

Wirksamkeit von Octenidin und Chlorhexidin in der artifiziell kontaminierten 3-D-Kultur mit humanen Keratinocyten

Effectiveness of octenidine and chlorhexidine in the artificially contaminated 3-D-culture of human keratinocytes

Abstract

Epidermis-Equivalents (EpiDerm) derived from human keratinocytes were obtained after 14 d air-lift-culture. These In-vitro-models were used for the demonstration of a possible postantiseptic effect against the test microorganisms *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* after 5 min pre-incubation of the surface of the epidermis with equimolar concentrations of the antiseptic agents chlorhexidine digluconate (CHX) and octenidine dihydrochloride (OCT) of 1.6 mmol/l.

Both antiseptics adhere to the surface of EpiDerm. Each active agent cannot be removed by washing with phosphate-buffered saline (PBS) and remains microbiocidal active. EpiDerm-OCT was more effective after 30 min at room temperature against 10^6 cfu/ml *Staphylococcus aureus* resulting 3.2–4 \log_{10} reduction, but not for EpiDerm-CHX producing only 2–2.4 \log_{10} reduction. A maximum of 0.6–1.2 \log_{10} reduction was found against *Pseudomonas aeruginosa* after 30 min exposure in EpiDerm-OCT, but there was no or a neglectable microbiocidal activity of 0–0.2 \log_{10} reduction using EpiDerm-CHX. The postantiseptic effect of OCT is superior to EpiDerm-bound CHX comparing equimolar concentrations of active agent used for pre-incubation of EpiDerm.

Treatment of EpiDerm with OCT alone or in combination with test organisms resulted in no cytotoxic effect in viable keratinocytes. In contrast to that the test organism *Staphylococcus aureus*, the active agent CHX alone or in combination with both test organisms demonstrated a cytotoxic activity reducing the viability of basal keratinocytes more than 10%. Therefore, OCT is more tolerated than CHX by basal keratinocytes of the presented In-vitro-model EpiDerm.

Keywords: reconstructed human epidermis, keratinocytes, chlorhexidine, octenidine, post-antiseptic effect

Zusammenfassung

Epidermis-Äquivalente (EpiDerm) aus menschlichen Keratinocyten, die nach 14 d Kultur in der Luft-Flüssigkeits-Phase erhalten wurden, dienten als In-vitro-Prüfmodelle, um eine mögliche postantiseptische mikrobiocidale Wirksamkeit nach 5 min Kontakt der Epidermis-Oberfläche mit äquimolaren Konzentrationen der antiseptischen Wirkstoffe Chlorhexidindigluconat (CHX) und Octenidindihydrochlorid (OCT) von 1,6 mmol/l gegenüber den Prüfmikroorganismen *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* nachzuweisen.

Die beiden antiseptischen Wirkstoffe werden an der Epidermis-Oberfläche gebunden. Der jeweilige Wirkstoff ist durch Waschen mit phosphatgepuffertem Kochsalz (PBS) nicht zu entfernen und bleibt mikrobiocid aktiv. Gegenüber *Staphylococcus aureus* resultiert nach Inokulation mit 10^6 KBE/ml nach 30 min Kontakt bei Raumtemperatur ein RF-Wertebereich für das Modell EpiDerm-OCT von 3,2–4 sowie für EpiDerm-

Gerald Müller¹
Axel Kramer²
Jörg Siebert³

1 Ernst-Moritz-Arndt-Universität,
Institut für Hygiene und
Umweltmedizin, Greifswald,
Deutschland

2 Institut für Hygiene und
Umweltmedizin der Ernst-
Moritz-Arndt-Universität,
Greifswald, Deutschland

3 Schülke & Mayr GmbH,
Norderstedt, Deutschland

CHX von 2–2,4. Eine Reduktion von *Pseudomonas aeruginosa* um 0,6–1,2 log-Stufen konnte nur im Modell EpiDerm-OCT nachgewiesen werden. Der mikrobiozide Effekt von EpiDerm-CHX mit 0–0,2 log-Stufen gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* ist vernachlässigbar. Beim Vergleich äquimolarer Wirkstoffkonzentrationen ist der postantiseptische Effekt von OCT dem von CHX überlegen.

