Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Zentrum für

Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

Poliklinik für Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde

Direktorin: Prof. Dr. Ursula Platzer

Die Wirksamkeit der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie im infizierten Wurzelkanal in vitro

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Jochen Bastian
aus Reinbek

Hamburg 2014

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 01.04.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: **Prof. Dr. Ulrich Schiffner**

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: **Prof. Dr. Petra Schmage**

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: **Prof. Dr. Holger Rohde**

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	**Einleitung und Arbeitshypothese**	**1**
2	**Literaturübersicht**	**4**
2.1	Endodont: Charakteristika und klinische Bezüge	5
2.2	Pulpitiden	7
2.3	Mikrobiologie des infizierten Wurzelkanals	10
2.4	Wurzelkanalbehandlung	13
2.5	Keimreduktion im Wurzelkanal	16
3	**Material und Methode**	**32**
3.1	Verwendete Geräte und Materialien	32
3.2	Methodik	36
3.3	Versuch 1: In-vitro Überprüfung der PACT®-200 Wirkung in einer E. faecalis-Suspension	38
3.4	Versuch 2: In-vitro Überprüfung der PACT®-200 Wirkung auf E. faecalis in Anwesenheit von inaktivem Serum und physiologischer Kochsalzlösung	39
3.5	Versuch 3: In-vitro Überprüfung der PACT®-200 Wirkung auf E. faecalis in Anwesenheit von inaktiviertem humanem Serumalbumin	41
3.6	Versuch 4: Kontamination der Zähne mit E. faecalis / Beurteilung von PACT®-Komponenten im Vergleich zur Spülung mit NaCl (0,9%)	43
3.7	Versuch 5: Kontamination mit E. faecalis / Überprüfung der Wirkung von PACT®-200	47
3.8	Versuch 6: Kontamination mit aerober Mischinfektion / Überprüfung der Wirkung von PACT®-200	49
3.9	Versuch 7: Kontamination mit anaerober Mischinfektion / Überprüfung der Wirkung von PACT®-200	50
3.10	Auswertung und Statistik	50

4	**Ergebnisse**	**52**
4.1	Versuch 1: In-vitro Überprüfung der PACT®-200 Wirkung in einer E. faecalis-Suspension	52
4.2	Versuch 2: In-vitro Überprüfung der PACT®-200 Wirkung auf E. faecalis in Anwesenheit von inaktivem Serum und physiologischer Kochsalzlösung	55
4.3	Versuch 3: In-vitro Überprüfung der PACT®-200 Wirkung auf E. faecalis in Anwesenheit von inaktiviertem humanem Serumalbumin	59
4.4	Versuch 4: Kontamination der Zähne mit E. faecalis / Beurteilung von PACT® im Vergleich zur Spülung mit NaCl (0,9%)	63
4.5	Versuch 5-7: Kontamination mit unterschiedlichen Keimfloren / Überprüfung der chemischen Wirkung von NaOCl-Spülung und PACT®-200 gegen NaCl- und NaOCl-Spülung	67
4.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	73
5	**Diskussion**	**74**
5.1	Diskussion der Methode	74
5.2	Diskussion der Ergebnisse	77
5.3	Schlussfolgerungen	80
6	**Zusammenfassung**	**81**
7	**Literatur**	**84**
8	**Anhang**	**98**
9	**Danksagung**	**103**
10	**Lebenslauf**	Fehler! Textmarke nicht definiert.
11	**Eidesstattliche Versicherung**	**105**

Abkürzungsverzeichnis

ALA	Aminolävulinsäure
aPDT	antimikrobielle Photodynamische Therapie
BHI	Brain Heart Infusion Broth
C. albicans	Candida albicans
CHX	Chlorhexidindiglukonat
E.	Enterococcus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E.faecalis	Enterococcus faecalis
Er, Cr:YSGG-Laser	Erbium, Chromium:Yttrium-Scandium-Gallium-Granatstruktur-Laser
Er:YAG-Laser	Erbium:Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
HSA	humanes Serumalbumin
ISO	International Organsiation for Standardization
KBE	Koloniebildende Einheit
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
Mio.	Million
mTHPC	m – Tetrahydroxyphenylchlorin
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaOCl	Natriumhypochlorit
Nd:YAG-Laser	Neodym:Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
PACT®	Photoaktivierte Chemotherapie
PAD	Photoaktivierte Desinfektion
PDT	Photodynamische Therapie
SD	Standardabweichung
TBO	Toluidinblau, Toloniumchlorid

1 Einleitung und Arbeitshypothese

Die Endodontologie (früher: Endodontie) als Teilgebiet der Zahnheilkunde beschäftigt sich mit der Morphologie, der Physiologie und der Pathologie der Zahnpulpa und des periradikulären Gewebes sowie deren Therapie (GULDENER und LANGELAND 1993). Eine Haupttherapiemaßnahme stellt die Wurzelkanalbehandlung, also die Entfernung des Zahnnervs mit anschließender Wurzelkanalfüllung, dar.

Die Pulpa kann in Kronen- und Wurzelpulpa unterteilt werden. Am Apex mündet sie in die umgebenden Gewebestrukturen. Dort stehen die Blutgefäße und Nervenfasern mit dem Parodont sowie dem Alveolarknochen in Verbindung (MEYER und SCHEELE 1954, SCHUMACHER 1990). Neben einem oder mehreren Hauptkanälen sind oftmals Seiten- und akzessorische Kanäle vorhanden. Jedoch lassen sich in der Regel nur die Hauptkanäle mechanisch aufbereiten (HELLWIG et al. 2007). Gerade die Seitenkanäle können einen so komplizierten anatomischen Aufbau haben, dass sie einer Instrumentierung im Zuge der Wurzelkanalaufbereitung nicht zugänglich sind. Neben den Seitenkanälen gibt es am Zahnapex eine Vielzahl weiterer Kanäle, die zusammen ein „apikales Delta“ bilden.

Die am häufigsten anzutreffende Ursache einer Pulpitis stellt die kariesbedingte Invasion von Bakterien in die Pulpa dar (KLIMM 2003). Dabei dringen Bakterien in den Wurzelkanal, in intaktes Dentin und die radikulären Dentintubuli ein und lösen eine Entzündung der Pulpa aus (KANTZ und HENRY 1974, SUNDQVIST 1976, DAHLÉN und BERGENHOLTZ 1980, HELLWIG et al. 2007, HÜLSMANN 2008, FOUAD 2009). Ziel einer Wurzelkanalbehandlung ist es, pathogene Bakterien sowie infiziertes und nekrotisches Pulpagewebe effektiv zu entfernen und einen Zustand herzustellen, der eine Reinfektion verhindert.

Zu Beginn der Infektion handelt es sich in der Regel um aerobe Mischinfektionen, die je nach Sauerstoff- und Nährstoffangebot durch Anaerobier ersetzt werden (BAUMGARTNER und FALKLER 1991, SUNDQVIST 1992, HELLWIG et al. 2007). Bei therapieresistenten persistierenden Infektionen ist als Problemkeim oftmals E. faecalis als Monokultur nachweisbar (SUNDQVIST et al. 1998, PECIULIENE et al. 2001).

E. faecalis wurde in mehr als 50% gefüllter Wurzelkanäle mit Bakterienwachstum nachgewiesen (PINHEIRO et al. 2003). Der Keim kann Bedingungen mit einem pH-Wert von 9,6 oder Temperaturen von 60°C überleben (STUART et al. 2006).

Heute nimmt die Anzahl von Wurzelkanalbehandlungen in Deutschland im Zuge eines Paradigmenwechsels bei der Zahnbehandlung nachweislich zu. Waren es 1970 noch 3,2 Mio. Eingriffe in den alten Bundesländern, so waren es 2000 bereits 6,8 Mio. und im Jahr 2005 7,3 Mio. Wurzelkanalbehandlungen (BRAUCKHOFF et al. 2009). Im Gegenzug nimmt die Anzahl der Extraktionen stetig ab. Trotz allen Fortschritts aber liegt die Erfolgsquote der Wurzelkanalbehandlungen laut internationaler Literatur jedoch nur bei 70% - 95%, wobei der Erfolg je nach Studiendesign unterschiedlich definiert ist. Als ursächlich für Misserfolge wird unter anderem die Resistenzzunahme bestimmter Pathogene, z. B. Enterococcus faecalis, gegen Antibiotika und die hohe Widerstandsfähigkeit gegen Desinfektionsmittel wie Natriumhypochlorit diskutiert (PINHEIRO et al. 2003, SCHIRRMEISTER 2008). Ein weiterer Grund ist, dass die Keime in nicht zugänglichen Bereichen des Wurzelkanalsystems liegen, die weder mit Handinstrumenten noch mit maschinellen Instrumenten erreicht werden können (NAIR et al. 2005). Zudem erreichen desinfizierende Spüllösungen häufig nicht die Bakterien, da der Durchmesser der Dentintubuli sehr klein ist und sie dort nicht einfließen können (GULDENER und LANGELAND 1993).

Auf der Suche nach neuen Möglichkeiten, diese Grenzen erfolgreicher Wurzelkanalbehandlung zu minimieren, wurde kürzlich eine Laser-Anwendung beschrieben. Das im Zusammenspiel von Laseraktivierung und antimikrobiellen Substanzen als antimikrobielle Photodynamische Therapie (aPDT, PACT®) von der Firma Cumdente aus Tübingen entwickelte System ist Gegenstand der vorliegenden Untersuchung. Bei der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie wird ein Photosensitizer in den mechanisch aufbereiteten Wurzelkanal appliziert und dann mit Laserlicht bestrahlt. Der Photosensitizer Toloniumchlorid (=TBO) bewirkt, dass hochreaktiver Singulett-Sauerstoff gebildet wird und so die Zellwände der Bakterien zerstört werden. Singulett-Sauerstoff stellt ein hochwirksames Oxidationsmittel dar, das sich an Doppelbindungssysteme binden kann (RADSCHUWEIT 2002). Den Firmenangaben zu Folge soll dies zum Absterben der Keime führen (Cumdente 2009).

Ziel dieser In-vitro-Studie ist es, die Effektivität der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie bezüglich der Desinfektion von Wurzelkanälen zu ermitteln. Diese sollen vorab mit dem häufig bei endodontischen Misserfolgen nachweisbaren Markerkeim E. faecalis, einer aeroben Mischkultur sowie einer anaeroben Mischkultur infiziert werden.

Da laut FOUAD (2009) in humanen Wurzelkanälen auch Serum enthalten ist, das in seiner Zusammensetzung dem Serum in anderen Körperbereichen entspricht, soll zudem ermittelt werden, ob die Anwesenheit von Serumalbumin als Hauptbestandteil humanen Serums die Effektivität der Photoaktivierten Desinfektion beeinflusst. Hochreaktiver Singulett-Sauerstoff ist in der Lage, Proteine zu oxidieren und in ihrer Struktur zu verändern, wobei auch reaktive Zwischenprodukte der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Histidin entstehen. Dies kann zu einer Proteinfragmentierung oder Proteinaggregation führen, wodurch es zu veränderten chemischen und physikalischen Eigenschaften des Proteins kommt (PATTISON et al. 2012). Ob es hierdurch zu einer Verstärkung oder Schwächung des Effektes der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie kommt, kann nicht aus der Literatur abgeleitet werden, da hierzu keine Arbeiten vorliegen. Da aber oxidierte Proteinzwischenprodukte reaktiv sind, ist davon auszugehen, dass diese einen Einfluss auf die Bakterienmembran haben.

Der Studie liegen die Hypothesen zugrunde,

- dass die antimikrobielle Photodynamische Therapie im infizierten Wurzelkanal zu einer erhöhten Keimreduktion führt, und
- dass die Anwesenheit von Serum oder Serumalbumin die Effektivität der Photoaktivierten Desinfektion verstärkt und es dadurch zu einer erhöhten Keimabtötung kommt.

2 Literaturübersicht

Der Begriff „Endodontie“ leitet sich aus dem Griechischen ab und bedeutet so viel wie „das im Zahninneren Befindliche“.

Die Anfänge der Endodontologie gehen zurück in die Zeit der Babylonier. Zahnschmerzen wurden damals unter Anwendung von pflanzlichen Rezepturen als Einlage in kariöse Höhlen und möglicherweise narkotisierenden Dämpfen behandelt. Aus chinesischen Schriften geht hervor, dass bereits 4000 v. Chr. die Nutzung von Arsen zur Schmerzbehandlung bei Pulpaerkrankungen eingesetzt wurde (HÜLSMANN 2008). Ab dem 17. Jahrhundert gibt es viele Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der Endodontologie. Neue Techniken und Materialien kamen zum Einsatz bzw. es wurden neue Instrumente mit dem Ziel entwickelt, Schmerzen zu lindern, die Pulpa und den Zahn zu erhalten. Insbesondere Pierre Fauchard (1678-1761), der als Begründer der modernen Zahnheilkunde erachtet wird, beschreibt in seinem Werk „Le chirugien dentiste“ präzise Behandlungsmethoden zur Aufbereitung und Kauterisieren von Wurzelkanälen. Er vertrieb die Legende des „Zahnwurms“, welcher lange Zeit als Ursache von Zahnschmerzen und Karies angesehen wurde (HÜLSMANN 2008, CASTELLUCCI 2004).

Bis in das 19. Jahrhundert hinein konzentrierte sich die Endodontologie hauptsächlich auf die Schmerzlinderung. Erst im späteren Verlauf verschob sich der Fokus hin zur Weiterentwicklung feiner Instrumente und zugehöriger Techniken, wie zum Beispiel als 1838 Edward Maynard eine Uhrfeder mit einer Feile derart bearbeitete, dass eine Art Exstirpationsnadel entstand. Mit dem Fortschritt im 20. Jahrhundert (Röntgentechnologie, Einführung chemischer und physikalischer Methoden, Ultraschall, Laser etc.) wuchsen die Möglichkeiten der Endodontologie rasant (HÜLSMANN 2008, CASTELLUCI 2004).

2.1 Endodont: Charakteristika und klinische Bezüge

Das Pulpa-Dentin-System ist ein komplexes, dreidimensionales System, welches zu den angrenzenden Gewebestrukturen hin anatomisch offen gestaltet ist. Dabei sind Pulpa und Dentin entwicklungsgeschichtlich sowie funktionell als eine Gesamtheit zu betrachten. Diese Einheit wird als Endodont bezeichnet (PIESCO 1994, HÜLSMANN 2008).

Das Dentin ist zwischen Zahnschmelz und Pulpa angeordnet und besteht zu 70 Gewichtsprozent aus anorganischen und zu 20 Gewichtsprozent aus organischen Bestandteilen (HELLWIG et al. 2007). Es wird durch Odontoblasten der Zahnpulpa produziert. Generell werden primäres, sekundäres und tertiäres Dentin unterschieden. Die Entstehung von Tertiärdentin bis zur vollständigen Obliteration endodontischer Höhlen geschieht aufgrund einer Abwehrreaktion der Pulpa auf äußere Reize. Dies ist jedoch nur möglich, so lange die Pulpa vital ist (HÜLSMANN 2008).

Dentintubuli besitzen einen Durchmesser von 1-2 µm und durchziehen das Dentin von der Schmelz-Dentin-Grenze bis zur Pulpa. Sie bergen Odontoblastenfortsätze und sind mit Dentinliquor ausgefüllt (HÜLSMANN 2008).

Die Zahnpulpa besteht aus gut innerviertem und vaskularisiertem Bindegewebe. Die Pulpakammer ist der Bereich, den das Pulpagewebe ausfüllt. Kronenkavum und Wurzelkanäle sowie Kronenpulpa und Wurzelpulpa sind voneinander zu unterscheiden. Die Pulpakammer ist von Dentin umschlossen und ihre Form entspricht dem Zahnumriss in kleinerer Dimension. Die Kronenpulpa besitzt okklusale bzw. inzisale Ausdehnungen, welche Pulpahörner genannt werden. Diese entsprechen optisch den Kauflächenhöckern. Das Pulpagewebe interagiert durch das Foramen apicale, Seitenkanäle, Pulpaperiodontalkanäle sowie akzessorische Kanäle mit dem Parodontium. Unter praktisch-klinischen Gesichtspunkten kann die Pulpa als Endorgan ohne kollaterale Zirkulation betrachtet werden (MEYER und SCHEELE 1954, HELLWIG et al. 2007).

Die Funktion der Seiten- und Nebenkanäle ist bisher unbekannt. Bei einer Infektion des Wurzelkanals kann es allerdings zu einer Infektionsausbreitung über die Seitenkanäle bis in das Parodont kommen, was in einer Parodontitis lateralis

resultiert. Die Seitenkanäle sind einer Instrumentierung unzugänglich (HÜLSMANN 2008). Das Foramen apicale liegt oft vom röntgenologischen Apex entfernt und gibt häufig akzessorische Kanäle ab, so dass ein „apikales Delta“ entsteht.

40% aller Prämolaren besitzen zwei Wurzelkanäle, wobei in 1% zwei separate apicale Foramina vorliegen. Die ersten Oberkieferprämolaren besitzen sogar in ca. 84% der Fälle zwei Wurzelkanäle (BEER et al. 2006). Während der Wurzelentwicklung liegt nur ein Wurzelkanal vor, der durch Zellen und Hartgewebe geteilt wird. Der palatinale Anteil entwickelt sich oft nicht so intensiv und kann auch obliteriert sein (BEER et al. 2006). Bei den unteren Prämolaren liegt in der Regel nur ein Wurzelkanal vor, wobei der erste Prämolar zu 25% einen weiteren Kanal birgt. Die vorderen unteren Molaren enthalten zu 85% in der mesialen Wurzel zwei Kanäle, die hinteren unteren Molaren haben meist nur einen Kanal (HELLWIG et al. 2007).

Bei den vorderen Oberkiefermolaren liegt die Wahrscheinlichkeit für einen vierten Wurzelkanal zwischen 19 und 77%, bei den hinteren Oberkiefermolaren sind es 10-38%. Oftmals sind in der mesiobukkalen Wurzel zwei Kanäle enthalten, in 52% der Fälle konvergieren diese vor dem Apex (BEER et al. 2006).

Nach WEINE (1989) können die anatomischen Verläufe von Wurzelkanälen wie folgt eingeteilt werden (Tabelle 1):

Wurzelkanalkonfigurationen	
Typ I	Einzelner, sich vom Wurzelkanaleingang zum Foramen apicale erstreckender Wurzelkanal.
Typ II	Zwei Wurzelkanäle, die sich innerhalb der Wurzel vereinen und in einem gemeinsamen Foramen enden.
Typ III	Zwei separate Wurzelkanäle mit eigenständigem Verlauf und separaten Foramina
Typ IV	Ein Wurzelkanal, der sich in der Wurzel aufteilt und in zwei getrennten Foramina endet.

Tabelle 1: Einteilung der Wurzelkanalkonfiguration (WEINE 1989)

2.2 Pulpitiden

Pulpaerkrankungen können unterschiedlicher Genese sein. Sie können in drei grobe ätiologische Gruppen klassifiziert werden (Tabelle 2):

Infektiös-toxisch	Traumatisch	Iatrogen
Karies	Kronenfakturen	Präparatorische Maßnahmen
Parodontopathien	Wurzelfrakturen	Reinigung, Trocknung der Kavität
Nicht-kariesbedingter Zahnhartssubstanzverlust	Kontusion, Avulsion, Infraktion	Andere restaurative Maßnahmen
Hämatogen	Traumatische Okklusion	Kieferorthopädische Behandlung

Tabelle 2: Übersicht über Ursachen von Pulpaerkrankungen (nach HELLWIG et al. 2007)

Infektiöse Pulpitis

Die häufigste Ursache der infektiösen Pulpitis ist die kariesbedingte mikrobielle Invasion in das Pulpa-Dentin-System (NOLDEN 1994, KLIMM 2003). Meist reagiert die Pulpa-Dentin-Einheit erst, wenn die Karies bis zum Dentin fortgeschritten ist und die Bakterien durch die Dentinkanälchen hindurch bis zur Pulpa gelangen (HELLWIG et al. 2007). Ob bereits eine Schmelzkaries zu einer Puplareaktion führt, wird seit Jahren kontrovers diskutiert (GULDENER und LANGELAND 1993). Zunächst werden Reize nur durch bakterielle Stoffwechselprodukte ausgelöst. Dies ist der Fall, wenn die Karies die Pulpa noch nicht erreicht hat. Man spricht hier von einer reversiblen Pulpitis. Dabei liegt meist eine kurze, in der Intensität wechselnde Schmerzanamnese vor, die meist auf Kälte- oder Wärmereize hin auftritt (KLIMM 2003). Wenn Bakterien über die Dentinkanälchen die Pulpa penetrieren, kommt es zu einem Aufeinandertreffen mit neutrophilen Leukozyten in der Pulpa. Diese sterben ab und setzen dabei Lysosome in die Pulpa frei. Es kommt zu örtlich begrenzten Nekrosen. Ab diesem Zeitpunkt spricht man von einer irreversiblen Pulpitis (GULDENER und LANGELAND 1993). Klinisch sind dann oft eine langandauernde Schmerzanamnese sowie durch Wärme provozierbare Schmerzen vorhanden (KLIMM 2003).

