Therapie 7

1.3 Slow-Releasing-Devices 8

1.4 Zielsetzung 10

2 Material und Methoden 12

2.1 Materialienüberblick 12

2.1.1 Chlorhexidin 12

2.1.2 Alginat 12

2.1.3 Polymilchsäure 14

2.1.4 Referenzmaterialien 14

2.2 Partikelherstellung 15

2.2.1 Versuch I: Externe Gelation / Eintropftechink 15

2.2.2 Versuch II: Entwicklung des Ultraschallverfahrens 16

2.2.3 Versuch III: Interne Gelation / Emulsionsverfahren 21

2.3 Testung unterschiedlicher CHX Beladungsmöglichkeiten 23

2.3.1 Einrühren in Alginat 23

2.3.2 Testung CHX-Diacetat 24

2.3.3 Abbindereaktion durch CHX initiiert 24

2.3.4 Lagerung der Partikel in CHX 24

2.4 Mikroskopische Untersuchungen 25

2.4.1 ESEM 25

2.4.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen 26

2.5 Gefriertrocknung: 26

2.5.1 Trocknungsprozess 27

2.5.2 Quellverhalten 27

2.6 Untersuchungen zur Chlorhexidinfreisetzung 27

2.6.1 HPLC-Analysebedingungen: Chlorhexidindigluconat 28

2.6.2 Untersuchung der Stabilität von CHX in Kunstspeichel 29

2.6.3 Durchführung HPLC-Analyse allgemein 29

2.6.4 Screening 29

2.6.5 Freisetzungsverhalten unterschiedlicher Trägermaterialien 30

2.6.6 Freisetzungsverhalten unterschiedlicher CHX-Konzentrationen 30

2.6.7 Freisetzungsverhalten in Abhängigkeit der Beladungszeit in CHX 31

2.6.8 Freisetzungsverhalten von Partikelkombinationen 31

2.6.9 Definition von Betrachtungszeiträumen 32

2.7 Statistische Auswertung 32

3 Ergebnisse 33

3.1 Entwicklung des Ultraschallverfahrens 33

3.1.1 Partikelherstellung allgemein 33

3.1.2 Intensitätseinstellung 33

3.1.3 Rührgeschwindigkeit der $CaCl_2$-Lösung 33

3.1.4 Konzentration der Alginatlösung 34

3.1.5 Konzentration der $CaCl_2$-Lösung 36

3.2 Mikroskopische Untersuchungen 38

3.2.1 ESEM 38

3.2.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen 41

3.3 Gefriertrocknung 43

3.3.1 Quellverhalten 43

3.3.2 Lichtmikroskopie 45

3.4 Untersuchungen zur Freisetzung von Chlorhexidin 47

3.4.1 Untersuchung der Stabilität von CHX in Kunstspeichel 47

3.4.2 Screening: CHX-Freisetzung aus unterschiedlichen Alginatproben 48

3.4.3 Alginat und PLGA 49

3.4.4 Einfluss unterschiedlicher CHX-Konzentrationen 50

3.4.5 Einfluss von unterschiedlichen Beladungszeiten 52

3.4.6 Beurteilung der Referenzmaterialien 53

3.4.7 Kombination verschiedener Partikelgrößen 54

4 Diskussion 57

4.1 Partikelproduktion 57

4.1.1 Alginate und deren Verwendung als Drug-Delivery-Devices 57

4.1.2 Ultraschallaktivierte Herstellung 59

4.1.3 Beladung der Partikel mit CHX 60

4.2 Sulkusflüssigkeit 61

4.3 CHX-Freisetzungsverhalten 62

4.3.1 Vergleich der Biomaterialien PLGA und Alginat 62

4.3.2 Chlorhexidin zur lokalen Applikation 63

4.3.3 Vergleich der Referenzmaterialien 65

4.4 Vorteile und klinische Anwendungsmöglichkeiten des Alginatpartikelsystems 66

5 Zusammenfassung 69

6 Literaturverzeichnis 71

7 Anhang 80

7.1 Abbildungsverzeichnis: 80

7.2 Tabellenverzeichnis 84

7.3 Danksagung 85

7.4 Eidesstattliche Versicherung 86

7.5 Thesen 87

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Definition der Parodontitis

Gingivitis und Parodontitis zählen zu den häufigsten infektiösen Erkrankungen weltweit. Um die Größenordnung zu verdeutlichen: In den Vereinigten Staaten von Amerika sind 46 % aller Erwachsenen über 30 Jahren (entsprechend 64,7 Millionen Personen) von einer Parodontitis betroffen[1], in Deutschland leidet nahezu jeder zweite (52 %) junge Erwachsene im Alter von 35-44 Jahren an einer parodontalen Erkrankung.[2] Schwere Verlaufsformen mit Zahnfleischtaschen über 6 mm Sondierungstiefe (ST) zeigen hierbei eine Prävalenz von 10 % bis 15 % weltweit.[3]
Aufgrund der mit dem demografischen Wandel einhergehenden Alterung der westlichen Gesellschaften und zunehmender Evidenz für Zusammenhänge zwischen Parodontitis und anderen systemischen Erkrankungen, wie Diabetes mellitus und Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wird vielfach ein steigender Therapiebedarf prognostiziert.[2], [4]–[6]

Parodontale Erkrankungen sind klinisch mit dem Vorhandensein bakterieller Plaque sowie mit Entzündungen und dem Verlust parodontaler Stützgewebe definiert.[7] Die Parodontitis wird hierbei als eine multifaktorielle chronisch-entzündliche Erkrankung mit assoziierter dysbiotischer bakterieller Plaque definiert. Sie geht mit einer fortschreitenden Destruktion des Zahnhalteapparates einher und kann final in Zahnverlust resultieren.[8]
Parodontale Gesundheit beschreibt im Umkehrschluss die Abwesenheit von klinisch erkennbarer Entzündung und gilt somit als Ziel der Parodontitistherapie.[9]

In der Mundhöhle können beim gesunden Erwachsenen etwa 500-700 unterschiedliche Bakterienarten gefunden werden, von diesen sind bei weitem nicht alle pathogen.[10], [11] Besonders das Auftreten gram-negativer Bakterien und eine geringe Diversität an Bakterienspezies sind mit dem Vorhandensein einer Parodontitis und parodontalen Gewebeabbau

korreliert.[11] Nach der Adhäsion und Formation eines bakteriellen Biofilms auf der Wurzeloberfläche stimulieren die Bakterien eine entzündliche Immunantwort und proteolytische Enzyme werden sezerniert. Ein Abbau von parodontalen Stützgeweben und der Bildung von Zahnfleischtaschen sind die Folge.[12] Neuere Studien konnten zeigen, dass insbesondere eine Dysbiose des bakteriellen Biofilms mit dem Fortschreiten der Parodontitis korreliert.[11] Darüber hinaus spielt auch das Vorhandensein von genetischen und *life-style*-Risikofaktoren eine Rolle bei der Ausprägung des Schweregrades der Parodontitis.[13]

1.2 Grundlagen der Therapie

Ziel derzeitiger Therapieformen ist eine langfristige Reduktion der bakteriellen Besiedlung und der daraus resultierenden Entzündung. Hierfür sind Maßnahmen wie die Optimierung der Mundhygiene und die mechanische Reinigung der Wurzeloberflächen verbreiteter Standard. Zusätzlich können unterschiedliche chemische Substanzen wie Antibiotika und Desinfektiva, sowie physikalische Methoden, beispielsweise der Einsatz eines Lasers, den therapeutischen Effekt und das regenerative Potential verstärken.[14] Die Therapie fortgeschrittener parodontaler Läsionen (ST ≥ 6mm) erfordert häufig chirurgische Interventionen. Bei extremer Schädigung kann schließlich auch eine Extraktion des betroffenen Zahnes unumgänglich sein.[15], [16]

Seit mehr als 45 Jahren finden Chlorhexidin (CHX) und dessen Derivate (-digluconat und -diacetat) als Desinfektiva erfolgreich Einsatz in der (Zahn-) Medizin. Gute Voraussetzungen für die intraorale Anwendung ergeben sich vor allem durch das breite Wirkspektrum, ein günstiges Nebenwirkungsprofil und die ausbleibende Triggerung bakterieller Resistenzen.[17]
Chlorhexidindigluconat gehört zu den am weitreichendsten untersuchten Desinfektiva. Es zeigt in der Mundhöhle eine effektive desinfizierende Wirkung gegen gram-positive und negative Bakterien und wirkt zusätzlich fungizid.[18] Die Verwendung in der Zahnmedizin reicht von der prophylaktischen prä- und postoperativen Desinfektion bis hin zum

therapeutischen Einsatz in der Parodontitistherapie. Hierfür sind unterschiedliche Applikationsformen erhältlich mit CHX-Konzentrationen von 0.05 % bis zu max. 20 %.[18]

1.3 Slow-Releasing-Devices

Für eine langwirksame Medikation und Applikation eines Medikaments in der Zahnfleischtasche wurden so genannte „Slow-Releasing-Devices“ (SRD) oder auch „Drug-Delivery-Devices“ (DDD) entwickelt und klinisch etabliert.[19]–[21] Hierbei unterscheidet man „Suistained-Delivery-Devices“ (SDD), welche einen Wirkstoff innerhalb von 24 h abgeben, von „Controlled-Delivery-Devices“ (CDD) mit einer Freisetzungsdauer von über 24 h.[22]
Wichtige Anforderungen an SRD sind:

1. Das Erreichen einer wirksamen Konzentration in der parodontalen Tasche,
2. ein ausreichende Menge und Reservoirwirkung des Wirkstoffs, um die wirksame Konzentration über den gewünschten Zeitraum aufrechtzuerhalten sowie
3. eine einfache Applikation und gute Stabilität in der Tasche.[22]

Der Entwicklung eines optimalen Trägersystems liegen folgende Überlegungen zugrunde:
SRD bestehen aus biodegradierbaren Materialien, welche einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Immunantwort haben.[22] In der Medizin werden verschiedenste Materialien als Medikamententräger eingesetzt, z. B. Milchsäurederivate (PLGA und PLA), Hyarulonsäuren, Gelatine, Chitosane oder Alginate. Diese Substanzen werden je nach Indikation und Wirkungsort gemäß ihrer speziellen Charakteristika eingesetzt.[23]–[25]

Für die Parodontitistherapie ist eine mechanische Stabilität der Trägerstoffe in der Tasche nötig. Greenstein *et al.* beschreiben hier einen Vorteil von Präparaten, die sich ausdehnen, die Form der parodontalen Tasche annehmen und in der Form über einen Zeitraum stabil bleiben.[22]

Dazu zählen Alginate, natürliche Polymere gewonnen aus Braunalgen. Aufgrund ihrer günstigen Biokompatibilität, Biodegradierbarkeit, ungiftigen Abbauprodukte und guten Verfügbarkeit finden sie bereits einen weiten Einsatz in der Lebensmittelindustrie und in der Medizin.[25]–[27] Das Spektrum reicht hier von dem Einsatz für die Wundheilung[25], als Drug-Delivery-System[25], [27]–[30], bis zur Zell- und Bakterien Verkapselung[31]–[34] für regenerative Therapien und zum Transport von Proteinen[25]. Häufig werden sie mit weiteren biologisch degradierbaren Materialien und Hydrogelen wie Chitosan und Hyaluronsäure kombiniert und funktionalisiert. Die Wahl der Applikationsformen ist ebenfalls vielseitig, anwendungsabhängig und reicht von Nanopartikeln über Mikropartikeln bis zu Fasern und Membranen.[25], [29], [30], [35]–[37]

In der Zahnmedizin werden Alginate aufgrund ihrer Formstabilität und eines kostengünstigen Einsatzes seit Jahrzehnten zur Herstellung von Abformungen verwendet. Jedoch finden sie auch vermehrt Einzug in den Bereich der Medikamentenapplikation in der Mundhöhle, wie zum Beispiel von Silva *et al.* beschrieben wird.[38] Gerade mit Mikropartikeln könnte eine gute Verteilung, bei gleichzeitigem hohen Wirkstoffangebot, in der Zahnfleischtasche gegeben sein.

Ein bereits weit untersuchtes CDD ist ein gelatinebasierter CHX-haltiger Chip (Periochip), welcher in eine tiefe parodontale Tasche appliziert wird und über sieben Tage CHX *in vivo* abgeben soll.[39] Die Größe des Chips limitiert jedoch den Einsatz für schwere Formen der Parodontitis mit deutlich erhöhten Sondierungstiefen. Ein prophylaktischer Einsatz bei moderaten und leichten Formen kann auf Grund kleiner Taschenformationen nicht stattfinden. Daher würde ein spritzbares, flüssiges und sich verteilendes Material bei weiteren Indikationen eher eingesetzt werden können(vergleiche Abb. 51). Spritzbare SRDs sind erhältlich zur Applikation von Doxyzyklin (Ligosan), Metronidazol (Elyzol), aber auch CHX (Chlosite).
Im Laufe der letzten Jahre gab es eine hohe Anzahl verschiedener SRD mit hauptsächlich antibiotischen Wirkstoffen. Hier sind Tetrazyklin, Metronidazol, Minozyklin und Doxyzyklin zu nennen.[20] Diskutiert wird jedoch die

Wirksamkeit auf komplexe Biofilme, wie sie in einer tiefen Zahnfleischtasche vorhanden sind.[40] Dies ist gerade bei lokal angewendeten Antibiotika als kritisch zu betrachten, da somit eine erhöhte Gefahr der Resistenzbildung besteht.[41]

Die Freisetzungsdauer steht im Zusammenhang mit dem Wirkungseintritt des pharmakologischen Effektes eines applizierten Medikaments. So wirkt CHX beispielsweise direkt an den Zellwänden der Bakterien und somit deutlich schneller als z.B. Tetrazykline, welche die Proteinsynthese inhibieren. Hierfür bedarf es demnach einer längeren Wirkungsperiode.[22]

Klinisch erfolgreich eingesetzt werden dentale Drug-Delivery-Systeme häufig in Kombination mit einer mechanischen Reinigung der Wurzeloberflächen. Es werden hierbei mehr parodontale Strukturen regeneriert und Sondierungstiefen verringert, als dies bei einer mechanischen Reinigung allein geschieht.[21], [42] Ein prophylaktischer Nutzen der Applikation von antibakteriellen Drug-Delivery-Systemen im Rahmen der unterstützenden Partodontitistherapie wurde von Tonetti *et al.* gezeigt.[43]

Bei der Behandlung von parodontalen Taschen muss überdies ein weiterer, entscheidender Faktor berücksichtigt werden. Aus der Zahnfleischtasche wird kontinuierlich die Sulkusflüssigkeit sezerniert. Diese gilt als Serumexsudat, wirkt als Schutzmechanismus und beinhaltet Abwehrmoleküle und Zellen.[44] Die sogenannte Sulkusflüssigkeits-Fließrate (SFFR) nimmt mit steigender lokaler Entzündung zu und reduziert als Nebeneffekt die Konzentration von lokal applizierten Medikamenten.[45] Die Sulkusflüssigkeit wird nach Goodson *et al.* in einer 5 mm tiefen Zahnfleischtasche bis zu 40 mal pro h erneuert.[46]

1.4 Zielsetzung

Keine der existierenden Applikationsformen kann zum jetzigen Zeitpunkt alle oben dargestellten Anforderungen erfüllen. Daher ist die Entwicklung eines einfach zu applizierenden biodegradierbaren Trägersystems, welches

Medikamente – unabhängig von der Ausdehnung einer parodontalen Tasche – über eine vorhersehbare Zeit und in einer ausreichenden Menge abgibt, notwendig. Auf Grundlage dieser Arbeit sollte im Idealfall die Entwicklung einer effektiven, nebenwirkungsarmen und leicht zu applizierenden adjunktiven Parodontitistherapie, die sich klinisch optimal in bestehende Abläufe integrieren lässt, möglich sein.

Die Verwendung von alginatbasierten Mikropartikeln könnte hierbei die beschriebenen Anforderungen erfüllen. Sie sind biokompatibel und biodegradierbar. Außerdem zeigen sie eine gute Verteilung. Bei ausreichender Menge an Trägermaterial sind wirksame Konzentrationen der Medikamente realisierbar. Durch Vernetzung könnte die Stabilität in der Zahnfleischtasche erhöht werden und somit könnten die Freisetzungszeiten verlängert werden.

Um dies zu erreichen, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Freisetzungsverhalten von CHX aus alginatbasierten Mikropartikeln hinsichtlich einer Eignung als Drug-Delivery-System im Rahmen der Parodontitistherapie untersucht.

2 Material und Methoden

In diesem Teil werden die Reagenzien und die Untersuchungsmethoden erläutert. Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Herstellungssysteme werden im Ergebnisteil ausführlich erörtert.

2.1 Materialienüberblick

2.1.1 Chlorhexidin

Chlorhexidin ist ein vielseitig eingesetztes Desinfektivum. Es handelt sich hierbei um ein spiegelsymmetrisches Molekül mit zwei Benzolringen, welches in wässriger Lösung zweifach positiv geladen ist. Chlorhexidin selbst ist schlecht wasserlöslich, die handelsüblich verwendeten Formen Chlorhexidindigluconat und Chlorhexidindiacetat zeigen allerdings eine gute Wasserlöslichkeit.

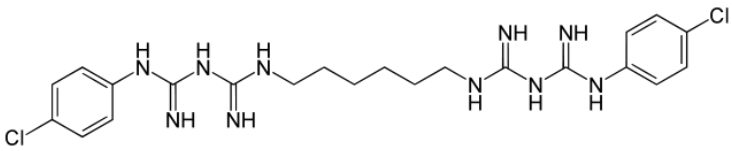


Abbildung 1: Strukturformel von Chlorhexidin

Chlorhexidin weist eine bakteriostatische und in höheren Dosen – durch die Zerstörung der Zellmembranen – eine bakterizide Wirkung auf.[18] Die desinfizierende Wirkung erstreckt sich auch auf Pilz- und Virusinfektionen. Über die positive Ladung haftet Chlorhexidin langfristig auf den negativ geladenen Oberflächen von Zähnen und Schleimhäuten. Diese sogenannte Substantitivtät bedingt eine verlängerte Wirkdauer in der Mundhöhle im Vergleich zu anderen Präparaten.[18], [47] Eine Inaktivierung ist in Gegenwart von anionischen Molekülen zu beobachten. Eine Metabolisierung im Gastrointestinal-Trakt erfolgt nicht und wird vollständig wieder ausgeschieden.

2.1.2 Alginat

Alginate sind die Salze der Alginsäuren, β-D-Mannuronat und L-Gulloronat, welche über β-1,4 bzw. α-1,4-glycosidisch verbunden sind. In der Natur

werden sie von Braunalgen produziert und in diesen als Strukturbildner der Zellwände vorgefunden. Zahlreiche Anwendungen finden Alginate in der Lebensmittel-, sowie der Pharma-, und Kosmetikindustrie. Die am häufigsten verwendeten Alginate sind derzeitig Natrium- (E 401), Calcium- (E 404), Kalium- (E 402), Ammonium- (E 403), und Propylenglycolalginat (PGA, E 405).

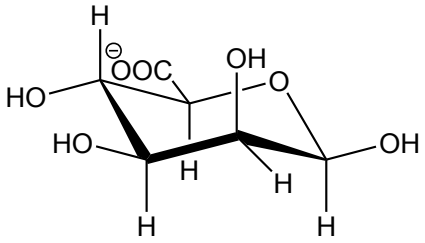


Abbildung 2: Strukturformel von Mannuronat

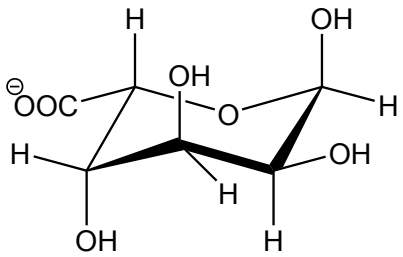


Abbildung 3: Strukturformel von Guloronat

Die Polymerketten setzen sich aus verschiedenen Blöcken und Sequenzen der Mannuron- (M) und Gulloronsäuren (G) zusammen. Mögliche Kombinationen sind hierbei MM-, GG-, GM- und MG-Blöcke, welche je nach Braunalgenart unterschiedlich sind.

Natriumalginat, aus der Gruppe der Alkalialginate, ist wasserlöslich und bildet in Gegenwart von Wasser eine Sole. Diese Eigenschaft findet Verwendung als Emulsions- und Suspensionsstabilisator.

Die Anwesenheit von multivalenten Ionen wie Ca^{2+}, Fe^{3+} oder Ba^{2+} initiiert die Neuanordnung der Polyguloronatsequenzen und führt somit zu einer Verfestigung der Sole und somit zu der Ausbildung von Gelen.

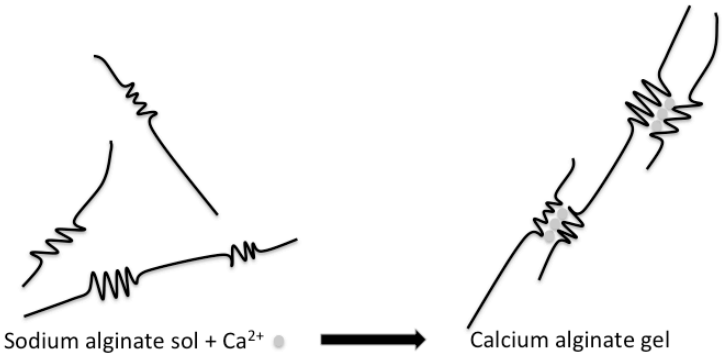


Abbildung 4: Alginat-Abbindereaktion [48]

Eine einfache und häufig angewendete Methode kugelförmige Partikel herzustellen, ist die externe Gelbildung. Wird wie bei der Eintropftechnik eine Alginatlösung über eine Kanüle in eine $CaCl_2$-Lösung getropft, beginnt bei Kontakt des Alginats mit der $CaCl_2$-Lösung die Abbindereaktion des Alginats. Es bildet sich eine ionenpermeable Membran an der Oberfläche aus Calciumalginat. Der noch flüssige Kern aus Natriumalginat verfestigt sich fortlaufend durch Diffusion der Ca^{2+}-Ionen zu einer vollständigen Matrix aus Calciumalginat.

Stoffe, die sich in der Alginatlösung befinden, werden somit in der Kapsel eingeschlossen und immobilisiert, wie z.B. Chemikalien, Medikamente, Bakterien oder Zellen.

2.1.3 Polymilchsäure

Als Alternative zu dem Alginat sollte ein weiteres biodegradierbares Material getestet werden. Hierfür wurden von der Firma Micromod GmbH (Warnemünde, Deutschland) Polymilchsäure (PLGA) basierte Partikel der Größe 50 µm erworben und für die Testung verwendet. Diese Partikel wurden in einem Emulsionsverfahren hergestellt.

2.1.4 Referenzmaterialien

Als weitere Referenzmaterialen wurden zwei klinisch eingesetzte, CHX-freisetzende Produkte käuflich erworben und verwendet.

Bei dem Periochip (Dexcel-Pharma, Alzenau, Deutschland) handelt es sich um ein biodegradierbares Slow-Releasing-Device, basierend auf Gelatine, mit einer Größe von 5 mm x 4 mm x 0.35 mm und einem Gewicht von 7 mg. Über einen Zeitraum von bis zu sieben Tagen soll dieser Chip bis zu 2.5 mg CHX (33 % Gewichtsanteil) freisetzen. Der Gelatinechip wird in der klinischen Anwendung in eine parodontale Zahnfleischtasche appliziert.[39]
Das zweite Referenzprodukt Chlosite (Ghimas, Casaleccio di Reno, Italien) ist ein 0.5 %-Chlorhexidindigluconat und 1.0 %-dihydrochlorit-haltiges Xanthan-Gel. Der klinische Einsatz erfolgt ebenfalls im Rahmen der Parodontitistherapie und wird in die parodontale Tasche appliziert und soll laut Hersteller über einen Zeitraum von bis zu 3 Wochen CHX freisetzen.

2.2 Partikelherstellung

2.2.1 Versuch I: Externe Gelation / Eintropftechink

Materialien:

- Natriumalginat Lösungen (1 %, 2 %, 3 %, 4 %) für mindestens 24 h unter ständigem Rühren in H_2O (aqua dest) gelöst. (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)
- 2%ige $CaCl_2$-Lösung (200 ml) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)
- Magnetrührer (VWR international GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Becherglas 500 ml
- Einwegspritze 20 ml (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Kanülen mit 0.2 mm, 0,4 mm und 0,8 mm Innendurchmesser (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

Durchführung:

Bei der Eintropftechnik werden über eine dünne Kanüle einzelne flüssige Natriumalginattropfen in eine 2%ige Calciumchloridlösung eingetropft. Dies geschieht unter stetigem Rühren. In der $CaCl_2$-Lösung findet ein Austausch von Natrium- und Calciumionen statt, welches zur Verfestigung der Alginatketten und somit der Partikel führt. Um ein vollständiges Durchhärten zu erreichen, werden die Partikel für 20 min in der Lösung belassen.

Es wurden verschieden konzentrierte Alginatlösungen (1 %, 2 %, 3 %, 4 %) und unterschiedlich dicke Kanülen verwendet, um den Einfluss auf Größe und Form der Partikel zu untersuchen.

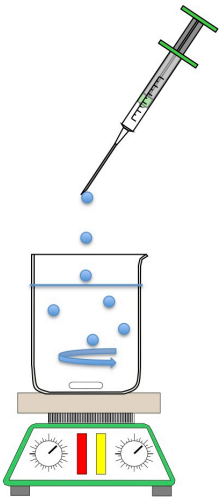


Abbildung 5: Darstellung Eintropftechnik

Die oben beschriebene Methode dient zur Herstellung von Alginatpartikeln mit einem Durchmesser von ca. 2 mm. Partikel mit einem Durchmesser von 2 mm sind für den Einsatz als Delivery-System auf Grund der Größe in einem parodontalen Defekt nicht geeignet. Daher musste das Verfahren so modifiziert und weiterentwickelt werden, dass möglichst kleine Partikel hergestellt werden können.

Eine Verkleinerung der Tropfengröße war daher erforderlich. Einfachste Versuche wie Verkleinerung der Kanülendurchmesser zeigten auf Grund der Oberflächenspannung keine erfolgreiche Verkleinerung der Partikel. Eine mechanische Verkleinerung führte zu unregelmäßig und irregulär geformten Partikeln. Daher wurde dieses Verfahren für die weiteren Versuche vernachlässigt und eine alternative Herstellungsform getestet.

2.2.2 Versuch II: Entwicklung des Ultraschallverfahrens

2.2.2.1 Ultraschall:

Ultraschall wird schon seit längerer Zeit verwendet, um Flüssigkeiten zu zerstäuben.[49] Der Effekt der Ultraschallzerstäubung wird in verschiedenen Verfahren industriell genutzt und stellt eine Möglichkeit zur Herstellung von Tropfengrößen im Mikrometerbereich dar.[50]

In der Zahnmedizin werden sowohl magnetostriktive, als auch piezo-elektrische Ultraschallaufsätze eingesetzt. Die Einsatzbereiche reichen von der Zahnsteinentfernung bis zur Kavitätenpräparation im Schmelz. Bei der Benutzung wird Wasser zur Kühlung beigefügt. Durch die Schwingungsenergie entsteht ein feiner Sprühnebel an dem Ultraschallaufsatz.