Eine zytotoxische Reaktion auf die basalen Keratinocyten in den Epidermis-Äquivalenten ist für OCT nach Durchführung der Prüfungen mit und ohne Prüfmikroorganismen nicht nachweisbar. Dagegen zeigen sowohl der Prüfmikroorganismus *Staphylococcus aureus* und der Wirkstoff CHX allein als auch CHX in Kombination mit beiden Prüfmikroorganismen einen zytotoxischen Effekt. Demzufolge wird OCT von den basalen Keratinocyten in dem vorgestellten In-vitro-Modell EpiDerm besser vertragen als CHX

Schlüsselwörter: rekonstruierte menschliche Epidermis, Keratinocyten, Chlorhexidin, Octenidin, postantiseptischer Effekt

Einleitung

Der Wunsch beim Einsatz von antiseptischen Wirkstoffen besteht darin, dass das verwendete Antiseptikum eine bevorzugte Wirkung gegenüber Mikroorganismen besitzt. Realität ist jedoch, dass eine schädigende Wirkung in tierischen und menschlichen Geweben, insbesondere gegenüber den Zellen, als unerwünschte Begleiterscheinung auftritt, wobei sich die Relation von Wirksamkeit und Verträglichkeit Wirkstoff abhängig deutlich unterscheidet, was mit der Bestimmung des Biokompatibilitätsindex (BI) quantifiziert werden kann [1]. Sofern der BI >1 ist, d.h. die antiseptische Wirksamkeit die Zytotoxizität übertrifft, kann die zytotoxische Reaktion als Nebeneffekt toleriert werden, da die Zellen sich in dem mit dem Antiseptikum behandelten Gewebe aus dem Wundgrund und vom Wundrand her regenerieren. Die zytotoxische Aktivität des antiseptischen Wirkstoffs hat hauptsächlich eine Wechselwirkung zwischen Wirkstoff und Zellen bzw. Zell- und Gewebestandteilen als Ursache. Hieraus ergibt sich die Fragestellung, inwieweit diese Wechselwirkung eine Inaktivierung des Wirkstoffs zur Folge hat oder ein postantiseptischer Effekt nachweisbar bleibt, d.h. dass der gebundene Wirkstoff weiterhin biologisch – hinsichtlich seiner mikrobioziden Wirksamkeit – aktiv bleibt. Voruntersuchungen mit normalen Zellkulturen zeigten, dass die Wirkstoffe Chlorhexidindigluconat (CHX) und Octenidindihydrochlorid (OCT) u.a. von humanen Keratinocyten gebunden werden. Das resultierende Wirkstoffdepot bleibt weiterhin gegenüber den Prüfmikroorganismen *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* mikrobiozid wirksam, wobei die mikrobiozide Wirkung von zellgebundenem OCT der von CHX weit überlegen ist, wenn vergleichbare Konzentrationen von Wirkstoff betrachtet werden [2].

In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, inwieweit gewebeähnliche Strukturen ebenfalls in der Lage sind, die antiseptischen Wirkstoffe CHX und OCT zu binden und ob dadurch ein postantiseptischer mikrobiozider Effekt nachweisbar ist. Als In-vitro-Untersuchungsmodell dienten humane Keratinocyten, die mit

einem geeigneten Verfahren kultiviert wurden, so dass eine künstliche Epidermis in 3-D-Struktur mit typischer Stratifizierung resultierte [3]. Die Wechselwirkung zwischen antiseptischem Wirkstoff und Epidermis-Äquivalenten (EpiDerm) erfolgte ausschließlich über die Hornschicht (Stratum corneum), die keine vitalen Zellen, aber potentielle Bindungskomponenten, z.B. komplexe Lipide (Lipide), enthält [4], [5].

Methoden

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden primäre humane Keratinocyten (NHEK-Zellen, PromoCell) als Prüfzellen verwendet. Die Stammhaltung und Vermehrung der Keratinocyten erfolgte in serumfreien Medien entsprechend den Angaben von PromoCell.