Reagiert die Pulpa-Dentin-Einheit auf den Reiz mit einer Verengung der Kanälchen im Dentin, liegt eine tubuläre Sklerose vor. An der Pulpa-Dentin-Grenze kann es zur Bildung von Tertiärdentin kommen. Wenn die Karies bis in das Tertiärdentin vorgedrungen ist, ist eine Sklerosierung aufgrund der veränderten Struktur nicht mehr möglich. In der Pulpa resultiert der Reiz in einer Entzündungsreaktion und es treten erste Veränderungen in den peripheren Pulpazonen sowie in der Odotoblastenschicht auf (HELLWIG et al. 2007).

Parodontitis apicalis

Auch wenn im Bereich der Wurzelpulpa noch keine Entzündungsreaktionen eingetreten sind, zeigen sich röntgenologisch oftmals periapikale Veränderungen

sowie ein verbreiterter Parodontalspalt. Durch das Gefäßsystem der Pulpa werden die durch Bakterien verursachten Zerfallsprodukte zum periapikalen Venenplexus befördert, die dort durch die Gefäßwände treten und zu apikalen Läsionen führen (GULDENER und LANGELAND 1993). Diese Läsionen stellen Resorptionen des periapikalen Knochens dar, welche zu Granulomen oder zystischen Veränderungen führen können. Da die Pulpa durch Seitenkanäle mit dem Parodont verbunden ist, kann sich eine Parodontitis auch im Seitenbereich der Wurzel zeigen (HELLWIG et al. 2007).

Traumatische Pulpitis

Eine traumatische Pulpitis kann durch Dentin-, Kronen- oder Wurzelfrakturen sowie durch Kontusion oder Avulsion hervorgerufen werden. Dentinfrakturen führen gegebenfalls zu Pulpitiden oder zur Nekrose der Pulpa. Dentinsprünge oder Infraktionen können in Zusammenwirkung mit bis in das Dentin eindringenden Bakterien zu einer Reaktion der Pulpa führen. Von besonderer Schwere kann dies beim Vorhandensein eines direkten Zugangs zur Pulpa sein. Akute Pulpitiden können durch die Eröffnung von Dentinkanälchen ausgelöst werden, auch wenn die Pulpahöhle geschlossen ist. Posttraumatisch kann es zu einer Nekrose der Pulpa kommen. Im Fall, dass die Pulpahöhle eröffnet ist, kann sich bei komplizierten Kronenfrakturen schnell ein Blutgerinnsel bilden und so ein schnelles Bakterienwachstum forcieren. Bei Wurzelfrakturen hingegen besteht die Möglichkeit, dass Blutgerinnsel und temporäre Entzündungen der Pulpa spontan ausheilen, sofern der Bruchspalt nicht mit der Mundhöhle verbunden ist. Ähnlich wie auch bei einer Kontusion oder Avulsion, kann es bei schwerer Schädigung zu einer Unterbrechung der Blutzirkulation mit ischämischer Nekrose der Pulpa kommen. Eine Revaskularisierung der Pulpa ist hier nur möglich, wenn das Wurzelwachstum noch nicht abgeschlossen ist. Eine sterile Pulpanekrose kann keine Parodontitis apicalis hervorrufen (HELLWIG et al. 2007).

Iatrogene Pulpitis

Eine Iatrogene Pulpitis ist diagnostisch schwer zu identifizieren, da der behandelte Zahn bereits durch eine Karies vorgeschädigt sein kann. Iatrogene Ursachen können physikalischer und chemischer Herkunft sein. Dazu gehören präparatorische Maßnahmen, die Trockenlegung der Kavität sowie das Einbringen von Füllungsmaterialen. Auch das Anwenden von Reinigungs-, Desinfektions- und Trocknungsmitteln, Säuren usw. kann die Pulpa irreversibel schädigen. Die wohl häufigste Ursache stellt die Kronen- und Kavitätenpräparation dar, bei der Dentinkanälchen eröffnet und Entzündungsmediatoren freigesetzt werden. Wenn mit unzureichender Wasserkühlung präpariert wird, kann es zu einer Überhitzung und Austrocknung des Dentins kommen. Insbesondere die Austrocknung kann schwerwiegende Folgen haben, da dies zur Odontoblastenkernaspiration führen kann. Selten können auch kieferorthopädische Behandlungen zu einer Pulpitis führen. Weiterhin können chemische Materialen wie z. B. Lacke, Säuren oder Füllungsmaterialien schädigende Wirkungen auf die Pulpa haben (HELLWIG et al. 2007).

2.3 Mikrobiologie des infizierten Wurzelkanals

Die orale Mikroflora wird von etwa 1000 Bakterienarten gebildet, wobei nur wenige Arten in der Lage sind, in Wurzelkanal, intaktes Dentin und die radikulären Dentintubuli einzudringen und Wurzelkanalinfektionen auszulösen (KANTZ und HENRY 1974, SUNDQVIST 1976, DAHLÉN und BERGENHOLTZ 1980, HELLWIG et al. 2007, HÜLSMANN 2008, FOUAD 2009). Wenn es zur bakteriellen Besiedelung des Wurzelkanals gekommen ist, handelt es sich meist um Mischinfektionen, es werden aber auch Monoinfektionen beobachtet. Die bakterielle Besiedelungsreihenfolge richtet sich nach dem im Wurzelkanal verfügbaren Sauerstoff- und Nährstoffangebot, auch spielen bakterielle Wechselwirkungen eine wichtige Rolle (SUNDQVIST 1992). Anfangs handelt es sich meist um aerobe Mischinfektionen, die bei Abnahme des Sauerstoffangebotes von fakultativen und obligaten Anaerobiern ersetzt werden (BAUMGARTNER und FALKLER 1991, SUNDQVIST 1992, HELLWIG et al. 2007). Auch Spirochäten, Pilze (HÜLSMANN 2008) und Hefen (NAIR et al. 1990) können in Wurzelkanälen gefunden werden. Die Keimzahl kann bis zu 10^8

koloniebildende Einheiten absolut betragen, wobei bei primären Wurzelkanalinfektionen signifikant höhere Keimzahlen als bei Sekundärinfektionen beobachtet werden (BLOME et al. 2008). Bei einer Sekundärinfektion liegt bereits eine Infektion mit einem anderen pathogenen Erreger vor. Ebenso steht die Größe einer apikalen Läsion mit der Anzahl der im Kanal vorkommenden Mikroorganismen in Zusammenhang (BYSTRÖM et al. 1987). Auch die klinischen Symptome scheinen mit den im Wurzelkanal befindlichen pathogenen Mikroorganismen zu korrelieren (HÜLSMANN 2008).

Neben Streptokokken, Laktobazillen und Aktinomyzeten werden besonders häufig die obligaten Anaerobier Fusobakterium, Peptostreptococcus, Eubacterium, Propionibacterium, Veilonella, Wolinella, Prevotella und Porphyromonas in infizierten Wurzelkanälen gefunden (WITTGOW und SABISTON 1975, SUNDQVIST 1976, 1992, MÖLLER et al. 1981, LE GOFF et al. 1997, GOMES et al. 2004).

Der als Problemkeim geltende E. faecalis, ein fakultativer Anaerobier, ist nur in geringen Anteilen bei der primären Wurzelkanalinfektion nachweisbar. Bei wurzelgefüllten Kanälen mit persistierender Infektion und apikaler Parodontitis ist dieser stark therapieresistente Keim hingegen häufig als Monokultur nachweisbar (SUNDQVIST et al. 1998, PECIULIENE et al. 2001). In einer Untersuchung von SUNDQVIST et al. (1998) wurde in 38% der nach erfolgloser Wurzelkanalbehandlung extrahierten Zähne E. faecalis festgestellt.

LOVE (2001) und LOVE et al. (2002) zeigten, dass E. faecalis und andere Bakterien die Fähigkeit besitzen, in die Dentintubuli einzudringen und dort überleben zu können. Bereits 1987 fanden HAAPASALO und ØRSTAVIK in einer In-vitro Studie an einem bovinen Dentintestkörper heraus, dass E. faecalis in der Lage ist, zehn Tage in einem stark alkalischen Milieu zu überleben, das durch ein eingebrachtes Kalziumhydroxid-Präparat verursacht wurde. Zellprotonenpumpen scheinen hierfür ursächlich zu sein (EVANS et al. 2002). E. faecalis kann selbst unter diesen ungünstigen Bedingungen Biofilme bilden (DISTEL et al. 2002) und zeigt auch bei Nährstoffmangel große Widerstandsfähigkeit gegen Natriumhypochlorit, Hitze, Säure und Ethanol (GIARD et al. 1996). E. faecalis konnte in einer Untersuchung von PATAKY et al. (2002) bei 60°C bis zu 30 Minuten überleben. Außerdem ist es dem Keim möglich, lange Zeit in Wasser (HARTKE et al. 1998), wassergefüllten

Dentintubuli und menschlichem Serum zu überleben (ØRSTAVIK und HAAPASALO 1990, Love 2001).

Tabelle 3 fasst die im infizierten Wurzelkanal, bei periapikaler Parodontitis oder bei Infektion nach vorangegangener Wurzelkanalbehandlung vorkommenden Bakterien zusammen.

	Infizierter Wurzelkanal	Periapikale Parodontitis	Infektion nach Therapie
Eubakterien	**+++**	+	++
Aktinomyzeten	**+++**	++	++
P. micra	++	**+++**	++
Andere anaerobe Strept.	++	++	+
Prevotella Sp.	**+++**	**+++**	+
Fusobakterien	**+++**	++	(+)
Porphyromonas Sp.	+	++	(+)
Veillonellen	+	++	(+)
Andere Anaerobier	+	+	+
Staphylokokken	+	+	+
S. aureus	(+)	(+)	(+)
Orale Streptokokken	**+++**	**+++**	**+++**
Enterokokken	+	+	**+++**
Enterobakterien	(+)	-	**++**
Sprosspilze	-	-	**++**

Tabelle 3: Übersicht im infizierten Wurzelkanal vorkommende Bakterien (aus: Fouad 2009; modifiziert nach Eick 2010)

2.4 Wurzelkanalbehandlung

Die Arbeitsabläufe von Wurzelkanalbehandlungen lassen sich in die manuelle bzw. maschinelle Aufbereitung und das nachfolgende Füllen des Wurzelkanalsystems gliedern (HELLWIG et al. 2007). Die Aufbereitung des Wurzelkanalsystems wird als der wichtigste Behandlungsschritt angesehen. Dabei werden vitales und nekrotisches Gewebe sowie infiziertes Dentin entfernt (HÜLSMANN et al. 2005).

Nach klinischer und röntgenologischer Befundung ist gegebenfalls eine Lokalanästhesie durchzuführen. Das Anlegen eines Kofferdams als Schutz vor Aspiration, Infektionskrankheiten sowie zur Arbeitserleichterung und Desinfektion des Arbeitsfeldes ist elementar (GULDENER und LANGELAND 1993). Karies und insuffiziente Füllungen werden entfernt, die optimale Zugangskavität gewählt. Nach Lokalisation der Kanaleingänge werden diese sondiert und die Arbeitslänge bestimmt. Der Wurzelkanal wird mit Feilen aufbereitet sowie gespült und getrocknet. Die Notwendigkeit einer medikamentösen Einlage mit einem provisorischen Verschluss ist vor der endgültigen Wurzelfüllung zu prüfen. Nach dem Füllen des Wurzelkanals wird eine Röntgenaufnahme des behandelten Zahnes gemacht und der Zahn definitiv gefüllt (HELLWIG et al. 2007).

Zu den Zielen der Wurzelkanalbehandlung gehört das Entfernen von vitalem oder nekrotischem Gewebe und damit verbunden die Reduzierung der Keimzahl im Wurzelkanal. Dabei ist auch die ausreichende chemische Desinfektion eine wichtige Maßnahme. Studien haben gezeigt, dass bakterienfreie Wurzelkanäle eine deutlich bessere Prognose aufweisen (SJÖGREN et al. 1997). Die Aufbereitung einer Wurzelkanalform soll vor allem eine wandständige Obturation ermöglichen sowie die Bewahrung der Zahnhartsubstanz und der originären Wurzelkanalkrümmung gewährleisten. Grundsätzlich können die Aufbereitungstechniken in manuelle und maschinelle Instrumentierung, nichtinstrumentelle Aufbereitung, Schall- und Ultraschalltechniken, kombinierte Techniken sowie die Aufbereitung und Keimreduktion durch Laserapplikation untergliedert werden (HÜLSMANN 2008).

Wurzelkanal-Aufbereitung

Das Ziel einer Wurzelkanal-Aufbereitung ist das Entfernen von infiziertem Gewebe im Wurzelkanalsystem und somit eine Keimreduktion (SCHÄFER et al. 2000, GUERISOLI et al. 2002, CHAVEZ DE PAZ et al. 2003). Es kann manuell oder mit maschinellen Aufbereitungssystemen gearbeitet werden.

Bei der manuellen Aufbereitung wird mit Feilen wie der Hedstroem-Feile, K-Feile oder K-Reamer oder für schwerer zugängliche Bereiche mit flexibleren Instrumenten wie der K-Flex-File gearbeitet. Die Feilen unterscheiden sich jeweils im Schneidekantenwinkel und können so mehr oder weniger Dentin abtragen. Exstirpationsnadeln hingegen werden verwendet, um die Pulpa in einem Arbeitsgang zu exstirpieren. Hierbei wird die Pulpa idealerweise am Apex abgerissen und nicht abgeschnitten (HELLWIG et al. 2007, HÜLSMANN 2008).

Die Nutzung von Handinstrumenten ist meist sehr zeitaufwändig und führt zu Ermüdungserscheinungen beim Behandler. Alternativ wurden zahlreiche maschinelle Aufbereitungstechniken entwickelt, welche zudem den Vorteil einer gleichmäßigeren Aufbereitung bieten. Erstmalig beschrieb OLTRAMARE 1892 die Nutzung von rotierenden Feilen in zahnärztlichen Handstücken. 1889 entwickelte ROLLINS das erste Endodontiehandstück, dessen Rotationsgeschwindigkeit auf 100 Umdrehungen pro Minute limitiert war. 1958 erschien von der Firma W&H das „Feilwinkelstück Racer“, 1964 gefolgt von dem Endodontiewinkelstück Giromatic (MicroMega, Besançon, Frankreich). In diesen Zeitraum fällt auch das Endolift der Firma Kerr (Karlsruhe, Deutschland) (HÜLSMANN et al. 2005). Diese Geräte arbeiteten mit reziproken Rotationsbewegungen sowie Hubbewegungen. Es bestand jedoch ein erhöhtes Risiko von Stufenbildung sowie Perforation (HELLWIG et al. 2007). Später entstanden von LEVY (1984) der Canal-Finder (jetzt S.E.T., Gröbenzell, Deutschland) sowie der Excalibur (W&H, Bürmoos, Österreich). Der Canal-Finder war das erste Gerät mit einem teilweise flexiblen Bewegungsablauf. Das Excalibur Endodontiehandstück (W&H) nutze lateral oszillierende Instrumente (HÜLSMANN et al. 2005).

Neu entwickelte maschinelle Nickel-Titan-Systeme, wie zum Beispiel ProTaper und FlexMaster, weisen ein pseudoelastisches Verhalten auf, d.h. sie kehren nach Verformungen wieder in ihre ursprüngliche Form zurück, den sogenannten „Memory

Effekt“. Obwohl Nickel-Titan-Systeme im Aufbau sehr verschieden sind und ein eigenes Präparationskonzept verfolgen, werden in der Literatur fast ausnahmslos deren positiven Ergebnisse bei der Erhaltung der anatomischen Kanalkrümmung betont (HELLWIG et al. 2007, HÜLSMANN 2008).

Nicht zu vernachlässigen ist die allerdings die Tatsache, dass eine optimale Reinigung der Wurzelkanalwand allein mit instrumenteller Bearbeitung nicht erreichbar ist. Die mechanische Erweiterung ist daher immer mit einer sorgfältigen, hochvolumigen Spüllösung zu kombinieren (HÜLSMANN 2008).

Der Laserpräparation kommt in der Endodontie bislang nur eine untergeordnete Rolle zu, weil der Zahnhartsubstanzabtrag im Vergleich zum Einsatz rotierender Instrumente geringer ist und sich Füllmaterialien mit Hilfe dieser Technologie nicht aus den Kavitäten entfernen lassen. Eine Nachbearbeitung mit rotierenden Instrumenten ist hier unerlässlich (HELLWIG et al. 2007).

Eine einheitliche Meinung besteht in der Literatur lediglich bezüglich der guten Desinfektionswirkung von bestimmten Laservarianten. Die im Zusammenhang mit einer Laseranwendung entstehenden Probleme wie Haarrisse und Cracks in der Hartsubstanz sowie die kaum kontrollierbare Eindringtiefe konnten bislang noch nicht hinreichend gelöst werden (HÜLSMANN 2008). Die Hitzeentwicklung von über 60°C nach nur wenigen Sekunden im Inneren des Zahnes führt zu einer Vaporisation der Wurzelkanaloberfläche und kann zu einem Hitzeschaden des parodontalen Gewebes führen (KHAN et al. 1997). In Folge einer Laserbehandlung können zudem periapikale Entzündungen, Ankylosen oder Resorptionen auftreten.

Auf der anderen Seite wirken Laser in Bereichen bakterizid, in welche Spüllösungen nicht vordringen können (MORITZ et al. 1999).

2.5 Keimreduktion im Wurzelkanal

Wurzelkanalspülung

1981 beschrieben LEHMANN et al. einen Zusammenhang zwischen größerem Kanaldurchmesser und effektiverer Reinigungsleistung. Dies wurde in mehreren Untersuchungen bestätigt (ROLLINSON et al. 2002). Es ist bekannt, dass Bakterien die Dentintubuli bis zu 2000 µm tief in das Wurzeldentin hinein penetrieren können (HÜLSMANN 2008). Daher ist es nicht möglich, die Bakterienzahl allein durch die mechanische Aufbereitung ausreichend zu reduzieren (BAUMANN und BEER 2008), ohne die Wurzelstabilität durch den großen Zahnhartsubstanzverlust zu sehr zu schwächen, was in einer größeren Frakturgefahr münden würde (ZANDBIGLARI et al. 2006). Auch Seitenkanäle, apikale Ramifikationen und andere komplexe anatomische Besonderheiten des Wurzelkanals sind einer rein mechanische Aufbereitung nicht zugänglich (BAUMANN und BEER 2008, BECKER und WOOLLARD 2001). Aus diesen Gründen sind zusätzliche chemische Desinfektionen unumgänglich (BYSTRÖM und SUNDQVIST 1981, ØRSTAVIK et al. 1991, BAUMANN und BEER 2008, HÜLSMANN 2008).

Die manuelle Wurzelkanalspülung ist in der Praxis das gängigste Verfahren. Bereits 1983 untersuchte CHOW unter anderem den Einfluss des Durchmessers und der Tiefe der Applikationsnadel im Wurzelkanal auf die antimikrobielle Wirkung der Spülung. Mit Hilfe von gläsernen Prüfkörpern und standardisierten Wurzelkanälen konnte belegt werden, dass kleine Kanülen die Effektivität der Wurzelkanalspülung erhöhen, da sie ohne zu verkanten weit in das Kanallumen eingebracht werden können. Die Spüllösung kann dennoch abfließen, ohne über das apikale Foramen hinaus gedrückt zu werden (CHOW 1983). Es wurde außerdem gezeigt, dass der Reinigungseffekt bei der manuellen Wurzelkanalspülung nur in einem geringem Ausmaß über die Nadelspitze hinaus reicht (CHOW 1983).

Wurzelkanalspülungen sollten im Allgemeinen eine geringe Toxizität, eine bakterizide Wirkung, eine niedrige Oberflächenspannung sowie einen Schmiereffekt aufweisen und vitales und nekrotisches Pulpagewebe auflösen (HELLWIG et al. 2007). Grundsätzlich sind Spülungen häufiger und höher dosiert durchzuführen, je stärker der Wurzelkanal mit Keimen verunreinigt ist. Eine Studie von BERUTTI et al. (1997) zeigte, dass Keime nach einer Spülung in den kleinsten

Dentinkanälchen noch vorhanden sind. Das Volumen der Lösung ist hierbei von höherer Wichtigkeit als die Konzentration (HÜLSMANN 2008).