Dieser Effekt sollte genutzt werden, um kostengünstig Alginatpartikel im Mikrometerbereich herzustellen.

In ersten Vorversuchen zeigte sich ein Zerstäuben der viskösen Alginatlösungen mit einer Konzentration bis zu 3 % bei der Verwendung eines E.M.S.–Ultraschallaufsatzes (Electro Medical Systems S.A., Schweiz) zur Zahnsteinentfernung. Mittels einer Kanüle wurde das Alginat auf die Ultraschallspitze appliziert und vernebelt.

2.2.2.2 Materialien:

- Ultraschallgerät E.M.S. mit Prophylaxe Handstück (Electro Medical Systems S.A., Schweiz)
- Magnetrührer (VWR international GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Bechergläser 500 ml
- Schlauchpumpe mit Schlauch (3 mm Innendurchmesser)(B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Kanüle mit Durchmesser von 0,4 mm (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

2.2.2.3 Reagenzien:

- Natriumalginat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)
- H_2O
- $CaCl_2$ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)

2.2.2.4 Versuchsdurchführung

Es wurde ein Prophylaxe-Ultraschallgerät der Firma E.M.S. mit einem einfachen Prophylaxeaufsatz zur Entfernung von Zahnstein verwendet. Das Ultraschallgerät wurde im Dry-Modus betrieben und auf maximale Leistung eingestellt (Herstellerangabe: Maximale Ausgangsleistung 8 W und Frequenz 32 kHz).

Zur Herstellung der Alginatlösungen wurde je nach gewünschter Konzentration Natriumalginat in H_2O über Nacht gelöst (min. 12 h). Über eine Schlauchpumpe wurde die Alginatlösung langsam über eine Kanüle mit einem Innendurchmesser von 0.4 mm (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) an die Spitze des aktivierten Ultraschallaufsatzes geführt. Der dort entstandene Sprühnebel fiel in eine 2%ige $CaCl_2$-Lösung, welche mittels magnetischem Rührstab (300 rpm) gerührt wurde. Der Abstand des Aufsatzes zur Oberfläche der $CaCl_2$ Lösung betrug 3 cm. Die Tropfen begannen bei Eintritt in die $CaCl_2$-Lösung die Polymerisation durch Austausch der Na- durch Ca-Ionen (siehe 1.1.4.). Die Partikel wurden für weitere 20 min in der $CaCl_2$ Lösung belassen und weiter gerührt, um ein vollständiges Durchhärten der Partikel zu erreichen. Danach wurden die Partikel zweifach mit Aqua dest. gewaschen und mittels Zentrifugation (2000 rpm für 3 min) von der flüssigen Phase getrennt. Die Lagerung erfolgte in Aqua dest.

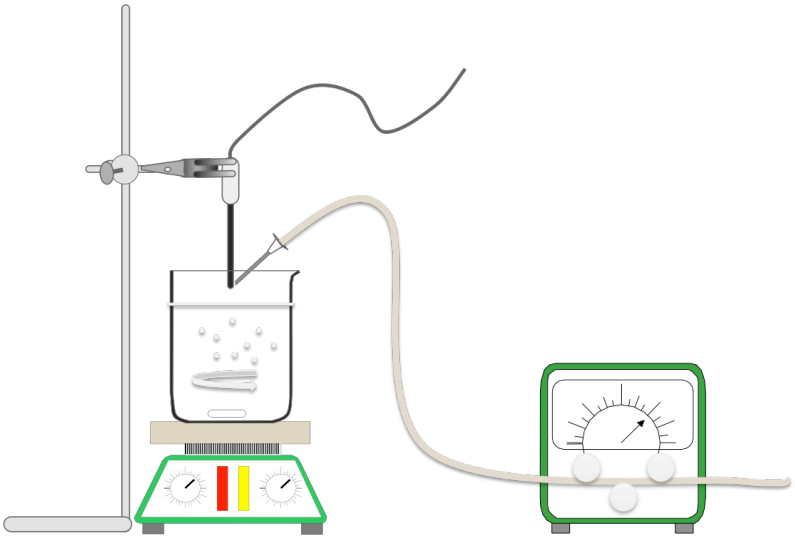


Abbildung 6: Versuchsaufbau zur Herstellung von Alginatpartikeln mittels Ultraschall-Methodik

Die möglichen Einflüsse veränderbarer Faktoren wie Intensitätseinstellung, Viskosität der Alginatlösung, die Konzentration der $CaCl_2$-Lösung und die Rührgeschwindigkeit des Magnetrührers wurden untersucht. Hierzu wurden mit den jeweils folgenden Variablen und dem oben beschriebenen Prozedere Alginatpartikel hergestellt.

2.2.2.5 Intensitätseinstellung

Der Einfluss der Intensitätseinstellung (Herstellerangabe: Maximale Ausgangsleistung 8 W und Frequenz 32 kHz) des Ultraschallgerätes auf die entstehenden Partikel sollte hierbei untersucht werden. Drei unterschiedliche Intensitätsstufen (10 %, 50 % und 100 %) wurden gewählt

Probe	Intensität	Konzentration Alginat	$CaCl_2$-Konzentration	Rührgeschwindigkeit
1	10 %	2 %	2 %	300 rpm
2	50 %	2 %	2 %	300 rpm
3	100 %	2 %	2 %	300 rpm

Tabelle 1: Definition der Proben und Parameter zur Untersuchung des Einflusses der Intensitätseinstellung

2.2.2.6 Rührgeschwindigkeit der $CaCl_2$-Lösung

Drei unterschiedliche Rührgeschwindigkeiten wurden neben den festgelegten Bedingungen gewählt.

Probe	Intensität	Konzentration Alginat	$CaCl_2$-Konzentration	Rührgeschwindigkeit
1	100 %	2 %	2 %	100rpm
2	100 %	2 %	2 %	300 rpm
3	100 %	2 %	2 %	600 rpm

Tabelle 2: Definition der Proben und Parameter zur Untersuchung des Einflusses der Rührgeschwindigkeit

2.2.2.7 Viskositäten der Alginatlösung

Fünf unterschiedliche konzentrierte Alginatlösungen, 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, wurden bei maximaler Intensitätseinstellung des Ultraschallgerätes verwendet, um Partikel herzustellen.

Probe	Intensität	Konzentration Alginat	$CaCl_2$-Konzentration	Rührgeschwindigkeit
1	100 %	0,5 %	2 %	300 rpm
2	100 %	1 %	2 %	300 rpm
3	100 %	2 %	2 %	300 rpm
4	100 %	3 %	2 %	300 rpm
5	100%	4 %	2 %	300 rpm

Tabelle 3: Definition der Proben und Parameter zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Viskositäten

2.2.2.8 Konzentration der $CaCl_2$-Lösung

Die möglichen Einflüsse unterschiedlicher $CaCl_2$-Konzentrationen sollten untersucht werden.

Probe	Intensität	Konzentration Alginat	$CaCl_2$-Konzentration	Rührgeschwindigkeit
1	100 %	2 %	1 %	300 rpm
2	100 %	2 %	2 %	300 rpm
3	100 %	2 %	3 %	300 rpm

Tabelle 4: Definition der Proben und Parameter zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlich konzentrierter $CaCl_2$-Lösungen

2.2.2.9 Partikelanalyse:

Anschließend wurden alle Mikrokapseln mittels eines Durchlichtmikroskops (MIRAX MIDI, Carl Zeiss, Jena, Germany) mit einer 10- und 20-fachen Vergrößerung untersucht und auf Bildern digital festgehalten. Mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware (AxioVision Carl Zeiss, Jena, Germany) wurden die Partikel vermessen und analysiert. Sie wurden hierbei auf Größe, Homogenität und Form untersucht. Pro Probe wurden 100 Mikrokapseln von mindestens 10 Einzelbildern ausgewertet.

Die Größe wurde zur Auswertung in drei Stufen eingeteilt:

I) < 30 µm

II) 30-70 µm

III) > 70 µm

Die Form wurde eingeteilt nach:

I) rund
II) tropfenförmig
III) undefinierbar

Die Homogenität wurde in zwei Klassen eingeteilt:

I) homogen
II) inhomogen

2.2.3 Versuch III: Interne Gelation / Emulsionsverfahren

Bei der Herstellung der Alginatpartikel mittels Ultraschall, zeigte sich ein Größenspektrum von 30-150 µm. Da jedoch auch größere Partikel untersucht werden sollten, wurde ein weiteres Verfahren benötigt. Bei dem alternativ verwendeten Verfahren handelt es sich um ein modifiziertes Verfahren der internen und externen Gelbildung nach Poncelet.[51] Bei dem Verfahren der internen Gelation wird zu dem Alginat schwerlösliches Calciumcarbonat hinzugegeben. Über die spätere Zugabe von Eisessig werden dann die Calciumionen freigesetzt, welche die Gelbildung im Inneren der Alginattropfen initiieren. Diese Methode eignet sich besonders, um kugelförmige Partikel in einem Größenbereich von 100-800 µm herzustellen.[51]

2.2.3.1 Materialien:

- Magnetrührer (VWR international GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Bechergläser: 20 ml, 150 ml und 500 ml
- Gaze: Nylon 100 µm, Metall 200 µm, Metall 400 µm Maschenweite (Micromod GmbH, Warnemünde, Deutschland)

2.2.3.2 Reagenzien:

- Natriumalginat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland), mittels H_2O zu einer 2% und 3%igen Lösung angesetzt und über 24 h bei Raumtemperatur gelöst
- Keimöl (Mazola, Peter Kölln GmbH, Deutschland)
- Eisessig (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)
- Calciumcarbonatlösung (500 mM) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)

- Calciumchloridlösung (50 mM) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)
- Tween 20 1 % (Polysorbat) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland)

2.2.3.3 Partikelherstellung:

10 ml der Alginatlösung wurden mit 0,5 ml der Calciumcarbonatlösung (500 mM) vermischt. Das Alginat-Calciumcarbonat-Gemisch wurde mit 50 ml Öl in einem Becherglas (150 ml) mit einem Rührfisch für 15 min bei 500 rpm verrührt. Daraufhin wurden 10 ml Öl mit 40 µl Eisessig vermengt und unter weiterem Rühren der Emulsion hinzugefügt. Es wurden nun Ca^{2+}-Ionen aus dem schwerlöslichen Calciumcarbonat freigesetzt, welche die Gelbildung des Alginats von innen heraus initiieren. Nach fünf Minuten wurde die Öl-Partikel-Suspension unter leichtem Rühren zu 75 ml Calciumchloridlösung hinzugegeben.

Nach vollständiger Separierung der Öl-Phase durch Zentrifugation (2000 rpm für 3 min) wurde diese abgenommen. Die Partikel wurden nun gefiltert und mittels Gaze der Größe nach sortiert (A: <100 µm B: 100-200 µm und C: 200-400 µm D: >400 µm) und mit einer 1%igen Tween 20-Lösung gewaschen. Die Lagerung erfolgte in Aqua dest. Die Partikelherstellung ist in Abbildung 7 illustriert.

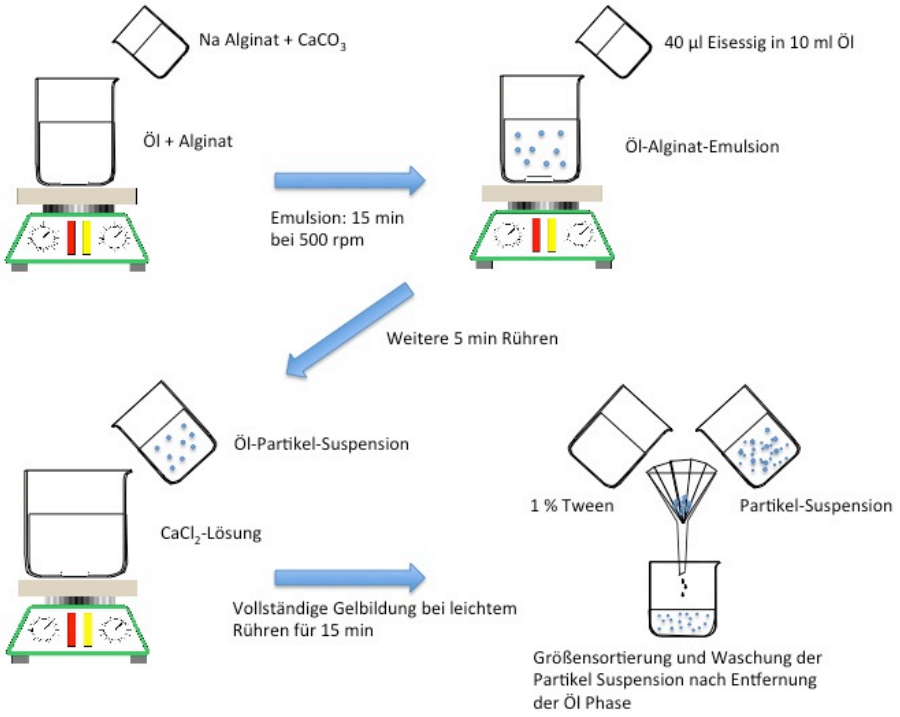


Abbildung 7: Darstellung des Emulsionsverfahren zur Herstellung alginatbasierter Mikropartikel. [48]

2.3 Testung unterschiedlicher CHX Beladungsmöglichkeiten

2.3.1 Einrühren in Alginat

Ein einfacher Weg Alginatpartikel mit Stoffen zu beladen, ist, diese mit der Natriumalginatlösung zu vermengen. Bei Kontakt mit einer $CaCl_2$-Lösung werden die eingebrachten Stoffe im Calciumalginat immobilisiert. Dies wurde mit dem Einrühren von 5 ml unterschiedlich konzentrierten CHX-Lösungen (0,2 %, 2 %, 10 % und 20 %) in jeweils 5 ml Natriumalginatlösung experimentell getestet. Hierbei zeigte sich eine verfrühte Abbindereaktion und Verklumpung des Alginats. Ein weiterer Einsatz der Lösungen war nicht möglich.

Zur Auswertung der verfrühten Abbindereaktion wurden je 10 ml Lösung mit einem CHX-Gehalt von 20 %, 10 %, 2 % und 0,2 % angesetzt. Dieser Lösung wurde jeweils 2%ige $CaCl_2$-Lösung dazugegeben.

Beobachtung: Je höher der CHX-Gehalt war, desto intensiver war eine Ausfällungsreaktion. Aufgrund der freien positiven Ladung des CHX kam es zu einer Abbindereaktion des Alginates (vergleiche 2.1.1 und 2.1.4).

2.3.2 Testung CHX-Diacetat

In einem zweiten Versuch sollte untersucht werden, ob es möglich ist pulverförmiges Chlorhexidindiacetat in die Alginatlösung einzubringen. Hierzu wurden 1 g und 0,1 g CHX-Diacetat jeweils auf 5 g Alginatlösung gegeben und mittels Speedmixer 3000 (Hauschild & Co.KG, Hamm, Deutschland) homogenisiert.

Sofort bei Kontakt des Pulvers mit der Alginatlösung bildete sich auch hier eine Kapsel, welche das Pulver vollständig umschloss. Selbst weitere Versuche, die Verklumpung mit einem Ultraschallmixer zu homogenisieren misslangen (Siehe Abbildung 8).

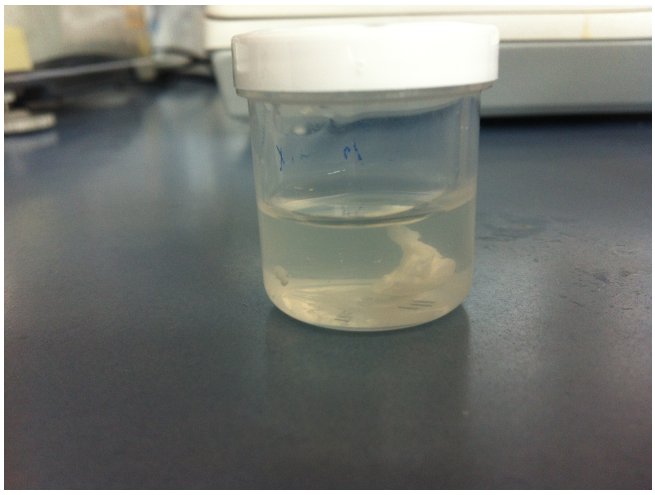


Abbildung 8: Einbringen von CHX-Diacetat in Alginat

2.3.3 Abbindereaktion durch CHX initiiert

Als weitere Möglichkeit der CHX-Beladung wurde das oben beschriebene Ultraschallverfahren modifiziert und die $CaCl_2$-Lösung durch unterschiedlich konzentrierte CHX-Lösungen (0,2 %, 2 %, 10 % und 20 %) ersetzt. Mit diesem Versuchsaufbau initiierte nun das Chlorhexidin bei Eintreffen der Alginattropfen die Gelbildung.

2.3.4 Lagerung der Partikel in CHX

Die Aufnahme von Chlorhexidin in die Partikel während der Lagerung in unterschiedlich konzentrierten Chlorhexidinlösung sollte untersucht werden. Diesbezüglich wurde die Untersuchung der Partikel mit der HPLC-Methode gewählt (siehe 2.6.6).

2.4 Mikroskopische Untersuchungen

Die Partikel wurden mikroskopisch auf Größe, Oberfläche, Form und Struktur untersucht. Die Untersuchung des Einflusses auf das Quellverhalten von unterschiedlichen Lagerungsmedien erfolgte ebenfalls.

2.4.1 ESEM

Es erfolgte eine rasterelektronenmikroskopische (REM) Untersuchung im ESEM (Environmental Scanning Electron Microscope) Modus. Hierbei ist der wesentliche Unterschied zu einem konventionellen REM ein geringeres Vakuum und somit ist ein Einbringen von nicht-vorbehandelten Proben möglich. In die Probenkammer des Mikroskops wurden je Durchgang sechs Proben gleichzeitig gegeben und mit 100facher, 200facher und 400facher Vergrößerung der Reihe nach untersucht.

Folgende Proben wurden untersucht:

Probe	Partikelart	Lagerungsmedium
1	Alginat 30-100 µm	H_2O
2	Alginat 30-100 µm	CHX (24 h)
3	Alginat US 30-100 µm gefriergetrocknet	trocken
4	Alginat US 30-100 µm gefriergetrocknet	CHX (24 h)
5	Alginat 100-200 µm	H_2O
6	Alginat 100-200 µm gefriergetrocknet	trocken
7	Alginat 100-200 µm gefriergetrocknet	CHX (24 h)
8	Alginat 100-200 µm	CHX (24 h)
9	Alginat 200-400 µm	H_2O
10	Alginat 200-400 µm gefriergetrocknet	trocken
11	Alginat 200-400 µm gefriergetrocknet	CHX (24 h)
12	Alginat 200-400 µm	CHX (24 h)

Tabelle 5: Definition der Proben der ESEM-Untersuchung; (US: Abkürzung für Herstellungsverfahren mittels Ultraschall)

In den resultierenden Bildern zeigten sich die eigentlich runden, nicht-getrockneten Partikel abgeplattet und zusammengefallen. Um Artefakte und Trocknungseffekte des Vakuums zu zeigen, wurden vier Proben erneut untersucht. Um mögliche Trocknungseffekte zu minimieren, wurde jede Probe nun einzeln in die Kammer eingebracht und schnellstmöglich untersucht.

Folgende Partikel wurden nun betrachtet:

Probe	Partikelart	Lagerungsmedium
1	Alginat US 30-100 µm	H_2O
2	Alginat 30-100 µm	H_2O
3	Alginat 100-200 µm	H_2O
4	Alginat 200-400 µm	H_2O

Tabelle 6: Definition der Proben zur Untersuchung von Trocknungseffekten im ESEM; (US: Abkürzung für Herstellungsverfahren mittels Ultraschall)

2.4.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Um die Partikel auch im feuchten Milieu und das Quellverhalten besser untersuchen zu können, wurden die Partikel mittels Auflichtmikroskopie (Stemi 2000, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) betrachtet. Hierzu wurden die Proben mit Lagerungsmedium auf einen Objektträger mit hinterlegter Skalierung (500 µm je Teilstrich) gegeben und mit einer bis zu 18-fachen Vergrößerung untersucht.

Probe	Partikelart	Lagerungsmedium
1	Alginat US 30-100 µm	H_2O
2	Alginat US 30-100 µm gefriergetrocknet	H_2O (1 h)
3	Alginat US 30-100 µm gefriergetrocknet	H_2O (24 h)
4	Alginat US 30-100 µm gefriergetrocknet	CHX (1 h)
5	Alginat US 30-100 µm gefriergetrocknet	CHX (24 h)
6	Alginat 100-200 µm	H_2O
7	Alginat 100-200 µm gefriergetrocknet	H_2O (1 h)
8	Alginat 100-200 µm gefriergetrocknet	H_2O (24 h)
9	Alginat 100-200 µm gefriergetrocknet	CHX (1 h)
10	Alginat 100-200 µm gefriergetrocknet	CHX (24 h)
11	Alginat 200-400 µm	H_2O
12	Alginat 200-400 µm gefriergetrocknet	H_2O (1 h)
13	Alginat 200-400 µm gefriergetrocknet	H_2O (24 h)
14	Alginat 200-400 µm gefriergetrocknet	CHX (1 h)
15	Alginat 200-400 µm gefriergetrocknet	CHX (24 h)

Tabelle 7: Definition der Proben für die Lichtmikroskopische Untersuchung; (US: Abkürzung für Herstellungsverfahren mittels Ultraschall)

2.5 Gefriertrocknung:

Um eine vereinfachte Lagerung, Verarbeitung und Einwaage der Partikel zu ermöglichen, wurden die Partikel nach Herstellung gefriergetrocknet. Nach

dem Trocknungsprozess sollte nicht nur die äußere Beschaffenheit, sondern auch das Quellverhalten in Wasser und CHX und eine möglicherweise damit zusammenhängende verbesserte CHX-Beladung untersucht werden.

2.5.1 Trocknungsprozess

Das Gefriertrocknen wurde an einem Rotations-Vakuum-Konzentrator SpeedDry 2-33 IR (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) mit den folgenden Einstellungen vorgenommen:

- Temperatur: 40 °C,
- Vakuum: 1,7 mbar,
- Drehzahl: 1500 U/min.

Um einen möglichst geringen Flüssigkeitsanteil in der Probe zu erhalten, wurden die Alginatpartikel zuvor von der Lösung durch Sieben mittels Gaze getrennt. Die Probe wurde dann für den Trocknungsprozess in ein offenes 15 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) gegeben und das Programm mit o. g. Parametern durchlaufen.

Probe	Partikelart	Lagerungsmedium
1	Alginat US 30-100 µm	H_2O
2	Alginat 30-100 µm	H_2O
3	Alginat 100-200 µm	H_2O
4	Alginat 200-400 µm	H_2O

Tabelle 8: Definition der Proben für den Gefriertrocknungsprozess; (US: Abkürzung für Herstellungsverfahren mittels Ultraschall)

2.5.2 Quellverhalten

Das Quellverhalten der Alginatpartikel wurde für Einlagerungszeiten von 1 h und 24 h in Wasser und Chlorhexidinlösung (20%ig) untersucht. Hierfür wurden die Partikel nach Einlagerung mittels Rasterelektronen- und Auflichtmikroskop begutachtet (siehe 2.4).

2.6 Untersuchungen zur Chlorhexidinfreisetzung

Die Freisetzung des Chlorhexidindigluconats aus den Proben wurde mittels High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) ermittelt. Es wurde ein HPLC-System der Knauer GmbH (Berlin, Deutschland) verwendet. Die

Freisetzung sollte in Kunstspeichel erfolgen. Dieser erwies sich jedoch aufgrund des Inhaltsstoffes Sorbinsäure, die als Konservierungsmittel dient, zunächst als ungeeignet. Die UV-Absorption des CHX hat ein Maximum bei 251 nm Wellenlänge, während Sorbinsäure ein Maximum von 264 nm aufweist. Um eine Überlagerung des CHX-Signals zu vermeiden, wurde Kunstspeichel ohne Sorbinsäure verwendet und die Freisetzung lieferte nun zuverlässig auswertbare Messwerte.

2.6.1 HPLC-Analysebedingungen: Chlorhexidindigluconat

Die folgenden Analysebedingungen des HPLC-Systems wurden in den weiteren Experimenten verwendet.

Säule:	Eurospher 100 C18, Körnung 5 µm, 250 x 4 mm ID
Mobile Phase:	Acetonitril/0,08M NaH_2PO_4 + 0,5% Triethylamin, pH 3,0 (350/650 v/v) isokratisch
Säulentemperatur:	20 °C
Flussrate:	1,0 ml/min
Detektion:	UV, 251 nm
Injiziertes Probevolumen:	20 µl
Retentionszeit:	ca. 5,2 min
Verdünnung:	1:1 Methanol
Kalibration:	10 mg Chlorhexidinacetat in 10 ml Reinstwasser per Ultraschall lösen
Kalibrationsstandards:	durch Verdünnung mit Kunstspeichel ohne Sorbinsäure zubereitet
Kalibrierter Messbereich:	0,2 – 20,0 mg/l

Tabelle 9: HPLC-Analysebedingungen zur Detektion von CHX

Der Kunstspeichel enthielt folgende Zusammensetzung:

Reagentien	**Gewicht pro 100 g**
Kaliumchlorid	0,12 g
Natriumchlorid	0,085 g
Natriumhydrogenphosphat	0,25 g
Sorbitol-Lösung 70%	4,3 g

Calciumchlorid-0,15%-Magnesiumchlorid-0,05%-Lösung	10 g
Carmellose-Natrium 400 (Blanose® 7MF)	0,5g
Wasser	84,645 g

Tabelle 10: Zusammensetzung des verwendeten Kunstspeichels ohne Sorbinsäure

2.6.2 Untersuchung der Stabilität von CHX in Kunstspeichel

In einem Vorversuch sollte die Stabilität der verwendeten CHX-Lösung untersucht werden. Dazu wurde eine Kunstspeichel-CHX-Lösung mit einer Konzentration von 8 µg/ml hergestellt. Die Lagerung der Proben (n=1) erfolgte in Dunkelheit bei Raumtemperatur (20 °C) und bei Körpertemperatur (37 °C). Extinktionswerte wurden bei t=0, t=2 d, t=3 d, t=4 d und t=7 d bestimmt.

2.6.3 Durchführung HPLC-Analyse allgemein

Zur Bestimmung der Freisetzung wurden die Proben in einem Eppendorfgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) zu je 10 mg eingewogen. Daraufhin wurden sie zu je 600 µl Kunstspeichel ohne Sorbinsäure gegeben, kurz mit einem Vortex-Gerät (VWR International GmbH, Darmstadt Deutschland) aufgewirbelt und dann bei 100 rpm und 37 °C auf den Schüttler gestellt und für den gewählten Zeitraum geschüttelt. Nach Ablauf der Zeit erfolgte eine Zentrifugation (2000 rpm für 3 min) und eine Entnahme des Mediums (Kunstspeichel mit jetzt gelöstem Chlorhexidin). Das Medium wurde mit Kunstspeichel und Methanol im Verhältnis 1:1 aufgefüllt und in der HPLC vermessen.