Die Herstellung der EpiDerm-Kulturen erfolgte ausschließlich entsprechend den Angaben von Poumay et al. [3]. Sowohl die Anzucht der NHEK-Zellen als auch die Durchführung der Kultur in der Luft-Flüssigkeits-Phase (air-liquid-interface) zur Herstellung der rekonstruierten Epidermis erfolgte in Millicell® Culture Plate Inserts (Millicell-PCF, PIHP 01250, Millipore Corp.) mit 12 mm Ø mit einer Polycarbonatmembran mit 0,4 µm Porengröße sowie in Polycarbonate Membrane Transwell® Inserts (3401, Corning Corp.) mit den gleichen Kenngrößen. Als Kulturgefäße dienten 24well Zellkulturtestplatten (92424, Biochrom). Die resultierenden EpiDerm-Kulturen wurden ausschließlich nach 14 d air-lift-Kultur für die Testungen verwendet.

Als antiseptische Wirkstoffe dienten OCT (Charge 1071654, Schülke&Mayr) als Reinstsubstanz und CHX (C9394, Sigma) in Form einer 20%igen Lösung in Wasser. Für die Untersuchungen wurden die Prüfmikroorganismen *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442, DSMZ) und *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538, DSMZ) eingesetzt.

Tabelle 1: Resultierender RF-Wertebereich nach 5 min Vorbehandlung von 14d EpiDerm-Kulturen mit äquimolaren Prüflösungen (1,6 mmol/l) von Chlorhexidindigluconat (CHX) und Octenidindihydrochlorid (OCT) und anschließender Prüfung der postantiseptischen Wirkung gegenüber den Prüfmikroorganismen *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) und *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) nach 30 min Kontakt

| Insert / Epidermis-Prüfkörper | RF-Wertebereich (n = 4) | |
|----------------------------------|-------------------------|------------------|
| | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i> |
| Millicell | | |
| EpiDerm-OCT | 0,6 – 0,7 | 3,3 – 3,4 |
| EpiDerm-CHX | 0 | 2,0 – 2,3 |
| Transwell | | |
| EpiDerm-OCT | 0,6 – 0,7 | 3,2 – 3,3 |
| EpiDerm-CHX | 0 | 2,1 – 2,4 |
| Millicell | | |
| EpiDerm-OCT | 1,0 – 1,2 | > 4 |
| EpiDerm-CHX | 0,1 – 0,2 | 2,0 – 2,2 |

Prüfverfahren

Auf die Oberfläche (apikal) von jeweils 2 Inserts mit 14 d-EpiDerm-Kulturen wurden pro Prüfmikroorganismus 0,5 ml 0,1% (1,6 mmol/l) OCT bzw. 0,144% (1,6 mmol/l) CHX appliziert und für 5 min bei Raumtemperatur belassen. Nach Exposition mit den Wirkstoffen wurde die Oberfläche der EpiDerm-Kulturen vorsichtig mit 3x0,5 ml HEPES-BSS (Hepes-buffered balanced salt solution) für jeweils 2 min gewaschen. Der Waschlösung wurde dabei jedes Mal vollständig entfernt und anschließend verworfen. Nach dem vorsichtigen Entfernen des letzten Waschlösung wurden 0,5 ml Prüfmikroorganismen in einer Zelldichte von 10^6 – 10^7 KbE/ml in Trypton/NaCl apikal hinzugefügt und 30 min bei Raumtemperatur auf der EpiDerm-Oberfläche belassen. Anschließend wurden jeweils 0,1 ml vorsichtig durchmischter Überstand entnommen, sofort zu 0,9 ml Inaktivator gefügt und gründlich durchgemischt. Nach Anfertigung weiterer 1:10-Verdünnungen im Inaktivator wurden jeweils 0,1 ml auf vorbereitete CASO-Agarplatten ausplattiert und über 48 h bebrütet. Anschließend wurden die resultierenden KbE ausgezählt und die Reduktionsfaktoren entsprechend der DIN EN 1040 [6] berechnet. Die Untersuchungen zur Mikrobiozidie erfolgten in 3 unabhängigen Versuchsansätzen als Doppelbestimmungen.