Die Wurzelkanalspülung als chemisch-desinfizierendes Verfahren sollte zusammen mit der mechanischen Wurzelkanalaufbereitung verwendet werden (BYSTRÖM et al. 2001, BECKER und WOOLLARD 2001, PATAKY et al. 2002, TULUS und SCHULZ-BONGERT 2004, HÜLSMANN 2008). Sie kann antibakteriell und gewebeauflösend wirken. Die Anzahl der Keime kann um den Faktor 100 – 1000 verringert werden, jedoch kann die Wurzelkanalspülung keine Sterilität im Wurzelkanal gewährleisten (BYSTROEM und SUNDQVIST 1983). Nach einer Studie von SIQUEIRA et al. (1999) können durch Instrumentation in Kombination mit einer Spülung mehr als 90% der Keime abgetötet werden (HÜLSMANN 2008). In einer Studie von BERBER et al. (2006) wurde mit 5,25% NaOCl sogar eine Keimreduktion von 100% erreicht.

Überblick über die gebräuchlichsten Spüllösungen

Folgende Desinfektionslösungen zählen zu den am häufigsten genutzten: Natriumhypochlorit (NaOCl), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Chelatoren, Chlorhexidin (CHX), Gly-Oxide. Neu entwickelt wurde die Lösung MTAD (Mixture of Tetracycline isomer, an Acid, and a Detergent), welche eine gute antibakterielle Wirkung auch gegen E. faecalis aufweist (HÜLSMANN 2008).

In einer gemeinsamen Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde und der Deutschen Gesellschaft für Zahnerhaltung von 2006 werden die Anforderungen an eine Spüllösung definiert:

Anforderungen an Spüllösungen:

1. Desinfektionswirkung
2. Biologische Verträglichkeit
3. Gewebe auflösende Wirkung
4. Einfache Applizierbarkeit

Natriumhypochlorit

Natriumhypochlorit gilt als die am häufigsten genutzte endodontische Spüllösung, da es antimikrobielle, antimykotische und gewebeauflösende Eigenschaften besitzt und somit gegen die meisten Bakterien, Bakteriophagen, Sporen, Pilze und Viren wirkt (MENTZ 1982, HÜLSMANN 2008). Dadurch ist Natriumhypochlorit den meisten anderen verfügbaren Spüllösungen überlegen (BYSTROEM und SUNDQVIST 1983, SHABAHANG und TORABINEJAD 2003, CARSON et al. 2005). NaOCl besitzt erheblich bessere keimreduzierende Eigenschaften als Kochsalzlösung (BYSTROEM und SUNDQVIST 1983), wobei bereits mit einer 1,25%igen NaOCl-Lösung in 62% der Fälle Keimfreiheit in den Wurzelkanälen erreicht werden konnte, im Gegensatz zu 28% bei 0,9%iger Kochsalzlösung (DALTON et al. 1998).

Die Wirkung von NaOCl beruht auf einer hohen Konzentration undissoziierter Hypochloritsäure (HClO), die die Sulfatgruppen der bakteriellen Enzyme oxidiert und chloridiert (MOORER und WESSELINK 1982, HEPPELER und HÜLSMANN 2006, HELLWIG et al. 2007). NaOCl besitzt die Fähigkeit, pulpales und nekrotisches Gewebe zu lösen (BECKER und WOOLLARD 2001), wobei diese Fähigkeit mit der Konzentration und der applizierten Menge zunimmt (BAKER et al. 1975, HAND et al. 1978, TÜRKÜN und CENGIZ 1997, HÜLSMANN 2004, CARSON et al. 2005). HAND et al. wiesen 1978 nach, dass eine 5,25%ige NaOCl-Lösung effektiver als die niedriger konzentrierten Lösungen von 2,6%, 1% oder 0,5% wirkt. Nicht nur die Konzentration korreliert mit der Wirksamkeit der Lösung, sondern auch die Temperatur (HÜLSMANN 2004). Die Effektivität einer auf 37°C erwärmten 2,6%igen NaOCl-Lösung entspricht derjenigen einer 5,2%igen NaOCl-Lösung bei Raumtemperatur (CUNNUNGHAM und BALEKJIAN 1980, HÜLSMANN 2008). Es kommt hierbei zu einer besseren Kollagenauflösung und schnelleren Keimreduktion, allerdings ist die Wirksamkeit auf wenige Stunden begrenzt, da die Lösung dann zerfällt und somit unwirksam wird (HÜLSMANN 2008).

Von herausragender Bedeutung für den auflösenden Effekt ist die Einwirkzeit an der Wurzelkanallwand. Um den bakteriellen Biofilm zu eliminieren ist eine Einwirkzeit von 30 – 60 Minuten erforderlich (HÜLSMANN 2008). In einer früheren

Untersuchung zeigten ANDERSEN et al. (1992), dass 6,5 mg pulpales Gewebe mit Hilfe einer 2%igen NaOCl-Lösung bei 37°C erst nach 2,5 Stunden aufgelöst wurde.

Für diese gewebeauflösenden Eigenschaften des NaOCl ist das enthaltene Chlor verantwortlich (MOORER und WESSELINK 1982). Dies zerfällt jedoch innerhalb von zwei Minuten, weshalb ein hohes Spülvolumen obligat ist (MOORER und WESSELINK 1982, HÜLSMANN 2008). Eine Studie von BECKER und WOOLLARD (2001) zeigte, dass nur organische Materialien zersetzt werden.

Zu den Nachteilen von Natriumhypochlorit gehört, und es in höherer Konzentration zytotoxisch wirkt. Allerdings herrschen unterschiedliche Meinungen hinsichtlich der Toxizität. Bei einer Konzentration von 0,5% wird es allgemein als nicht zytotoxisch angesehen (BAUMGARTNER und CUENIN 1992, HÜLSMANN 2004). VELVART (1987) empfiehlt eine 1%ige NaOCl-Lösung, wobei BEER et al. (1988) eine 2%ige Lösung befürworten. Um zytotoxische Nebenwirkungen möglichst gering zu halten, werden in der aktuellen Literatur Konzentrationen von 1 – 3% empfohlen (DAMMASCHKE et al. 2003, ØRSTAVIK 2003, BAUMANN und BEER 2008, HÜLSMANN 2008).

Chlorhexidindiglukonat

Chlorhexidindiglukonat besitzt antibakterielle Eigenschaften gegen eine Vielzahl von Bakterien bei einer gleichzeitig geringen Toxizität (HÜLSMANN 2008). Gegen den Problemkeim E. faecalis ist CHX einer NaOCl-Lösung bei entsprechend niedriger Konzentration überlegen (KLIMM et al. 2001, GOMES et al. 2003, KLIMM 2003, BAUMANN und BEER 2008, HÜLSMANN 2008), daher wird CHX gerade bei Revisionen empfohlen (HÜLSMANN 2008). In Konzentrationen von etwa 100 ppm wirkt es bakterizid und bei ca. 0,19 ppm besitzt es immer noch bakteriostatische Eigenschaften (HENNESSY 1973). Allerdings besitzt CHX im Gegensatz zu NaOCl keine gewebeauflösenden Fähigkeiten (CARSON et al. 2005, HÜLSMANN 2008). In einer Studie von JEANSONNE und WHITE (1994) konnte kein signifikanter Unterschied in der antimikrobiellen Wirksamkeit zwischen CHX und NaOCl festgestellt werden, wobei sich NaOCl wegen der gewebeauflösenden Eigenschaften gleichwohl als überlegen herausstellte. Zudem ist die Wirkung von CHX auf bakterielle Biofilme deutlich niedriger als die von NaOCl (MOHAMMADI und ABBOTT 2009). Allerdings

bleiben die antimikrobiellen Eigenschaften von CHX noch bis zu 21 Tage nach der Wurzelkanalaufbereitung wirksam (CARSON et al. 2005). Aufgrund seiner kationischen Struktur kann sich CHX an negativ geladene Flächen anlagern und eine Depotwirkung entfalten (HÜLSMANN 2008). Somit ist es auch als Zusatz zu medikamentösen Einlagen geeignet (KLIMM 2003).

Durch die positive Ladung ist CHX auch in der Lage, sich an die negativ geladene Bakterienzellwand anzulagern und dadurch die Permeabilität der Zellwand zu verändern, was zu einem CHX-Einstrom in die Bakterienzelle führt (MOHAMMADI und ABBOTT 2009). Konzentrationen von 0,1% bis 2% gelten als zytotoxisch unbedenklich (YESILSOY et al.1995). BABICH et al. (1995) fanden heraus, dass die Zusammensetzung der CHX-Lösung einen großen Einfluss auf die Zytotoxizität hat. So können Zusätze und Bakterien an die positiven Ladungen des CHX binden und so seine Toxizität verringern (BABICH et al. 1995). Dies könnte auch im Wurzelkanal der Fall sein (BOYCE et al. 1995). YESILSOY et al. (1995) überprüften die kurzzeitig toxischen Effekte von CHX durch eine subkutane Injektion bei Meerschweinchen und wiesen eine höhere Zytotoxizität von 5,25% NaOCl als von 0,12% CHX nach. In der Gesamtheit der Wirkungen und Nebenwirkungen ist CHX dem NaOCl nicht überlegen (HÜLSMANN 2008).

Chelatoren

Chelatoren sind Komplexbildner, die selektiv Kalziumionen aus dem Dentin an sich binden, um es so zu erweichen (HÜLSMANN 2008). EDTA, als der bekannteste Chelator, ist in der Lage, Wurzelkanaldentin bis zu 20-50 µm zu erweichen und zu demineralisieren, wodurch enge oder stark kalzifizierte Kanäle besser aufbereitet werden können (KLIMM 2003). Chelatoren werden genutzt, um den paräparationsbedingten, an der Wurzelkanalwand liegenden smear layer zu entfernen. Somit werden die Dentintubuli freigelegt und die Dichtigkeit der Wurzelkanalfüllung wird erhöht (HÜLSMANN 2008). Außerdem zeigt sich eine Verbesserung der antibakteriellen Wirkung von Desinfektionslösungen (HÜLSMANN 2008).

EDTA alleine ist allerdings nicht in der Lage, den smear layer vollständig zu lösen (KLIMM 2003), da es nur den anorganischen Anteil zersetzt (ÇALT und SERPER 2000, BECKER und WOOLLARD 2001). Daher wird häufig die Kombination mit NaOCl empfohlen, da dies die organischen Anteile auflöst (BYSTRÖM und SUNDQVIST 1985, CAMERON 1995, SCELZA et al. 2000, BECKER und WOOLLARD 2001). Allerdings inaktiviert EDTA NaOCl (EDTA seinerseits wird nicht von NaOCl inaktiviert), weshalb eine Wechselspülung nicht angebracht erscheint (HÜLSMANN 2008). ÇALT und SERPER (2000) zeigten, dass 17%iges EDTA in Verbindung mit 5%igem NaOCl zwar den smear layer vollständig entfernte, sich jedoch auch Erosionen des Wurzeldentins in allen Wurzelabschnitten belegen ließen. BAUMGARTNER und MADER (1987) konnten mit der Kombination von EDTA und NaOCl eine Erweiterung der Dentintubuli um bis zu 4 µm nachweisen.

Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid ist eine schwach saure Lösung, die als 3-5%ige Lösung zur Spülung von Wurzelkanälen eingesetzt wird, wobei sie in Wasser und Sauerstoff zerfällt. Wasserstoffperoxid wirkt stark zytotoxisch durch eine Oxidation von SH-Gruppen (HEIDEMANN 2001). Durch die Enzyme Katalase und Glutathionperoxidase wird das H_2O_2 in molekularen Sauerstoff überführt, was zu einer heftigen Schaumbildung bei Kontakt mit Gewebe, Blut oder Eiter führt (HEIDEMANN 2001). Durch das Schäumen wird der Debris aus dem Wurzelkanal hinausgespült. Freiwerdender naszierender Sauerstoff kann dann obligate Anaerobier eliminieren (HÜLSMANN 2008).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass es die ideale Spüllösung nicht gibt, da mit einer Steigerung der angestrebten reinigenden und antimikrobiellen Wirkung auch die Zytotoxizität steigt (GULDENER und LANGELAND 1993). Der entscheidende Nachteil von Spüllösungen ist in ihrem begrenzten bakteriziden Effekt zu finden, welcher nur innerhalb des Wurzelkanals wirksam ist. Da Dentinkanälchen nur einen geringen Durchmesser haben und Spüllösungen aufgrund ihres flüssigen Aggregatzustandes eine hohe Oberflächenspannung aufweisen, können sie nur einen geringen Teil des kanalnahen Gewebes erreichen (BERUTTI 1997, MORITZ et

al. 2006). Daher wurden verschiedene die Desinfektion ergänzende Maßnahmen vorgeschlagen, die im Folgenden beschrieben werden.

Die Wurzelkanalspülung ergänzende Maßnahmen zur Keimreduktion

Aktivierte Wurzelkanalspülung; Ultraschall- und Schallvibrations-systeme

Unter der aktivierten Wurzelkanalspülung wird der Einsatz von Schallvibrations- oder Ultraschallgeräten verstanden (HEIDEMANN 2001). Schallaktivierte Geräte arbeiten im Frequenzbereich von 1-8 kHz, Ultraschallgeräte mit 25-40 kHz (SABINS et al. 2003).

Die gesteigerte Effektivität der ultraschallaktivierten Wurzelkanalspülung wird auch durch das Phänomen der Kavitation erklärt (AHMAD et al. 1988). Durch die hochfrequente Schwingung der Feile kommt es zur Bildung submikroskopischer Bläschen innerhalb der Flüssigkeit. Diese zerplatzen bei starker Krafteinwirkung (AHMAD et al. 1988). Es kommt so zu submikroskopischen Implosionen und Vakuumeffekten, wodurch auch die Seitenkanälchen gereinigt und Mikroorganismen eliminiert werden (MARTIN und CUNNINGHAM 1985, HÜLSMANN 2008). Dieser Effekt kann allerdings quantitativ vernachlässigt werden (HÜLSMANN 2008).

Schallvibrationssysteme arbeiten mit niederfrequent oszillierenden Feilen im Bereich von 1,5 bis 6 kHz. Die niedrigere Frequenz der Schallvibrationssysteme im Vergleich mit Ultraschallsystemen birgt eine geringere Gefahr von z. B. Feilenfrakturen, was wiederum die Arbeitssicherheit erheblich steigert. Zudem treten Komplikationen wie Stufenbildung während des Eingriffs deutlich seltener auf (HÜLSMANN 2008). Die Effektivität der Keimreduktion kann durch den Einsatz von schallaktivierten Geräten gegenüber der manuellen Wurzelkanalspülung signifikant gesteigert werden (STAMOS et al. 1987, SABINS et al. 2003). SABINS et al. (2003) wiesen eine größere Effektivität von Schallgeräten bei der Entfernung von intrakanalärem Debris gegenüber der manuellen Spülung nach.

In der Literatur werden verschiedene Ursachen für den verbesserten Reinigungseffekt beschrieben. Es handelt sich dabei um ein Zusammenwirken der

Phänomene Kavitation, Wärmeentwicklung und „akustisches Microstreaming“ (KLIMM 2003). Darunter wird eine Verstärkung der Reinigungswirkung verstanden, welche durch eine über die hochfrequente Schwingung der Feilen erzeugte Flüssigkeitsbewegung erzielt wird (LUMELY et al. 1991, TULUS und SCHULZ-BONGERT 2004). Aufgrund der Oberflächenspannung folgt die Flüssigkeit der schwingenden Feile und kann so in Bereiche des Wurzelkanals gelangen (MARTIN und CUNNINGHAM 1985). Außerdem kommt es zu einer Erwärmung der Flüssigkeit, was im Falle von NaOCl zu einer Verstärkung der gewebeauflösenden Wirkung führt (HEIDEMANN 2001). Die Aktivierung durch Ultraschall ermöglicht so auch die Verwendung von niedriger konzentrierten Spüllösungen, insbesondere Natriumhypochlorit, wodurch die Zytotoxizität reduziert wird (MARTIN und CUNNINGHAM 1985).

SABINS et al. (2003) fanden, dass die ultraschallgestütze Wurzelkanalspülung der schallaktivierten Spülung deutlich überlegen war. Sie erklären dies damit, dass die Spitze der Ultraschallfeile bei Kontakt mit der Wurzelkanalwand weniger stark als die schallgetriebene Spitze gedrosselt wird. JENSEN et al. (1999) konnten hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen der schall- und ultraschallaktivierten Wurzelkanalspülung nachweisen. Im Vergleich der hydrodynamischen wie auch der ultraschallgestützten Wurzelkanalspülung gegenüber konventionellen manuellen Spülmethoden konnte ALTENHOF (2009) eine signifikant bessere keimreduzierende Wirkung aufzeigen. Beide Systeme gegeneinander verglichen zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Laseranwendung im Wurzelkanal

Alternativ oder ergänzend zur Wurzelkanalspülung wurde auch die Anwendung unterschiedlicher Laser zur Keimreduktion im Wurzelkanal vorgeschlagen. Laut einer Studie von MORITZ et al. (1999) liegt die Keimreduktion hier bei 99,05% - 99,64%. Gerade dies könnte für die Endodontie von großem Nutzen sein (MORITZ et al. 1999, MORITZ et al. 2006). Eine andere Studie von GUTKNECHT et al. (1996) misst sogar Erfolge als Keimreduktion von 99,9997% (GUTKNECHT et al. 1996). MORITZ et al. konnten nachweisen, dass der Nd:YAG-Laser bis zu 99,5% der Bakterien in einer 1mm dicken Dentinschicht abtötete (MORITZ et al. 2000).

Im direkten Vergleich des Es,Cr:YSGG-Lasers mit einer NaOCl-Spüllösung bei einem geraden Wurzelkanal konnten ELDENIZ et al. (2007) in einer Ex-vivo-Pilotstudie jedoch nachweisen, dass der Laser nicht annähernd alle Bakterien beseitigen konnte. Die 3% NaOCl-Spüllösung hingegen unterdrückte das Wachstum von E. faecalis und machte in der Studienanordnung alle Wurzelkanäle keimfrei (ELDENIZ et al. 2007).

In der letzten Zeit sind auch Dioden-Laser, die mit deutlich niedrigeren Leistungen arbeiten, von zunehmenden Interesse. Die Eindringtiefe in das Gewebe ist geringer als bei den Nd:YAG-Lasern, wohingegen aber der negative Effekt der starken Wärmebildung entfällt. Nachteilig ist, dass sie bei tiefer infizierten Dentinschichten auch weniger wirksam sind (MORITZ et al. 1997, MORITZ et al. 2006).

1997 untersuchten MORITZ et al. den Effekt der Dioden-Laser in einem In-vitro-Versuch an Wurzelkanälen. Sie fanden eine sehr hohe Keimzahlreduktion und den Verschluss von Dentinkanälchen (MORITZ et al. 1997). In einem In-vivo-Versuch konnte die Keimzahlreduktion klinisch bestätigt werden (MORITZ et al. 1997).

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit von Diodenlasern liegt laut MORITZ et al. (2006) im Bereich der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie (aPDT, auch als Photoaktivierte Chemotherapie oder Photoaktivierte Desinfektion bezeichnet), auf die im Folgenden genau eingegangen werden soll.

Photodynamische Therapie

Das Grundprinzip der Photoaktivierten Chemotherapie oder antimikrobiellen Photodynamischen Therapie (PACT®, aPDT) liegt im Anfärben von malignen Zellen oder Mikroben mit einem Photosensibilisator und der anschließenden Elimination derselben durch Aktivierung des Farbstoffes mittels einer Lichtquelle. Dieses Prinzip wird in diversen Fachbereichen der Medizin wie der Gynäkologie, der Augenheilkunde oder auch der Onkologie bereits seit Jahren erfolgreich angewendet (MORITZ et al. 2006). Beispielsweise spricht das Carcinoma in situ circa in 90% der Fälle auf diese Behandlungsmethode an (FAN et al. 1997). Als Lichtquelle kommen neben Lasern mittlerweile auch LED-Systeme zum Einsatz (RAJESH et al. 2011).

Grundsätzlich werden drei Bestandteile für die antimikrobielle Photodynamische Therapie benötigt - der Farbstoff (Photosensitizer), Sauerstoff und Licht (RAJESH et al. 2011). Bei Laser-Bestrahlung mit einer speziell für das Absorptionsmaximum des benutzen Farbstoffs gewählten Wellenlänge wird das Photosensibilisatormolekül durch die Photonen in einen höheren Energiezustand, den sogenannten „Singulett-Zustand“, versetzt.

Molekularer Sauerstoff ist ein relativ reaktionsträges Gas. Nach der Hundschen Regel ist hier das höchste Molekülorbital mit zwei einzelnen Elektronen gleichen Spins besetzt, das heißt, dass Sauerstoff im Grundzustand ein Biradikal darstellt und auch als Triplett-Sauerstoff bezeichnet wird. Singulett-Sauerstoff ist der angeregte Zustand, der durch einen Wechsel in der 2p-Schale stattfindet, wodurch zwei Sauerstoff-Radikale entstehen. Im vorliegenden Fall geschieht der Wechsel in den hochreaktiven Zustand mit Hilfe des Photosensitizers durch die Aufnahme von Photonen, wobei der Photosensitizer als Transfermolekül wirkt (ELSTNER 1990, RADSCHUWEIT 2002).