2.6.4 Screening

Nach Anpassung und Etablierung der HPLC-Methodik erfolgte ein erstes Screening der zuvor hergestellten Partikel. Eine Vielzahl verschiedener Partikel wurde mit geringer Probenzahl (n=1) über einen Zeitraum von bis zu 150 h untersucht. Es sollte untersucht werden, ob überhaupt CHX über einen längeren Zeitraum aus den Proben freigesetzt wird. Anhand dieser Untersuchung sollten später genauere Untersuchungen von geeignet erscheinenden Partikeln mit erhöhter Probenzahl und längeren

Freisetzungszeiträumen geplant werden. Die Freisetzungsmengen wurden über die Zeit festgehalten und kumulativ aufgetragen.
Untersucht wurden folgende Proben nach Lagerung in einer 20%igen CHX-Lösung über 24 h:

Probe	Probenkörper	Herstellung	Lagerungsmedium
1	Alginatblock Maße: 0,5 cm x 0,5 cm (n=1)	Gegossen aus 3% Na-Alginat, gehärtet mit 6%$CaCl_2$-Lösung	24 h in 20% CHX
2	Alginatpartikel 2%ig Größe: 100-200 µm (n=1)	Emulsionsverfahren	24 h in 20% CHX
3	Alginatpartikel 2%ig Größe: 200-400 µm (n=1)	Emulsionsverfahren	24 h in 20% CHX
4	Periochip® Dexcel Pharma (n=1)	7,4 mg Gelatine mit 2,5 mg CHX	

Tabelle 11: Definition der Proben für die Screeninguntersuchung zur Testung der CHX-Freisetzung aus Alginatpartikeln nach Lagerung in CHX für 24 h

2.6.5 Freisetzungsverhalten unterschiedlicher Trägermaterialien

Aufgrund der ersten Screeninguntersuchung sollten noch kleinere Partikel untersucht werden. Diese sollten auch mit einem alternativen Trägermaterial (PLGA) verglichen werden. Hierzu wurden mittels Ultraschalltechnik Alginatpartikel mit einer durchschnittlichen Größe von 50 µm hergestellt. Diese wurden mit gleich großen PLGA-Partikel (Durchmesser: 50 µm) der Firma Micromod GmbH (Warnemünde, Deutschland) untersucht.

Probe	Probenkörper	Herstellung	Lagerungsmedium
1-5 (n=5)	Alginatpartikel Ø 50 µm	Ultraschallverfahren (US)	24 h in 20% CHX
5-10 (n=5)	PLGA-Partikel Ø 50 µm	Emulsionsverfahren	24 h in 20% CHX

Tabelle 12: Definition der Proben zur Untersuchung der CHX-Freisetzung aus unterschiedlichen Biomaterialen

2.6.6 Freisetzungsverhalten unterschiedlicher CHX-Konzentrationen

Um einen möglichen Einfluss von unterschiedlichen CHX-Konzentrationen auf das Freisetzungsverhalten zu zeigen, wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen (20 % und 10 %) gewählt.

Probe	Probenkörper	Herstellung	Lagerungsmedium
1-5 (n=5)	Alginatpartikel Ø 50 µm	Ultraschallverfahren (US)	24 h in 20% CHX
5-10 (n=5)	Alginatpartikel Ø 50 µm	Ultraschallverfahren (US)	24 h in 10% CHX

Tabelle 13: Definition der Proben zur Untersuchung der CHX-Freisetzung aus unterschiedlich beladenen Alginatpartikeln

2.6.7 Freisetzungsverhalten in Abhängigkeit der Beladungszeit in CHX

Untersucht wurde das Freisetzungsverhalten von Alginatpartikel der Größe 200-400 µm. Beladungszeiten (t_B) der Partikel waren hierbei: 1 min, 30 min, 6 h, und 24 h mit jeweils fünf Proben pro Beladungsdauer (n=5).

Probe	Beladungszeit (t_B)	Probenkörper	Lagerungsmedium
1–5 (n=5)	1 min	Alginatpartikel: Ø 200-400 µm	20% CHX
6–10 (n=5)	30 min	Alginatpartikel: Ø 200-400 µm	20% CHX
11-15 (n=5)	6 h	Alginatpartikel: Ø 200-400 µm	20% CHX
16–20 (n=5)	24 h	Alginatpartikel: Ø 200-400 µm	20% CHX

Tabelle 14: Definition der Proben zur Untersuchung der CHX-Freisetzung aus unterschiedlich lang beladenen Alginatpartikeln

Die untersuchten Freisetzungszeiträume (t_F) betrugen 0,25, 0,75, 1,5, 3,6, 10, 17, 33, 57, 81, 105, 129, 153, 177, 201, 225, 249, 273, 369 und 393 h.

2.6.8 Freisetzungsverhalten von Partikelkombinationen

Nach Auswertung der oben genannten Untersuchungen wurden folgende Partikelkombinationen zur weiteren Testung gewählt:

Probe	Probenkörper	
1–5 (n=5)	50% Alginatpartikel: Ø 50 µm US	50% Alginatpartikel: Ø 200-400 µm
6–10 (n=5)	30% Partikel: Ø 50 µm US	70% Alginatpartikel: Ø 200-400 µm
11–15 (n=5)	Periochip/ Gelatinechip	
16–20 (n=5)	Chlosite/ Xanthan-Gel	

Tabelle 15: Definition der Proben zur Untersuchung der CHX-Freisetzung aus Partikelkombinationen und Referenzprodukten (US: Abkürzung für Herstellungsverfahren mittels Ultraschall)

Die oben angegeben Proben wurden in den Intervallen (t) von 0,25, 0,75, 1,5, 3,6, 10, 17, 33, 57, 81, 105, 129, 153, 177, 201, 225, 249, 273, 369 und 393 h untersucht.

2.6.9 Definition von Betrachtungszeiträumen

Um eine bessere Vergleichbarkeit der Freisetzungsprofile zu erhalten, wurden drei Zeiträume definiert. Dies ist eine initiale Freisetzungsphase (t_i=0-17 h), eine mittelfristige Phase (t_m=17-177 h) und eine langfristige Freisetzungsperiode (t_l=177-393 h). Diese Phasen orientieren sich an möglichen klinisch relevanten Einsatzphasen.

2.7 Statistische Auswertung

Die in den oben genannten Untersuchungen zur Freisetzung von CHX gewonnen Daten wurden mittels IBM SPSS Advanced Statistics 23.0 verarbeitet. Alle Werte werden als Mittelwert ± Standardabweichung (SD) für die genannte Anzahl an Proben (n) angegeben. Um unterschiedliche Probengruppen in Bezug auf Freisetzungsraten zu vergleichen, wurde eine nichtparametrische Varianzanalyse durchgeführt. Hierfür wurde der Kruskal-Wallis-Test (für >2 ungepaarte Proben), andernfalls der Mann-Whitney U-Test (two-sided) angewandt. Wenn möglich, wurden Untergruppen paarweise über die Verwendung des U-Tests verglichen. P-Werte <0,05 (Bonferroni-angepasst für Mehrfachtestung) wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung des Ultraschallverfahrens

3.1.1 Partikelherstellung allgemein

Mittels der gewählten Verfahren konnten unterschiedliche Partikel erfolgreich hergestellt werden. Die Partikel befanden sich hierbei in einem Größenbereich von 7-210 µm. Sie zeigten je nach Wahl der Versuchsparameter unterschiedliche Formen und Größen. Außerdem zeigte sich ein Einfluss der Parameter auf die Homogenität.

Das Hauptinteresse lag bei der Herstellung von möglichst homogenen Partikeln mit einer durchschnittlichen Größe von ca. 50 µm, da diese besonders geeignet zur Einbringung in die parodontale Tasche scheinen. Zur Klassifizierung wurden die oben genannten Größeneinteilungen (<30 µm, 30-70 µm und >70 µm) getroffen.

3.1.2 Intensitätseinstellung

Durch die Wahl unterschiedlicher Intensitätseinstellungen der Schwingungsenergie des Ultraschallgerätes sollte ein möglicher Einfluss auf die Partikelparameter gezeigt werden. Hierbei wurden drei Intensitätsstufen gewählt (10 %, 50 % und 100 %). Es konnte kein Einfluss der Intensitätsstufen auf die Partikelparameter gezeigt werden. Alle Intensitätsstufen produzierten annähernd homogene, gleichgroße und gleichförmige Partikel. Die Entwicklung eines Spraynebels scheint bei dem verwendeten Ultraschallgerätes mit einer Tropfengröße von ungefähr 7-210 µm unabhängig von der Intensitätseinstellung zu sein. Daher wurde die Intensität von 100 % gewählt und für die folgenden Untersuchungen als Standard definiert.

3.1.3 Rührgeschwindigkeit der $CaCl_2$-Lösung

In dem gewählten Geschwindigkeitsbereich von 100-600 rpm konnten ebenfalls keine Unterschiede bezüglich der Partikelform, -größe und -homogenität gezeigt werden. Bei einer Rührgeschwindigkeit von 300 rpm zeigte sich eine geringe Strudelbildung der $CaCl_2$-Lösung, so dass eine

einfache Versuchsdurchführung gegeben war. Daher wurde diese Rührgeschwindigkeit für die weiteren Untersuchungen verwendet.

3.1.4 Konzentration der Alginatlösung

Die unterschiedlichen Viskositäten der Lösungen ergaben sich aus dem prozentualen Anteil der Einwaage des Alginats. Besonders auffällig waren die Ergebnisse der 0,5%igen und der 4%igen Lösungen. Die Viskosität der 4%igen Lösung war deutlich zu hoch und es konnten keine Partikel mit ihr hergestellt werden. Die aufgebrachte Energie des Ultraschallaufsatzes reichte nicht aus, um ein Zerreißen der Alginatlösung zu erreichen und so einen Sprühnebel zu erzeugen. Auf die weitere Betrachtung dieser Konzentration wurde daher verzichtet.

Ein ebenfalls deutlich erkennbarer Effekt zeigte sich bei der Verwendung der 0,5%igen Lösung. Diese zeigte zu 95 % ungleichmäßig geformte Partikel (Abbildung 9 und 13). Ähnlich erzeugte die Verwendung der niedrigviskosen 1%igen Alginatlösung einen großen Anteil von unregelmäßig geformten Partikeln (65 %). Schon die 2%ige und 3%ige Lösung zeigte eine erhöhte Anzahl an runden Partikeln. Allerdings stieg mit steigender Konzentration auch die Anzahl der tropfenförmigen Partikel (Abbildung 13).

Bei der Betrachtung der Partikelgröße zeigte sich, dass die niedrigviskoseren Lösungen tendenziell ein unregelmäßigeres Größenspektrum erzeugten. So lag der Anteil der Partikel >70 µm bei der 0,5%igen Lösung bei 16 % und bei der 3%igen bei 0 %. Die 1%ige Lösung erzeugte nahezu gleichmäßig Partikel der Größen <30 µm (43%) und 30-70 µm (46%) (Abbildung 14).

Die Homogenität der Partikel nahm mit steigendem Alginatanteil zu. Mehr als die Hälfte der 0,5%igen Partikel (64 %) zeigten keine Einschlüsse, mit steigender Konzentration zeigte sich bei 2%iger und 3%iger Lösung eine Homogenität bis zu 80 % (Abbildung 15).

Die Partikelparameter sind also im wesentlichen abhängig von dem entstehenden Spraynebel. Bei einer hohen Viskosität reicht die Energie nicht aus ein Zerreißen der Lösung und somit eine Tropfenbildung zu erzielen. Bei zu geringeren Viskositäten werden unregelmäßige Partikelformen produziert. Die Energie zerstäubt hier die Lösung so stark, dass keine einheitliche Tropfenbildung vor Auftreffen in die $CaCl_2$-Lösung stattfindet.

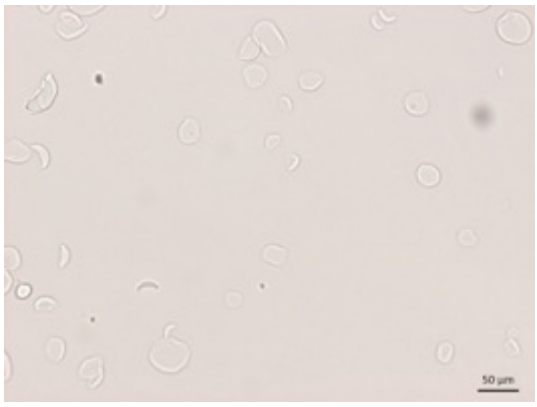


Abbildung 9: Lichtmikroskopische Aufnahme von Alginatpartikeln: Alginat 0,5 %, $CaCl_2$ 2 %

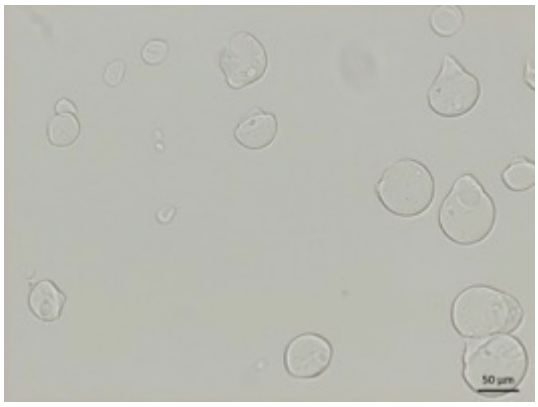


Abbildung 10: Lichtmikroskopische Aufnahme von Alginatpartikeln: Alginat 1 %, $CaCl_2$ 2 %

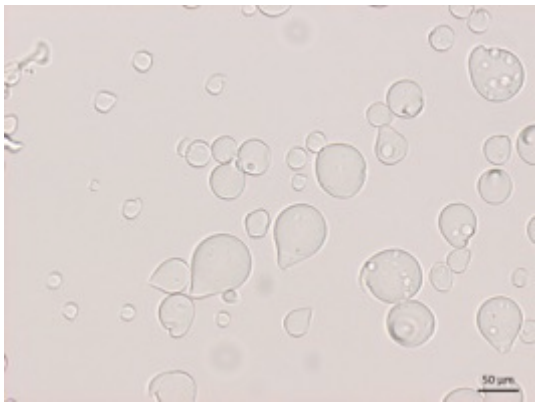


Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahme von Alginatpartikeln: Alginat 2 % $CaCl_2$ 2 %

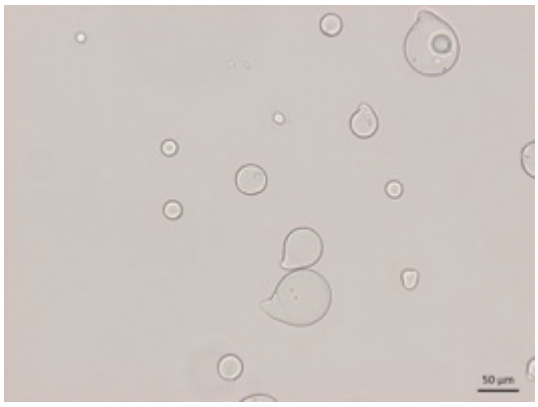


Abbildung 12: Lichtmikroskopische Aufnahme von Alginatpartikeln: Alginat 3 %; $CaCl_2$ 2 %

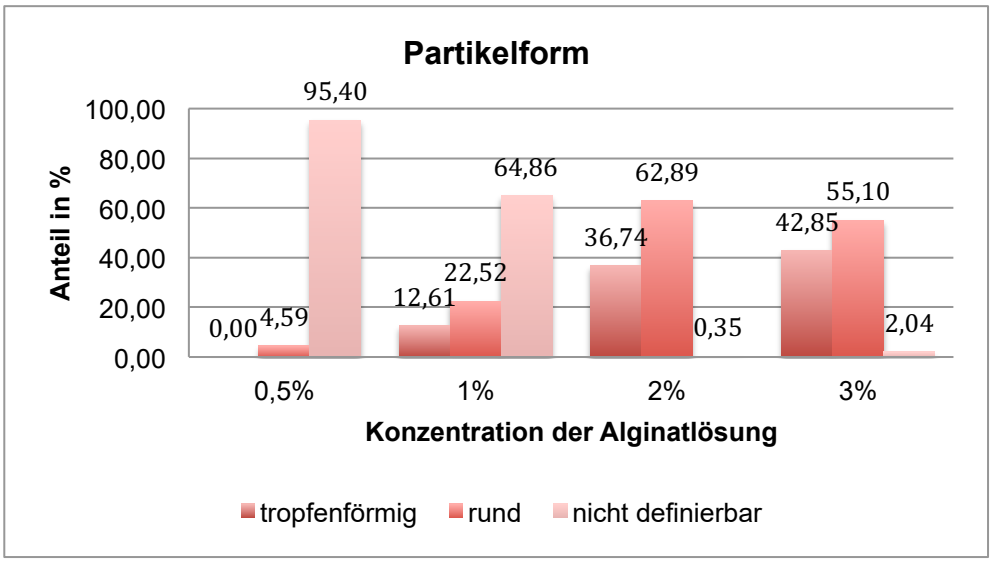


Abbildung 13: Auswertung Partikelform bei veränderter Alginatkonzentration

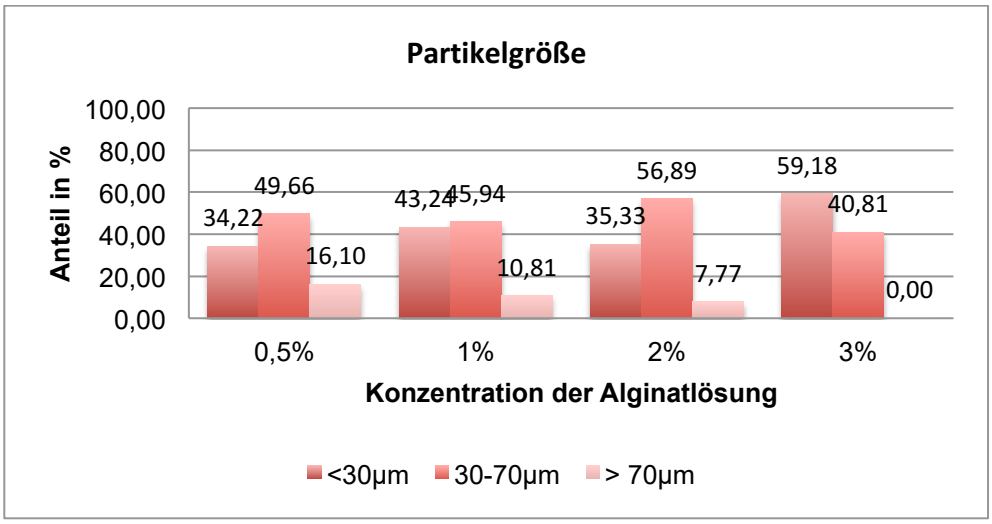


Abbildung 14: Auswertung Partikelgröße bei veränderter Alginatkonzentration

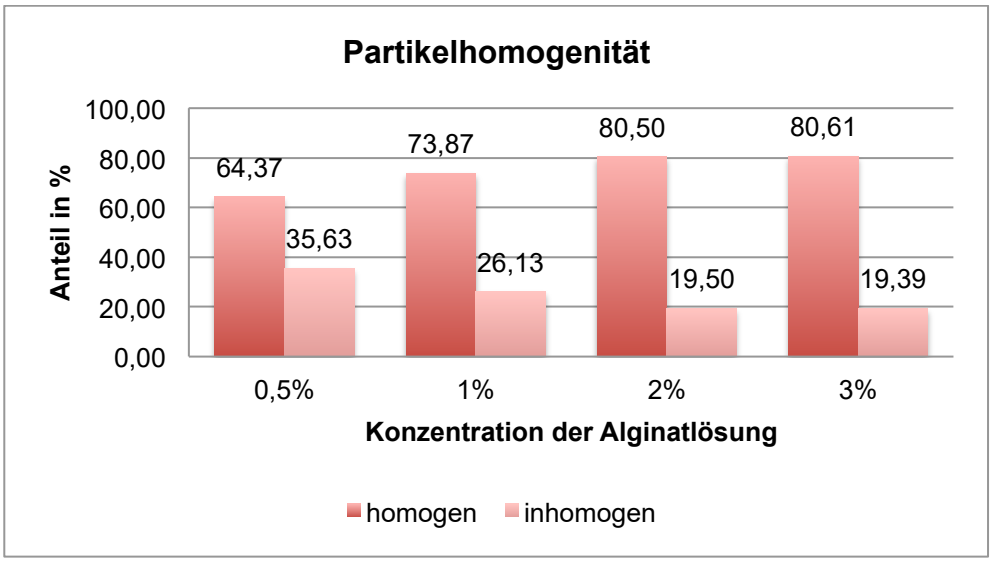


Abbildung 15: Auswertung Partikelhomogenität bei veränderter Alginatkonzentration

3.1.5 Konzentration der $CaCl_2$-Lösung

Die Partikelform ist ebenfalls von der verwendeten $CaCl_2$-Konzentration abhängig. So zeigte sich die einheitlichste Partikelform in Kombination mit der 3%igen $CaCl_2$-Lösung. Es wurden zu 83% runde Partikel hergestellt. Je geringer der $CaCl_2$-Anteil war, desto größer war die Fraktion der tropfenförmigen Partikel (Abbildung 19 und 20). Eindeutige Unterschiede bezüglich der Homogenität konnten nicht erkannt werden. Sie betrug zwischen 80 % und 86 %. Ein Einfluss auf die Größe konnte ebenfalls nicht gezeigt werden. Die durchschnittliche Größe der Partikel liegt mit 52-56 % in den drei Gruppen zwischen 30-70 µm. Partikel größer 70 µm wurden zu max. 8 % generiert.



Abbildung 16: Lichtmikroskopische Aufnahme von Alginatpartikeln: $CaCl_2$ 1 %; Alginat 2 %

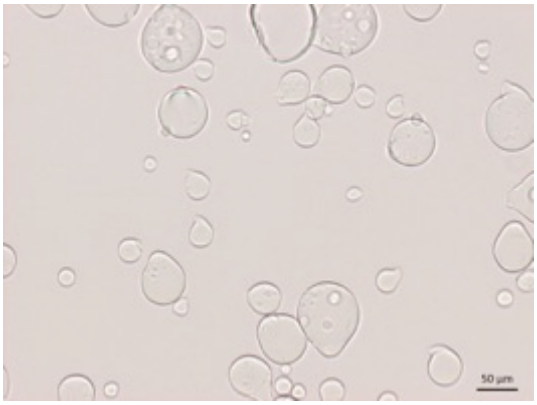


Abbildung 17: Lichtmikroskopische Aufnahme von Alginatpartikeln: $CaCl_2$ 2 % Alginat 2 %

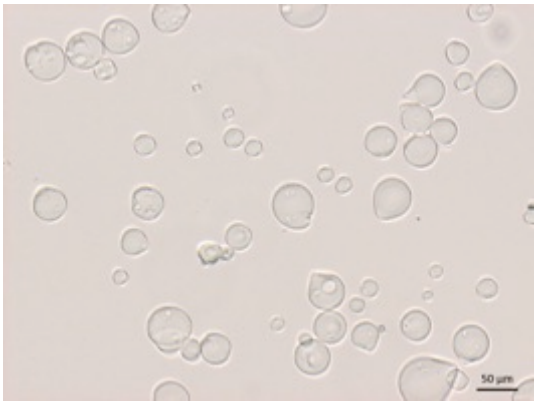


Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahme von Alginatpartikeln: $CaCl_2$ 3 % Alginat 2 %

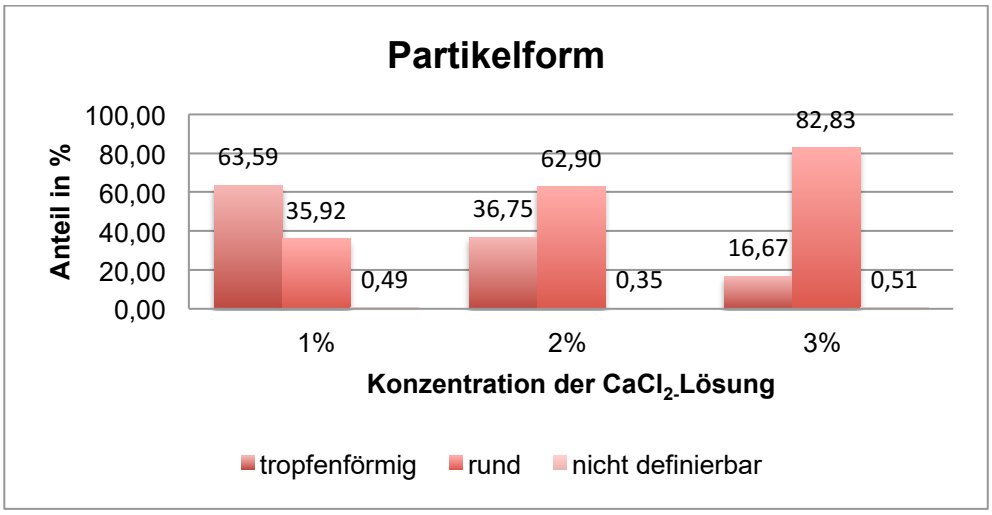


Abbildung 19: Auswertung Partikelform bei unterschiedlicher $CaCl_2$-Konzentration

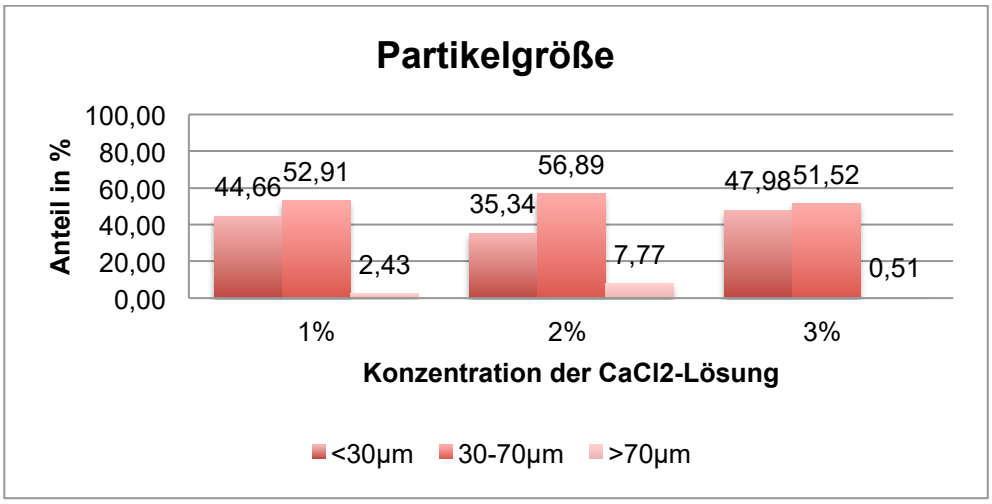


Abbildung 20: Auswertung Partikelgröße bei unterschiedlicher $CaCl_2$-Konzentration

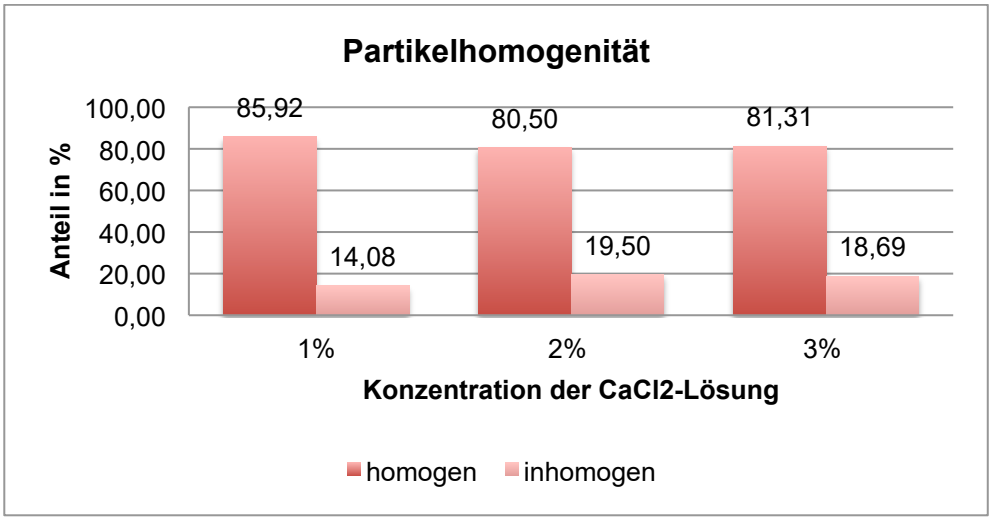


Abbildung 21: Auswertung der Partikelhomogenität bei unterschiedlicher $CaCl_2$-Konzentration

3.2 Mikroskopische Untersuchungen

3.2.1 ESEM

In der elektronenmikroskopischen Untersuchung konnte die Größe, die Form und die Oberflächenstruktur untersucht werden.