Sämtliche Inserts mit den EpiDerm-Kulturen wurden nach der Mikrobiozidie-Prüfung gründlich mit 5x0,5 ml HEPES-BSS für jeweils 1 min gewaschen, auf Zellstoff getrocknet und anschließend der Vitalitätsprüfung mittels MTT-Test unterzogen. Der MTT-Test [7] basiert darauf, dass die mitochondriale Succinatdehydrogenase, ein Enzym der Atmungskette, das Substrat 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem unlöslichen Formazan-Derivat metabolisiert, das in vitalen Zellen gespeichert wird. Jedes Insert mit der EpiDerm-Kultur wurde in eine Vertiefung einer 24well Zellkulturtestplatte überführt, die bereits 0,5 ml NHEK-Zellkulturmedium mit 0,5 mg/ml MTT enthielten. Nach 3 h Inkubation bei 37 °C erfolgte die Elution des gebildeten Formazans

aus den zuvor auf Zellstoff getrockneten EpiDerm-Kulturen mit 2-Propanol/1 M HCl über Nacht bei 4 °C.

Als Positivkontrolle für den Nachweis einer intakten Diffusionsbarriere der EpiDerm-Kulturen diente 0,1% Natriumdodecylsulfat (SDS). Parallel erfolgten die Untersuchungen zur Zytotoxizität sowohl mit den reinen Wirkstofflösungen als auch separat mit den Prüfmikroorganismen. Die spektralphotometrische Auswertung erfolgte nach dem Überführen von jeweils 2x0,2 ml Eluat in die Vertiefungen einer unbenutzten 96well Zellkulturtestplatte bei 560 nm mit dem EIA-Reader Power Wave XS (BioTek).

Ergebnisse

Die Untersuchungen zur postantiseptischen Wirkung von CHX und OCT erfolgten in 3 unabhängigen Versuchsansätzen als Doppelbestimmungen. Eingesetzt wurden hierbei ausschließlich Epidermis-Äquivalente nach 14 d air-lift-Kultur, die in Millicell- bzw. Transwell-Inserts angezüchtet wurden. Die resultierenden Reduktionsfaktoren (RF-Werte) sind in Tabelle 1 zusammenfassend für die 3 separaten Versuchsansätze gegenübergestellt.

Die postantiseptische Wirksamkeit von an der EpiDerm-Oberfläche gebundenem OCT ist der von CHX überlegen, wenn äquimolare Konzentrationen von Wirkstoff betrachtet werden. Es ist kaum oder nur eine sehr geringe remanente mikrobiozide Wirksamkeit von epidermal gebundenem CHX gegenüber dem Prüfmikroorganismus *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen worden, wohingegen beim gebundenen OCT ein RF-Wertebereich von 0,6–1,2 resultiert (Tabelle 1). Die resultierende mikrobiozide Wirksamkeit gegenüber *Staphylococcus aureus* beträgt für EpiDerm-Oct 3,3–4 log-Stufen und für EpiDerm-CHX 2–2,4 log-Stufen.

Die resultierende Vitalität der Keratinocyten in den EpiDerm-Kulturen für die Versuchsansätze der Epidermis mit sowohl nur Prüfmikroorganismen oder nur Prüflösungen für 30 min als auch nach 5 min antiseptischer Vorbehandlung der Epidermis mit äquimolaren Konzentrationen von CHX bzw. OCT und anschließendem 30 min Kontakt mit Prüfmikroorganismen sowie der