Prinzipiell gibt es zwei Reaktionswege, wie der Photosensitizer weiter reagieren kann, die als Typ I oder Typ II beschreiben werden (s. auch Abbildung 1).

Im ersten Fall (Typ I) überträgt der Photosensitizer Elektronen auf organische Substrate von Zellen, wobei freie Radikale entstehen, welche extrem reaktiv sind und mit endogen vorhandenem Sauerstoff zu hochreaktiven Sauerstoffspezies reagieren. Dabei entstehen Superoxide, Hydroxylradikale und Wasserstoffradikale, die Biomoleküle oxidieren und Proteine, Lipide, Nukleinsäuren sowie Zellmembranen angreifen und irreparabel schädigen (CALZAVARA-PINTON et al. 2007, KONOPKA und GOSLINSKI 2007, RAJESH et al. 2011).

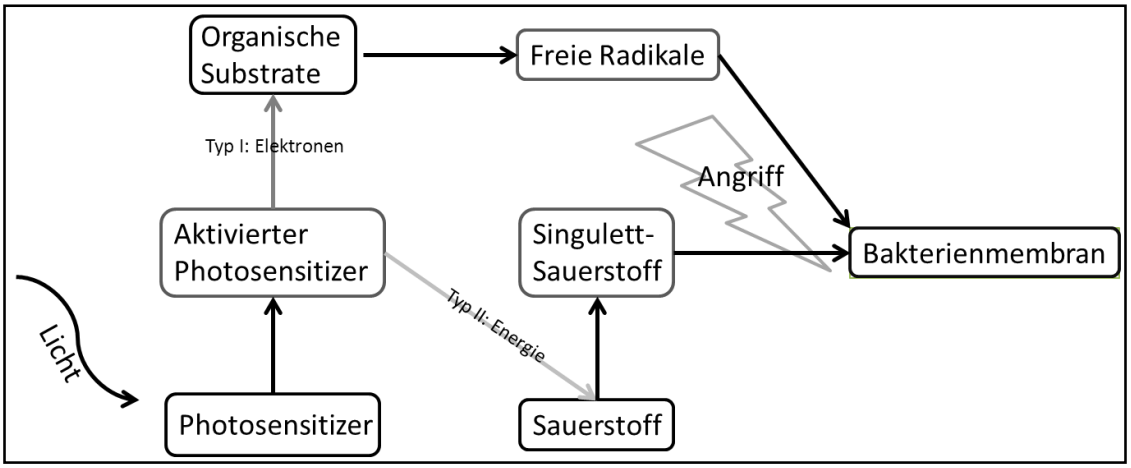

Abbildung 1: Schematische Darstellung der aPDT-Wirkungsprinzipen

Bei der Typ II-Reaktion wird die Energie des Photosensitizers auf den in der Umgebung vorhandenen Sauerstoff übertragen, der dadurch zu hochreaktivem Singulett-Sauerstoff ($^1O_2$) wird. Diese Sauerstoffradikale haben in biologischen Systemen eine Lebensdauer von weniger als 0,004 Millisekunden und einen Aktivitätsradius von weniger als 0,02 µm (DOUGHERTY et al. 1998). Die Radikale schädigen die Bakterienmembran, Zellorganellen sowie die DNS von Bakterien, was zur Elimination führt. Ebenso werden Pilze und Viren bekämpft (WAINWRIGHT 1998). Die zytotoxische Wirkung hält so lange an, wie Licht zugeführt wird und wirkt unspezifisch sowohl auf grampositive als auch auf gramnegative Bakterien. Eine Resistenzbildung gegen Singulett-Sauerstoff und damit gegen die aPDT ist nicht möglich, womit die antimikrobielle Photodynamische Therapie eine Alternative zur Antibiotikatherapie darstellt (MORITZ et al. 2006, RAJESH et al. 2011).

Es ist möglich, die Membranen aller Bakterien, egal ob gramnegativ oder grampositiv, anzufärben. Durch ihre chemischen Bindungseigenschaften können verschiedene Farbstoffe unterschiedlich mit den einzelnen Bakterienarten interagieren. So kann ein Farbstoff beispielsweise mit der Mureinhülle der einen Art eine Bindung eingehen, bei einem anderen Bakterium bindet er aber sowohl an der Zellwand als auch an Zellorganellen (MORITZ et al. 2005). Dies geschieht über Ionenbindung, Antikörperbindung oder andere membranaktive Substanzen (KONOPKA und GOSLINSKI 2007). BHATTI et al. (2000) zeigten, dass der Photosensibilisator zum Abtöten der Bakterien nicht in die Zelle eindringen muss, sondern schon bei Bindung an die Bakterienwand bakterizid wirken kann.

Vornehmlich binden Photosensitizer aufgrund ihres lipophilen Charakters an der Phospholipiddoppelschicht in den Membranen (WAINWRIGHT 1998).

Eine Studie von KÖMERIK et al. (2000) hat gezeigt, dass die aPDT nicht nur auf die Bakterien an sich wirkt, sondern auch auf die von Bakterien vermittelte Aktivität von Virulenzfaktoren wie Lipopolysacchariden und Proteasen wirkt. Diese wird signifikant reduziert. Dadurch werden durch Makrophagen keine proinflammatorischen Zytokine mehr ausgeschüttet (KÖMERIK et al. 2000).

Photosensitizer

Photosensitizer müssen bestimmte photo-chemische, chemische und biologische Eigenschaften aufweisen, die zu berücksichtigen sind, um als Bakteriostatikum eingesetzt werden zu können (MORITZ et al. 2006, RAJESH et al. 2011; Tabelle 4).

Zu berücksichtigende Faktoren des Photosensibilisators
– Zelltypen, mit denen der Photosensitizer bindet
– Wirksamste Konzentration
– Für Aktivierung erforderliche Lichtstärke und Wellenlänge
– Konzentration, in der er im aktivierten Zustand auf bestimmte Bakterien toxisch wirkt und Art der toxischen Wirkung auf die Zellmembran
– Löslichkeit in Wasser und Lipidumgebung
– Ionisierungsgrad
– Anregungseffizienz (bei Erreichen des Triplett-Zustandes)
– Dauer des Verbleibens im Triplett-Zustand

Tabelle 4: Zu berücksichtigende Faktoren des Photosensibilisators (nach MORITZ et al. 2006)

Drei Strukturtypen werden bei medizinisch relevanten Photosensitizern unterschieden (RAJESH et al. 2011):

1. Die Gruppe der trizyklischen Farbstoffe mit verschiedenen meso-Atomen, zu denen beispielsweise Methylenblau, Riboflavin, Fluorescein oder Erythrosin gehören.

2. Die Tetrapyrrol-Gruppe, zu denen Porphyrine und deren Derivate zählen, ebenso wie Chlorophyll, Phylloerythrin und Phthalocyanine.

3. Die Furocoumarin-Gruppe, zu denen Psoralen und seine methoxy-Derivate, Xanthotoxin und Bergaptene gezählt werden.

In der Onkologie wurden anfangs Photofrin® und Hämatopyrinderivate eingesetzt. Mit der zweiten Photosensitizer-Generation kamen dann 5-Aminolävulinsäure (ALA), Benzoporphyrinderivate, Texaphyrin und m-Tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC) hinzu. ALA wird beispielsweise in der Behandlung von Präkanzerosen eingesetzt (RAJESH et al. 2011). Gängige Kombinationen von Photosensibilisatoren und Lasern sind in Tabelle 5 wiedergegeben (MORITZ et al. 2006).

Kombinationen von Photosensibilisatoren und Lasern	
Photosensibilisator	**Laser**
Toloniumchlorid	Dioden-Laser bei λ=635 nm Helium-Neon-Laser bei λ=632,5 nm
Methylenblau	Dioden-Laser bei λ=670 nm

Tabelle 5: Kombination von Photosensibilisatoren und Lasern (nach MORITZ et al. 2006)

Zu den wichtigsten Eigenschaften eines als Photosensibilisator genutzten Farbstoffs gehört, dass er rotes Laserlicht im sichtbaren und nahen Infrarotbereich absorbieren kann. Rotes Laserlicht hat die größte Eindringtiefe in Gewebe und durchdringt sogar Blut (MORITZ et al. 2005). Auch sollte der Farbstoff in ausreichender Konzentration vorliegen, denn nur so werden genügend Singulett-Sauerstoff-Moleküle für eine erfolgreiche Desinfektion erzeugt. Gleichwohl darf der Farbstoff aber auch nicht in zu hoher Konzentration vorliegen, da das Laserlicht sonst nicht mehr zu den Bakterien vordringen kann (BHATTI et al. 1997).

Außer dem Farbstoff sind in Photosensibilisatoren je nach Hersteller auch noch Stoffe wie Puffer, Konservierungsmittel, Antioxidantien sowie Detergenzien zur Oberflächenbenetzung enthalten. Die genauen Inhaltsstoffe werden vom Hersteller nicht veröffentlicht. In Studien wurde gezeigt, dass der pH-Wert einen wichtigen Einfluss auf das Bindungsverhalten des Farbstoffs an die Bakterien hat. Alkalische Lösungen fördern das Eindringen des Farbstoffs in Zellen und erhöhen die Zytotoxizität der Singulett-Sauerstoffmoleküle. Zudem verlängert sich auch der Triplett-Zustand (MORITZ et al. 2005, KÖMERIK et al. 2002).

Am besten haben sich zum Anfärben Toluidinblau, Methylenblau und Azur-B-Chlorid bei grampositiven und gramnegativen Keime bewährt (WILSON et al. 1997). Lediglich Methylenblau ist in der Lage, auch ohne Lichtzufuhr toxisch auf Candida albicans und wenige Streptokokkenarten zu wirken. Toluidinblau hat ohne Lichtzufuhr praktisch keinen toxischen Effekt auf Bakterien (O'NEILL et al. 2002, O'NEILL et al. 2003).

Photodynamische Therapie in der Zahnheilkunde

Die Abtötung von Bakterien durch den Einsatz eines Farbstoffes in Kombination mit einer Lichtquelle versucht man sich seit Ende der 1990er Jahre in der Zahnheilkunde zunutze zu machen (BHATTI et al. 1997, BHATTI et al. 1998, WILSON et al. 1997). Als Einsatzgebiete der aPDT in der Zahnheilkunde sind neben der Endodontie die Parodontologie, die Implantologie, in der Zahnerhaltung die Entfernung kariöser Areale sowie auch die Therapie von oralen Weichgewebsinfektionen vorgeschlagen worden (SHIBLI et al. 2003, WILSON 2004, DE OLIVEIRA et al. 2007).

Nur sehr wenige Bakterienarten, wie beispielsweise Porphyromonas spp. und Prevotella spp. stellen endogen photosensible Farbstoffe (Protohämin bzw. Protoporphyrin) her. Daher ist es bei diesen Spezies möglich, sie mit einer dem Absorptionsmaximum des eigenen Farbstoffs entsprechenden Wellenlänge abzutöten. Bei diesen Spezies ist eine Abnahme der Lebensfähigkeit von 50% bei rotem Laserlicht (7,3 mW, λ=632,8 nm) ohne von außen zusätzlich hinzugefügtem Photosensibilisator nachgewiesen worden (KÖNIG et al. 2000). Bakterien wie

beispielsweise Enterococcus faecalis oder Streptococcus mutans stellen selbst keine Farbstoffe her und sind somit gegen die Abtötung mit rotem Laserlicht „resistent“. Über die Anbindung eines Photosensitizers an die Bakterienmembran können aber auch diese Arten durch die aPDT erfasst werden.

In der Zahnheilkunde werden die Farbstoffe Toluidinblau (Toloniumchlorid), Phenothiazinchlorid und Methylenblau in der aPDT eingesetzt. Photosensibilisatoren, die gegen Tumore eingesetzt werden können, sind für den Einsatz mit Rotlicht-Lasern bei Bakterien nur unzureichend wirksam. Das Besondere an dem eingesetzten Farbstoff Toluidinblau ist, dass er nur schlecht an menschliche Zellen binden kann (MORITZ et al. 2006). Toluidinblau hat weiterhin den Vorteil, dass er, im Gegensatz zu Natriumhypochlorit, in die Dentinkanälchen diffundieren kann (WILSON 2004).

In einer In-vitro-Studie von SOUKOS et al. wurde 2003 gezeigt, dass auch Bakterien in Biofilmen abgetötet werden können. In einer klinischen Vergleichsstudie bei aggressiven Parodontitiden konnte eine alleinige aPDT eine der subgingivalen Therapie mittels Scaling vergleichbare Wirkung erzielen (DE OLIVEIRA et al. 2007). YILMAZ et al. (2002) zeigten, dass eine Kombination aus der klassischen „Kürettage“ und der Photodynamischen Therapie im Bereich der Parodontologie zu signifikant besseren klinischen und mikrobiologischen Werten führt als Scaling und Root Planing allein.

HASS et al. zeigten bereits 1997, dass Bakterien auf Implanatoberflächen mittels aPDT abgetötet werden können, ohne dass die Implantatoberfläche beschädigt wird. SHIBLI et al. (2003) bestätigten die bakterienreduzierende Wirkung bei Ligatur-induzierter Periimplantitis bei Hunden.

SOUKOS et al. untersuchten 2006 die Wirkung der aPDT an extrahierten Zähnen, wobei Methylenblau als Photosensitizer in Kombination mit rotem Licht unterschiedlicher Energie genutzt wurde. Es zeigte sich, dass die Wirkung der aPDT nicht nur von der genutzten Wellenlänge, sondern auch von der Energie der Lichtquelle abhängt, So wurden bei 30 J/cm^2 nur 53% E. faecalis abgetötet, bei 222 J/cm^2 hingegen 97%.

In humanen Wurzelkanälen ist auch humanes Serum enthalten, das in seiner Zusammensetzung dem Serum in anderen Körperbereichen entspricht (FOUAD 2009). Serum ist der nach dem Entfernen der zellulären Bestandteile wie Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten und auch der Gerinnungsfaktoren verbleibende flüssige Anteil des Blutes. Blutserum enthält zu 91% Wasser und zu 7% Proteine, welche wiederum zu 62% aus Albumin und Globulinen bestehen. 2% des Serums sind Elektrolyte, Nähr- und Abfallstoffe sowie Hormone (BEHRENDS et al. 2012). PATTISON et al. veröffentlichten 2012, dass hochreaktiver Singulett-Sauerstoff in der Lage ist, Proteine zu oxidieren und in ihrer Struktur zu verändern, wobei auch reaktive Zwischenprodukte der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Histidin entstehen. Dies kann zu einer Proteinfragmentierung oder Proteinaggregation führen, die zu veränderten chemischen und physikalischen Eigenschaften des Proteins führen (PATTISON et al. 2012). Ob es zu einer Verstärkung oder Schwächung des Effektes der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie kommt, wurde bislang nicht publiziert.

Gegenstand der vorliegenden Untersuchung ist es, unter möglichst realitätsnahen Bedingungen zu ermitteln, ob mit Hilfe der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie in vitro eine überlegene Keimreduktion zu erzielen ist, aus der eine Optimierung der Wurzelkanalbehandlung abzuleiten wäre. Zudem soll überprüft werden, inwiefern oxidierte Serumproteine die antimikrobielle Photodynamische Therapie modifizieren.

3 Material und Methode

3.1 Verwendete Geräte und Materialien

Cumdente PACT® 200-System

Das PACT® 200-System (Cumdente GmbH, Tübingen) ist ein System zum Durchführen der Photodynamischen Therapie in der Zahnheilkunde und besteht aus der PACT® 200-Lösung bzw. dem PACT® 200-Gel und dem PACT® 200-Laser. Es kann bei folgenden Indikationen eingesetzt werden (DÖRTBUDAK et al. 2001, WILSON 2004):

- Parodontitis marginalis
- Periimplantitis
- Infektionen im Endodont
- anderen mikrobiellen Infektionen der Mundhöhle
- Karies-/Kavitäten-/Stumpf-»Sterilisation«, Caries-profunda-Therapie
- Weichgewebsinfektionen

Bei dem PACT® 200-Laser (Abbildung 2) handelt es sich um einen Diodenlaser der Klasse 2M mit einer Emission im Wellenlängenbereich von 632 - 644 nm, also im sichtbaren roten Bereich. Die Leistung der Diode beträgt 250 mW, wobei die Leistung durch den eingesetzten Lichtleiter auf ca. 200 mW reduziert wird. Der Laser wird durch einen Akku Li 3,7 V / 900 mAh mit Strom versorgt, womit ca. 100 Anwendungen durchgeführt werden können. Die Betriebstemperatur liegt bei 10 - 45° Celsius. Aus Sicherheitsgründen kann der Laser nur mit Lichtleiter und eingestecktem Schlüsselschalter verwendet werden. Er kann dann über eine Drucktaste aktiviert werden, wobei sich der Laser nach 30 Sekunden selbstständig ausschaltet.

Abbildung 2: PACT-Laser® mit Ladestation (Cumdente 2011)

Das PACT 200®-System kann mit drei je nach Anwendungsbereich verschiedenen Lichtleitern (Light Guides) betrieben werden. Hierzu gehören die Light Guides Universal**,** Endo und XL, die sich in den vorderen Bereich des Laserhandstückes einschieben lassen (siehe Tabelle 6). Die Lichtleiter sind laut Hersteller einmalig bei 134°C autoklavierbar. Die PACT®-Lösung besteht aus Toluidinblau (Toloniumchlorid) und ist in ihrer Zusammensetzung genau auf die Wellenlänge des Lasers abgestimmt. Die Konzentration des Photosensitizers ist in den Produktbeschreibungen nicht angegeben und konnte auch auf direkte Anfrage bei dem Hersteller nicht festgestellt werden.

PACT® Light Guide Universal	PACT® Light Guide Endo	PACT® Light Guide XL
Universal-Einmal-Lichtleiter mit kugelförmiger Lichtabstrahlung zum Einsatz bei: • Parodontitis • Periimplantitis • Karies • Weichgewebs-infektionen	Endo-Einmal-Lichtleiter mit stabförmiger Lichtabstrahlung für die Wurzelkanalbehandlung	Einmal-Lichtleiter mit flächiger Lichtabstrahlung für Weichgewebs-infektionen

Tabelle 6: PACT® - Light Guides

Bakterienkulturen

Zur Untersuchung der Effektivität der Photodynamischen Therapie wurden in den Versuchen verschiedene Bakterienkulturen verwendet. Es handelte sich um eine E. faecalis-Reinkultur sowie um aerobe und anaerobe Mischkulturen (Tabelle 7).

Reinkultur	Aerobe Mischkultur	Anaerobe Mischkultur
Enterococcus faecalis ATCC 29212	– Enterococcus faecalis WK 16-1 – Shewanella putrefaciens WK 16-2	– Actinomyces naeslundii WK 3-1 – Bifidobacterium adolescentis WK 3-2 – Peptostreptococcus prevotii WK 3-3 – Eggerthella lenta WK 3-4

Tabelle 7: Verwendete Bakterienkulturen

Die Bakterien wurden vom Labor für Orale Mikrobiologie der Universität Bern, Schweiz, zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um bakterielles Probenmaterial aus endodontisch behandelten Zähnen, bei denen zuvor mit üblichen Aufbereitungstechniken und Spülmethoden keine Keimfreiheit erreicht werden konnte und die somit einen endodontischen Misserfolg darstellten.

Zur Probengewinnung waren sterile Papierspitzen (ISO-Größe 40) für 10 s in die Wurzelkanäle eingebracht worden und anschließend in ein Transportmedium VMGA III (DAHLÉN et al. 1993) überführt. Nach Inkubation und Bebrüten auf aeroben bzw. anaeroben Nährmedien waren die Mikroorganismen identifiziert worden. In der aeroben Mischkultur waren dies die Bakterien E. faecalis und Shewanella putrefaciens. Shewanella putrefaciens ist ein gram-negatives, aerobes, im Wasser vorkommendes Bakterium (HOF und DÖRRIES 2002), das beim Menschen bei Infektionen wie Abszessen, Augeninfektionen, Zellgewebsentzündung, Otitis media, Osteomyelitis, Peritonitis und Sepsis vorkommt (MURRAY et al. 2003). Bei den Bakterien der anaeroben Mischkultur, Actionomyces naeslundii, Bifidobacterium adolescentis, Peptostreptococcus prevotii und Eggerthella lenta (vormals Eubacterium lentum) handelt es sich um gram-positive Spezies, die häufig in der oralen Flora nachgewiesen werden können (JOUSIMIES-SOMER et al. 2002). Bifidobacterium adolescentis, Eggerthella lenta und Actinomyces naeslundii gehören zu den anaeroben nicht-sporenbildenden Bazillen.