3.2.1.1 Unbeladene Partikel

Die untersuchten Partikel zeigten zu Beginn der Untersuchung eine homogene Oberfläche. Betrachtet man Abbildung 22, so sieht man eine Deckschicht über den Partikeln. Hierbei handelt es sich um Rückstände der Lagerungsflüssigkeit. Unter dieser sieht man gleichförmig gerundete Partikel mit einer mittleren Größe von ca. 50 µm. Die Oberfläche der Partikelgrößen 100–200 µm (Abbildung 23) zeigten sich nicht mehr prall und glatt, sondern

als gefaltete und strukturierte Oberfläche. Je größer die Partikel, umso stärker und gefalteter zeigten sich deren Oberflächen (Abbildung 24). Einzelne runde Mikropartikel waren nicht mehr zu erkennen. Vergleicht man die Partikel mit den gefriergetrockneten Partikeln (siehe Kapitel 2.3), erkennt man eine sehr ähnliche Oberflächenstruktur. Im feuchten Milieu hingegen zeigten sie eine glatte und pralle Oberfläche (vergleiche Kapitel 2.2.2). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich hierbei um Trocknungsartefakte handelt.

Um mögliche Trocknungs- und Präparationsartefakte zu identifizieren, wurden die Untersuchungen der unbehandelten Partikel wiederholt. Beachtet wurde eine besonders kurze Verweildauer im Vakuum des REMs, wozu jede Probe einzeln in die Untersuchungskammer eingebracht wurde und direkt aus der Lagerungslösung entnommen wurde.

Die Oberflächen der Partikel wiesen daraufhin erheblich geringere Veränderungen auf. Vollständig vermieden werden konnten die Trocknungsprozesse jedoch nicht. Auffällig zeigten sich die größeren Partikel, bei denen ein erhöhter Trocknungsprozess eintrat. Trotz des deutlich geringeren Vakuums des ESEM-Modus im Vergleich zu einem klassischen REM-Modus konnten die Untersuchungen nicht erfolgreich durchgeführt werden. Die Artefaktbildung und Veränderung der Oberfläche war schon bei kurzen Probenverweildauern stark ausgeprägt. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen waren somit nur bei kurzer und minimierter Probenverweildauer im Vakuum zur Beurteilung der Alginatpartikel geeignet.

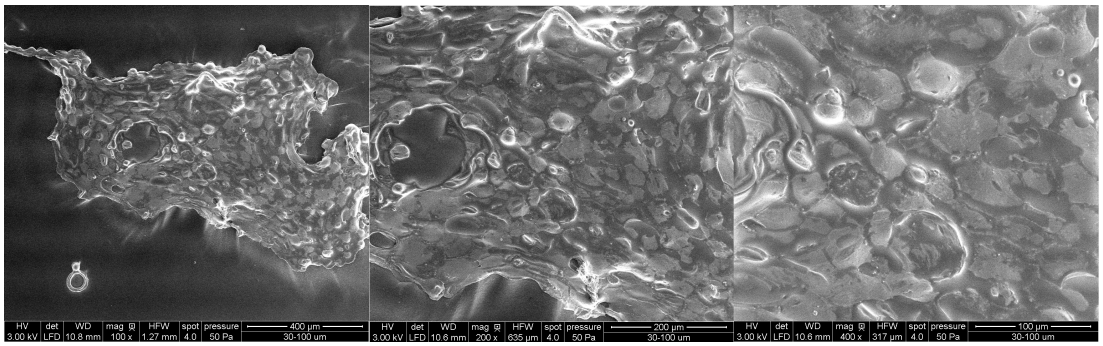


Abbildung 22: ESEM-Aufnahmen von Alginatpartikeln der Größe: 30-100 µm

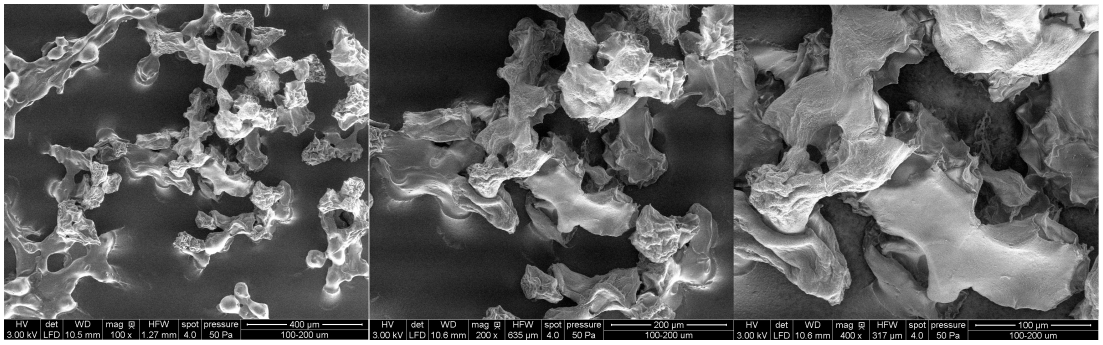


Abbildung 23: ESEM-Aufnahmen von Alginatpartikeln der Größe: 100-200 µm

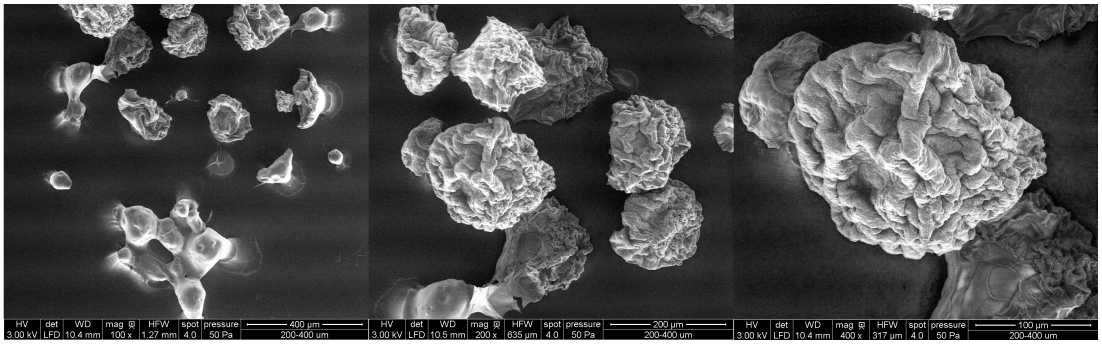


Abbildung 24: ESEM-Aufnahmen von Alginatpartikeln der Größe: 200-400 µm

3.2.1.2 Lagerung in CHX

Im Vergleich zu den unbehandelten Partikeln stellten sich die für 24h in CHX gelagerten Partikel deutlich praller und runder dar. Sie wurden mit dem gleichen zeitlichen Ablauf untersucht. Es konnte auf allen Bildern ein dünner Flüssigkeitsfilm auf der Oberfläche der Partikel beobachtet werden. Dieser verklebte die Partikel punktuell miteinander. Selbst nach langen Präparationszeiten zeigten sich geringere Trocknungseffekte (Abbildung 25, 26 und 27) Dieses spricht für die Stabilisierung der Partikel durch den aufgenommen Anteil an CHX.

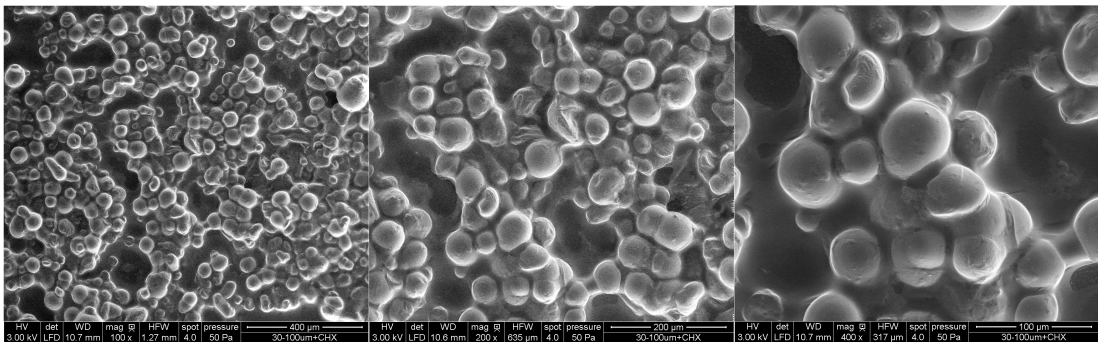


Abbildung 25: ESEM-Aufnahmen von Alginatpartikeln der Größe: 30-100 µm in CHX gelagert

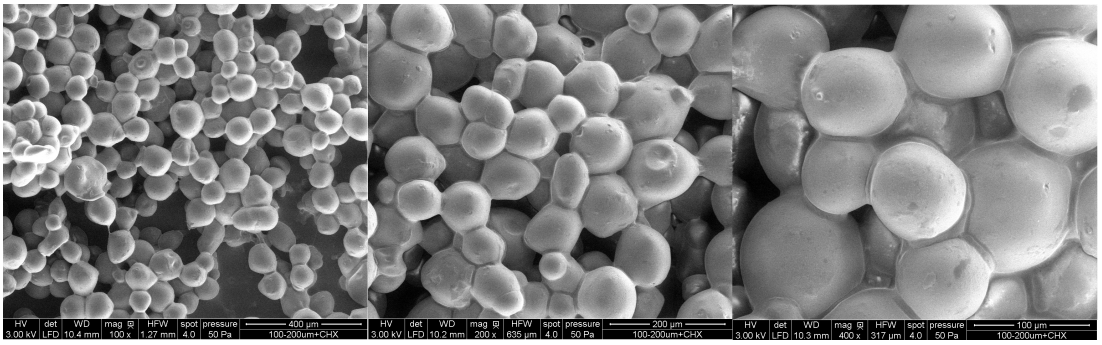


Abbildung 26: ESEM-Aufnahmen von Alginatpartikeln der Größe: 100-200 µm in CHX gelagert

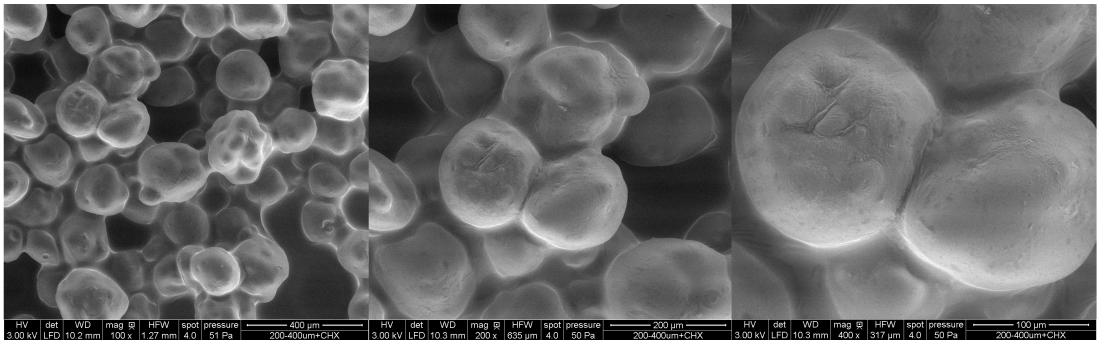


Abbildung 27: ESEM-Aufnahmen von Alginatpartikeln der Größe: 200-400 µm in CHX gelagert

3.2.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Unter dem Auflichtmikroskop zeigten sich die Partikel der Emulsionstechnik rund, transparent und mit einer glatten Oberfläche. Die Alginatpartikel, die mittels Ultraschallverfahren hergestellt wurden, zeigten ebenfalls eine glatte, nicht strukturierte Oberfläche, jedoch wies hier ein Teil die charakteristische Tropfenform auf. Einschlüsse wie z.B. Blasen konnten bei den Größen von 200-400 µm und vereinzelt bei den Größen von 100-200 µm beobachtet werden. Die sortierten Größenbereiche waren gut zu erkennen und die jeweiligen Größen entsprachen den Maschenweiten der eingesetzten Siebe zur Größensortierung. Es ist daher davon auszugehen, dass keine weitere Quellung während der Lagerung sattgefunden hat. Bei näherer Betrachtung

der beiden Gruppen der kleinen Partikel fiel auf, dass in der Gruppe der Ultraschallpartikel ein größerer Anteil Partikel im Bereich von 30-40 µm vorhanden war. Bei der Gruppe der Emulsionspartikel waren hauptsächlich Partikel der Größen um 90 µm zu erkennen.

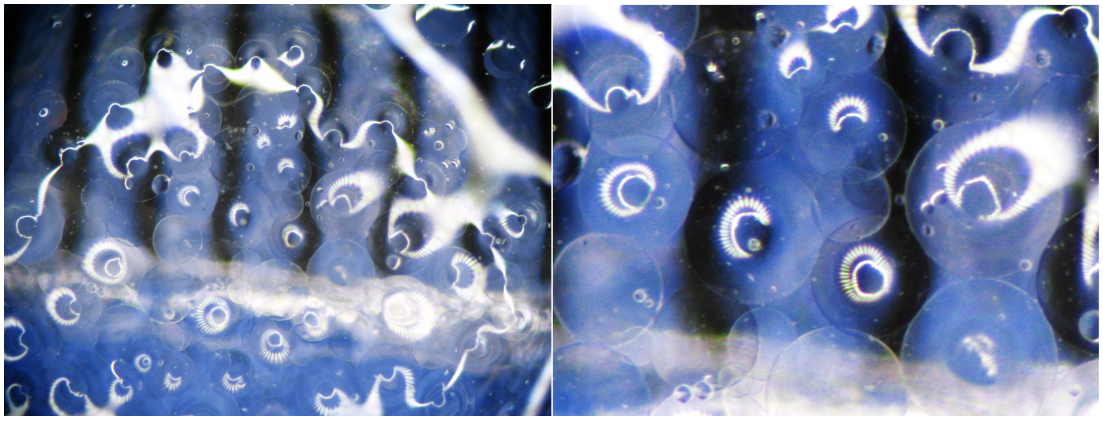


Abbildung 28: Alginatpartikel mit einer Größe von 200-400 µm unter Betrachtung mittels Auflichtmikroskop

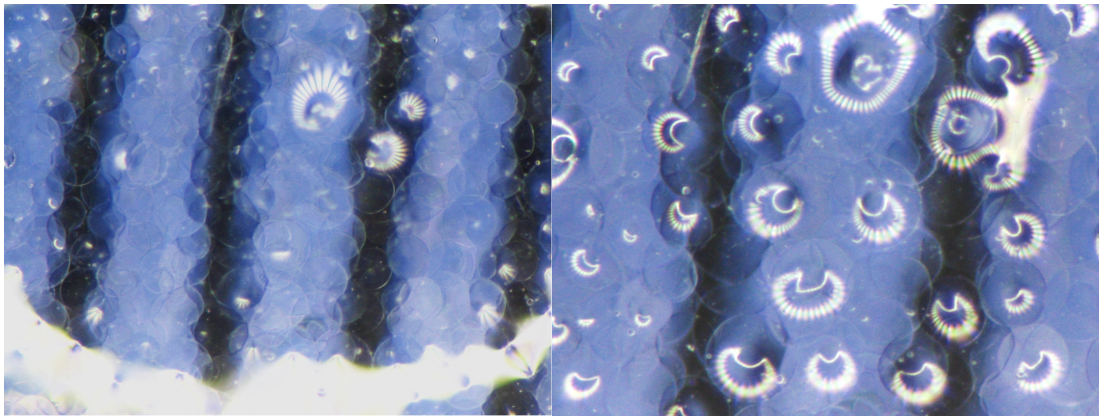


Abbildung 29: Alginatpartikel mit einer Größe von 100-200 µm unter Betrachtung mittels Auflichtmikroskop

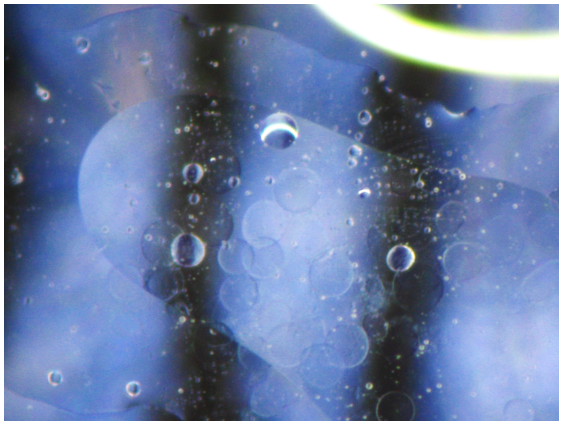


Abbildung 30: Alginatpartikel mit einer Größe von 30-100 µm unter Betrachtung mittels Auflichtmikroskop

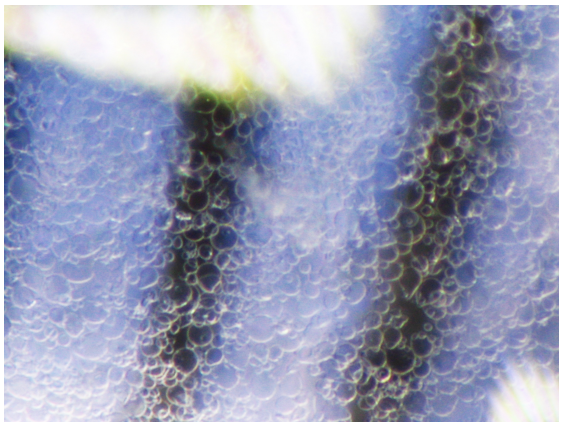


Abbildung 31: Alginatpartikel hergestellt mittels Ultraschallverfahren, mit einer Größe von 30-100 µm unter Betrachtung mittels Auflichtmikroskop

3.3 Gefriertrocknung

3.3.1 Quellverhalten

Mittels ESEM-Modus konnten unter geringem Vakuum die Partikeloberflächen analysiert werden. Es zeigten sich separate und einzelne Partikel, die um einen deutlichen Anteil (Wasser) geschrumpft waren. Die Oberfläche wies eine grob gefaltete Struktur auf. Die getrockneten Partikel nahmen eine längliche bis ovale Form und ungefähr ein Drittel der ehemaligen Größe ein.

Nach anschließender Einbringung in eine 20%ige CHX-Lösung für 24 h war eine Quellung zu erkennen. Besonders die kleinen Partikel um 50 bis 200 µm wiesen eine höhere Volumenzunahme auf. Die Oberfläche war geringer strukturiert und morphologisch glatter. Außerdem wirkten die Partikel zusätzlich gefüllter, jedoch wurde die ursprüngliche prall-runde Form unter den gewählten Bedingungen nicht wieder hergestellt. Möglicherweise war die Struktur sogar irreversibel geschädigt. Ob das für die Applikation und für die spätere Wirkstofffreisetzung von Bedeutung ist, wurde nicht untersucht. Eine Aussage über das aufgenommene Volumen ließ sich mit dieser Methode nicht machen.

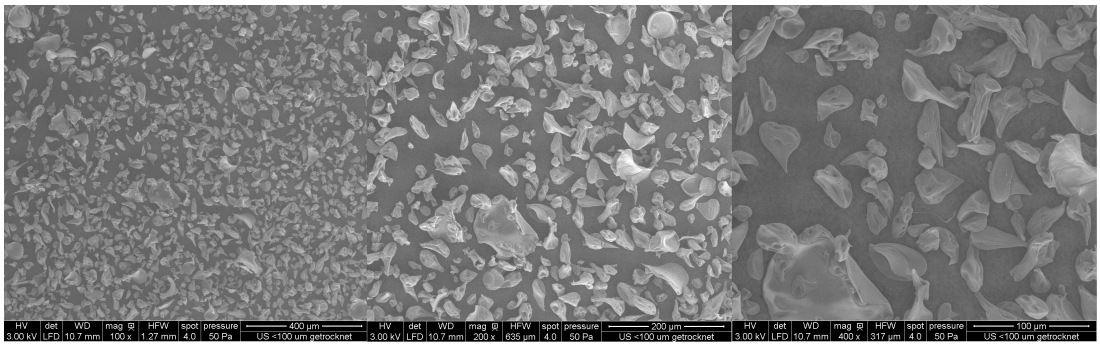


Abbildung 32: gefriergetrocknete Alginatpartikel, hergestellt mittels Ultraschalltechnik, Betrachtung im ESEM; Durchschnittliche Größe: 50 µm

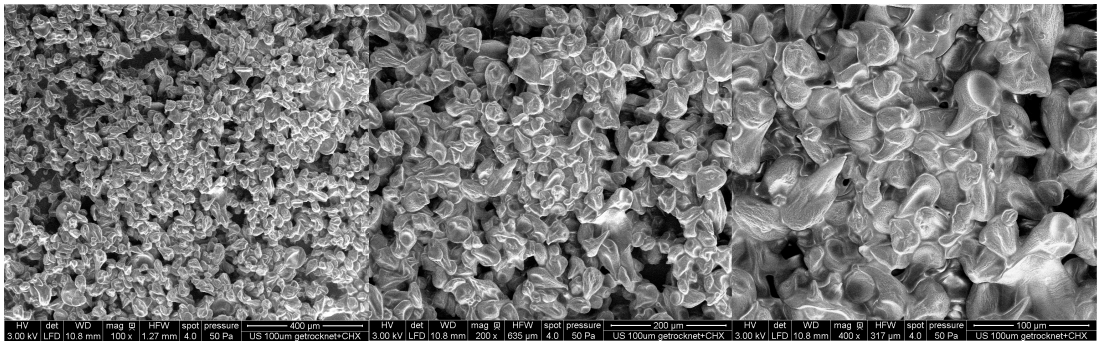


Abbildung 33: REM-Aufnahmen von gefriergetrockneten Alginatpartikeln; hergestellt mittels Ultraschalltechnik; durchschnittliche Größe: 50 µm; Lagerung 24 h in CHX

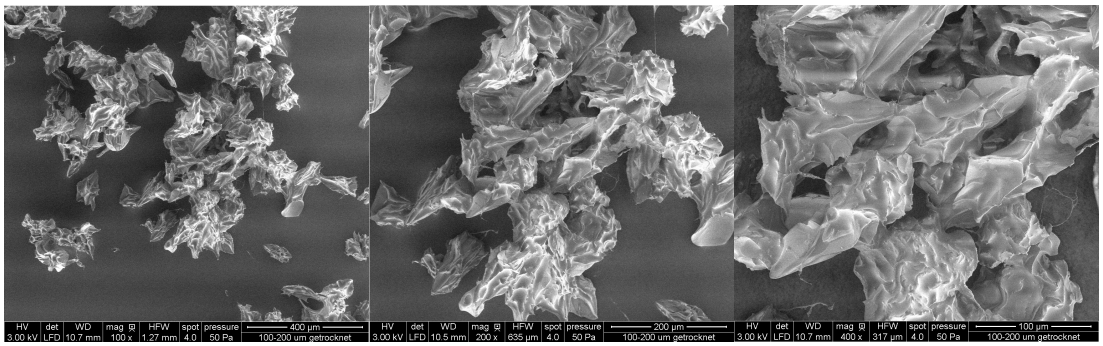


Abbildung 34: REM-Aufnahmen von gefriergetrockneten Alginatpartikeln; durchschnittliche Größe: 100-200 µm

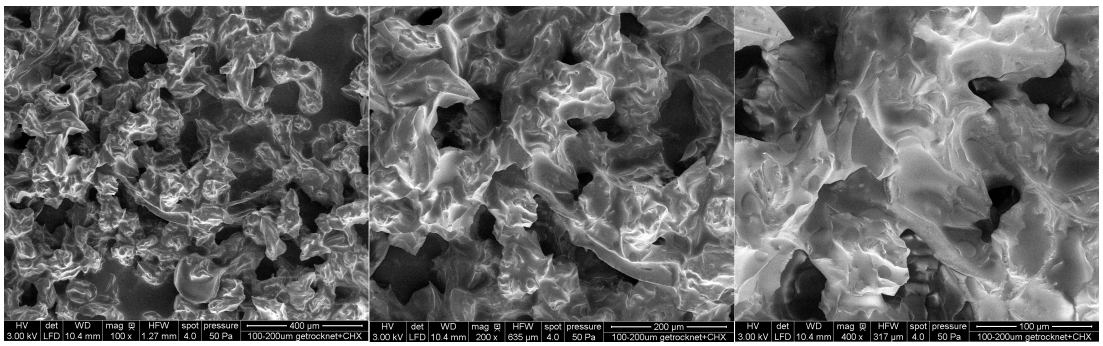


Abbildung 35: REM-Aufnahmen von gefriergetrockneten Alginatpartikeln; durchschnittliche Größe: 100-200 µm; Lagerung 24 h in CHX

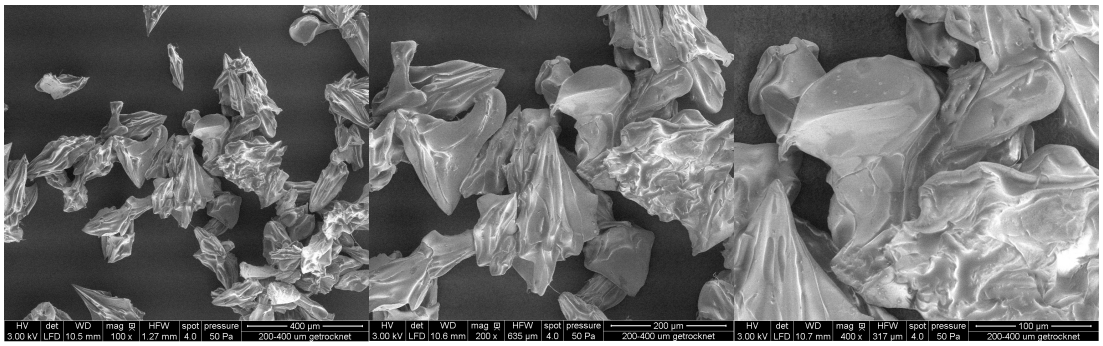


Abbildung 36: REM-Aufnahmen von gefriergetrockneten Alginatpartikeln; durchschnittliche Größe: 200-400 µm

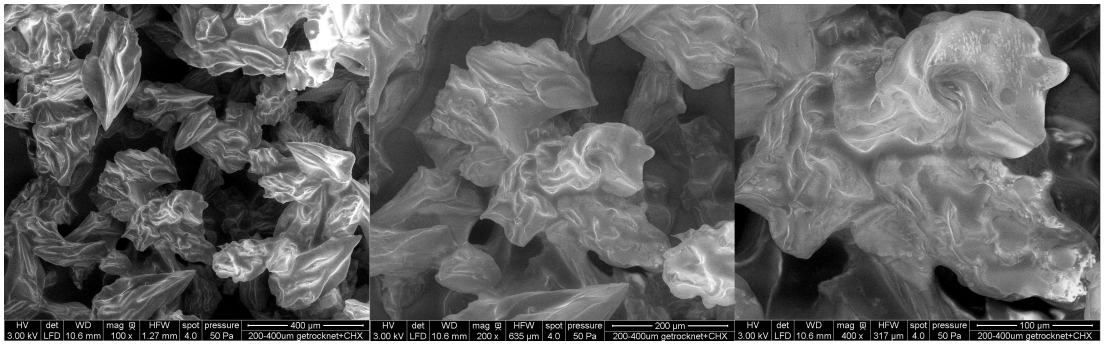


Abbildung 37: REM-Aufnahmen von gefriergetrockneten Alginatpartikeln; durchschnittliche Größe von 200-400 µm; Lagerung 24 h in CHX

3.3.2 Lichtmikroskopie

Um unerwünschte Trocknungseffekte (wie beim ESEM) zu vermeiden, wurden die Partikel mit dem Lichtmikroskop weiter untersucht. Hier zeigten sich alle gefriergetrockneten Partikel ebenfalls mit einer gefalteten und strukturierten Oberfläche. Sie waren alle deutlich kleiner als die nicht getrockneten Referenzpartikel. Es lässt sich in den einzelnen Gruppen kein Unterschied zwischen den Größen und Formen der unterschiedlich gelagerten Proben feststellen. Die kleinsten Partikel (Ultraschallverfahren) scheinen am ehesten die ursprüngliche Form wieder anzunehmen. Hier wiesen einige eine Tropfenform auf. Allerdings blieben sie deutlich kleiner als die Referenzpartikel. Nach einer Lagerung für 24 h in H_2O waren die Oberflächen der Partikel etwas geglättet. Dieser Effekt fiel bei der Betrachtung der Partikel von 100-200 µm am deutlichsten auf. Im Vergleich hierzu war eine weitere Quellung der in CHX gelagerten Partikel auch über 24 h nicht zu erkennen (vergleiche Abbildung 38, 39 und 40).