Tabelle 2: Resultierende Vitalität [%] der Keratinocyten in den EpiDerm-Kulturen nach 30 min Kontakt der EpiDerm-Oberfläche mit den Prüfmikroorganismen *Pseudomonas aeruginosa* (Pseudo) und *Staphylococcus aureus* (Staph), mit den Prüflösungen 0,144% CHX bzw. 0,1% OCT sowie nach 5 min Vorbehandlung mit diesen Prüflösungen und anschließendem Kontakt über 30 min mit den Prüfmikroorganismen bzw. nach 30–120 min Kontakt mit 0,1% SDS

| EpiDerm-Prüfkörper | Kontaktzeit [min] | A560nm (n = 4) Mittelwert ± SD | Vitalität [%] | Signifikanz (t-Test) |
|--------------------|-------------------|-----------------------------------|---------------|----------------------|
| EpiDerm | ohne | 1,764 ± 0,055 | | |
| EpiDerm-Staph | 30 | 1,552 ± 0,083 | 88,0 | p ≥ 0,01 |
| EpiDerm-Pseudo | 30 | 1,785 ± 0,009 | 101,2 | - |
| EpiDerm-OCT-Staph | 5 + 30 | 1,708 ± 0,008 | 96,8 | - |
| EpiDerm-OCT-Pseudo | 5 + 30 | 1,641 ± 0,198 | 93,1 | - |
| EpiDerm-CHX-Staph | 5 + 30 | 1,509 ± 0,076 | 85,5 | p ≥ 0,01 |
| EpiDerm-CHX-Pseudo | 5 + 30 | 1,535 ± 0,083 | 87,0 | p ≥ 0,01 |
| EpiDerm-OCT | 30 | 1,795 ± 0,014 | 101,8 | - |
| EpiDerm-CHX | 30 | 1,618 ± 0,069 | 91,7 | p ≥ 0,02 |
| EpiDerm-0,1% SDS | 30 | 1,758 ± 0,189 | 99,7 | - |
| EpiDerm-0,1% SDS | 60 | 1,458 ± 0,043 | 82,7 | p ≥ 0,01 |
| EpiDerm-0,1% SDS | 120 | 1,193 ± 0,041 | 67,6 | p ≥ 0,01 |

Positivkontrolle 0,1% SDS nach 30–120 min Kontakt mit der Epidermis ist in Tabelle 2 zusammenfassend dargestellt. Die Bestimmung der Vitalität der Keratinocyten erfolgte mit Hilfe des Substrats MTT. Dabei wird für jeden Versuchsansatz die relative Vitalität [%] der Keratinocyten in Relation zur Kontrolle ohne Behandlung berechnet, die als 100% definiert wird.

Sowohl nach 30 min Kontakt der Epidermis mit 0,1% OCT als auch nach 5 min Vorbehandlung der Epidermis mit 0,1% OCT und anschließendem 30 min Kontakt mit beiden Prüforganismen ist keine zytotoxische Reaktion in der EpiDerm-Kulturen nachweisbar (Tabelle 2). Demgegenüber werden nach 30 min Kontakt der Epidermis mit 0,144% CHX die Keratinocyten signifikant geschädigt. Eine ähnliche signifikante Schädigung der Keratinocyten in der Epidermis ist sowohl nach 30 min Einwirkzeit mit dem Prüfmikroorganismus *Staphylococcus aureus* als auch nach 5 min Vorbehandlung mit 0,144% CHX und anschließendem Kontakt mit beiden Prüfmikroorganismen vorhanden (Tabelle 2).

Diskussion

Die postantiseptische Wirkung (Remanenzeffekt) von an der Epidermis-Oberfläche gebundenem OCT ist der von CHX überlegen, wenn äquimolare Konzentrationen von Wirkstoff zuvor über 5 min appliziert worden sind. Möglicherweise wird CHX fester an oder in das Stratum corneum verankert oder ist durch den Waschvorgang leichter entfernbar, was eine verminderte mikrobiozide Wirkung zur Folge hat. OCT hingegen bleibt bei Anwesenheit von Prüfmikroorganismen mikrobiozid aktiv und wird möglicherweise leichter von dem epidermalen Wirkstoffdepot freigesetzt.

Im Gegensatz zu OCT wird für CHX eine statistisch signifikant höhere zytotoxische Folgereaktion nachgewiesen,

die jedoch zu vernachlässigen ist, da in keinem Fall >30% der Keratinocyten geschädigt werden.