Auswahl und Vorbereitung der extrahierten Zähne

Es wurden ausschließlich extrahierte einwurzelige Frontzähne mit einem Wurzelkanal verwendet. Prämolaren konnten aufgrund des häufigen Vorkommens von mehreren Wurzelkanälen und großer Wurzelkanalvariabilität nicht für die Studie genutzt werden. Die Extraktionen erfolgten aus verschiedenen Indikationen durch unterschiedliche, an der Studie nicht beteiligte Behandler. Das extrahierte Zahnmaterial wurde in 0,1%iger Thymol-Lösung in verschließbaren Behältnissen aus Braunglas gesammelt.

Folgende Ausschlusskriterien wurden bei der Zahnauswahl beachtet (HAUSER 2006):

Ausschlusskriterien
Wurzeln mit weit offenen apikalen Foramina
Wurzeln mit starker apikaler Krümmung
Wurzeln mit sehr großem Kanallumen
Zähne mit mehr als einem Wurzelkanal
Bereits wurzelkanalgefüllte Zähne

Tabelle 8: Ausschlusskriterien beim Zahnmaterial

3.2 Methodik

Vorbereitung der Zähne

Nach Verwerfen der gemäß oberen Kriterien ungeeigneten Zähne wurden 55 Testzähne mit einem Ultraschallgerät (Siemens M1) und Handinstrumenten manuell von Konkrementen und Geweberesten gereinigt. Daraufhin wurden die Wurzeln mit einer definierten Länge von 15 mm vom Apex aus gemessen etwa in Höhe der Schmelz-Zement-Grenze mit einem diamantierten Präzisionssägeblatt mit Wasserkühlung (Exact®, Remscheid) von der klinischen Krone abgetrennt. Mit K-Feilen der ISO-Größe 10 erfolgte die Bestimmung der Arbeitslänge mittels optischer Kontrolle der Feilenlänge bis zum sichtbaren physiologischen Foramen. Die Zähne wurden daraufhin konventionell mit Hedstroem-Feilen (VDW GmbH, München) der ISO-Größen 15, 20, 25, 30, 35 und 40 auf die Arbeitslänge aufbereitet. Nach jeder Instrumentengröße wurden die Wurzelkanäle mit 1 ml 1,5%iger NaOCl-Lösung gespült.

Nach Aufbereitung der Wurzelkanäle wurden die Zahnwurzeln mit einer Schicht Kaltpolymerisat (Paladur®, Fa. Kulzer, Bad Homburg) überzogen, um die Penetration von Bakterien und die Diffusion von Substrat von der Wurzeloberfläche

in Richtung Wurzelkanal zu verhindern. Anschließend wurden die Zahnwurzeln randomisiert zu je elf Stück in einem Silikonblock (Henry Schein) fixiert und in ein autoklavierbares Glasgefäß verbracht (Abbildung 3), wobei nur je zehn Zähne (n=10) für die Versuche genutzt werden sollten. Die übrigen 5 Zähne waren als Ersatz geplant, falls Bakterien in einem Zahn nicht anwachsen sollten.

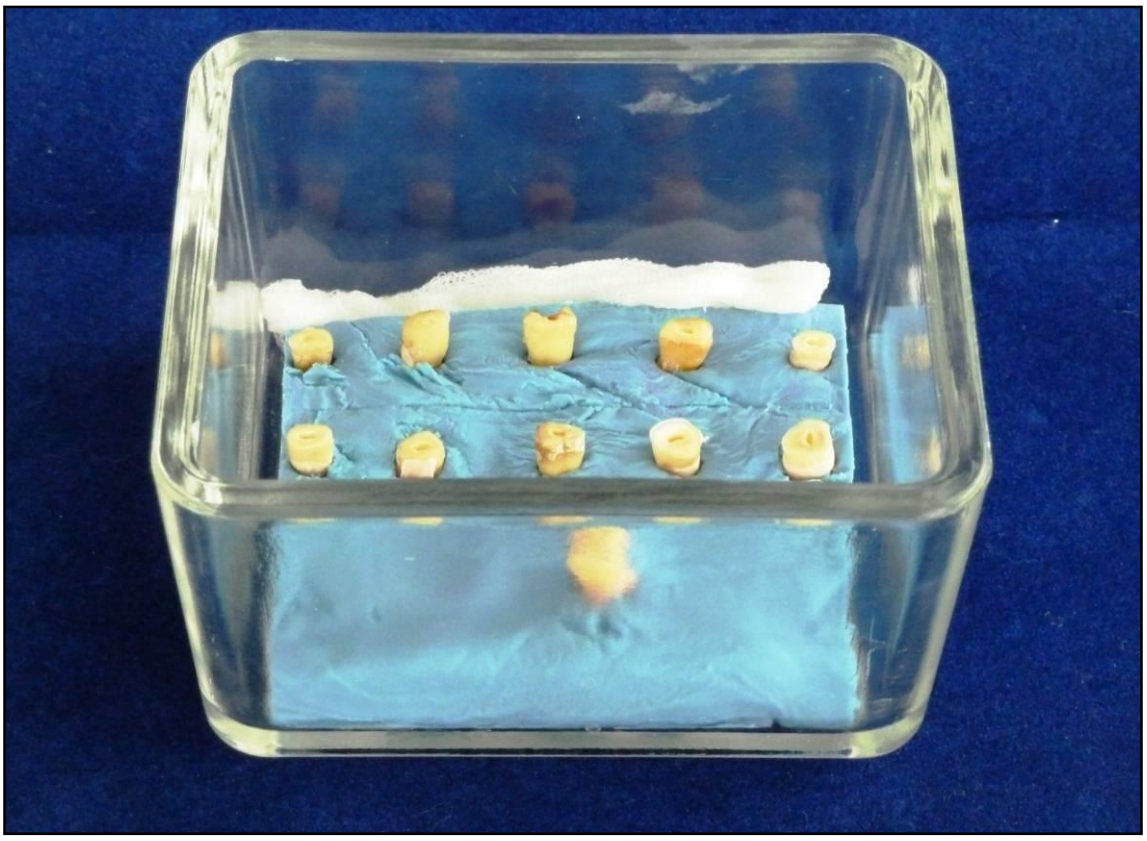

Abbildung 3: Zahnwurzeln in Silikon

Desinfektion

Die vorbereiteten Zähne wurden bei Wasserdampfatmosphäre im Autoklaven für 5 Minuten auf 121°C erhitzt. Nachdem das Versuchsmaterial abgekühlt war, wurde neben den Silikonblock in einer sterilen Werkbank (Vitatek Scanlaf Safe 1200, LaboGene ApS, Lynge, Dänemark) eine mit destilliertem Wasser befeuchtete sterile Kompresse eingelegt, um eine Austrocknung des Zahnmaterials im Brutschrank zu verhindern. Die Glasgefäße wurden mittels Klarsichtfolie verschlossen, um die Sterilität zu gewährleisten.

3.3 Versuch 1: In-vitro Überprüfung der PACT®-200 Wirkung in einer E. faecalis-Suspension

Ziel des Versuches war es, die Wirkung des PACT®-200 Systems auf den Keim E. faecalis zu testen.

Eine E. faecalis-Probe (ATCC 29212) wurde in steriler 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst und die Bakteriensuspension mit einem Spektrometer (Bio-Rad SmartSpec 3000™, Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, USA) bei einer Wellenlänge von 640 nm auf eine optische Dichte von 0,1 eingestellt. Dies entspricht anhand einer Eichkurve etwa 10^8 Bakterien/ml (HIRSCH-KAUFFMANN et al. 2009). Die E. faecalis-Lösung wurde auf 10^5 Bakterien/ml (1:10) und 10^3 Bakterien/ml (1:1000) verdünnt. Aus diesen beiden Lösungen wurden jeweils 10 µl auf je 16 Eppendorf-Gefäße (Eppendorf AG, Hamburg) verteilt.

In jedes Gefäß, mit Ausnahme der Kontrollen, wurden dann 10µl PACT®-200 Fluid (Photosensitizer) gegeben. Die Lagerung des Farbstoffes erfolgte zuvor kühl, trocken und lichtgeschützt in 0,6 ml Dosierspritzen. Nach jedem Versuchsabschnitt wurden die Spritzen sowie die Lichtleiter verworfen, um eine bakterielle Kontamination zu vermeiden.

In den Kontrollgruppen wurde anstelle des Photosensitizers sterile 0,9%ige NaCl-Lösung zugegeben. Die Eppendorf-Gefäße wurden daraufhin kurz anzentrifugiert. Je Gruppe und Bakterienansatz wurde eine Doppelbestimmung der verdünnten Lösungen durchgeführt. Jeweils 2 Gefäße wurden wie folgt beschickt und behandelt:

Keimsuspension 10^3 Keime/ml

- 10 µl sterile 0,9 %ige NaCl-Lösung (Kontrolle)
- 10 µl PACT®-200 Fluid
- 10 µl sterile 0,9 %ige NaCl-Lösung + Laserbelichtung 30 s (Kontrolle)
- 10 µl sterile 0,9 %ige NaCl-Lösung + Laserbelichtung 60 s (Kontrolle)
- 10 µl sterile 0,9 %ige NaCl-Lösung + Laserbelichtung 90 s (Kontrolle)
- 10 µl PACT®-200 Fluid + Laserbelichtung 30 s
- 10 µl PACT®-200 Fluid + Laserbelichtung 60 s
- 10 µl PACT®-200 Fluid + Laserbelichtung 90 s

Keimsuspension 10^5 Keime/ml

- 10 µl sterile 0,9 %ige NaCl-Lösung (Kontrolle)
- 10 µl PACT®-200 Fluid
- 10 µl sterile 0,9 %ige NaCl-Lösung + Laserbelichtung 30 s (Kontrolle)
- 10 µl sterile 0,9 %ige NaCl-Lösung + Laserbelichtung 60 s (Kontrolle)
- 10 µl sterile 0,9 %ige NaCl-Lösung + Laserbelichtung 90 s (Kontrolle)
- 10 µl PACT®-200 Fluid + Laserbelichtung 30 s
- 10 µl PACT®-200 Fluid + Laserbelichtung 60 s
- 10 µl PACT®-200 Fluid + Laserbelichtung 90 s

Nach der Behandlung wurden zu jedem Eppendorf-Gefäß 80 µl sterile 0,9%ige NaCl-Lösung zugegeben. In der 10^3 Bakterien/ml-Gruppe wurden daraus 25 µl auf eine Agarplatte übertragen und ausgestrichen, in der 10^5-Bakterien-Gruppe waren es 10 µl. Nach 24 Stunden Inkubationszeit in einem Brutschrank bei 37°C, CO_2-Atmosphäre und Wasserdampf wurden die Kolonien mittels manuellem Koloniezähler ausgezählt und die Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE/ml) berechnet.

3.4 Versuch 2: In-vitro Überprüfung der PACT®-200 Wirkung auf E. faecalis in Anwesenheit von inaktivem Serum und physiologischer Kochsalzlösung

Da im Wurzelkanal humanes Serum vorhanden ist, wurde in diesem Versuch die Wirkung des PACT®-Systems auf den Erreger E. faecalis in Gegenwart von humanem Serum getestet, um herauszufinden, ob Serum einen modulierenden Einfluss haben könnte.

E. faecalis (ATCC 29212) wurde in sterilem 0,9%igem NaCl gelöst und bei einer Wellenlänge von 640 nm auf eine optische Dichte von 0,2 (entsprechend $2x10^8$ Bakterien/ml) eingestellt.

Aus dieser Bakteriensuspension wurden je 25 µl auf 16 Eppendorf-Gefäße verteilt. Zu acht Gefäßen wurden jeweils 25 µl inaktives humanes Serum (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) pipettiert. Zu den verbleibenden acht Eppendorf-Gefäßen wurden je 25 µl sterile 0,9%ige NaCl-Lösung gegeben.

Eine weitere Differenzierung erfolgte bezüglich des Zufügens von PACT®-200 Fluid. In insgesamt 12 der Gefäße (Versuchsreihen B bis D) wurden jeweils 50 µl PACT®-200 Fluid zugegeben. In der Gruppe A (Kontrollgruppe mit und ohne Serum) wurde anstelle des Photosensitizers sterile 0,9%ige NaCl-Lösung verwendet. Die Serum-Gruppen enthielten somit Bakterienlösung, Photosensitizer und humanes Serum und wurden mit dem PACT®-200 Laser für 30 s, 60 s und 90 s bestrahlt (siehe Tabelle 9).

		Bakterienansatz Nr. (je 50 µl)	**NaCl (je 50 µl)**	**Photosensitizer (je 50 µl)**
1	**Kontrolle 1**	1	X	
2	**Kontrolle 2**	2	X	
3	**Kontrolle 3**	3	X	
4	**Laser 30 s**	1		X
5	**Laser 30 s**	2		X
6	**Laser 30 s**	3		X
7	**Laser 60s**	1		X
8	**Laser 60 s**	2		X
9	**Laser 60 s**	3		X
10	**Laser 90s**	1		X
11	**Laser 90 s**	2		X
12	**Laser 90 s**	3		X

Tabelle 9: Übersicht Eppendorf-Röhrchen

Nach der Bestrahlung wurden die Kontrollen (mit und ohne Serum) mit steriler 0,9%iger NaCl-Lösung auf eine Konzentration von 1:100 (10 µl Suspension auf 990 µl NaCl), die Serum- und die NaCl-Gruppe auf eine Konzentration von 1:20 (50 µl Suspension auf 950 µl NaCl) verdünnt. Anschließend wurden je 25 µl der verdünnten Lösung auf Agarplatten pipettiert und ausgespatelt. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Kolonien mittels manuellem Koloniezähler gezählt und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE/ml) berechnet.

3.5 Versuch 3: In-vitro Überprüfung der PACT®-200 Wirkung auf E. faecalis in Anwesenheit von inaktiviertem humanem Serumalbumin

Als Fraktion des humanen Serums wurde hier inaktiviertes humanes Serumalbumin verwendet, um den Einfluss des Serumalbumins an der Gesamtwirkung des PACT®-Systems zu ermitteln. Dabei wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen (25 mg/ml und 50 mg/ml) verwendet. Pharmazeutisch wird das humane Serumalbumin auf Temperaturen von 50 bis 70°C erwärmt, um Verunreinigungen durch Mikroorganismen zu inaktivieren (NOUCHI et al. 2007).

Für diesen Versuch wurde erneut eine E. faecalis-Kultur (ATCC 29212) verwendet und in steriler 0,9%iger NaCl-Lösung auf eine optische Dichte von 0,2 bei einer Wellenlänge von 640 nm eingestellt, entsprechend $2x10^8$ Bakterien/ml. Die inaktivierte humane Serumalbumin-Lösung (HSA) (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) wurde gemäß Herstellerangaben hergestellt (75 mg Pulver, 150 µl NaCl) und bei 37°C warmgestellt. Drei Ansätze wurden verwendet:

- Ansatz 1: 400 µl Bakteriensuspension + 100 µl steriler 0,9%iger NaCl-Lösung
- Ansatz 2: 600 µl Bakteriensuspension + 150 µl HSA-Lösung
- Ansatz 3: 200 µl Ansatz 2 + 160 µl Bakteriensuspension + 40 µl steriler 0,9%iger NaCl-Lösung

Gemäß unten stehender Tabelle 10 wurden die Ansätze 1 bis 3, das PACT®-200 Fluid und sterile 0,9%ige NaCl-Lösung auf Eppendorf-Röhrchen verteilt. Es erfolgte eine Doppelbestimmung.

	Gruppen	Eppendorf-Röhrchen Nr.
ohne HSA	Kontrolle	1
	Photo + Laser 30 s	4
	Photo + Laser 60 s	7
	Photo + Laser 90 s	10
mit 25 mg/ml HSA	Kontrolle	3
	Photo + Laser 30 s	6
	Photo + Laser 60 s	9
	Photo + Laser 90 s	12
mit 50 mg/ml HSA	Kontrolle	2
	Photo + Laser 30 s	5
	Photo + Laser 60 s	8
	Photo + Laser 90 s	11

Tabelle 10: Verteilung der Ansätze

Nach Herstellung der Kontroll-, der 25 mg/ml HSA-Gruppe (Ansatz 3) und der 50 mg/ml HSA-Gruppe (Ansatz 2) wurden diese je 30 s, 60 s oder 90 s mit dem PACT®-200 Laser bestrahlt. Nach der Belichtung wurden die Kontrollgruppe mit steriler 0,9%iger NaCl-Lösung auf eine Konzentration von 1:100 (10 µl Suspension auf 990 µl NaCl) und die Testgruppen auf eine Konzentration von 1:20 (50 µl Suspension auf 950 µl NaCl) verdünnt. 25 µl der verdünnten Lösungen wurden auf Agarplatten gegeben und ausgespatelt. Es erfolgte eine 24-stündige Inkubation im Brutschrank. Die Kolonien wurden gezählt und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE/ml) wurde berechnet.

3.6 Versuch 4: Kontamination der Zähne mit E. faecalis / Beurteilung von PACT®-Komponenten im Vergleich zur Spülung mit NaCl (0,9%)

Das Ziel dieses Versuches war die Wirksamkeit des PACT®-Systems an sich und die seiner einzelnen Komponenten, dem Laser und dem Photosensitizer, im Wurzelkanal zu untersuchen.

Für diesen Versuch wurde eine E. faecalis Bakterienkultur (ATCC 29212) in Brain Heart Infusion Broth (BD Bacto™ Brain Heart Infusion, Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA) auf einen Standard 2 der McFarland-Trübungsreihe gebracht, was etwa 600 Mio. Keimen/ml entspricht, und anschließend 1:10 verdünnt. In jeden Wurzelkanal wurden 10 µl Keimsuspension pipettiert. Wurzelkanäle, die nicht bis zum Rand gefüllt werden konnten, wurden mit BHI aufgefüllt. Die fünf Glasgefäße wurden mit Klarsichtfolie verschlossen und in einem Brutschrank (Forma Scientific ®, San Bruno, USA) bei 37 °C, CO_2-Atmosphäre und Wasserdampf für 72 Stunden inkubiert. Nach 24 und nach 48 Stunden wurden je 10 µl frische BHI hinzu gegeben.

Zur Wahrung der Sterilität erfolgten alle Arbeiten unter einer sterilen Werkbank (Vitatek Scanlaf Safe 1200, LaboGene ApS, Lynge, Dänemark). Vor und nach jeder Gruppe erfolgten Desinfektionsmaßnahmen, um eine Kontamination mit fremden Keimen zu verhindern. Die Zähne wurden in 5 Gruppen unterteilt und mit unterschiedlichen Spülmaßnahmen im Wurzelkanal behandelt (siehe Tabelle 11).

	Spülprotokoll	**N**
Gruppe A	Kontrollgruppe, keine Spülung	10
Gruppe B	Spülung mit 5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung	10
Gruppe C	Spülung mit 5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung, Bestrahlung mit PACT®-200 Laser	10
Gruppe D	Spülung mit 5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung, Zugabe von PACT®-200 Photosensitizer	10
Gruppe E	Spülung mit 5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung, Zugabe von PACT®-200 Photosensitizer, Bestrahlung mit PACT®-200 Laser	10

Tabelle 11: Spülprotokoll Versuch 4

Gruppe A, Kontrollgruppe

Nach der Inkubationszeit wurde in die Wurzelkanäle der Kontrollgruppe je eine sterile Papierspitze der ISO-Größe 40 bis zur Arbeitslänge eingebracht. Nach 30 s wurde die Spitze entfernt, in ein mit 2 ml 0,9%iger steriler NaCl-Lösung gefülltes Reagenzglas überführt und dort mit einem Rüttler (Vortex®, Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York, USA) für 30 s zur Überführung der Bakterien in die Lösung vibriert. Um eine Verdünnung von 1:100 zu erreichen, was später die Zählbarkeit gewährleisten sollte, wurden 10 µl der überführten Bakterienlösung in 990 µl sterile NaCl-Lösung gegeben. Anschließend wurde 100 µl der verdünnten Lösung auf eine Agarplatte (Hersteller: Universität Bern) pipettiert und ausgespatelt. Die Platten wurden für 24 Stunden in einem Brutschrank bei 37°C, CO_2-Atmosphäre und Wasserdampf inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Kolonien mit Hilfe eines mechanischen Zählwerks ausgezählt und die Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE/ml) wurde berechnet.

Gruppe B, manuelle Spülung mit NaCl

Die Zahnwurzeln der weiteren Gruppen wurden mit einer Kochsalzlösung gespült. Hierzu wurden sie nach der Inkubationszeit in eine sterile Werkbank gestellt, und eine Einwegspritze (5ml) mit einer sterilen Kanüle (0,4 x 12 mm) wurde bis etwa 1 mm vor der Arbeitslänge ohne Verkeilen in den Wurzelkanal eingeführt. Eine Minute wurde mit 5 ml steriler 0,9%iger NaCl-Lösung gespült. Durch minimale Bewegungen konnte eine Klemmwirkung vermieden werden. Mit diesem Vorgehen waren die keimreduzierenden Maßnahmen in Gruppe B abgeschlossen.