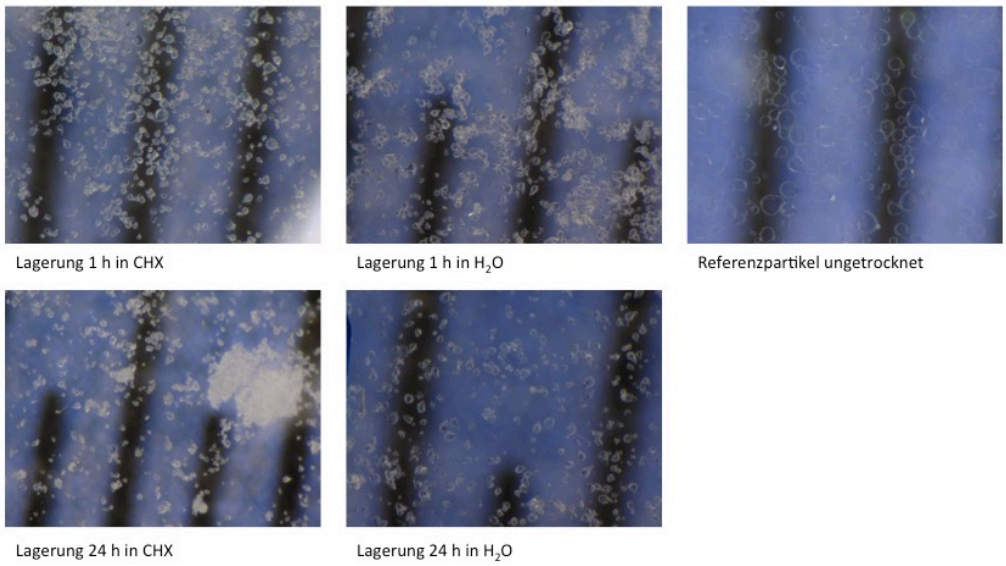


Abbildung 38: Lichtmikroskopische Betrachtung; gefriergetrocknete Alginatpartikel (Ultraschallverfahren), Zustand nach unterschiedlichen Lagerungszeiten in H_2O und CHX

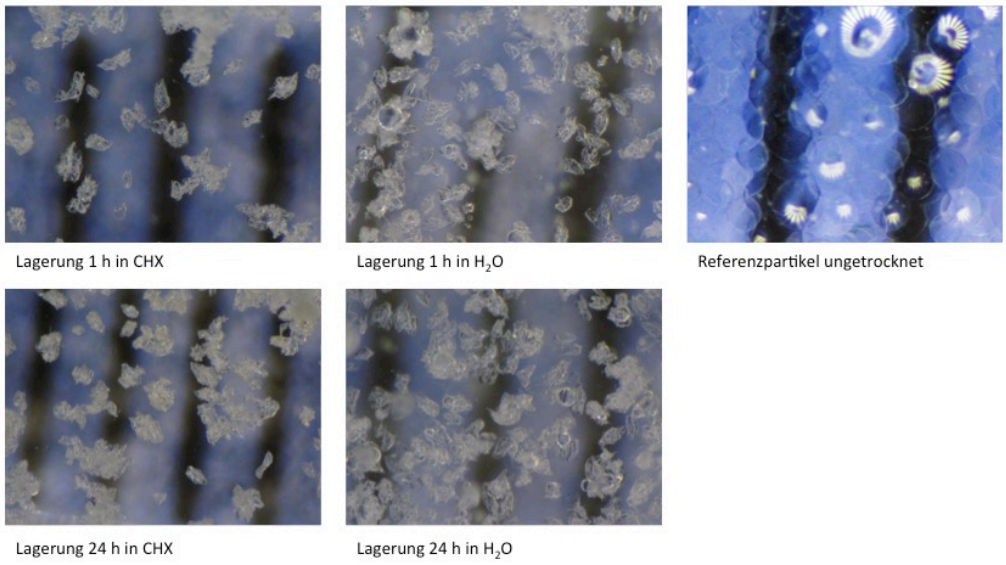


Abbildung 39: Lichtmikroskopische Betrachtung; gefriergetrocknete Alginatpartikel (100-200 µm), Zustand nach unterschiedlichen Lagerungszeiten in H_2O und CHX

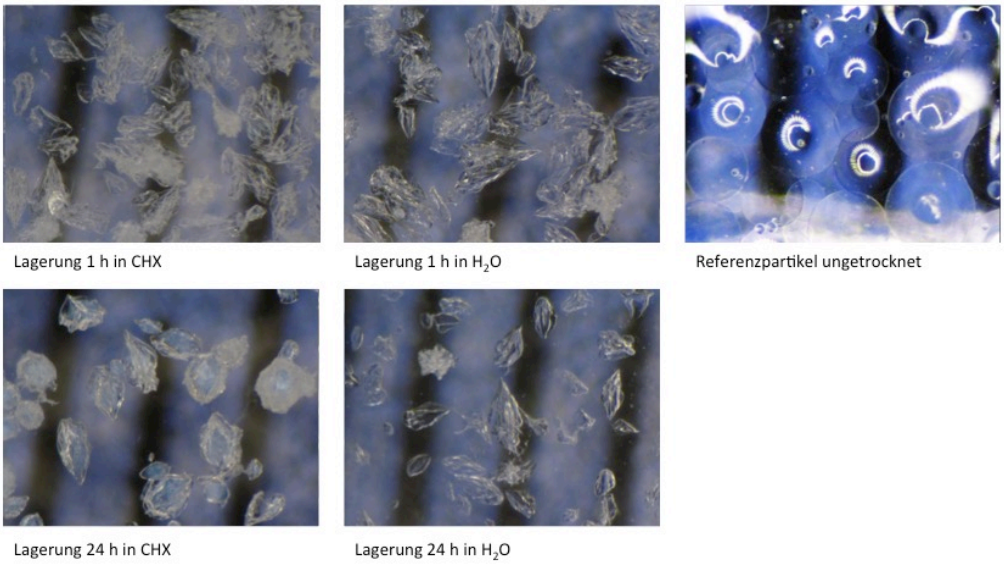


Abbildung 40: Lichtmikroskopische Betrachtung; gefriergetrocknete Alginatpartikel (200-400 µm), Zustand nach unterschiedlichen Lagerungszeiten in H_2O und CHX

3.4 Untersuchungen zur Freisetzung von Chlorhexidin

3.4.1 Untersuchung der Stabilität von CHX in Kunstspeichel

Zur Kalibrierung des HPLC-Systems wurde die Stabilität des CHX in Kunstspeichel ohne Sorbinsäure, da diese wie oben beschrieben eine Störung des Chlorhexidinsignals im UV-Detektor erzeugte, zum einen bei Raumtemperatur und zum anderen bei Körpertemperatur (37°C) untersucht. Wie in Abbildung 41 ersichtlich, war der Gesamtanteil des CHX über 7 Tage nahezu stabil. Im Bereich der Raumtemperatur war eine konstante Konzentration an CHX zu erkennen. Die erhöhte Temperatur führte zu einer leichten Chlorhexidinabnahme, die aber nicht so hoch war, dass sie die Messungen bei einer Durchführung der Versuche bei 37°C wesentlich beeinflusste. Für die weiteren Untersuchungen konnte die Stabilität des CHX als ausreichend betrachtet werden.

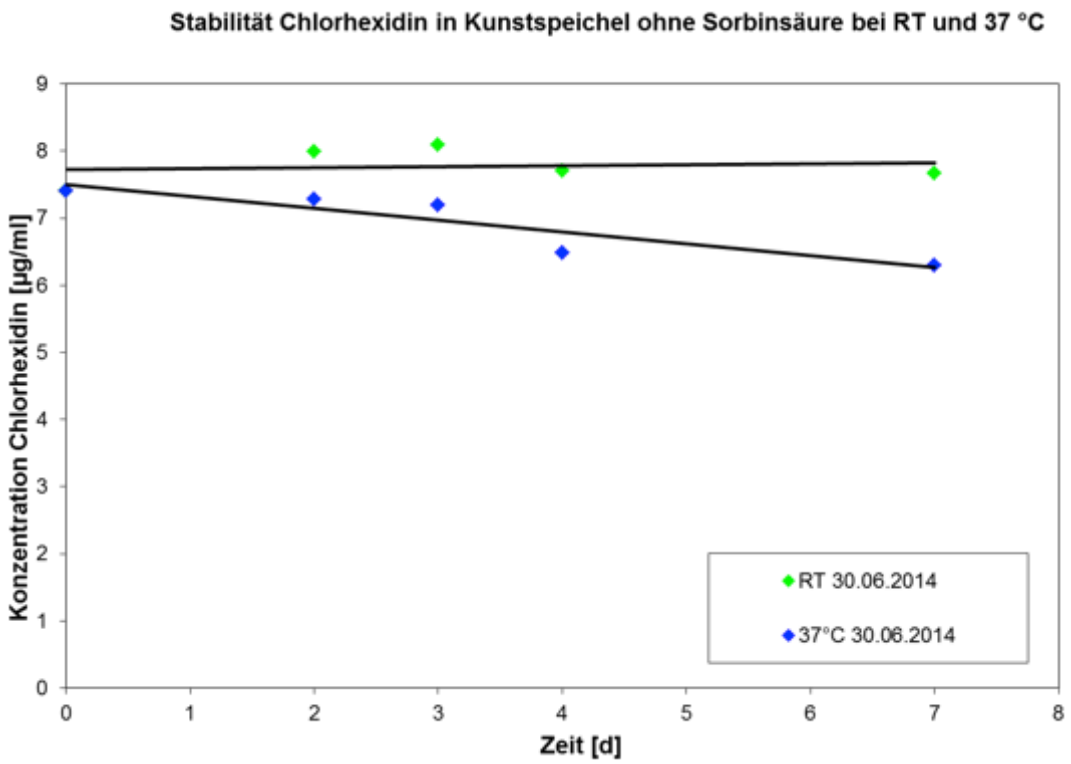


Abbildung 41: Stabilität von CHX über 7 d in Kunstspeichel ohne Sorbinsäure bei RT und 37 °C

3.4.2 Screening: CHX-Freisetzung aus unterschiedlichen Alginatproben

In dem ersten Screening konnte ein erfolgreich etabliertes HPLC-System gezeigt werden. Aus allen Proben konnte eine Freisetzung von CHX über einen Zeitraum von mehr als 100 h in unterschiedlichen Mengen gemessen werden (Abbildung 42). Hierbei setzte der Alginatblock im Vergleich mit den anderen Partikeln am wenigsten CHX frei. Partikel mit kleinem Durchmesser wiesen eine größere Oberfläche im Vergleich zu größeren Partikeln auf. Passend zu diesem Verhältnis zeigten die 50 µm Partikel ein schnelleres Freisetzungsverhalten als größere Partikel. Nach einer anfänglich hohen Freisetzung des größten CHX-Anteils in den ersten zwei Tagen zeigten alle Proben ein verlangsamtes Freisetzungsverhalten in den folgenden Zeiträumen. Die Partikel mit einer Größe von mehr als 200 µm zeigten den größten Anteil an verzögert freigesetztem CHX (t=20 h bis 105 h) mit 130 µg. Im Vergleich hierzu wurden 96 µg im gleichen Zeitraum in der Gruppe von 100-200 µm großen Partikeln und 45 µg bei den 50 µm großen Partikeln gemessen. Dieses kann durch ein kleineres Oberflächen-Volumen-Verhältnis, als auch über eine mögliche erhöhte Aufnahmemenge in das Innere der Partikel erklärt werden. Die initialen und absoluten

Freisetzungsmengen waren umso größer, je kleiner die Partikel waren. Um eine mögliche Anpassung des CHX-Gesamtanteils und der Veränderung der verzögerten Freisetzung zu erhalten, wurden Partikelgrößen von 50 µm und 200-400 µm für die weitere Untersuchungen gewählt.

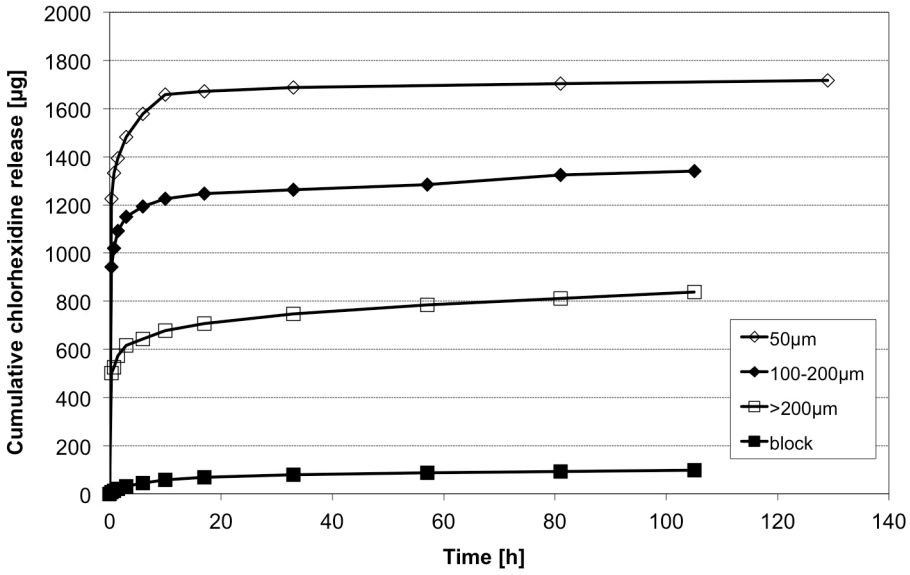


Abbildung 42: CHX-Freisetzungsprofile aus unterschiedlich großen Alginatpartikeln; Kumulative CHX-Freisetzung der Screeninguntersuchung (HPLC) über 120 h (n=1 je Probe). [48]

3.4.3 Alginat und PLGA

Aufgrund der ersten Screening-Untersuchung sollten nun zusätzliche Partikel aus anderen Materialien untersucht werden. Hierzu wurden PLGA-Partikel der gleichen Größe (um 50 µm) im Vergleich zu den Alginatpartikeln verwendet. Die Untersuchungszeit wurde auf über 630 h ausgedehnt, bei einer angestrebten effektiven Freisetzungsdauer von 14 d.

Beide Gruppen zeigten einen inital hohen CHX-Gehalt, welcher sich über die Zeit deutlich reduzierte (Abbildung 43). Die Alginatpartikel gaben in dem initialen Zeitintervall (t_i) und dem mittelfristigen Zeitraum (t_m) statistisch signifikant mehr CHX als die vergleichbaren PLGA-Partikel ab ($p=.48$, $p<.001$). Im Durchschnitt waren dies 38.1 %. In dem Zeitraum von 10 bis 630 h gab es nur eine geringe Freisetzung von 48.4 ± 7.1 µg CHX in der PLGA-Gruppe. Die Alginatpartikel zeigten eine höhere Freisetzung von 151.6 ± 3.9 µg, welches ungefähr 8 % des freigesetzten CHX entspricht. Aufgrund der deutlich erhöhten Herstellungskomplexität der PLGA-Partikel

und der einleitend genannten Vorteile des Alginats, wurden die Untersuchungen mit den Alginatpartikeln fortgeführt.

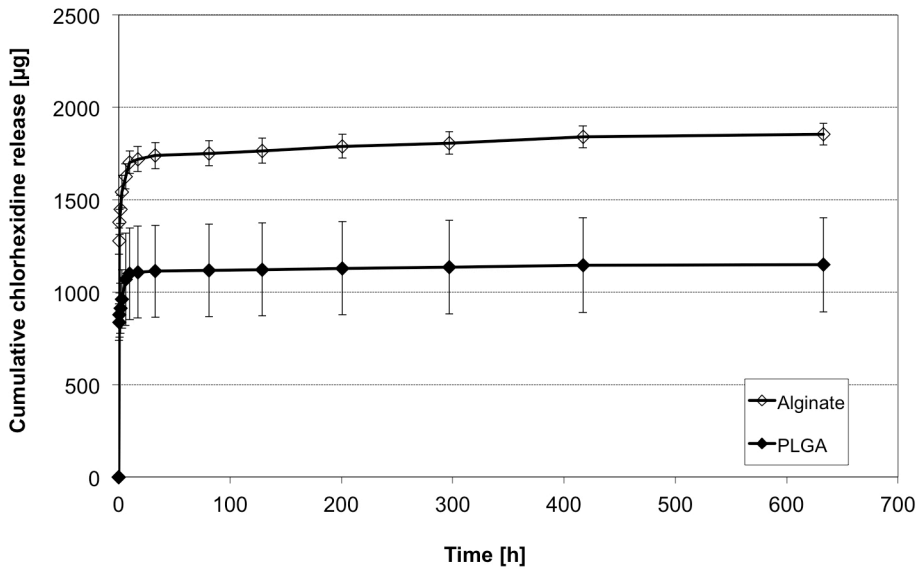


Abbildung 43: CHX-Freisetzungsprofil aus unterschiedlichen biodegradierbaren Materialien; Kumulative CHX-Freisetzung aus 50 µm großen PLGA-Partikel und 50 µm großen Alginatpartikel über 630 h (Mittelwert ± SD, n=5).[48]

3.4.4 Einfluss unterschiedlicher CHX-Konzentrationen

Gelöstes CHX ist nur in einer wässrigen Lösung bis zu 20 % erhältlich. Mit der Absicht eine möglichst hohe Beladung der Partikel zu erzielen, wurden zwei unterschiedliche CHX-Konzentrationen (20 % und 10 %) gewählt, um einen möglichen Einfluss auf die Freisetzung zu untersuchen (Abbildung 44 und 45). Beide Gruppen zeigten nahezu identische Freisetzungscharakteristika. Sie unterschieden sich jedoch in der Menge des initial freigesetzten CHX. Die Gruppe des höher konzentrierten CHX (20 %) zeigte eine 1.8-fach höhere Konzentration zum ersten Messzeitpunkt (t=0.25 h). Über den Untersuchungszeitraum verringerte sich dieser Faktor auf 1.53 (t=630 h). Nach der initialen Freisetzungsphase (t_i) wurden 134.7 ± 15.1 µg CHX in der 20 %-Gruppe freigesetzt. Dieses ist vergleichbar mit der 10 %-Gruppe, hier wurden 156.9 ± 41.1 µg gemessen. Der Hauptunterschied lag demnach in der frühen Freisetzung, welche gut durch die höhere Konzentration des an der Oberfläche der Mikropartikel haftenden CHX erklärt werden kann. Die sich ähnelnde Freisetzungskinetik der späteren Untersuchungsintervalle wurde dann durch die Bindung des CHX an das Alginat selbst bestimmt.

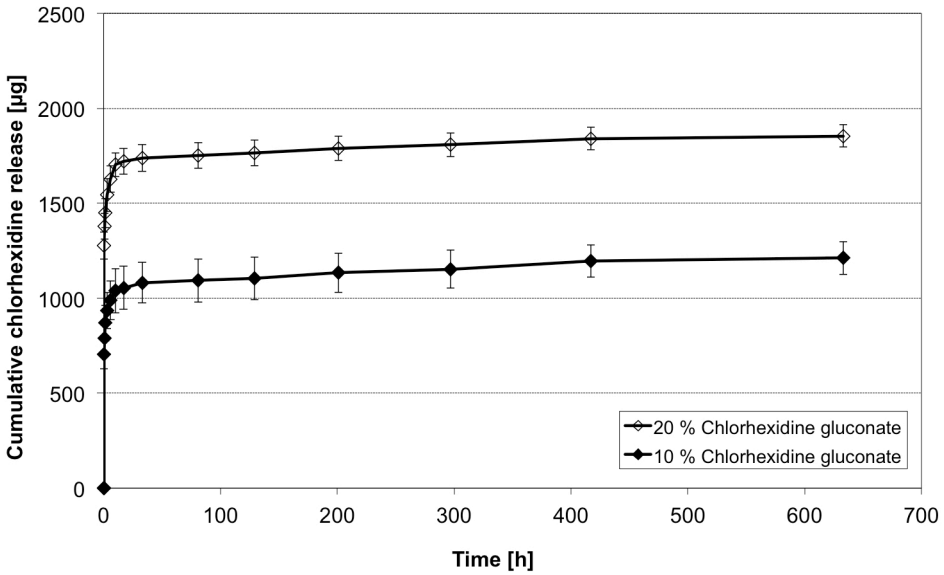


Abbildung 44: CHX-Freisetzungsprofil von unterschiedlichen CHX Konzentrationen; Kumulative CHX-Freisetzung über 630 h Beladung von 50 µm Alginatpartikeln mit CHX über 24 h in 10 % und 20 % konzentrierter CHX-Lösung (Mittelwert ± SD, n=5).[48]

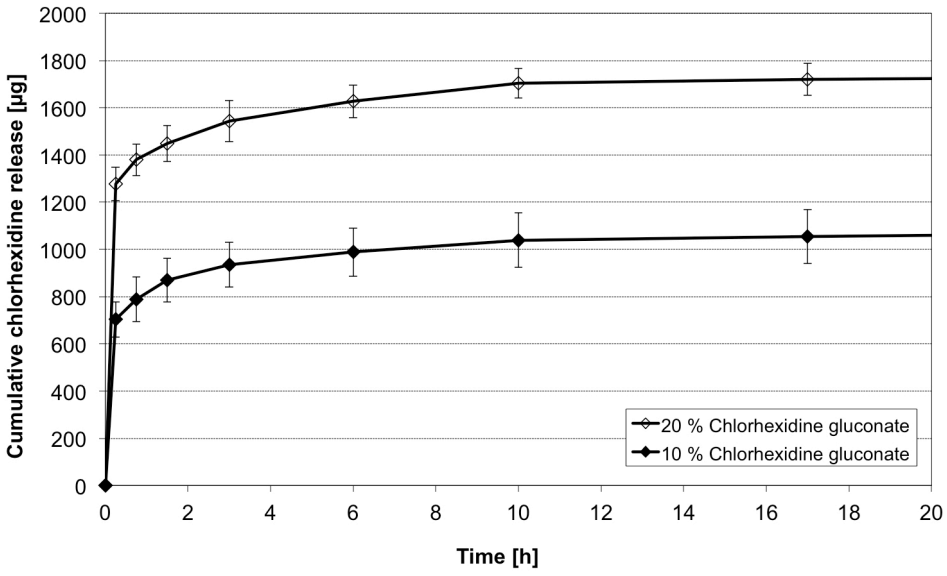


Abbildung 45: Initiales CHX-Freisetzungsprofil von unterschiedlichen CHX Konzentrationen; Kumulative CHX-Freisetzung der initialen Freisetzungsmessung (HPLC) über 20 h von unterschiedlich beladenen Partikeln (10 % und 20 % CHX) (Mittelwert ± SD, n=5). (vergleiche Abbildung 44).[48]

3.4.5 Einfluss von unterschiedlichen Beladungszeiten

Der Vergleich des Freisetzungsverhaltens nach verschiedenen Beladungszeiträumen (1 min, 30 min, 6 h, 24 h) aus Alginatpartikeln mit einer Größe von 200-400 µm zeigte eine effektive Beladung bereits nach einer Minute Beladungszeit (Abbildung 46 und 47). Die höchste initiale Freisetzungsmenge wurde in der Gruppe der kürzesten Beladungszeit (1 min) mit 2118.5 ± 106.4 µg gemessen, vergleichend hierzu wurden 1014.9 ±146.0 µg in der 24 h-Gruppe gemessen. Dies könnte dadurch verursacht werden, dass mit der Zeit eine erhöhte Aufnahme in die Partikel stattfindet und nach einer kurzen Beladung mehr CHX an der Oberfläche haftet. Ebenfalls konnte für die betrachteten Freisetzungsintervalle (t_i, t_m und t_l) kein statistisch signifikanter Unterschied in den Freisetzungsraten der unterschiedlichen Beladungszeitgruppen festgestellt werden (138<p<1.0).