Durch weiterführende Untersuchungen in Form einer zeitabhängigen zytotoxischen Reaktion sollte geklärt werden, ob die an der Epidermis gebundenen Wirkstoffe auch eine Zytotoxizitäts-Kinetik aufweisen, was die biologische Verfügbarkeit dieser Wirkstoffe zusätzlich beweisen würde.

Informationen zum Verbleib und zur Bioverfügbarkeit der untersuchten Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkombinationen wären von hoher Aussagekraft für die Abschätzung einer besseren Eignung/Verträglichkeit von OCT im Vergleich von CHX z.B. für die Hautantiseptik.

Fazit

1. Durch Bindung der antiseptischen Wirkstoffe CHX und OCT an das Stratum corneum der Epidermis in vitro wird die mikrobiozide Wirksamkeit nicht aufgehoben.
2. Die mikrobiozide Wirksamkeit von an der Epidermis-Oberfläche gebundenem OCT ist der von CHX beim Vergleich äquimolarer Konzentrationen überlegen.
3. 3–4 log-Stufen Reduktion werden nach 30 min Kontakt von EpiDerm-OCT gegenüber dem Prüfmikroorganismus *Staphylococcus aureus* erzielt, wohingegen der RF-Wert für EpiDerm-CHX 2–2,4 beträgt. EpiDerm-OCT erzielt nach 30 min Kontakt mit dem Prüfmikroorganismus *Pseudomonas aeruginosa* 0,6–1 log-Stufe Reduktion, wohingegen EpiDerm-CHX weitestgehend inaktiv bleibt.
4. Eine zytotoxische Wirkung auf die basalen Keratinocyten in den EpiDerm-Kulturen ist im angewandten Prüfsystem zu vernachlässigen. OCT ist im Vergleich mit CHX als verträglicher einzustufen.

Literatur

1. Müller G, Kramer A. Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61:1281-1287. DOI: 10.1093/jac/dkn125
2. Müller G, Kramer A. Wechselwirkung von Octenidin und Chlorhexidin mit Säugerzellen und die resultierende Mikrobiozidie (Remanenzverhalten) der Reaktionsprodukte. *GMS Krankenhaushyg Interdiszip.* 2007;2(2):Doc46. Available from: <http://www.egms.de/de/journals/dgkh/2007-2/dgkh000079.shtml>
3. Poumay Y, Dupont F, Marcoux S, Leclercq-Smekens M, Héryn M, Coquette A. A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. *Arch Dermatol Res.* 2004;296:203-211. DOI: 10.1007/s00403-004-0507-y
4. Bonté F, Saunois A, Pinguet P, Meybeck A. Existence of a lipid gradient in the upper stratum corneum and its possible biological significance. *Arch Dermatol Res.* 1997;289:78-82. DOI: 10.1007/s004030050158
5. Gilbert P, Moore LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol.* 2005;99:703-715. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02664.x
6. DIN EN 1040, Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung (Basistest) chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 1). Deutsche Fassung EN 1040; 2005.
7. Mosman T. Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth.* 1983;65(1-2):55-63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. med. Axel Kramer
 Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Walther-Rathenau-Str. 49 a, 17489 Greifswald, Deutschland, Tel.: +49-(0)3834-515542, Telefax: +49-(0)3834-515541
kramer@uni-greifswald.de

Bitte zitieren als

Müller G, Kramer A, Siebert J. Wirksamkeit von Octenidin und Chlorhexidin in der artifiziell kontaminierten 3-D-Kultur mit humanen Keratinocyten. *GMS Krankenhaushyg Interdiszip.* 2009;4(2):Doc14.

Artikel online frei zugänglich unter

<http://www.egms.de/en/journals/dgkh/2009-4/dgkh000139.shtml>

Veröffentlicht: 16.12.2009

Copyright

©2009 Müller et al. Dieser Artikel ist ein Open Access-Artikel und steht unter den Creative Commons Lizenzbedingungen (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.de>). Er darf vervielfältigt, verbreitet und öffentlich zugänglich gemacht werden, vorausgesetzt dass Autor und Quelle genannt werden.