Nach der Spülung wurden sterile Papierspitzen der ISO-Größe 40 in die Kanäle eingebracht und für 30 s belassen. Wie bereits bei der Kontrollgruppe wurden die Bakterien in 2 ml 0,9%ige sterile NaCl-Lösung überführt. 100 µl der überführten Bakterienlösung wurden auf je eine Agarplatte pipettiert und ausgespatelt. Das weitere Vorgehen entspricht der oben beschriebenen Methodik.

Gruppe C, Spülung mit NaCl, Bestrahlung mit PACT®-200 Laser

Das Vorgehen entspricht dem der Spülung mit 0,9%iger NaCl-Lösung. Nach dem Spülvorgang wurde die Spülflüssigkeit in den Wurzelkanälen belassen, um einer möglichen Wärmeentwicklung des Lasers entgegen zu wirken. Der PACT®-Light Guide Endo wurde vorsichtig in die Kanäle eingeführt und die Beleuchtung für 60 sec. durchgeführt. Nach Abschluss der Behandlung wurden, wie beschrieben, Papierspitzen eingebracht, in je 2 ml 0,9%ige sterile NaCl-Lösung gegeben und jeweils 100 µl auf Agarplatten ausgespatelt und inkubiert.

Gruppe D, Spülung mit NaCl, Zugabe von PACT®-200 Photosensitizer

Die Methodik in dieser Gruppe war mit der in der oben genannten Spülgruppe C nahezu identisch, jedoch wurde zusätzlich der Photosensitizer eingebracht. Da der Photosensitizer der Firma Cumdente nicht steril verkauft wird und daher die Möglichkeit der bakteriellen Kontamination bestehen könnte, wurden zuvor 0,6 ml Farbstoff zur Kontrolle auf eine Blutagarplatte gegeben und für 24 h im Brutschrank bei 37°C, CO_2-Atmosphäre und Wasserdampf inkubiert. Drei weitere Spritzen PACT®-Photosensitizer wurden in Eppendorf-Gefäße (Eppendorf AG, Hamburg) entleert, im Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg) 30 min bei 95°C sicherheitshalber keimfrei gemacht und 1:1 mit steriler 0,9%iger NaCl-Lösung, wie mit dem Hersteller abgesprochen, gemischt. Durch die Mischung sollte Farbstoff gespart werden. Nach der Inkubationszeit zeigte sich keine bakterielle Besiedelung auf der mit dem unsterilen Farbstoff benetzten Blutagarplatte.

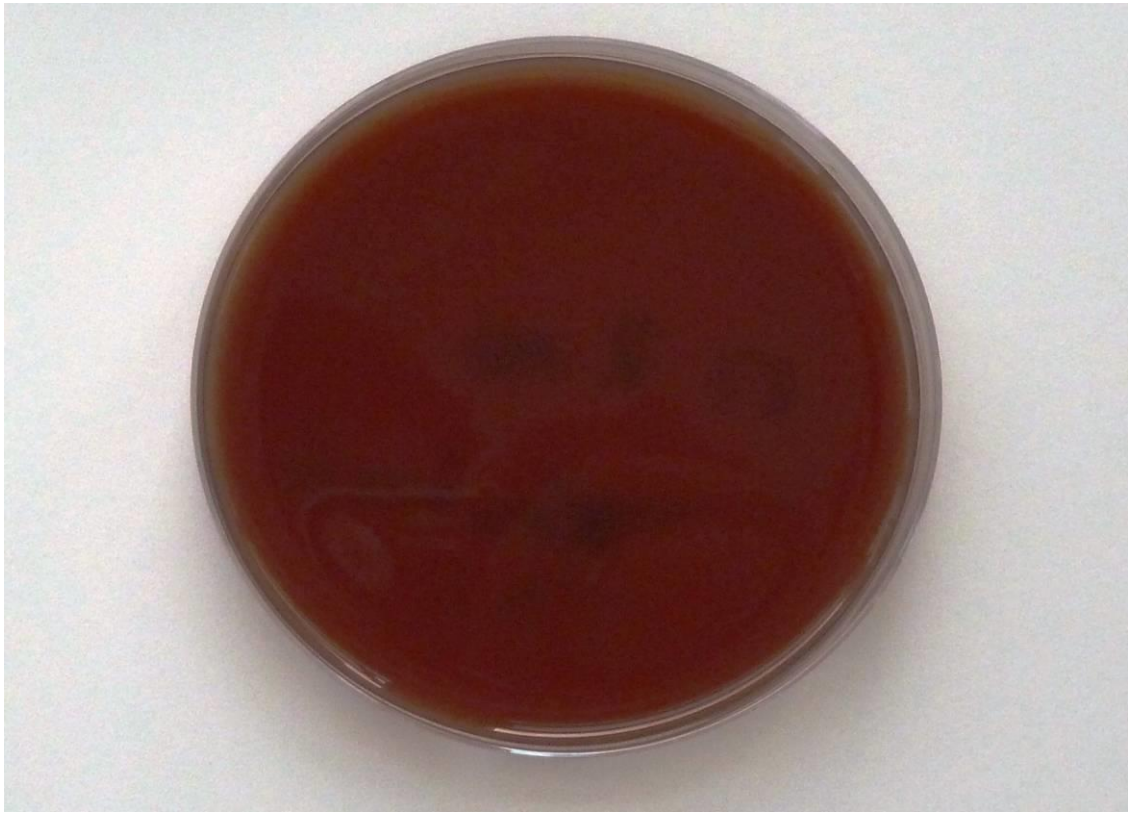

Abbildung 4: Mit PACT®-200 Fluid benetzte Blutagarplatte nach Inkubation

Nach der Feststellung der Keimfreiheit des Photosensitizers konnte dieser in die Wurzelkanäle eingebracht werden. Nach der Spülung der Kanäle mit 0,9%iger NaCl-Lösung wurde diese vollständig mit einer Einwegspritze (5ml) und Kanüle (0,4 x 12 mm) abgesaugt. In die entleerten Wurzelkanäle wurde bis zum Wurzelkanalrand der verdünnte Photosensitizer eingebracht. Nach einer Einwirkzeit von zwei Minuten wurden wie oben beschrieben sterile Papierspitzen in die Kanäle eingebracht, in je 2 ml 0,9%ige sterile NaCl-Lösung gegeben und jeweils 100 µl auf Agarplatten ausgespatelt.

Gruppe E, Spülung mit NaCl, Zugabe von PACT®-200 Photosensitizer, Bestrahlung mit PACT®-200 Laser

Mit den 10 Wurzelkanal-Proben der verbleibenden Gruppe E wurde der Effekt der beiden zusammengehörigen Komponenten des PACT®-Systems überprüft. Nach der oben beschriebenen Spülung mit steriler 0,9%iger NaCl-Lösung und der Zugabe des 1:1 verdünnten PACT®-200 Farbstoffs wurde der Laser mit dem Ansatz PACT®-

Light Guide Endo in die Wurzelkanäle eingeführt und für je 60 s aktiviert. Nach Abschluss der Behandlung wurden wiederum sterile Papierspitzen der ISO-Größe 40 eingebracht, dann in je 2 ml 0,9%ige sterile NaCl-Lösung gegeben und jeweils 100 µl der Lösung auf Agarplatten ausgespatelt und inkubiert.

In allen Gruppen erfolgte die Auszählung der Kolonien nach 24 Stunden Inkubationszeit.

3.7 Versuch 5: Kontamination mit E. faecalis / Überprüfung der Wirkung von PACT®-200

Ziel dieses Versuches war die Untersuchung der Langzeitwirkung des PACT®-Systems bei zusätzlicher Verwendung im Wurzelkanal im Vergleich zur alleinigen Spülung mit NaCl und NaOCl. Das Keimwachstum wurde am Tag 0, also dem Tag der Bestrahlung, am Tag 2 sowie am Tag 4 nach Bestrahlung überprüft und semiquantitativ ausgewertet.

Die E. faecalis-Lösung wurde auf eine optische Dichte von 0,2 bei 640 nm eingestellt, dies entspricht $2x10^8$ Bakterien/ml. Die entsprechend dem ersten Versuch vorbereiteten Zähne wurden mit 10 µl der Suspension beschickt, 5 Tage lang inkubiert und auf drei Gruppen verteilt. Anschließend wurden die Kanäle mit zwei unterschiedlichen Spülprotokollen behandelt (Tabelle 12).

	Spülprotokoll	**N**
Gruppe 1	Kontrollgruppe	5
Gruppe 2	Spülung mit 2,5 ml steriler 0,9%iger NaCl-Lösung und 1,5%iger NaOCl-Lösung	10
Gruppe 3	Spülung mit 2,5 ml steriler 0,9%iger NaCl- Lösung und 1,5%iger NaOCl-Lösung, Behandlung mit PACT®-System	10

Tabelle 12: Spülprotokoll Versuch 5

Nach Spülung und Behandlung der Zähne mit dem PACT®-System, d. h. Füllung der Testzähne bis zum Wurzelkanalrand mit PACT®-Fluid und Bestrahlung mit dem PACT®-200 Laser für 60 s, wurden je Zahn 10 µl Flüssigkeit abgesaugt und auf ein Feld einer Agarplatte gegeben. Auf jeder Agarplatte standen sechs Felder zur Verfügung. Anschließend wurden die Platten bei 37°C, CO_2-Atmosphäre und Wasserdampf für 24 Stunden in einem Brutschrank (Forma Scientific®) inkubiert. Die Platten wurden daraufhin auf Bakterienwachstum geprüft, wobei die Anzahl der Kolonien semiquantitativ erfasst wurde (Tabelle 13).

Kolonienanzahl	Code
0 Kolonien	0
1-10 Kolonien	1
11-50 Kolonien	2
51-100 Kolonien	3
101-500 Kolonien	4
> 500 Kolonien	5

Tabelle 13: Semiquantitative Auswertung des Bakterienwachstums

Nach der Probenentnahme (pro Zahn 10 µl Flüssigkeit) wurden am Tag 0 mit einer Pipette (Eppendorf AG, Hamburg) jeweils 10 µl BHI in die Wurzelkanäle eingebracht, und die Zähne wurden weitere zwei Tage wie bereits beschrieben inkubiert.

Am zweiten Tag wurden erneut je 10 µl einer sterilen BHI in die Wurzelkanäle pipettiert, durch zweimaliges Ansaugen und Abpipettieren durchmischt und wie oben beschrieben auf eine Agarplatte aufgetragen, um ein mögliches Keimwachstum zu untersuchen. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Proben auf bakterielles Wachstum hin kontrolliert und wie oben beschrieben semiquantitativ ausgewertet.

In die Wurzelkanäle wurden ein weiteres Mal 10 µl sterile BHI gegeben und die Zähne wurden für zwei weitere Tage im Brutschrank inkubiert. Am vierten Tag des

Versuchs wurden wie oben beschrieben Proben aus den Wurzelkanälen entnommen, inkubiert und semiquantitativ ausgewertet.

3.8 Versuch 6: Kontamination mit aerober Mischinfektion / Überprüfung der Wirkung von PACT®-200

Mit den abschließenden Versuchen 6 und 7 wurde das Vorgehen von Versuch 5 wieder aufgenommen, es wurden dabei jedoch andere Keimfloren zur Infektion der Wurzelkanäle verwendet. In Versuch 6 erfolgte die Inkubation mit der aeroben Mischflora. Die entsprechend dem ersten Versuch vorbereiteten Zahnwurzeln wurden fünf Tage lang mit der aeroben Mischkultur inkubiert und anschließend gemäß dem unten aufgeführten Spülprotokoll in der in Versuch 5 beschriebenen Weise behandelt, wobei die Wurzelkanäle jeweils mit 2,5 ml einer sterilen Spüllösung gespült wurden.

	Spülprotokoll	**N**
1. Gruppe	Kontrollgruppe	5
2. Gruppe	Spülung mit 2,5 ml steriler 0,9%iger NaCl- Lösung und 1,5%iger NaOCl-Lösung	10
3. Gruppe	Spülung mit 2,5 ml steriler 0,9%iger NaCl- Lösung und 1,5%iger NaOCl-Lösung, Behandlung mit PACT®-System	10

Tabelle 14: Spülprotokoll Versuch 6

Die Probenentnahme, das weitere Vorgehen mit weiterer Inkubation und Entnahme von Proben nach 2 und 4 Tagen, die Aufbereitung und Auswertung der genommenen Proben erfolgte ebenfalls entsprechend Versuch 5.

3.9 Versuch 7: Kontamination mit anaerober Mischinfektion / Überprüfung der Wirkung von PACT®-200

Im Gegensatz zu Versuch 6, in dem mit einer aeroben Mischkultur gearbeitet wurde, wurde hier eine anaerobe Mischflora verwendet. Die entsprechend dem ersten Versuch vorbereiteten Zahnwurzeln wurden wie in den vorhergehenden Versuchen in drei Gruppen eingeteilt und fünf Tage lang mit einer anaeroben Mischkultur in einer CO_2-Kammer (COY Laboratory Products INC., Michigan, USA) inkubiert und dann gemäß dem bekannten Spülprotokoll nach Tabelle 14 behandelt.

Die Aufbereitung der Proben erfolgte entsprechend Versuch 5. Für diesen Versuch wurden Schaedler-Agarplatten zur Kultivierung der anaeroben Mischkultur eingesetzt. Die Inkubation der Platten erfolgte ebenfalls in der CO_2-Kammer. Die Inkubation der Zahnwurzeln sowie die zeitliche Folge der Probenentnahmen erfolgten analog zu Versuch 5. Die Inkubationszeit der Agarplatten wurde auf 72 Stunden verlängert, da das Wachstum von Anaerobiern deutlich langsamer erfolgt als bei aeroben Keimen (FUCHS 2006). Die Auszählung der Kolonien erfolgte wie in den beiden vorherigen Versuchen semiquantitativ.

3.10 Auswertung und Statistik

Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Programmes SPSS 16.0. Für das Feststellen statistisch signifikanter Differenzen musste die Irrtumswahrscheinlichkeit p der statistischen Vergleiche einen α-Wert von jeweils 0,05 unterschreiten. Für multiples Testen wurde dieser Wert nach der Bonferroni-Methode adjustiert, um die Alphafehler-Kumulierung bei multiplen Paarvergleichen zu neutralisieren. Hierbei wird bei n paarweisen Vergleichen die statistische Signifikanzgrenze, die bei der Annahme der Nullhypothese zu unterschreiten ist, auf 1/n der Signifikanz gesetzt, die sich bei der Testung nur einer Hypothese ergeben würde.

Auswertung Versuche 1 – 3

Nach Erfassung und Berechnung der koloniebildenden Einheiten und Berechnung der Mittelwerte wurden diese statistisch nicht untersucht, da die Anzahl der Werte hierfür zu gering erschien. Geplant war hier eine Auswertung mittels ANOVA.

Auswertung Versuch 4

Nach 24-stündiger Inkubation der Proben auf Agarplatten wurden die koloniebildenden Einheiten ausgezählt, und es wurden unter Berücksichtigung der Verdünnung die absoluten Werte für die Anzahl der koloniebildenden Einheiten berechnet. Aus den zehn Einzelwerten je Gruppe wurde der Mittelwert berechnet. Die weitere statistische Auswertung der Daten mittels Kruskal-Wallis-Test sollte im Vergleich von mehreren Gruppen zeigen, ob zwischen den Keimzahlen der Gruppen signifikante Unterschiede bestehen. Die Mittelwerte der Untersuchungsgruppen sowie die Werte der Kontrollgruppe wurden anschließend paarweise mittels Mann-Whitney-Test mit den Werten der Gruppe B (Spülgruppe) verglichen. Anschließend wurden nacheinander auch die Ergebnisse von je zwei Untersuchungsgruppen gegenübergestellt und paarweise miteinander verglichen. Die Vergleiche waren Spülgruppe gegen Lasergruppe, Spülgruppe gegen Photosensitizergruppe und Spülgruppe gegen Laser/Photosensitizergruppe.

Auswertung Versuche 5 – 7

Die Erfassung der koloniebildenden Einheiten erfolgte entsprechend der oben abgebildeten Tabelle (Tabelle 13) bei diesen Versuchen semiquantitativ in 6 Kategorien. Die Bestimmungen erfolgten am Tag 0, Tag 2 und Tag 4 der Versuche. Mittels Varianzanalysen (ANOVA) sollte ursprünglich überprüft werden, ob signifikante Unterschiede zwischen allen Gruppen insgesamt vorlagen, und mittels Post-Hoc-Tests sollte dies für den Vergleich zwischen jeweils zwei Gruppen erfolgen. Da bereits am Tag 2 der Maximalwert von 500 KBE/ml erreicht wurde, konnte auf eine statistische Auswertung verzichtet werden.

4 Ergebnisse

4.1 Versuch 1: In-vitro Überprüfung der PACT®-200 Wirkung in einer E. faecalis-Suspension

Es konnte eine erhebliche Reduktion der Keimzahl festgestellt werden. So zeigten sich in der Kontrollgruppe 33850 KBE/ml, diese wurden in den Gruppen mit einer Kombination von Laser und Photosensitizer hochsignifikant reduziert (Tabellen 15 und 16, Abbildungen 5 – 8). Bereits eine Belichtungszeit von 30 s führte zu einer Keimzahlreduktion auf 650 KBE/ml, und bei einer Belichtungszeit von 60 s und 90 s wurden 100% der Bakterien eliminiert. Dies entspricht einer Verringerung von 98,08% und somit einer Reduktion der koloniebildenden Einheiten um 2 Logarithmus-Stufen. Auch der Photosensitizer allein führte zu einer Keimreduktion von 72,7% auf 9250 KBE/ml.

	Bakterienzahl
Kontrolle	33850
Sensitizer	9250
Laser 30 s	20100
Laser 60 s	25950
Laser 90 s	35750
Sensitizer + Laser 30 s	650
Sensitizer + Laser 60 s	0
Sensitizer + Laser 90 s	0

Tabelle 15: Bakterienzahl (KBE/ml) nach Behandlung

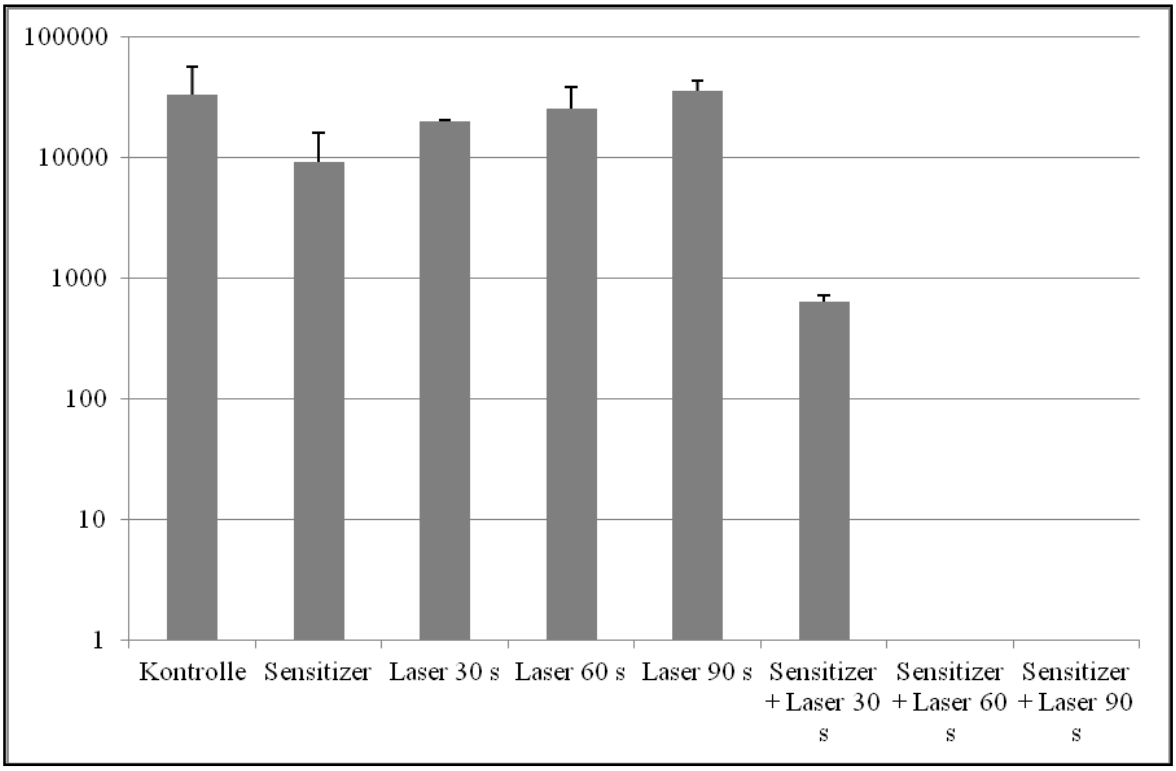

Abbildung 5: Bakterienanzahl (E. faecalis) nach Behandlung

	PACT®-200 Fluid ohne Aktivierung	Aktivierung 30 s	Aktivierung 60 s	Aktivierung 90 s
Keimreduktion [%]	72,7	98,08	100	100