Im Gegensatz dazu wich das Xanthangel von allen getesteten Gruppen ab (p<.001, jedes Freisetzungsintervall), während sich die Gelatinechip-Gruppe nur von allen Gruppen in dem Intervall t_m(p<.001) und von den kurzzeitig beladenen Alginatpartikel-Gruppen (1 min, 30 min) im Betrachtungsintervall t_l (p=.025, p=.002) unterschied.

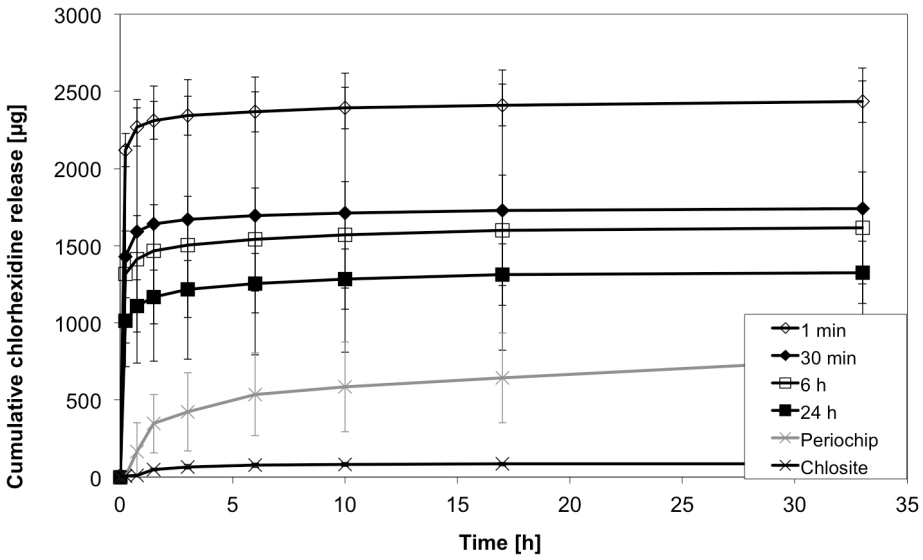


Abbildung 46: Initiale CHX-Freisetzungsprofile bei unterschiedlichen Beladungszeiträumen; Kumulative CHX-Freisetzung über 35 h aus 200-400 µm großen Alginatpartikeln, beladen für 1 min, 30 min, 6 h und 24 h, und den Referenzgruppen Periochip und Chlosite (Mittelwert ± SD, n=5).[48]

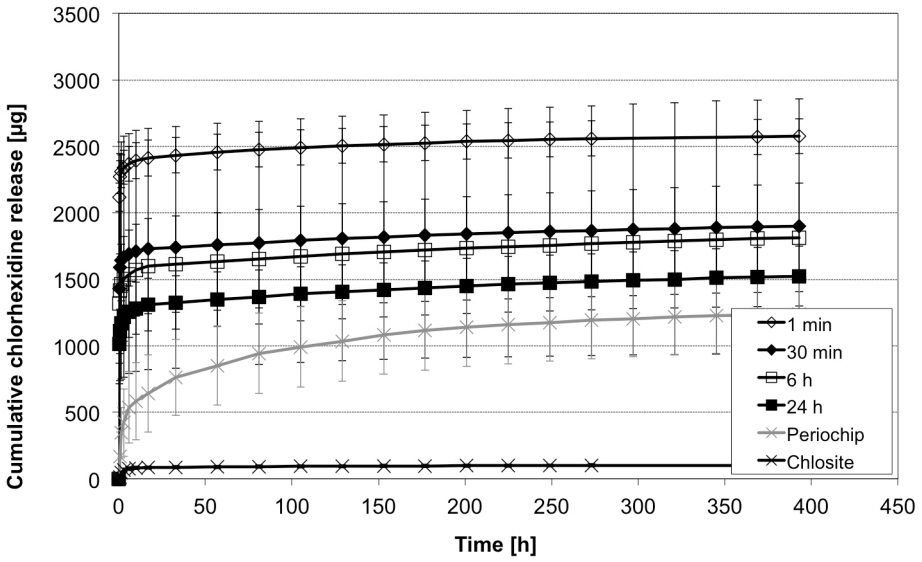


Abbildung 47: CHX-Freisetzungsprofile bei unterschiedlichen Beladungszeiträumen; Kumulative CHX Freisetzung über 400 h aus 200-400 µm großen Alginatpartikeln, beladen für 1 min, 30 min, 6 h und 24 h, und den Referenzgruppen Periochip und Chlosite (Mittelwert ± SD, n=5).[48]

3.4.6 Beurteilung der Referenzmaterialien

Im Verhältnis zu dem auf Gelatine basierenden Periochip und dem xanthanhaltigen Chlosite zeigten die Alginatpartikel höhere initiale Freisetzungsmengen (Abbildung 46). Die Gesamtmenge des freigesetzten CHX zum Zeitpunkt von t=393 h unterschied sich in den betrachteten Gruppen. So wurde zum Beispiel 1236.9 ± 280.4 µg für den Gelatinechip im Gegensatz zu nur 102.2 ± 12.1 µg für das Xanthangel gemessen. Statistisch signifikant war allerdings nur der Unterschied zwischen der absolut freigesetzten CHX Menge der eine Minute lang beladenen Alginatpartikeln und des Xanthangels (p=.001).

Der gelatinebasierte Chip zeigte eine stetige Freisetzung von über 300h. Zu Beginn (t=0.25) wurde noch keine Freisetzung gemessen. Im Zeitraum t_i wurden bis zu 50 % (641.7 ± 290.7 µg) des enthaltenen CHX nach 17 h freigesetzt und final 1236.9 ± 280.4 µg erreicht. In den Alginatpartikelgruppen wurden 50 % der Gesamtmenge CHX, aufgrund des an der Oberfläche haftenden CHX, schon in den ersten Messungen erreicht.

Das Xanthangel zeigte insgesamt eine sehr geringe CHX-Freisetzung (102.2 ± 12.1 µg). Es erreichte die 50 %-Grenze in den ersten zwei Stunden und setzte nur noch minimale Konzentrationen in den späteren Perioden frei

(Abbildung 48). In den Intervallen t_m und t_l (von 17 h bis 393 h) wurden nur 16.5 ± 5.1 µg CHX gemessen. Vergleichend hierzu waren es 213.6 ± 46.4 µg aus den 24 h beladenen Alginatpartikeln und 595.2 ± 123.1 µg in der Gelatinechip-Gruppe.

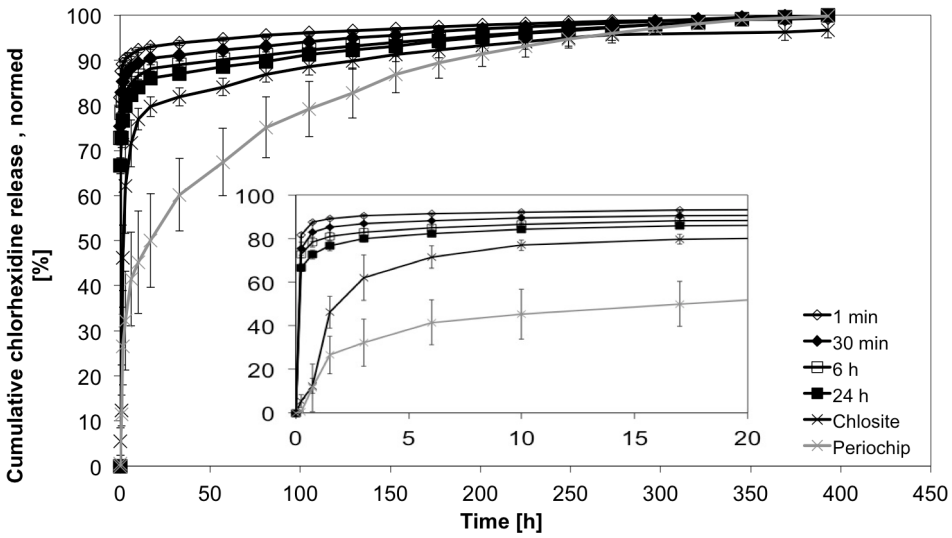


Abbildung 48: Normierte CHX-Freisetzungsprofile bei unterschiedlicher Beladungszeit; Normierte kumulative CHX-Freisetzung über 400 h und 20 h aus 200-400 µm großen Alginatpartikeln, beladen für 1 min, 30 min, 6 h und 24 h und Referenzgruppen Periochip und Chlosite (Mittelwert ± SD, n=5).[48]

3.4.7 Kombination verschiedener Partikelgrößen

Um ein Freisetzungsverhalten zu erhalten, welches eine hohe initiale Freisetzungsphase mit einer möglichst langen verzögerten Freisetzung kombiniert, wurden 50 µm und 200-400 µm große Partikel in den Verhältnissen (30/70 w/w) und (50/50 w/w) gemischt und untersucht. Hierbei traten geringere Standardabweichungen im Vergleich zu dem Gelatinechip (bis zu 300 µg) auf (Abbildung 49). Dies spricht für die Reproduzierbarkeit bei der Probenpräparation der Alginatpartikel und einer wahrscheinlich ungleichmäßigen CHX-Beladung der Gelatinematrix des Periochips. Insgesamt konnte eine Anpassung des verzögerten Freisetzungsverhalten des Alginatsystems an das des Gelatinechips gezeigt werden. Tatsächlich zeigte die Partikelkombination (50/50 w/w) mit dem höheren Anteil der 50 µm Partikel eine leicht erhöhte initiale Freisetzung (t=0-1.5 h) verglichen mit der (30/70 w/w)-Komposition. Dennoch zeigten alle Gruppen in der frühen Beobachtungsperiode(t_i) ähnliche Freisetzungsverhalten (p=.967, Abbildung

49). Nach 393 h zeigte sich eine Gesamtmenge an CHX für die Gruppe (50/50 w/w) von 1492.1 ± 122.3 µg, für die Gruppe (30/70 w/w) von 1237.4 ± 102.7 µg und für den Gelatinechip von 1236.9 ± 280.4 µg (Abbildung 50). In diesem Zeitraum wurde mehr als 50 % des Gesamt-CHX aus den alginatbasierten Kompositionen freigesetzt. Nach 17 h Beobachtungszeitraum hatte der Gelatinechip ebenfalls schon mehr als 50% CHX freigesetzt. Bis zu dem Zeitpunkt t=150 h hatten sowohl die Alginatkombinationen (30/70 w/w) und (50/50 w/w) als auch der Gelatinechip ungefähr die gleichen Mengen an CHX freigesetzt (1079.8 ± 100.7 µg, 1336.9 ± 122.9 µg und 1083.3 ± 296.4 µg, p=.065). Nach dieser Zeit zeigten die Graphen einen ähnlichen Verlauf. Freisetzungsmengen von 157.6 ± 23.5 µg (30/70 w/w), 155.2 ± 14.7 µg (50/50 w/w) und 153.5 ± 35.8 µg (Gelatinechip) wurden gemessen. In der mittleren Beobachtungsphase (t_m) zeigte der Gelatinechip die effektivste Freisetzung mit 472.2 ± 97.4 µg CHX, welche nahezu doppelt so hoch wie in beide Alginatgruppen war (p<.001, Abbildung 49).

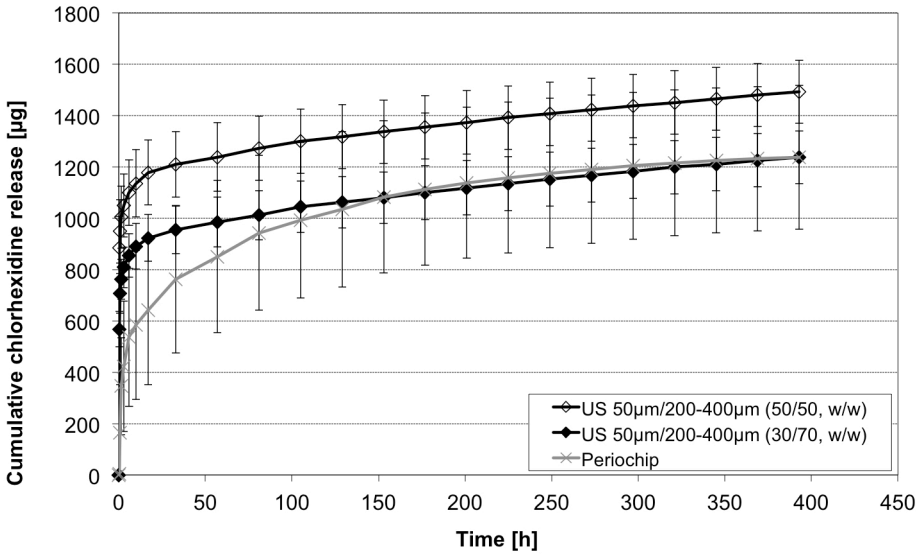


Abbildung 49: CHX-Freisetzungprofile von Partikelkombinationen; Kumulative CHX-Freisetzung über 400 h aus Alginatpartikelkombinationen der Größen 50 µm und 200-400 µm im Verhältnis 30/70 w/w und 50/50 w/w verglichen mit Periochip (Mittelwert ± SD, n=5).[48]

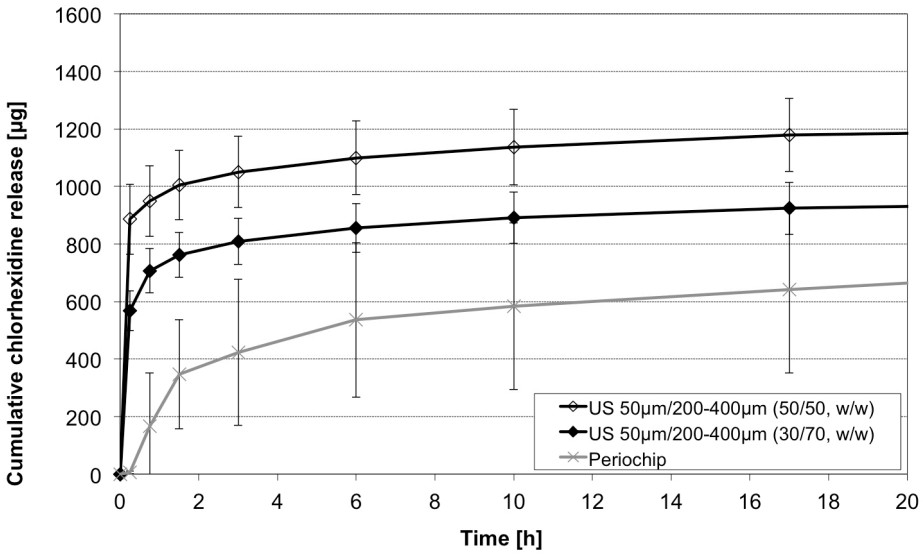


Abbildung 50: Initiale CHX-Freisetzungprofile von Partikelkombinationen; Kumulative CHX-Freisetzung über 20 h aus Alginatpartikelkombinationen der Größen 50 µm und 200-400 µm im Verhältnis 30/70 w/w und 50/50 w/w verglichen mit Periochip (Mittelwert ± SD, n=5).[48]

4 Diskussion

4.1 Partikelproduktion

4.1.1 Alginate und deren Verwendung als Drug-Delivery-Devices

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, stellen sich folgende Anforderungen an ein parodontales Releasing-System: Applikation und Stabilität in der Tasche, Erreichen einer wirksamen Konzentration sowie ein ausreichend großes Reservoir an Wirkstoff zum Erreichen einer wirksamen Konzentration über eine längere Zeit. Dies alles verbunden mit einer guten Biodegradierbarkeit und hohen Biokompatibilität.[22], [46]

Die anatomischen Strukturen der parodontalen Tasche geben hierbei die mögliche Größe und Applikationsmenge eines DDD vor: Für die Verwendung in der parodontalen Tasche (vergleiche Abbildung 51) ist der Einsatz von Mikropartikeln mit einer maximalen Größe von 600 µm möglich. Je nach Entzündungsgrad weist die parodontale Tasche eine unterschiedliche Zugänglichkeit auf. Eine entzündungsfreie Zahnfleischtasche weist eine Sondierungstiefe von bis zu 3 mm auf. Diese wird im klinischen Alltag mit einer 0,5 mm dicken Sonde ermittelt.[52] Hieraus ergeben sich ungefähre Maße einer gesunden Zahnfleischtasche von 3 mm x 0,5 mm zirkulär um einen Zahn herum. Bei Besiedlung der Zahnoberfläche durch Bakterien werden die lokalen Gewebe durch initiale Entzündungsreaktionen gelockert. Dies ist vor allem vor allem auf den Verlust von kollagenen Fasern zurückzuführen.[53] Dies resultiert in einer Vergrößerung der Sondierungstiefe, wodurch das Volumen zur Aufnahme von lokal applizierten Medikamenten ebenfalls steigt.

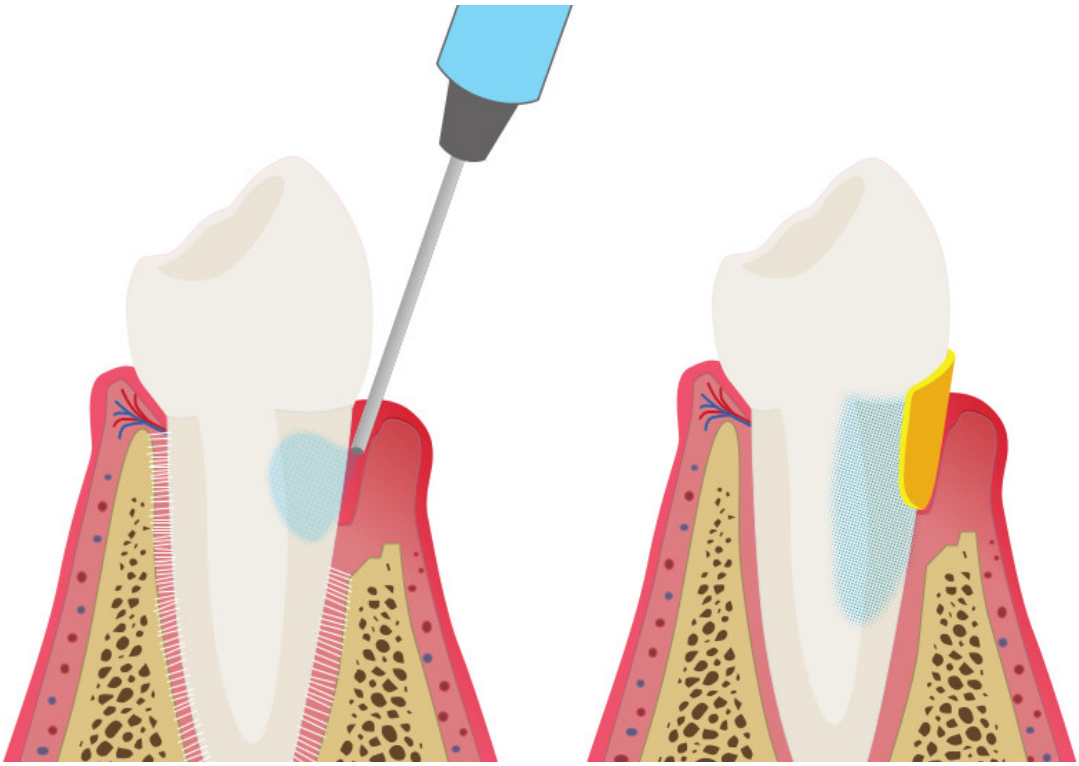


Abbildung 51: Schematische Darstellung einer parodontalen Tasche mit Aufnahme eines Periochips (gelb) und eines gelförmigen Drug-Delivery-Systems (blau)

Will man eine prophylaktische Anwendung ermöglichen, so muss das Medium möglichst flexibel in der parodontalen Tasche verteilt werden können. Betrachtet man hierbei den Periochip, so erkennt man, dass dieser bedingt durch die Form und Größe (4 mm x 5 mm x 0,35 mm) erst ab Sondierungstiefen von 5 mm effektiv eingesetzt werden kann. Ab dieser Sondierungstiefe liegt in der Regel schon eine Destruktion von parodontalen Geweben vor. Somit scheint die Verwendung eines spritzbaren Systems vorteilhaft. Je kleiner die Partikel sind, desto einfacher wird eine Verteilung in der parodontalen Tasche möglich sein. Aus diesem Grund wurden Alginat-Mikropartikel als Trägersystem für die weiteren Untersuchungen gewählt.

Alginate werden, wie eingangs beschrieben, in der Medizin und der Zahnmedizin seit langer Zeit bei vielseitigen Anwendungen in verschiedenen jeweils adaptierten Größen und Formen verwendet. Der Einsatz von Alginaten ist flexibel, sicher und kostengünstig.
Alginatpartikel können auf verschiedene Art und Weisen hergestellt werden. Je kleiner die gewünschten Partikel sein sollen, desto aufwendiger werden

die Verfahren. Hier sind Tropfverfahren, verstärkt durch elektrische Ladung und Luftströme, vibrationsunterstützte Verfahren und modifizierte Jet-Cutting Verfahren zu nennen.[54] Weitere Möglichkeiten der Air-Atomisation[55], des Flüssigkeitsdruckverfahren[56] und der Verwendung von Microfluid Apparaten[36] werden aktuell weiterentwickelt und ermöglichen es immer kleinere Partikel herzustellen.

4.1.2 Ultraschallaktivierte Herstellung

Die Entwicklung der Verfahren zur Herstellung von Alginatpartikeln beruht auf der Basis einer Ionenquervernetzung und dem Austausch multivalenter Ionen.[25] Dies geschieht bei den hier genannten Verfahren durch den Austausch der Na^{+}- durch Ca^{2+}-Ionen. Die Herstellung der Alginatpartikel mittels Ultraschallaktivierung, wie in dieser Arbeit untersucht, ist eine bisher wenig beschriebene Methodik. Mittels Ultraschallaktivierung können jedoch kleinere Tropfen als mit klassischer Luftzerstäubung generiert werden, wie von Rajan *et al.* gezeigt wurde. Sie erschienen daher in Hinsicht auf das Ziel, möglichst tief zu applizierende Mikropartikel herzustellen, vorteilhaft.[57]

Die entwickelte und im Vorfeld beschriebene Methodik verwendet Ultraschallenergie eines dentalen Ultraschall-Scalers, um die Alginatlösung zu zerstäuben. Die Ergebnisse zeigen die Möglichkeit einer reproduzierbaren Herstellung von Alginatpartikeln. Ähnlich dem Verfahren von Cascone *et al.*[58] findet die Vernetzung durch einen Ionenaustauch in der $CaCl_2$-Lösung statt. Durch die Versuche konnte gezeigt werden, dass die Ultraschallenergie des dentalen Scalers ausreicht, um Alginatlösungen bis zu einer Konzentration von 3 % erfolgreich zu zerstäuben. Die einheitlichsten Partikel wurden mit der 2% und 3%igen Alginat Lösung (siehe Abbildung 14 und 15) in Kombination mit einer 3%igen $CaCl_2$-Lösung erzielt (83 % runde Partikel). Tropfenförmige Partikel konnten besonders bei der Verwendung niedrig konzentrierter $CaCl_2$-Lösung gewonnen werden. Dies ist auf eine veränderte Vernetzung der Alginatoberfläche bei dem Auftreffen auf die $CaCl_2$-Lösung zurückzuführen.

Vergleicht man die Homogenität und Vorhersagbarkeit der Partikelformen mit anderen Herstellungsverfahren wie dem Emulsionsverfahren nach Poncelet

et al.[51] oder der Verwendung von Microfluid-Verfahren nach Liu *et al.*[36] zeigten sich weniger runde und vorhersagbare Partikelformen. Mittels Emulsionsverfahren konnten allerdings für die weiteren Versuche nicht ausreichend 50 µm große Partikel erzeugt werden. Das Microfluid-Verfahren bedingt einen deutlich komplexeren Umfang und einen deutlich höheren materiellen und finanziellen Aufwand. Eine mögliche ungleichmäßigere Freisetzung oder Beeinflussung des Freisetzungsverhalten durch die Tropfenform im Vergleich zu runden Partikeln erschien dem Autor als vernachlässigbar.

Das von uns beschriebene Verfahren erlaubt es, sehr kosten- und materialeffektiv Alginatpartikel in einer durchschnittlichen Größe von 50 µm (30-150 µm) herzustellen und zu reproduzieren. Eine Größensortierung ist durch die Verwendung von Sieben möglich.

4.1.3 Beladung der Partikel mit CHX

Die Beladung der Alginatpartikel konnte nur durch Diffusion erzielt werden. Vorversuche, Alginatlösungen direkt mit CHX anzusetzen, wie durch Silva *et al.*[38] beschrieben, scheiterten. Hierbei kam es bei Kontakt der CHX-Lösung sofort zu einer Gelbildung des Alginats (siehe Abbildung 8). CHX ist ein mehrfach positiv geladenes Molekül. Daher erfolgt bei Kontakt mit dem Alginat ein Austausch der Na-Ionen und eine Vernetzung wird initiiert. Dieser Effekt sollte genutzt werden, um Na-Alginattropfen direkt in der CHX-Lösung zu vernetzen. Es entstanden keine einheitlichen Partikel und von einer weiteren Verwendung musste abgesehen werden. Weitere Versuche CHX durch Ultraschallvermischung in die Alginatlösung einzubringen, erwiesen sich als nicht erfolgreich.

Bei den Versuchen, gefriergetrocknete Partikel durch Quellung in CHX-Lösung zu beladen, stellte sich ebenfalls keine erfolgreiche CHX-Aufnahme in die Partikel ein. Wie in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zu erkennen war, wurde nur eine geringe Quellung beobachtet. Jedoch zeigte sich durch Lagerung der Partikel in CHX eine stabilisierende Wirkung in Bezug auf die artifizielle Trocknung durch das Vakuum des ESEM.

Aus dieser Überlegung heraus wurden die Partikel für die Beladung in unterschiedlich konzentrierten CHX-Lösungen für unterschiedliche Zeiträume gelagert. Die Beladung durch Diffusion wird ebenfalls von Abruzzo *et al.* verwendet, um z.B. CHX beladene chitosan- und alginatbasierte Delivery-Devices herzustellen.[59] Die späteren Freisetzungsuntersuchungen zeigten, dass schon eine kurze Verweildauer von einer Minute in der Lösung zu einer effektiven Beladung und Freisetzung führt. Längere Beladungszeiten zeigten hingegen ein verlangsamtes Freisetzungsverhalten.