Tabelle 16: Keimreduktion (%) durch Photosensitizer sowie Laser und Photosensitizer mit Belichtungszeiten von 30 s, 60 s und 90 s

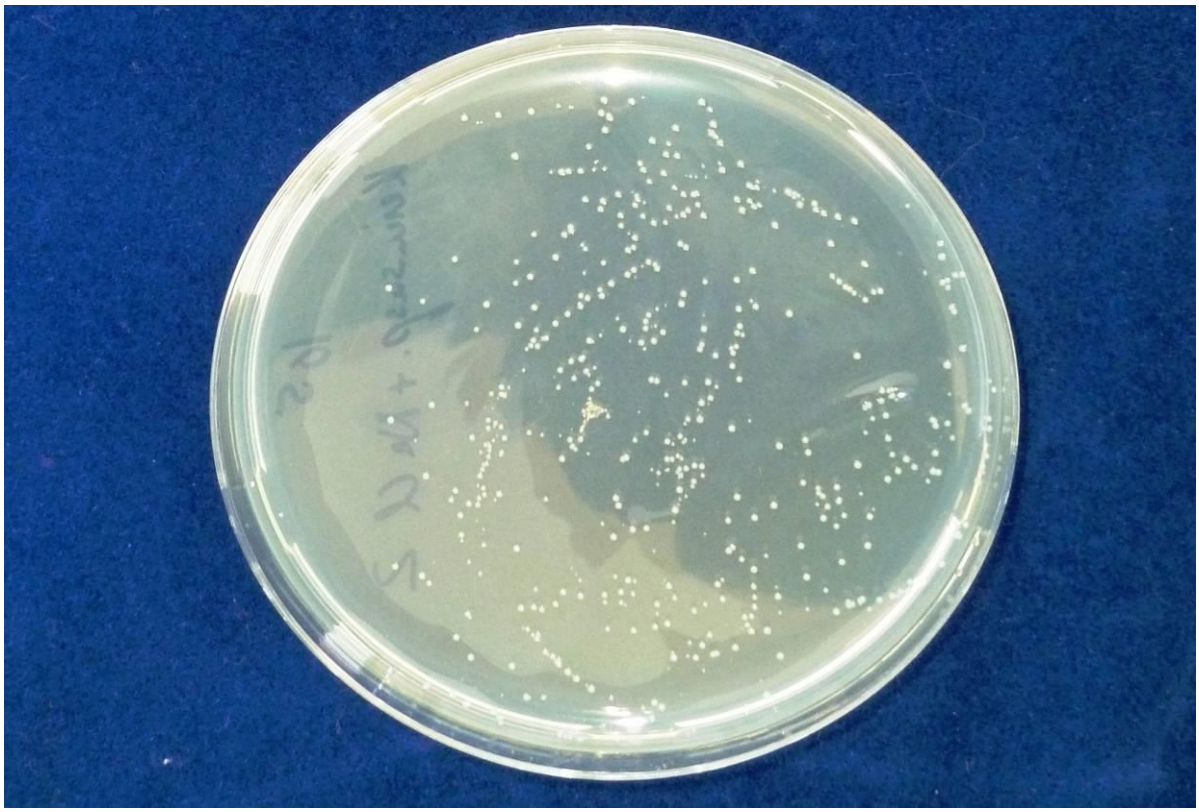

Abbildung 6: Besiedelung der Agarplatte [Kontrolle (NaCl ohne Laser)]

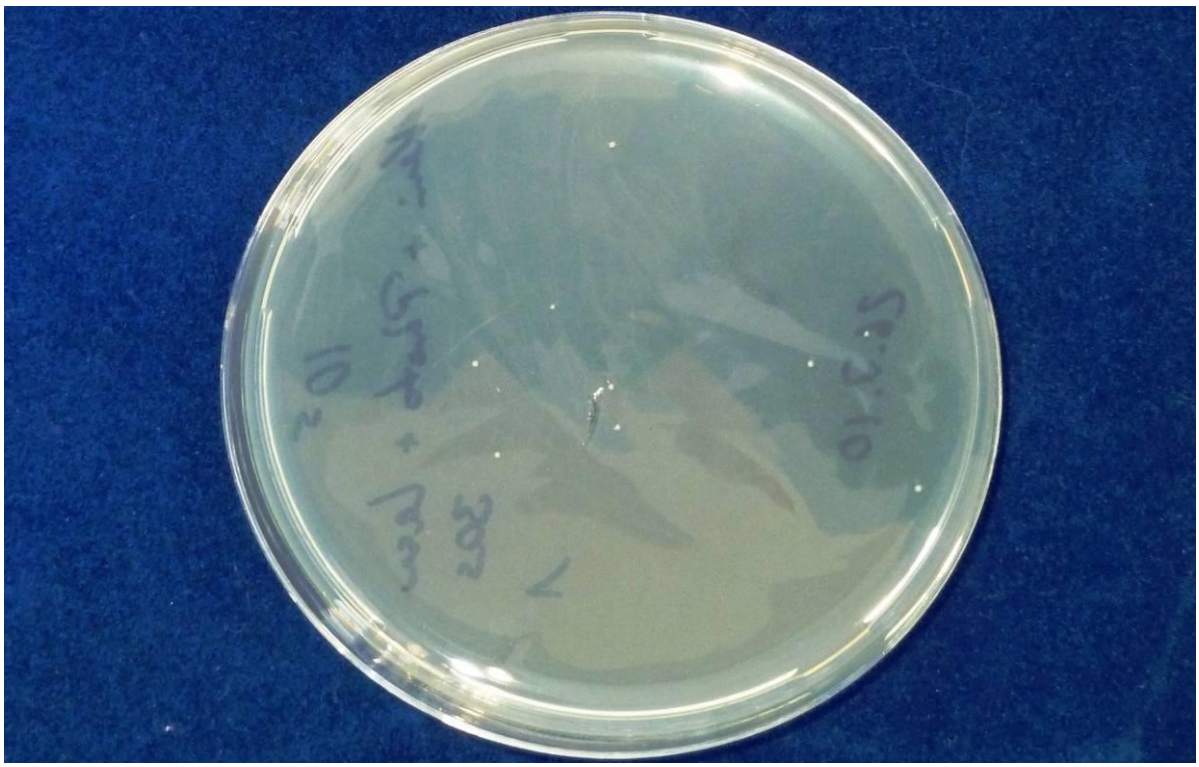

Abbildung 7: Besiedelung der Agarplatte mit E. faecalis [Keimlösung, PACT®-200 Fluid, Laserbestrahlung 30 Sekunden]

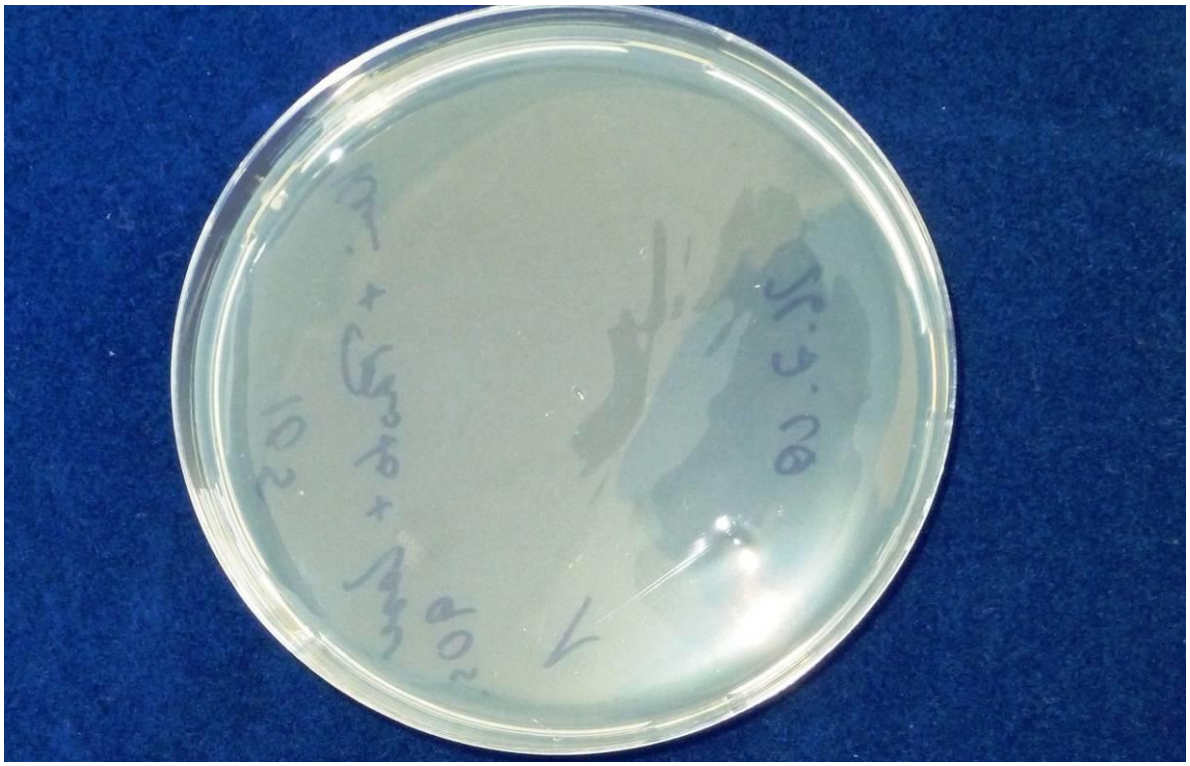

Abbildung 8: Besiedelung der Agarplatte mit E. faecalis [Keimlösung, PACT®-200 Fluid, Laserbestrahlung 90 Sekunden]

4.2 Versuch 2: In-vitro Überprüfung der PACT®-200 Wirkung auf E. faecalis in Anwesenheit von inaktivem Serum und physiologischer Kochsalzlösung

Es konnten nur die Ergebnisse der 10^5-Bakterien-Gruppe ausgewertet werden, da die Bakterienkonzentration in der 10^3-Gruppe nicht zu ermitteln war. In der Gruppe ohne Serum zeigte sich eine in Abhängigkeit zur Belichtungszeit gesteigerte Eliminierungsrate. Nach 30 s wurden 94,1% der Bakterien abgetötet, nach 60 s 98,5% und nach 90 s 99,9% (Tabellen 17 und 18, Abbildungen 9 – 13).

In der Gruppe mit Serum wurden bereits nach 30 s 100% aller sich in Lösung befindender Bakterien eliminiert, es konnten keine lebenden Bakterien nachgewiesen werden. Die mittlere Keimzahl in der Kontrollgruppe ohne Serum betrug 2.238.000 Keime, in der Kontrollgruppe mit Serum 4.108.000 Keime.

Keimzahl	30 s	60 s	90 s
ohne Serum	131.250	33.500	1.000
mit Serum	0	0	0

Tabelle 17: Keimzahl (E. faecalis) ohne und mit Serum im Wurzelkanal

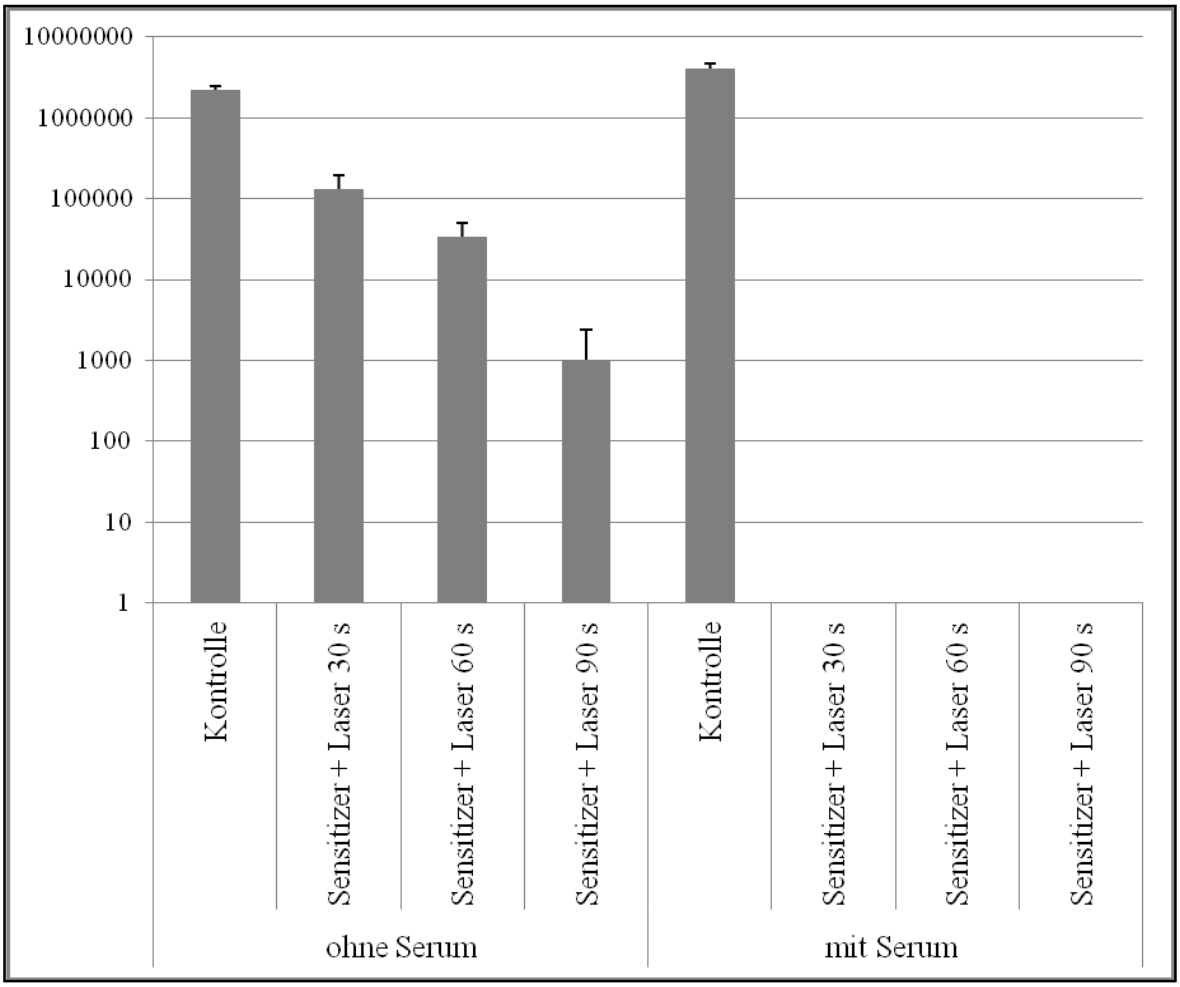

Abbildung 9: Bakterienanzahl (E. faecalis) nach PACT®-Behandlung mit und ohne Serum im Wurzelkanal

Keimreduktion	30 s	60 s	90 s
ohne Serum	94,1 %	98,5 %	99,9 %
mit Serum	100 %	100 %	100 %

Tabelle 18: Keimreduktion (E. faecalis) ohne und mit Serum

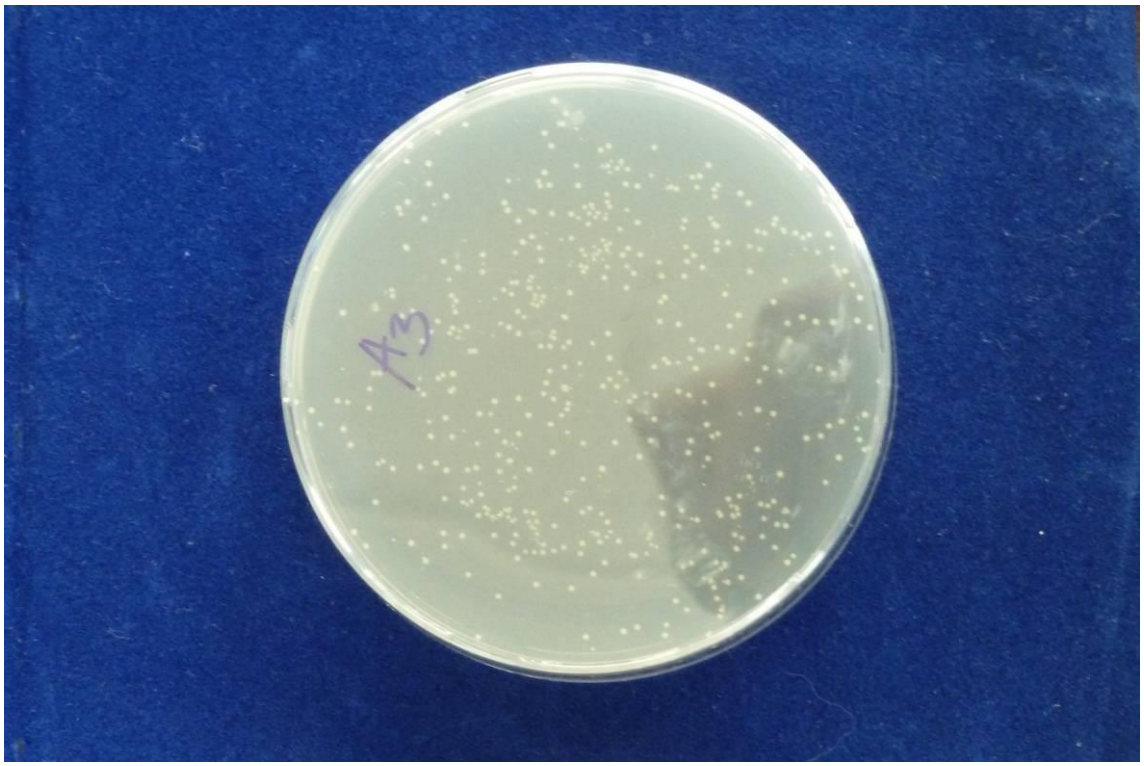

Abbildung 10: Besiedelung der Agarplatte A3 (Kontrolle) mit E. faecalis

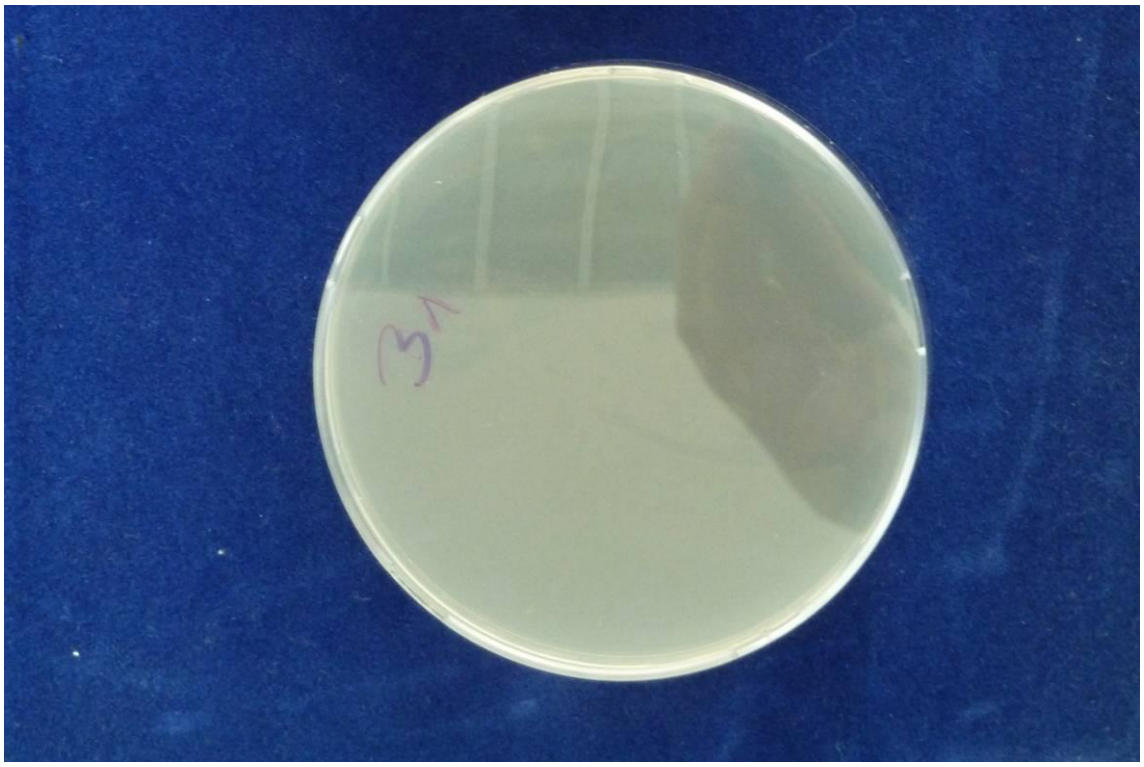

Abbildung 11: Keine Besiedelung der Agarplatte B1 (Serumgruppe, Bakterien, Photosensitizer, Laserbestrahlung 30 s) mit E. faecalis nachweisbar