4.2 Sulkusflüssigkeit

Eine wesentliche Problematik bei der Applikation von Medikamenten im Rahmen der parodontalen Therapie stellt das Herauswaschen dieser aus der Zahnfleischtasche und somit der Verminderung der Konzentration durch die gingivale Sulkusflüssigkeit dar. Die Sulkusflussrate von gesunden mit 3-8 µl/h unterscheidet sich von erkrankten Parodontien mit 137 µl/h.[45] Die Sulkusflüssigkeit wird nach Goodson *et al.* in einer 5 mm tiefen Zahnfleischtasche bis zu 40 mal pro h erneuert.[46] Hierbei stellt die verzögerte Freisetzung des beschriebenen Systems einen Lösungsansatz dar. Denn durch die kontinuierliche Freisetzung eines Medikamentes können auch bei Herauswaschen wirksame Konzentrationen aufrecht erhalten werden.

Dieses Herauswaschen zeigt die Notwendigkeit einer ständigen Freisetzung der lokal applizierten Medikamente auf. Es scheint sinnvoll, zuerst eine hohe CHX-Dosis zu wählen, um eine initiale Reduktion der pathogenen Bakterien und somit auch der Entzündung zu erzielen. Dieses könnte durch den Einsatz kleiner Partikel und durch kurze Beladungszeiträume der Alginatpartikel erzielt werden (vergleiche Abbildung 46, 47, 49, 50). Eine reduzierte Entzündung würde im Modell somit mit der Abnahme der Sulkusflussrate einhergehen und als Konsequenz wären dann geringere Dosen von CHX nötig, um die bakterielle Besiedlung zu stabilisieren.[60]

Es bedarf weiterer Untersuchungen, ob der Sulkusfluss ausreicht, um ganze Partikel aus der Zahnfleischtasche heraus zu spülen. Jedoch könnten die Partikel für die Erhöhung der lokalen Stabilität untereinander oder an lokalen

Geweben mit weiteren Biomaterialen wie PLGA oder Chitosan, beschichtet oder in diese eingebettet werden. Dies könnte, je nach Beschichtung, in einer weiteren Verzögerung der Freisetzung und somit Steuerbarkeit, wie von Matricardi *et al.*[61] gezeigt, resultieren.

4.3 CHX-Freisetzungsverhalten

Diese Untersuchung zeigte, dass Alginatpartikel erfolgreich als Freisetzungssystem für CHX verwendet werden können. Bereits kurze Beladungszeiten von nur einer Minute reichten aus, um effektive Freisetzungsmengen zu erhalten. Längere Beladungszeiten resultierten in einer verlängerten Freisetzung von CHX aus den Alginatpartikeln. Um eine suffiziente Desinfektion der parodontalen Tasche zu erreichen, scheinen hohe initiale Dosen von CHX vorteilhaft[18] und dies könnte mit kleineren Partikeln erzielt werden. Größere Partikel setzten hingegen langsamer und in höherer Dosis CHX frei und könnten somit die Wirkung des CHX deutlich länger aufrecht erhalten. Kombinationen von unterschiedlichen Partikelgrößen wie 50 µm und 200-400 µm veränderten wiederum das Freisetzungsverhalten. Durch die Auswahl dieser Parameter konnte das Freisetzungsverhalten kontrolliert und angepasst werden. Die Größe der Partikel lassen eine Applikation und Verteilung in der Zahnfleischtasche, wie bereits gefordert, zu.

4.3.1 Vergleich der Biomaterialien PLGA und Alginat

Zwei verschiedene Biomaterialien wurden im Vorfeld untersucht, um eine geeignete Mikropartikel-Matrix für die Freisetzung von CHX zu etablieren. Silva *et al.* zeigten in Studien geeignete biochemische und biophysikalische Eigenschaften wie Degradation und Biokompatibilität für die zahnmedizinische Verwendung von Alginat als Drug-Delivery-Depot.[38] PLGA zeigt ähnliche, aber keine überlegenen, Freisetzungs- und Biokompatibilitätscharakteristika im Vergleich zu Alginat.[62] Jedoch wurde in den Freisetzungsuntersuchungen bis zu 40% weniger CHX aus den PLGA-Beads freigesetzt, weshalb Alginat für die weiteren Untersuchungen favorisiert und auch verwendet wurde.

4.3.2 Chlorhexidin zur lokalen Applikation

Aus den eingangs dargestellten und hier vertieften Gründen wurde für die Beladung der Trägermaterialien sowie für die Untersuchungen zum Freisetzungsverhalten Chlorhexidin als Inhaltsstoff der Partikel gewählt.

CHX ist ein mehrfach positiv geladenes Molekül. Über diese Ladung besitzt es die Möglichkeit sich an negativ geladene Oberflächen wie bakteriellen Zellwänden zu binden. Ebenfalls bindet CHX an die Oberflächen von Schleimhäuten, Zähnen – und sogar an die Pellicel und Speichel.[18]
Rollä beschrieb 1975 drei mögliche Mechanismen der Plaquehemmung: Hemmung der Pellicelbildung durch Einfluss auf Glycoproteine im Speichel, bakteriostatische Hemmung durch Bindung an die Bakterienmembran und durch Komplexbildung der im Speichel bestehenden Agglutinationspartikel.[63], [18]
Jenkins zeigte 1988 *in vivo* die Wirksamkeit der Plaquehemmung einer 0,2% lokal applizierten und zur Spülung der gesamten Mundhöhle angewendeten CHX-Lösung an Schmelz-Plättchen. Er schlussfolgerte, dass der Gesamteffekt sich aus einer sofort wirksamen bakteriotoxischen und einer verzögerten bakteriostatischen Wirkung, an der Oberfläche des Pellicel, zusammensetzt.[64] Diese Zusammenhänge zeigen die sogenannte Substantivität des CHX und begründen eine verlängerte Wirkdauer des Medikaments in der Mundhöhle.[18]

Betrachtet man den plaquehemmenden Mechanismus des CHX genauer, so kann man erkennen, dass die Wirkung von geringen Mengen CHX ausreicht, um die dem Zahn oberflächlich aufgelagerten Bakterien zu hemmen. Über eine mit der Zeit steigende Konzentration wird somit ein bakterienhemmender Zustand gefördert werden. Daher sind mit hoher Wahrscheinlichkeit hohe initiale Dosen vorteilhaft und danach auch gering steigende Freisetzungen immer noch effektiv. [18]

Für die Anforderungen an ein Drug-Delivery-Device nach Greenstein *et al.*, nämlich eine langfristige Aufrechterhaltung einer wirksamen Konzentration des verwendeten Medikamentes, zeigt sich hier CHX im Vorteil gegenüber

möglicher Antibiotika. CHX wirkt direkt an den Zellwänden der Bakterien und somit deutlich schneller als z.B. Tetrazykline, welche die Proteinsynthese inhibieren. Hierfür bedarf es auch einer längeren Wirkungsperiode.[22] Wie eingangs erwähnt, bietet CHX noch einen weiteren, fundamentalen Vorteil gegenüber dem Einsatz von Antibiotika: Bislang konnte keine Ausbildung von Resistenzen beobachtet werden. Angesichts der globalen Zunahme solcher Resistenzen und den bereits besorgniserregenden Zahlen an multiresistenten Erregern wie MRSA oder 4MRGN ist dies sicherlich begrüßenswert.[65]

Die Freisetzung von CHX wird nicht nur in der Mundhöhle und dem Parodont angewandt, sondern auch um eine bakterielle Besiedlung von Geweben in anderen Bereichen zu verringern. Zur CHX-Freisetzung aus Alginat existieren allerdings nahezu keine Untersuchungen. Lediglich Verwendungen zur Wundheilung und vaginale Applikationen wurden bislang untersucht.[66], [67] Abruzzo *et al.*, entwickelten beispielsweise ein Freisetzungssystem aus Chitosan und Alginat für vaginale Anwendungen.[59]
Für eine intraorale Anwendung untersuchten Silva *et al.* mehrlagige CHX-haltige Membranen.[38] Garner *et al.* beschrieben die Verwendung von CHX-beladenen Hexametaphostphat-Nanopartikeln in der Mundhöhle.[68] Soriano-Souza *et al.* verwendeten CHX-beladene Hydroxylapatitpartikel um osteokonduktive Eigenschaften zu untersuchen.[69] Hierbei wurde versucht unterschiedliche Effekte wie Desinfektion und Regeneration zu kombinieren.
Im Rahmen der Wundheilung zeigten Jiang *et al.* ebenfalls regenerative Potentiale von platelet-growth factors in Kombination mit CHX-Freisetzung aus PLGA Mikropartikeln.[70] Ähnliche duale Applikationsformen könnten ebenfalls bei Verwendung von Alginat als Trägermaterial realisiert werden.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen aus Sicht des Autors vielversprechende Möglichkeiten, die lokale Freisetzung von CHX aus Alginatpartikeln in die Parodontitistherapie zu überführen. Inwieweit die intraorale Anwendung dieser These standhält, müssen letztendlich klinische Studien zeigen.

4.3.3 Vergleich der Referenzmaterialien

Das Xanthan-basierte Gel Chlosite enthält nach Herstellerangaben 1,5% CHX insgesamt. Dies entspricht bei einer Probenmasse von 10 mg 150 µg CHX. Mittels HPLC-Technik konnten nur 103 µg detektiert werden. Hiervon wurden bereits in den ersten 10 h 83 µg freigesetzt. Verglichen mit einer Gesamtfreisetzung von 1,2 mg aus dem Gelatinechip ist dies ein 12-fach kleinerer Anteil. Das System (Chlosite) ist somit den Sustainable-Release-Devices zuzuordnen. Allerdings wurde ebenfalls nur ca. die Hälfte des eigentlich beinhalteten CHX (2,5 mg) aus dem Gelatinechip gemessen. Hierbei lagen deutliche Unterschiede der einzelnen Proben vor (1040-1706 µg). Dies spricht für eine uneinheitliche Verteilung des CHX im Gelatinechip.

Deutlich geringere Abweichungen wurden bei den Alginatpartikel festgestellt. Vergleicht man nun die Gesamtanteile der beiden Partikelkombinationen (50/50 w/w) und (30/70 w/w) der 50 µm und 200-400 µm großen Alginatpartikel, zeigen sich ähnliche Anteile mit 1,5 mg und 1,2 mg. Ein Unterschied der Releasing-Charakteristik liegt in der anfangs deutlich höheren Freisetzung der Alginatpartikel. Dies ist auf oberflächlich adhärentes CHX zurückzuführen. Dies bedingt ebenfalls, durch den höheren Anteil an 50 µm großen Partikeln und deren größerer Oberfläche, die größere Gesamtmenge an CHX der 50/50 w/w-Gruppe. Ab dem Zeitpunkt von 150 h zeigen die Alginat-Partikel-Kombinationen eine ähnliche Freisetzungsrate wie der Gelatinechip.

Betrachtet man eine mögliche klinische Anwendung, so könnte man die Alginatpartikelkombinationen mit dem Gelatinechip vergleichen. Dieser gelatinebasierte Chip zeigt eine erfolgreiche klinische Anwendung als Drug-Delivery-System für CHX in der parodontalen Tasche, wie von Soskolone *et al.* und Kalsi *et al.* gezeigt wurde.[39], [71]

Die Freisetzungsprofile des Gelatinechips und der Alginatpartikel-Kombinationen unterscheiden sich vor allem in der frühen und der mittleren Freisetzungsphase. Annähernd gleiche Freisetzungsraten zeigen diese

Gruppen in den späten Phasen. Somit konnte durch die Wahl unterschiedlicher Größen der Alginatbeads die CHX-Freisetzung modifiziert und kontrolliert werden. Höhere initiale CHX-Mengen scheinen von Vorteil für die Desinfektionswirkung der parodontalen Tasche zu sein und sprechen somit für eine vorteilhafte Eigenschaft der Alginatpartikel.[18]

4.4 Vorteile und klinische Anwendungsmöglichkeiten des Alginatpartikelsystems

Die Anforderungen von Goodson und Greenstein an ein dentales Drug-Delivery-System wie Erreichen des Wirkortes durch geeignete Applikation, geeignete und anhaltend hohe Wirkkonzentration und die Positionsstabilität in der Tasche können mit dem untersuchten System realisiert werden.

Die Möglichkeit der Applikation der Alginatpartikel über ein Injektionssystem stellt klinsich eine deutlich einfachere Form dar als das Platzieren eines starren Chips in einem schwer zugänglichen Bereich wie einer Zahnfleischtasche. Dies könnte den Einsatz in größeren Patientengruppen ermöglichen. Denn der Gelatinechip bedarf zur Applikation eine fortgeschrittene Destruktion der parodontalen Gewebe (Sondierungstiefe >5mm), die Alginatpartikel könnten im Gegensatz dazu schon in deutlich flachere Taschen appliziert werden.[68] Somit wäre eine prophylaktische Gabe möglich und eine protektive Wirkung zu erwarten.

Vergleicht man den Nutzen von CHX freisetzenden Produkten in klinischen Studien, so scheinen diese Vorteile vielversprechend für die Umsetzung des Alginat-Releasing-Systems in den klinischen Alltag.[72], [73] Die klinischen Ergebnisse zeigen für den Gelatinechip und das Xanthangel einen Nutzen, wenn es zusätzlich zur mechanischen Reinigung angewendet wurde.[74] So konnte in einer Studie unter Verwendung des Xanthangels ein bis zu 0,9 mm großer Attachmentgewinn der parodontalen Geweben gezeigt werden.[19] In einer Metaanalyse mit zehn eingeschlossenen Studien liegt der durchschnittliche Gewinn von Attachment bei der zusätzlichen Verwendung von dem Gelatinechip bei 0,22 mm und die Reduktion der parodontalen Tasche bei 0,3 mm im Vergleich zur alleinigen mechanischen Reinigung.[74]

Die Verwendung von anderen lokalen applizierten antibakteriell wirksamen Medikamenten zeigt ebenfalls ähnliche Ergebnisse wie die Verwendung der CHX-basierten Produkte.[74]–[76] Im Rahmen der unterstützenden Parodontitistherapie (UPT) zeigten Tonetti *et al.* einen prophylaktischen Nutzen der antibakteriellen Drug-Delivery-Device bei der Applikation in ST ≥ 5mm.[43] Eine mechanische Reinigung ist auch vor der Applikation eines antibakteriellen Stoffes in die Zahnfleischtasche sinnvoll. Hierbei werden die komplexen Biofilme zerstört und die Wirkung der Medikamente ist deutlich verbessert. Dies ist besonders bei der systemischen Gabe von Antibiotika, wie von Herrera *et al.* gefordert, unumgänglich.[77]

Eine weitere Stärke des Alginatsystems liegt darin, dass es möglich ist *in vivo* unterschiedliche Freisetzungsgrade von Medikamenten zu erzielen. In akuten Entzündungsphasen könnte zum Beispiel der Einsatz von hohen initialen Konzentrationen für einen relativ kurzfristigen Zeitraum von einigen Tagen sinnvoll sein, um somit die Symptome zu reduzieren. Für eine Prävention der bakteriellen Besiedlung und unterstützenden Desinfektionswirkung nach einer mechanischen Parodontitistherapie könnten längerfristig wirkende geringere CHX-Dosen vorteilhaft sein.[18]
Diese Möglichkeiten erlauben einen patientenadaptierten und individuell angepassten Einsatz in Form eines modular veränderbaren Systems. Diese patientenorientierten Modifikationen könnten sogar während der Behandlung (Chairside) mit dem untersuchten Alginatsystem angepasst werden. So können die Freisetzungscharakteristika der Alginatpartikel, wie beschrieben, durch die Wahl der Partikelgröße, der Beladungszeit, der verwendeten CHX-Konzentrationen und durch die Kombination dieser Partikel gesteuert werden. Das Beladen der 200-400 µm großen Partikel von nur einer Minute, würde eine effektive CHX-Freisetzung für die Behandlung von akuten parodontalen Entzündungen erreichen (minimale Hemmkonzentration MHK für Porphyromonas gingivalis 62 µg/ml).[78] Partikel mit einer längeren Lagerungszeiten in CHX und Kombinationen von verschieden großen Partikeln könnten präventiv gegen eine Rekontamination der parodontalen Tasche eingesetzt werden. So überschritt die CHX-Freisetzung aller

Partikelgruppen nach 150 h die minimale Hemmkonzentration für die meisten parodontal-pathogenen Bakterien.

Eine darüber hinausgehende Anpassung des Systems an den individuellen Entzündungsstatus des Patienten ergibt sich durch die Vielfältigkeit des Alginats. Nach einer ersten Entzündungshemmung durch Desinfektion könnte sich eine Modulation der Entzündung durch Freisetzung weiterer Wirkstoffe anschließen.[79] Die mögliche Freisetzung von probiotischen Bakterien[80], Wachstumsfaktoren[81], Stammzellen[82] oder anderen Proteinen[83] aus Alginatpartikeln stellen weitere Möglichkeiten dar, die Regeneration und Heilung in der Parodontitistherapie zu fördern.

Eine Übertragung in die klinische Anwendung scheint durch Vorteile wie ein flexibles und adaptierbares Anwendungssystem bei geringen Produktionskosten vielversprechend zu sein. Durch die genannten Eigenschaften des Alginatträgersystems könnte sich dieses therapeutische Spektrum erweitern lassen. Inwieweit Lagestabilität und das Degradation sich *in vivo* verhalten, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Die Therapiemöglichkeiten des Systems und die daraus resultierenden Therapieeinsätze müssen in weiteren experimentellen Studien erprobt und anschließend in randomisierten klinischen Studien (RCT) bestätigt werden.

5 Zusammenfassung

Die Parodontitis beschreibt eine der häufigsten chronischen Erkrankungen weltweit mit einer zunehmenden Behandlungsnotwendigkeit auf Grund von Interaktionen mit Allgemeinerkrankungen wie z.B. dem Diabetes mellitus. Hauptziel der Parodontitistherapie ist die Beseitigung der schädlichen bakteriellen Plaque auf den Wurzeloberflächen und die Stabilisierung einer gesunden Mundflora. Durch den stetigen Fluss der Sulkusflüssigkeit aus der parodontalen Tasche ist eine lokal medikamentös unterstützende Therapie nur durch verzögerte Freisetzung möglich. Hierfür können sogenannte Drug-Delivery-Systeme verwendet werden. Chlorhexidin zeigt eine sehr gute Hemmung der Biofilmbildung und wird daher seit vielen Jahren in der Zahnmedizin zur Hemmung der Plaquebildung eingesetzt. Eine kontrollierte Freisetzung von Chlorhexidin aus Alginat-Mikropartikeln für einen möglichen Einsatz in der Parodontitistherapie sollte im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* untersucht und entwickelt werden.

Nach der Testung geeigneter Herstellungsverfahren von Alginatpartikeln einer Größenordnung von 30-400 µm wurde ein eigenes Herstellungsverfahren (Ultraschallverfahren) entwickelt und auf Eignung zur Gewinnung von durchschnittlich 50 µm großen Partikeln getestet. Zur Herstellung größerer Partikel wurde auf ein zweites Verfahren (Emulsionstechnik) zurückgegriffen. Die Beladung der Partikel wurde über Diffusion ermöglicht. Mittels HPLC-Methode wurde die Freisetzung des Chlorhexidin über 600 h *in vitro* aus unterschiedlichen Proben gemessen und mit klinisch verwendeten Produkten verglichen.

Es zeigte sich eine steuer- und kontrollierbare Freisetzung aus den verschiedenen Alginatpartikeln. Einfluss auf die Freisetzung haben die Größe der Partikel, die Beladungszeit, die Konzentration der verwendeten Chlorhexidinlösungen und die Verwendung von Kombinationen der Partikel. Effektive Hemmkonzentrationen gegen klassische parodontal-pathogene Keime konnten mit dem untersuchten System erzielt werden. Durch die

Verwendung dieser Parameter konnte ein System etabliert werden, welches den Ansprüchen eines parodontalen Drug-Delivery-Systems gerecht wird. Die Möglichkeiten, aus Alginatpartikeln eine Vielzahl an Stoffen freisetzen zu können, versprechen weitere Entwicklungen im Rahmen eines patienten-individualisierbaren Freisetzungssystems in der Parodontitistherapie.

6 Literaturverzeichnis

[1] P. I. Eke, B. A. Dye, L. Wei, G. D. Slade, G. O. Thornton-Evans, W. S. Borgnakke, G. W. Taylor, R. C. Page, J. D. Beck, and R. J. Genco, “Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 - 2012,” *J. Periodontol.*, no. May, pp. 1–18, 2015.

[2] A. R. Jordan and W. Micheelis, “Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V),” *IDZ-Materialienreihe, Bd. 35*. Deutscher Zahnärzte Verlag DÄV, Köln, p. 617, 2016.

[3] P. E. Petersen and H. Ogawa, “Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach.,” *J. Periodontol.*, vol. 76, no. 12, pp. 2187–2193, 2005.

[4] A. T. Merchant, P. Georgantopoulos, C. J. Howe, S. S. Virani, D. A. Morales, and K. S. Haddock, “Effect of Long-Term Periodontal Care on Hemoglobin A1c in Type 2 Diabetes.,” *J. Dent. Res.*, vol. 95, no. 4, pp. 408–15, 2016.

[5] X. Zhou, W. Zhang, X. Liu, W. Zhang, and Y. Li, “Interrelationship between diabetes and periodontitis: Role of hyperlipidemia,” *Arch. Oral Biol.*, vol. 60, no. 4, pp. 667–674, 2015.

[6] Q. He, J. Johnston, J. Zeitlinger, K. City, and K. City, “Periodontal disease and metabolic syndrome: A qualitative critical review of their association,” *HHS Public Access*, vol. 33, no. 4, pp. 395–401, 2015.

[7] J. G. Caton, G. Armitage, T. Berglundh, I. L. C. Chapple, S. Jepsen, K. S. Kornman, B. L. Mealey, P. N. Papapanou, M. Sanz, and M. S. Tonetti, “A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification,” *J. Clin. Periodontol.*, vol. 45, pp. S1–S8, Jun. 2018.

[8] P. N. Papapanou, M. Sanz, N. Buduneli, T. Dietrich, M. Feres, D. H. Fine, T. F. Flemmig, R. Garcia, W. V. Giannobile, F. Graziani, H. Greenwell, D. Herrera, R. T. Kao, M. Kebschull, D. F. Kinane, K. L. Kirkwood, T. Kocher, K. S. Kornman, P. S. Kumar, B. G. Loos, E. Machtei, H. Meng, A. Mombelli, I. Needleman, S. Offenbacher, G. J. Seymour, R. Teles, and M. S. Tonetti, “Periodontitis: Consensus report

of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions," *J. Clin. Periodontol.*, vol. 45, pp. S162–S170, Jun. 2018.

[9] I. L. C. Chapple, B. L. Mealey, T. E. Van Dyke, P. M. Bartold, H. Dommisch, P. Eickholz, M. L. Geisinger, R. J. Genco, M. Glogauer, M. Goldstein, T. J. Griffin, P. Holmstrup, G. K. Johnson, Y. Kapila, N. P. Lang, J. Meyle, S. Murakami, J. Plemons, G. A. Romito, L. Shapira, D. N. Tatakis, W. Teughels, L. Trombelli, C. Walter, G. Wimmer, P. Xenoudi, and H. Yoshie, "Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions," *J. Clin. Periodontol.*, vol. 45, pp. S68–S77, Jun. 2018.

[10] K. Madhumathi and T. S. Sampath Kumar, "Regenerative potential and anti-bacterial activity of tetracycline loaded apatitic nanocarriers for the treatment of periodontitis.," *Biomed. Mater.*, vol. 9, no. 3, p. 35002, Jun. 2014.

[11] S. G. Nath and R. Raveendran, "Microbial dysbiosis in periodontitis.," *J. Indian Soc. Periodontol.*, vol. 17, no. 4, pp. 543–5, Jul. 2013.

[12] P. J. Sansonetti, "To be or not to be a pathogen: that is the mucosally relevant question.," *Mucosal Immunol.*, vol. 4, no. 1, pp. 8–14, Jan. 2011.

[13] J. Meyle and I. L. C. Chapple, "Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis," *Periodontol. 2000*, vol. 69, pp. 7–17, 2015.

[14] C. J. Smiley, S. L. Tracy, E. Abt, B. S. Michalowicz, M. T. John, J. Gunsolley, C. M. Cobb, J. Rossmann, S. K. Harrel, J. L. Forrest, P. P. Hujoel, K. W. Noraian, H. Greenwell, J. Frantsve-Hawley, C. Estrich, and N. Hanson, "Systematic review and meta-analysis on the nonsurgical treatment of chronic periodontitis by means of scaling and root planing with or without adjuncts," *J. Am. Dent. Assoc.*, vol. 146, no. 7, p. 508–524.e5, 2015.

[15] L. J. A. Heitz-Mayfield and N. P. Lang, "Surgical and nonsurgical periodontal therapy. Learned and unlearned concepts," *Periodontol. 2000*, vol. 62, no. 1, pp. 218–231, Jun. 2013.

[16] F. Graziani, D. Karapetsa, N. Mardas, N. Leow, and N. Donos, “Surgical treatment of the residual periodontal pocket,” *Periodontol. 2000*, vol. 76, no. 1, pp. 150–163, Feb. 2018.

[17] C. R. Schiott, H. Löe, S. B. Jensen, M. Kilian, R. M. Davies, and K. Glavind, “The effect of chlorhexidine mouthrinses on the human oral flora.,” *J. Periodontal Res.*, vol. 5, no. 2, pp. 84–9, Jan. 1970.

[18] C. G. Jones, “Chlorhexidine: is it still the gold standard?,” *Periodontol. 2000*, vol. 15, no. 1, pp. 55–62, Oct. 1997.

[19] P. Matesanz-Pérez, M. García-Gargallo, E. Figuero, A. Bascones-Martínez, M. Sanz, and D. Herrera, “A systematic review on the effects of local antimicrobials as adjuncts to subgingival debridement, compared with subgingival debridement alone, in the treatment of chronic periodontitis,” *Journal of Clinical Periodontology*, vol. 40, no. 3. pp. 227–241, Mar-2013.

[20] H. A. J. Da Rocha, C. F. Silva, F. L. Santiago, L. G. Martins, P. C. Dias, and D. De Magalhães, “Local Drug Delivery Systems in the Treatment of Periodontitis: A Literature Review.,” *J. Int. Acad. Periodontol.*, 2015.

[21] G. Greenstein and M. Tonetti, “The role of controlled drug delivery for periodontitis. The Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology.,” *J. Periodontol.*, vol. 71, no. 1, pp. 125–40, Jan. 2000.

[22] G. Greenstein and M. Tonetti, “The Role of Controlled Drug Delivery for Periodontitis,” *J. Periodontol.*, vol. 71, no. 1, pp. 125–140, Jan. 2000.

[23] A. Kumari, S. K. Yadav, and S. C. Yadav, “Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 75, no. 1, pp. 1–18, 2010.

[24] G. Tripodo, A. Trapani, M. L. Torre, G. Giammona, G. Trapani, and D. Mandracchia, “Hyaluronic acid and its derivatives in drug delivery and imaging: Recent advances and challenges,” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 97. pp. 400–416, 2015.

[25] K. Y. Lee and D. J. Mooney, “Alginate: Properties and biomedical applications,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 37, no. 1, pp. 106–126, Jan. 2012.

[26] D. Jain and D. Bar-Shalom, “Alginate drug delivery systems: application in context of pharmaceutical and biomedical research,” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 40, no. 12, pp. 1576–1584, Dec. 2014.

[27] H. H. Tønnesen and J. Karlsen, “Alginate in Drug Delivery Systems,” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 28, no. 6, pp. 621–630, 2002.

[28] D. Z. Liu, W. P. Chen, C. P. Lee, S. L. Wu, Y. C. Wang, and T. W. Chung, “Effects of alginate coated on PLGA microspheres for delivery tetracycline hydrochloride to periodontal pockets.,” *J. Microencapsul.*, vol. 21, no. 6, pp. 643–52, Sep. 2004.

[29] A. P. Gadad, M. B. Patil, S. N. Naduvinamani, V. S. Mastiholimath, P. M. Dandagi, and A. R. Kulkarni, “Sodium alginate polymeric floating beads for the delivery of cefpodoxime proxetil,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 114, no. 3, pp. 1921–1926, 2009.

[30] S. Jana, K. Kumar Sen, and A. Gandhi, “Alginate Based Nanocarriers for Drug Delivery Applications,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 22, no. 22, pp. 3399–3410, May 2016.

[31] S. Sugiura, T. Oda, Y. Aoyagi, R. Matsuo, T. Enomoto, K. Matsumoto, T. Nakamura, M. Satake, A. Ochiai, N. Ohkohchi, and M. Nakajima, “Microfabricated airflow nozzle for microencapsulation of living cells into 150 micrometer microcapsules.,” *Biomed. Microdevices*, vol. 9, no. 1, pp. 91–9, Feb. 2007.

[32] K. Sultana, G. Godward, N. Reynolds, R. Arumugaswamy, P. Peiris, and K. Kailasapathy, “Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt.,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 62, no. 1–2, pp. 47–55, Dec. 2000.

[33] J. S. Lee, D. S. Cha, and H. J. Park, “Survival of freeze-dried Lactobacillus bulgaricus KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles.,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 24, pp. 7300–5, Dec. 2004.

[34] P. de Vos, H. A. Lazarjani, D. Poncelet, and M. M. Faas, “Polymers in cell encapsulation from an enveloped cell perspective.,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Nov. 2013.

[35] M. T. Cook, G. Tzortzis, D. Charalampopoulos, and V. V

Khutoryanskiy, “Production and evaluation of dry alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria.,” *Biomacromolecules*, vol. 12, no. 7, pp. 2834–40, Jul. 2011.

[36] K. Liu, H.-J. Ding, J. Liu, Y. Chen, and X.-Z. Zhao, “Shape-controlled production of biodegradable calcium alginate gel microparticles using a novel microfluidic device.,” *Langmuir*, vol. 22, no. 22, pp. 9453–7, Oct. 2006.

[37] L. Fan, Y. Du, B. Zhang, J. Yang, J. Zhou, and J. F. Kennedy, “Preparation and properties of alginate/carboxymethyl chitosan blend fibers,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 65, no. 4, pp. 447–452, 2006.

[38] M. dos S. Silva, N. L. Neto, S. A. da Costa, S. M. da Costa, T. M. Oliveira, R. C. de Oliveira, and M. A. A. M. Machado, “Biophysical and biological characterization of intraoral multilayer membranes as potential carriers: A new drug delivery system for dentistry,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 71, pp. 498–503, 2017.

[39] W. A. Soskolne, T. Chajek, M. Flashner, I. Landau, A. Stabholtz, B. Kolatch, and E. I. Lerner, “An in vivo study of the chlorhexidine release profile of the PerioChip in the gingival crevicular fluid, plasma and urine,” *J Clin Periodontol*, vol. 25, no. 12, pp. 1017–1021, 1998.

[40] H. Anwar, J. L. Strap, and A. J. W. Costerton2, “MINIREVIEW Establishment of Aging Biofilms: Possible Mechanism of Bacterial Resistance to Antimicrobial Therapy,” 1992.

[41] M. Quirynen, W. Teughels, and D. Van Steenberghe, “Microbial shifts after subgingival debridement and formation of bacterial resistance when combined with local or systemic antimicrobials,” in *Oral Diseases*, 2003, vol. 9, no. SUPPL. 1, pp. 30–37.

[42] P. Matesanz-Pérez, M. García-Gargallo, E. Figuero, A. Bascones-Martínez, M. Sanz, and D. Herrera, “A systematic review on the effects of local antimicrobials as adjuncts to subgingival debridement, compared with subgingival debridement alone, in the treatment of chronic periodontitis,” *J. Clin. Periodontol.*, vol. 40, no. 3, pp. 227–241, Mar. 2013.

[43] M. S. Tonetti, N. P. Lang, P. Cortellini, J. E. Suvan, P. Eickholz, I. Fourmousis, H. Topoll, T. Vangsted, and B. Wallkamm, “Effects of a

single topical doxycycline administration adjunctive to mechanical debridement in patients with persistent/recurrent periodontitis but acceptable oral hygiene during supportive periodontal therapy," *J. Clin. Periodontol.*, vol. 39, no. 5, pp. 475–482, May 2012.

[44] J. J. Taylor and P. M. Preshaw, "Gingival crevicular fluid and saliva," *Periodontol. 2000*, vol. 70, no. 1, pp. 7–10, Feb. 2016.

[45] A. Gcf and J. M. Goodson, "Gingival crevice fluid flow," *Measurement*, vol. 31, no. 1, pp. 43–54, Feb. 2003.

[46] GOODSON and J. Goodson, "PHARMACOKINETIC PRINCIPLES CONTROLLING EFFICACY OF ORAL-THERAPY," *J. Dent. Res.*, vol. 68, no. supplement, pp. 1625–1632, 1989.

[47] M. R. Carrilho, R. M. Carvalho, E. N. Sousa, J. Nicolau, L. Breschi, A. Mazzoni, L. Tjäderhane, F. R. Tay, K. Agee, and D. H. Pashley, "Substantivity of chlorhexidine to human dentin.," *Dent. Mater.*, vol. 26, no. 8, pp. 779–85, Aug. 2010.

[48] M. Scholz, T. Reske, F. Böhmer, A. Hornung, N. Grabow, and H. Lang, "In vitro chlorhexidine release from alginate based microbeads for periodontal therapy," *PLoS One*, vol. 12, no. 10, p. e0185562, Oct. 2017.

[49] R. J. Lang, "Ultrasonic Atomization of Liquids," *J. Acoust. Soc. Am.*, vol. 34, no. 1, p. 6, Jul. 1962.

[50] M. N. Topp and P. Eisenklam, "Industrial and medical uses of ultrasonic atomizers," *Ultrasonics*, vol. 10, no. 3, pp. 127–133, May 1972.

[51] D. Poncelet, "Production of alginate beads by emulsification/internal gelation.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 944, pp. 74–82, Nov. 2001.

[52] E. Zee, E. H. Davies, and H. N. Newman, "Marking width, calibration from tip and tine diameter of periodontal probes," *J. Clin. Periodontol.*, vol. 18, no. 7, pp. 516–520, Aug. 1991.

[53] P. M. Bartold and P. M. Bartold, "Periodontal tissues in health and disease: introduction.," *Periodontol. 2000*, vol. 40, pp. 7–10, 2006.

[54] U. Prüsse, L. Bilancetti, M. Bučko, B. Bugarski, J. Bukowski, P. Gemeiner, D. Lewińska, V. Manojlovic, B. Massart, C. Nastruzzi, V. Nedovic, D. Poncelet, S. Siebenhaar, L. Tobler, A. Tosi, A.

Vikartovská, and K.-D. Vorlop, “Comparison of different technologies for alginate beads production,” *Chem. Pap.*, vol. 62, no. 4, pp. 364–374, Jul. 2008.

[55] S. Abang, P. Loh, P. Ravindra, Z. Yim, and E. Chan, “Production of Alginate Microbeads through Air Atomisation Technique,” *impascience.eu*, pp. 7–11, 2006.

[56] S. Arumuganathar, S. N. Jayasinghe, and N. Suter, “Versatile methodology for generating size-controlled composite micrometer beads capsulating nanomaterials,” no. 2, pp. 30–34, 2007.

[57] R. Rajan and A. B. Pandit, “Correlations to predict droplet size in ultrasonic atomisation,” *Ultrasonics*, vol. 39, no. 4, pp. 235–255, 2001.

[58] S. Cascone, G. Lamberti, G. Titomanlio, A. A. Barba, and M. D’Amore, “Microencapsulation effectiveness of small active molecules in biopolymer by ultrasonic atomization technique,” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 38, no. 12, pp. 1486–1493, Dec. 2012.

[59] A. Abruzzo, F. Bigucci, T. Cerchiara, B. Saladini, M. C. Gallucci, F. Cruciani, B. Vitali, and B. Luppi, “Chitosan/alginate complexes for vaginal delivery of chlorhexidine digluconate,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 91, no. 2, pp. 651–658, 2013.

[60] G. S. Griffiths, “Formation, collection and significance of gingival crevice fluid,” *Periodontol. 2000*, vol. 31, no. 1, pp. 32–42, Feb. 2003.

[61] P. Matricardi, C. Di Meo, T. Coviello, and F. Alhaique, “Recent advances and perspectives on coated alginate microspheres for modifi ed drug delivery,” pp. 417–425, 2008.

[62] H. K. Makadia and S. J. Siegel, “Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier.,” *Polymers (Basel).*, vol. 3, no. 3, pp. 1377–1397, Sep. 2011.

[63] G. Rölla, B. Melsen, and G. Rolla, “On the Mechanism of the Plaque Inhibition by Chlorhexidine.”

[64] S. Jenkins, M. Addy, and W. Wade, “The mechanism of action of chlorhexidine: A study of plaque growth on enamel inserts in vivo,” *J. Clin. Periodontol.*, vol. 15, no. 7, pp. 415–424, Aug. 1988.

[65] WHO, “WHO | Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014,” World Health Organization, 2016.

[66] J. Wasiak and H. Cleland, “Burns: dressings.,” *BMJ Clin. Evid.*, vol. 2015, Jul. 2015.

[67] S. Ampawong and P. Aramwit, “A study of long-term stability and antimicrobial activity of chlorhexidine, polyhexamethylene biguanide, and silver nanoparticle incorporated in sericin-based wound dressing,” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, pp. 1–17, Apr. 2017.

[68] S. Garner and M. Barbour, “Nanoparticles for controlled delivery and sustained release of chlorhexidine in the oral environment,” *Oral Dis.*, vol. 21, no. 5, pp. 641–644, Jul. 2015.

[69] C. A. Soriano-Souza, A. L. Rossi, E. Mavropoulos, M. A. Hausen, M. N. Tanaka, M. D. Calasans-Maia, J. M. Granjeiro, M. H. M. Rocha-Le??o, and A. M. Rossi, “Chlorhexidine-loaded hydroxyapatite microspheres as an antimicrobial delivery system and its effect on in vivo osteo-conductive properties,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 26, no. 4, p. 166, Apr. 2015.

[70] B. Jiang, G. Zhang, and E. M. Brey, “Dual delivery of chlorhexidine and platelet-derived growth factor-BB for enhanced wound healing and infection control,” *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 2, pp. 4976–4984, Feb. 2013.

[71] R. Kalsi, K. L. Vandana, and S. Prakash, “Effect of local drug delivery in chronic periodontitis patients: A meta-analysis.,” *J. Indian Soc. Periodontol.*, vol. 15, no. 4, pp. 304–9, Oct. 2011.

[72] W. A. Soskolne, H. M. Proskin, and A. Stabholz, “Probing depth changes following 2 years of periodontal maintenance therapy including adjunctive controlled release of chlorhexidine.,” *J. Periodontol.*, vol. 74, no. 4, pp. 420–7, Apr. 2003.

[73] M. T. Chitsazi, A. Kashefimehr, R. Pourabbas, A. Shirmohammadi, V. Ghasemi Barghi, and B. Daghigh Azar, “Efficacy of Subgingival Application of Xanthan-based Chlorhexidine Gel Adjunctive to Full-mouth Root Planing Assessed by Real-time PCR: A Microbiologic and Clinical Study.,” *J. Dent. Res. Dent. Clin. Dent. Prospects*, vol. 7, no. 2, pp. 95–101, 2013.

[74] K. Jepsen and S. Jepsen, “Antibiotics/antimicrobials: systemic and local administration in the therapy of mild to moderately advanced

periodontitis.," *Periodontol. 2000*, vol. 71, no. 1, pp. 82–112, Jun. 2016.

[75] H. A. J. Da Rocha, C. F. Silva, F. L. Santiago, L. G. Martins, P. C. Dias, and D. De Magalhães, "Local Drug Delivery Systems in the Treatment of Periodontitis: A Literature Review.," *J. Int. Acad. Periodontol.*, vol. 17, no. 3, pp. 82–90, Jul. 2015.

[76] T. W. J. Stanford, "Local drug delivery in the treatment of periodontitis," *Tex. Dent. J.*, vol. 118, no. 10, pp. 978–983, 2001.

[77] D. Herrera, B. Alonso, R. León, S. Roldán, and M. Sanz, "Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm," *J. Clin. Periodontol.*, vol. 35, pp. 45–66, Sep. 2008.

[78] A. Stanley, M. Wilson, and H. N. Newman, "The in vitro effects of chlorhexidine on subgingival plaque bacteria.," *J. Clin. Periodontol.*, vol. 16, no. 4, pp. 259–64, Apr. 1989.

[79] S. C. Sundararaj, M. V Thomas, R. Peyyala, T. D. Dziubla, and D. A. Puleo, "Design of a multiple drug delivery system directed at periodontitis.," *Biomaterials*, vol. 34, no. 34, pp. 8835–42, Nov. 2013.

[80] S. Mandal and S. Hati, "Microencapsulation of bacterial cells by emulsion technique for probiotic application," in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1479, 2017, pp. 273–279.

[81] T. Gonzalez-Fernandez, E. G. Tierney, G. M. Cunniffe, F. J. O'Brien, and D. J. Kelly, "Gene Delivery of TGF-β3 and BMP2 in an MSC-Laden Alginate Hydrogel for Articular Cartilage and Endochondral Bone Tissue Engineering.," *Tissue Eng. Part A*, vol. 22, no. 9–10, pp. 776–87, May 2016.

[82] F.-M. Chen, H.-H. Sun, H. Lu, and Q. Yu, "Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration.," *Biomaterials*, vol. 33, no. 27, pp. 6320–44, Sep. 2012.

[83] S. Bazban-Shotorbani, E. Dashtimoghadam, A. Karkhaneh, M. M. Hasani-Sadrabadi, and K. I. Jacob, "Microfluidic Directed Synthesis of Alginate Nanogels with Tunable Pore Size for Efficient Protein Delivery," *Langmuir*, vol. 32, no. 19, pp. 4996–5003, May 2016.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Strukturformel von Chlorhexidin 12
Abbildung 2: Strukturformel von Mannuronat 13
Abbildung 3: Strukturformel von Guloronat 13
Abbildung 4: Alginat-Abbindereaktion [48] 14
Abbildung 5: Darstellung Eintropftechnik 16
Abbildung 6: Versuchsaufbau zur Herstellung von Alginatpartikeln mittels Ultraschall-Methodik 18
Abbildung 7: Darstellung des Emulsionsverfahren zur Herstellung alginatbasierter Mikropartikel. [48] 23
Abbildung 8: Einbringen von CHX-Diacetat in Alginat 24
Abbildung 9: Lichtmikroskopische Aufnahme von Alginatpartikeln: Alginat 0,5 %, $CaCl_2$ 2 % 35
Abbildung 10: Lichtmikroskopische Aufnahme von Alginatpartikeln: Alginat 1 %, $CaCl_2$ 2 % 35
Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahme von Alginatpartikeln: Alginat 2 % $CaCl_2$ 2 % 35
Abbildung 12: Lichtmikroskopische Aufnahme von Alginatpartikeln: Alginat 3 %; $CaCl_2$ 2 % 35
Abbildung 13: Auswertung Partikelform bei veränderter Alginatkonzentration 35
Abbildung 14: Auswertung Partikelgröße bei veränderter Alginatkonzentration 36
Abbildung 15: Auswertung Partikelhomogenität bei veränderter Alginatkonzentration 36
Abbildung 16: Lichtmikroskopische Aufnahme von Alginatpartikeln: $CaCl_2$ 1 %; Alginat 2 % 37
Abbildung 17: Lichtmikroskopische Aufnahme von Alginatpartikeln: $CaCl_2$ 2 % Alginat 2 % 37
Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahme von Alginatpartikeln: $CaCl_2$ 3 % Alginat 2 % 37

Abbildung 19: Auswertung Partikelform bei unterschiedlicher $CaCl_2$-Konzentration 37
Abbildung 20: Auswertung Partikelgröße bei unterschiedlicher $CaCl_2$-Konzentration 38
Abbildung 21: Auswertung der Partikelhomogenität bei unterschiedlicher $CaCl_2$-Konzentration 38
Abbildung 22: ESEM-Aufnahmen von Alginatpartikeln der Größe: 30-100 µm 40
Abbildung 23: ESEM-Aufnahmen von Alginatpartikeln der Größe: 100-200 µm 40
Abbildung 24: ESEM-Aufnahmen von Alginatpartikeln der Größe: 200-400 µm 40
Abbildung 25: ESEM-Aufnahmen von Alginatpartikeln der Größe: 30-100 µm in CHX gelagert 41
Abbildung 26: ESEM-Aufnahmen von Alginatpartikeln der Größe: 100-200 µm in CHX gelagert 41
Abbildung 27: ESEM-Aufnahmen von Alginatpartikeln der Größe: 200-400 µm in CHX gelagert 41
Abbildung 28: Alginatpartikel mit einer Größe von 200-400 µm unter Betrachtung mittels Auflichtmikroskop 42
Abbildung 29: Alginatpartikel mit einer Größe von 100-200 µm unter Betrachtung mittels Auflichtmikroskop 42
Abbildung 30: Alginatpartikel mit einer Größe von 30-100 µm unter Betrachtung mittels Auflichtmikroskop 42
Abbildung 31: Alginatpartikel hergestellt mittels Ultraschallverfahren, mit einer Größe von 30-100 µm unter Betrachtung mittels Auflichtmikroskop 43
Abbildung 32: gefriergetrocknete Alginatpartikel, hergestellt mittels Ultraschalltechnik, Betrachtung im ESEM; Durchschnittliche Größe: 50 µm 44
Abbildung 33: REM-Aufnahmen von gefriergetrockneten Alginatpartikeln; hergestellt mittels Ultraschalltechnik; durchschnittliche Größe: 50 µm; Lagerung 24 h in CHX 44

Abbildung 34: REM-Aufnahmen von gefriergetrockneten Alginatpartikeln; durchschnittliche Größe: 100-200 µm 44
Abbildung 35: REM-Aufnahmen von gefriergetrockneten Alginatpartikeln; durchschnittliche Größe: 100-200 µm; Lagerung 24 h in CHX 44
Abbildung 36: REM-Aufnahmen von gefriergetrockneten Alginatpartikeln; durchschnittliche Größe: 200-400 µm 45
Abbildung 37: REM-Aufnahmen von gefriergetrockneten Alginatpartikeln; durchschnittliche Größe von 200-400 µm; Lagerung 24 h in CHX 45
Abbildung 38: Lichtmikroskopische Betrachtung; gefriergetrocknete Alginatpartikel (Ultraschallverfahren), Zustand nach unterschiedlichen Lagerungszeiten in H_2O und CHX 46
Abbildung 39: Lichtmikroskopische Betrachtung; gefriergetrocknete Alginatpartikel (100-200 µm), Zustand nach unterschiedlichen Lagerungszeiten in H_2O und CHX 46
Abbildung 40: Lichtmikroskopische Betrachtung; gefriergetrocknete Alginatpartikel (200-400 µm), Zustand nach unterschiedlichen Lagerungszeiten in H_2O und CHX 47
Abbildung 41: Stabilität von CHX über 7 d in Kunstspeichel ohne Sorbinsäure bei RT und 37 °C 48
Abbildung 42: CHX-Freisetzungsprofile aus unterschiedlich großen Alginatpartikeln; Kumulative CHX-Freisetzung der Screeninguntersuchung (HPLC) über 120 h (n=1 je Probe). [48] 49
Abbildung 43: CHX-Freisetzungsprofil aus unterschiedlichen biodegradierbaren Materialien; Kumulative CHX-Freisetzung aus 50 µm großen PLGA-Partikel und 50 µm großen Alginatpartikel über 630 h (Mittelwert ± SD, n=5).[48] 50
Abbildung 44: CHX-Freisetzungsprofil von unterschiedlichen CHX Konzentrationen; Kumulative CHX-Freisetzung über 630 h Beladung von 50 µm Alginatpartikeln mit CHX über 24 h in 10 % und 20 % konzentrierter CHX-Lösung (Mittelwert ± SD, n=5).[48] 51
Abbildung 45: Initiales CHX-Freisetzungsprofil von unterschiedlichen CHX Konzentrationen; Kumulative CHX-Freisetzung der initialen Freisetzungsmessung (HPLC) über 20 h von unterschiedlich beladenen

Partikeln (10 % und 20 % CHX) (Mittelwert ± SD, n=5). (vergleiche Abbildung 44).[48]..... 51
Abbildung 46: Initiale CHX-Freisetzungsprofile bei unterschiedlichen Beladungszeiträumen; Kumulative CHX-Freisetzung über 35 h aus 200-400 µm großen Alginatpartikeln, beladen für 1 min, 30 min, 6 h und 24 h, und den Referenzgruppen Periochip und Chlosite (Mittelwert ± SD, n=5).[48]..... 52
Abbildung 47: CHX-Freisetzungsprofile bei unterschiedlichen Beladungszeiträumen; Kumulative CHX Freisetzung über 400 h aus 200-400 µm großen Alginatpartikeln, beladen für 1 min, 30 min, 6 h und 24 h, und den Referenzgruppen Periochip und Chlosite (Mittelwert ± SD, n=5).[48]..... 53
Abbildung 48: Normierte CHX-Freisetzungsprofile bei unterschiedlicher Beladungszeit; Normierte kumulative CHX-Freisetzung über 400 h und 20 h aus 200-400 µm großen Alginatpartikeln, beladen für 1 min, 30 min, 6 h und 24 h und Referenzgruppen Periochip und Chlosite (Mittelwert ± SD, n=5).[48]..... 54
Abbildung 49: CHX-Freisetzungprofile von Partikelkombinationen; Kumulative CHX-Freisetzung über 400 h aus Alginatpartikelkombinationen der Größen 50 µm und 200-400 µm im Verhältnis 30/70 w/w und 50/50 w/w verglichen mit Periochip (Mittelwert ± SD, n=5).[48]..... 55
Abbildung 50: Initiale CHX-Freisetzungprofile von Partikelkombinationen; Kumulative CHX-Freisetzung über 20 h aus Alginatpartikelkombinationen der Größen 50 µm und 200-400 µm im Verhältnis 30/70 w/w und 50/50 w/w verglichen mit Periochip (Mittelwert ± SD, n=5).[48]..... 56
Abbildung 51: Schematische Darstellung einer parodontalen Tasche mit Aufnahme eines Periochips (gelb) und eines gelförmigen Drug-Delivery-Systems (blau)..... 58

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Definition der Proben und Parameter zur Untersuchung des Einflusses der Intensitätseinstellung 19
Tabelle 2: Definition der Proben und Parameter zur Untersuchung des Einflusses der Rührgeschwindigkeit 19
Tabelle 3: Definition der Proben und Parameter zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Viskositäten 20
Tabelle 4: Definition der Proben und Parameter zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlich konzentrierter $CaCl_2$-Lösungen 20
Tabelle 5: Definition der Proben der ESEM-Untersuchung; (US: Abkürzung für Herstellungsverfahren mittels Ultraschall) 25
Tabelle 6: Definition der Proben zur Untersuchung von Trocknungseffekten im ESEM; (US: Abkürzung für Herstellungsverfahren mittels Ultraschall) 26
Tabelle 7: Definition der Proben für die Lichtmikroskopische Untersuchung; (US: Abkürzung für Herstellungsverfahren mittels Ultraschall) 26
Tabelle 8: Definition der Proben für den Gefriertrocknungsprozess; (US: Abkürzung für Herstellungsverfahren mittels Ultraschall) 27
Tabelle 9: HPLC-Analysebedingungen zur Detektion von CHX 28
Tabelle 10: Zusammensetzung des verwendeten Kunstspeichels ohne Sorbinsäure 29
Tabelle 11: Definition der Proben für die Screeninguntersuchung zur Testung der CHX-Freisetzung aus Alginatpartikeln nach Lagerung in CHX für 24 h 30
Tabelle 12: Definition der Proben zur Untersuchung der CHX-Freisetzung aus unterschiedlichen Biomaterialen 30
Tabelle 13: Definition der Proben zur Untersuchung der CHX-Freisetzung aus unterschiedlich beladenen Alginatpartikeln 31
Tabelle 14: Definition der Proben zur Untersuchung der CHX-Freisetzung aus unterschiedlich lang beladenen Alginatpartikeln 31
Tabelle 15: Definition der Proben zur Untersuchung der CHX-Freisetzung aus Partikelkombinationen und Referenzprodukten (US: Abkürzung für Herstellungsverfahren mittels Ultraschall) 32

7.3 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Lang für die Unterstützung und Betreuung bei der Entstehung der Dissertation.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Reske für die geduldige und entstandene freundschaftliche Betreuung bei den Freisetzungsuntersuchungen.

Des Weiteren gilt mein ganz besonderer Dank meiner Frau für die tolle Unterstützung in allen Lebenslagen während diese Arbeit entstand.

7.4 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock _____ _____

(Abgabedatum) (Malte Scholz)

7.5 Thesen

1. Durch den Einsatz von Drug-Delivery-Systemen, wie in dieser Arbeit untersucht, können Medikamente über mehr als 24 Stunden in einer Zahnfleischtasche kontrolliert freigesetzt werden. Daraus resultiert eine verlängerte Wirkdauer gegenüber einer konventionellen Applikation.

2. Alginatpartikel können durch verschiedene Verfahren hergestellt werden. Mit den untersuchten Verfahren können Partikel unterschiedlicher Größe erzeugt werden. Für eine klinische Anwendung eignen sich vorzugsweise Partikel von 30-400 µm.

3. Alginatbasierte Mikropartikel können mit Chlorhexidin beladen werden und eignen sich als Trägermaterial zur Freisetzung von Chlorhexidin in Form eines Drug-Delivery-Systems.

4. Die Freisetzung von Chlorhexidin ist durch die Wahl von Partikelparametern, wie Partikelgröße, Beladungszeit, Chlorhexidin-Konzentration und Partikelkombinationen, steuer- und kontrollierbar.

5. Alginatpartikel verteilen sich bei der Applikation auch in komplexen Morphologien parodontaler Defekte. Durch die Kontrollierbarkeit der Chlorhexidin-Freisetzung ist eine patientenindividualisierte Parodontitistherapie möglich.