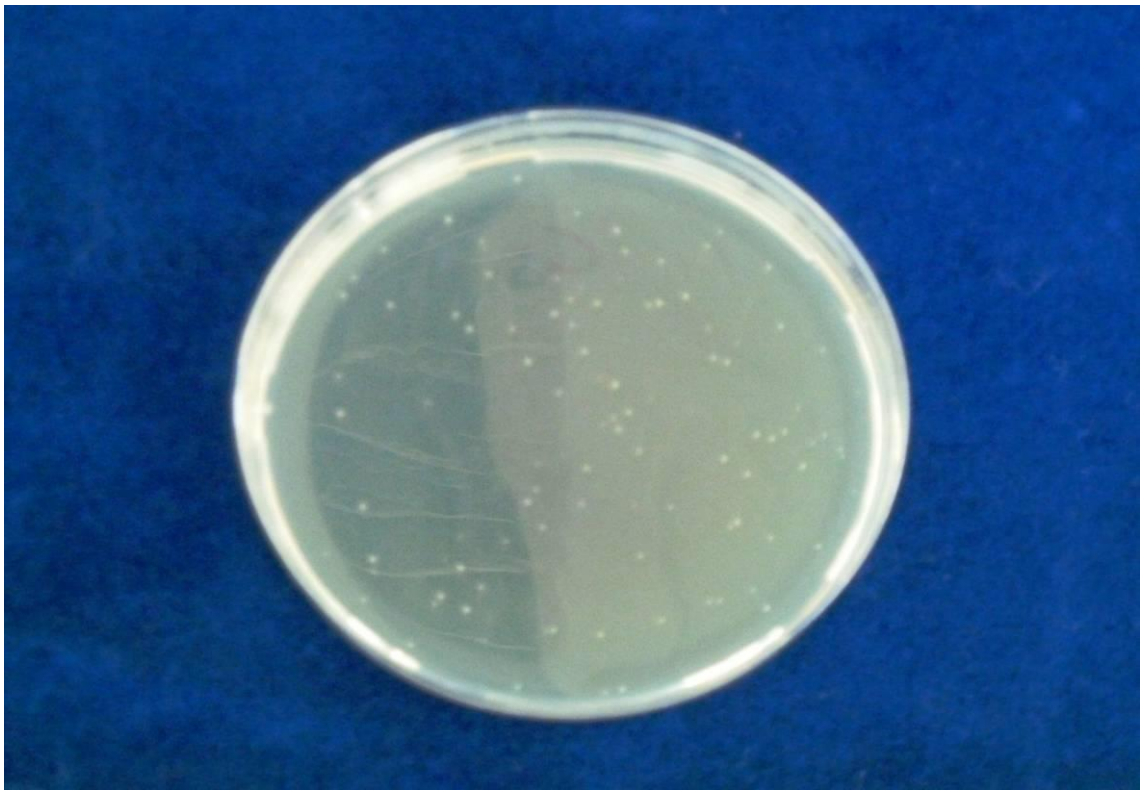

Abbildung 12: Besiedelung der Agarplatte C3 (NaCl-Gruppe, Bakterien, Photosensitizer, Laserbestrahlung 60 s) mit E. faecalis

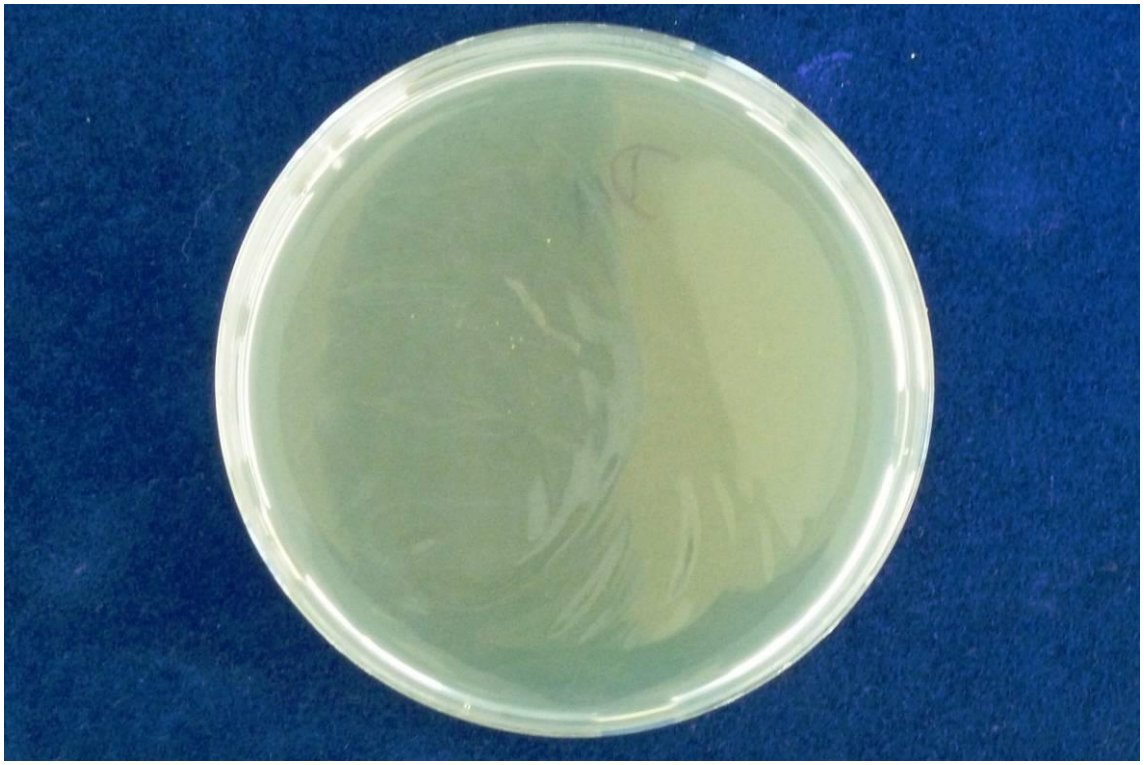

Abbildung 13: Besiedelung der Agarplatte D4 (NaCl-Gruppe, Photosensitizer, Laserbestrahlung 90s) mit E. faecalis

4.3 Versuch 3: In-vitro Überprüfung der PACT®-200 Wirkung auf E. faecalis in Anwesenheit von inaktiviertem humanem Serumalbumin

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob inaktiviertes humanes Serumalbumin in unterschiedlichen Konzentrationen (25 mg/ml und 50 mg/ml) einen Einfluss auf die Eliminationsrate des PACT®-200 Systems haben kann. Es zeigte sich in der Gruppe ohne inaktiviertes HSA, wie bereits in Versuch 3, eine von der Bestrahlungsdauer abhängige Bakterienelimination. Mit 25 mg/ml HSA und 50 mg/ml HSA zeigte sich nach 30 s die höchste Bakterienelimination (> 99,9%), die mit verlängerter Bestrahlungsdauer abnahm. So wurden in der 25 mg/ml Gruppe nach 60 s 99,4% eliminiert und nach 90 s nur noch 99,13%. In der 50 mg/ml Gruppe wurden nach 60 s immer noch 99,98% abgetötet, nach 90 s reduzierte sich die Eliminationsrate auf 99,2%. Bei einer Bestrahlungsdauer von 90 s zeigte sich die Anwendung des PACT®-200 Systems ohne Anwesenheit von humanem Serumalbumin als minimal effektiver. (Tabellen 19 und 20, Abbildungen 14 – 19).

Die mittlere Keimzahl in der Kontrollgruppe betrug mit 25 mg/ml HSA 26.988.000 Keime, bei 50 mg/ml HSA 31.882.000 Keime.

Keimzahl	30 s	60 s	90 s
Ohne HSA	2.581.500	389.000	219.000
mit 25 mg/ml HSA	1.250	145.500	232.750
Mit 50 mg/ml HSA	12.750	35.250	253.000

Tabelle 19: Keimzahl (E. faecalis) nach PACT®-Behandlung im Wurzelkanal ohne HSA, mit 25 mg/ml HSA und 50 mg/ml HSA

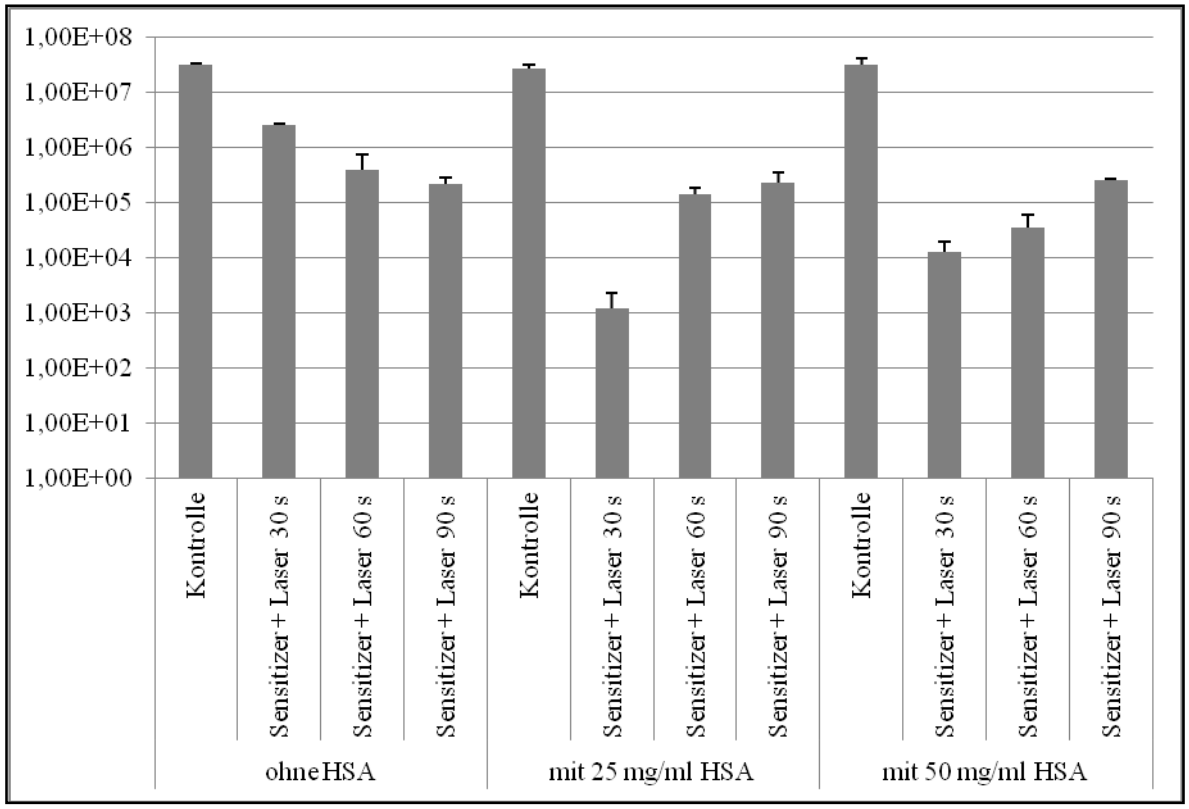

Abbildung 14: Bakterienanzahl (E. faecalis) nach PACT®-Behandlung ohne HSA, mit 25 mg/ml HSA und 50 mg/ml HSA

Keimreduktion	30 s	60 s	90 s
Ohne HSA	92 %	98,8 %	99,32 %
mit 25 mg/ml HSA	> 99,9 %	99,4 %	99,13 %
Mit 50 mg/ml HSA	> 99,9 %	99,98 %	99,2 %

Tabelle 20: Keimreduktion (E. faecalis) nach PACT®-Behandlung ohne HSA, mit 25 mg/ml HSA und 50 mg/ml HSA

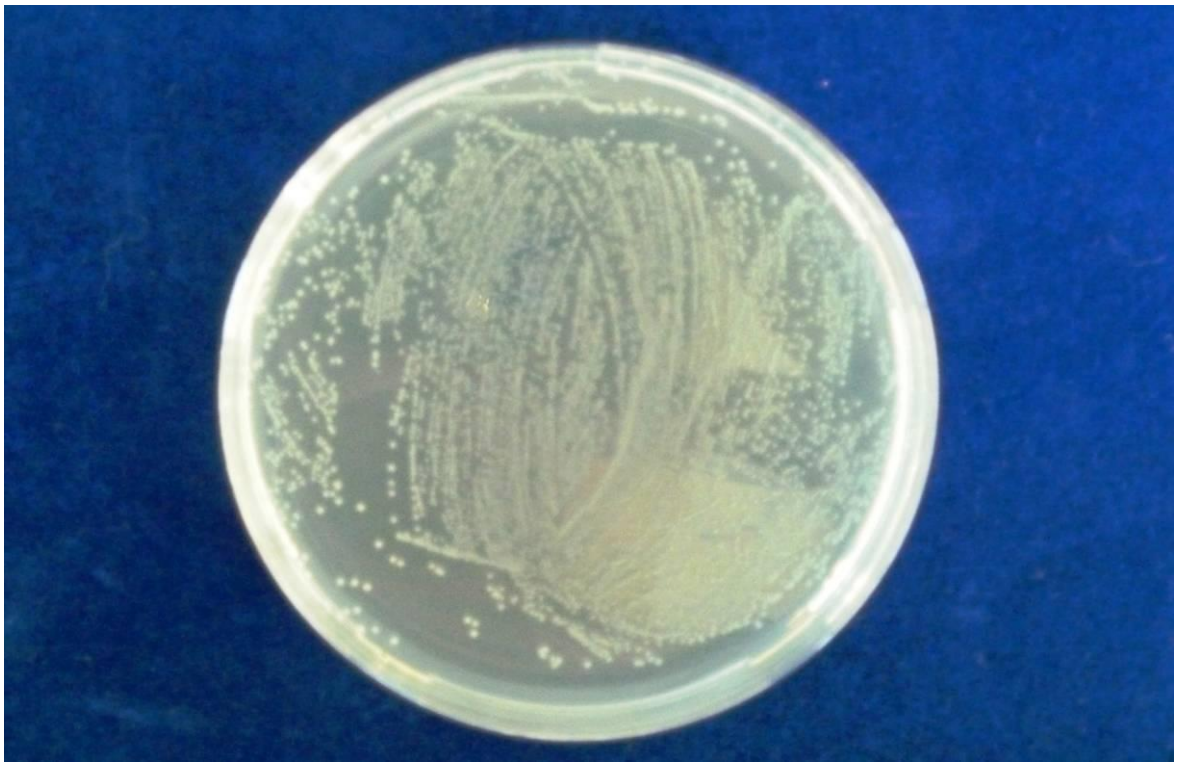

Abbildung 15: Besiedelung der Agarplatte 1A mit E. faecalis, Kontrollgruppe ohne HSA

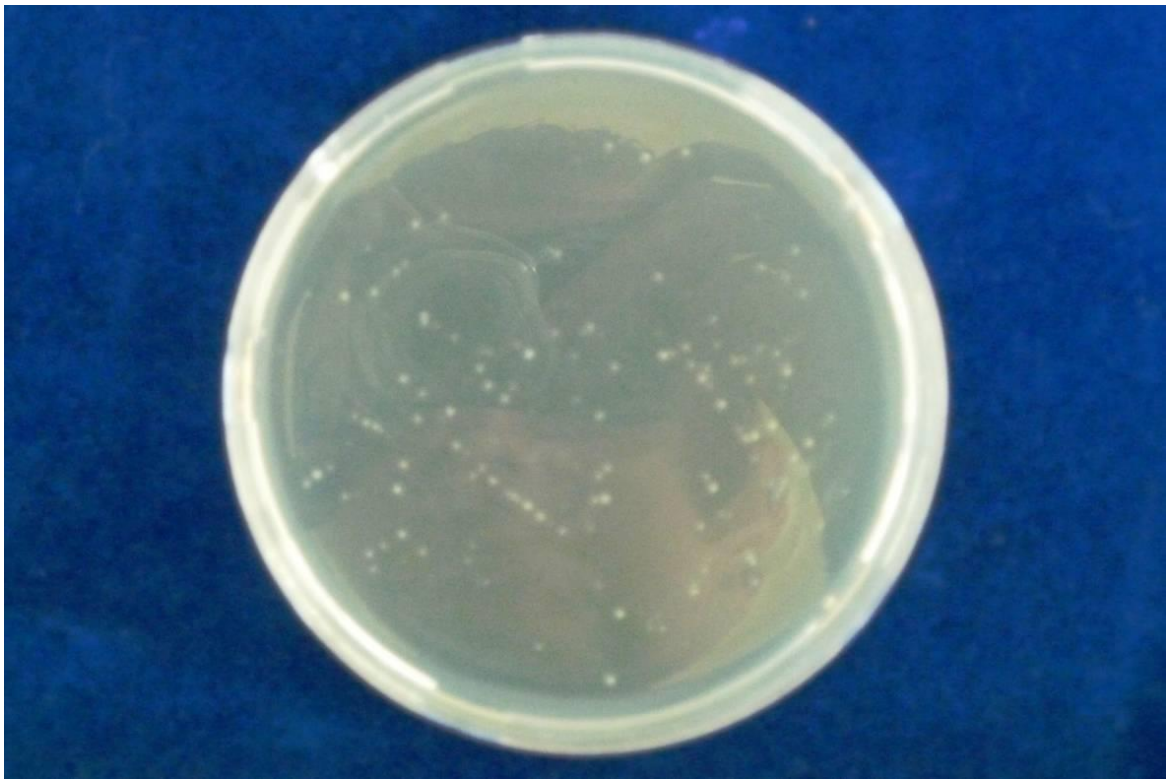

Abbildung 16: Besiedelung der Agarplatte 9A mit E. faecalis, 25 mg/ml HSA, Photosensitizer, 60 Sekunden Laserbestrahlung

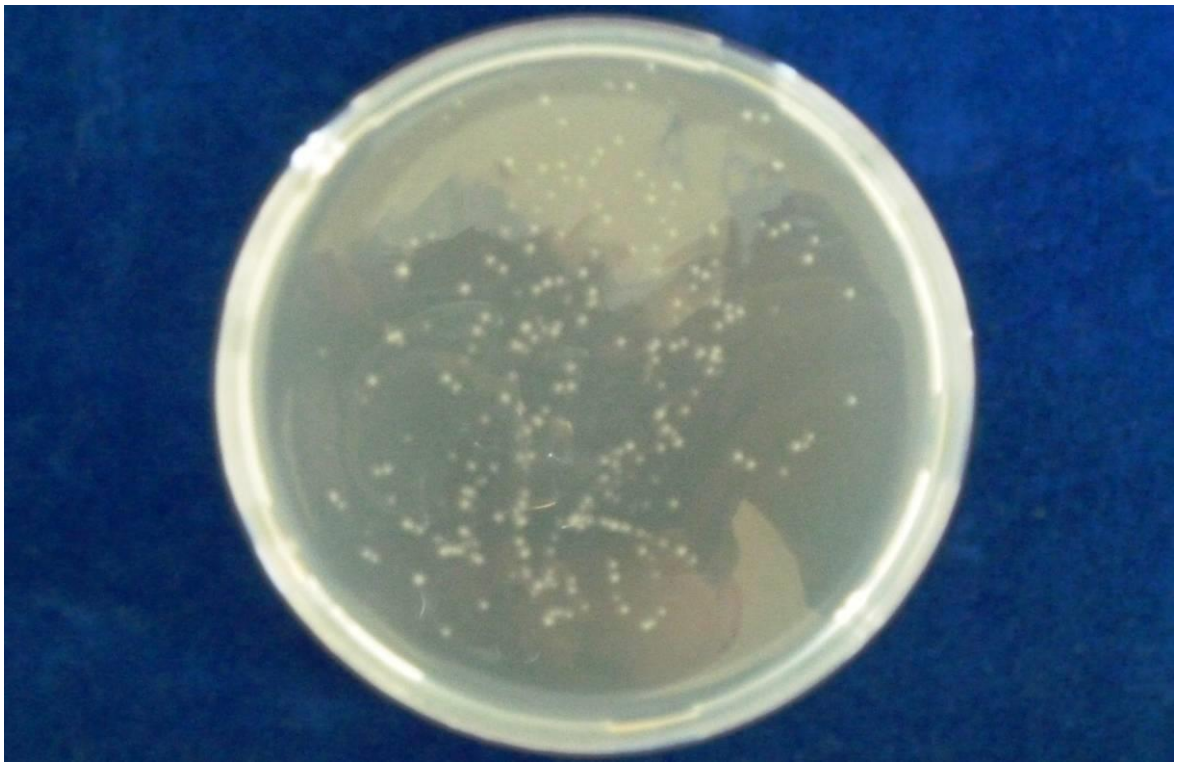

Abbildung 17: Besiedelung der Agarplatte 8A mit E. faecalis, 50 mg/ml HSA, Photosensitizer, 60 Sekunden Laserbestrahlung

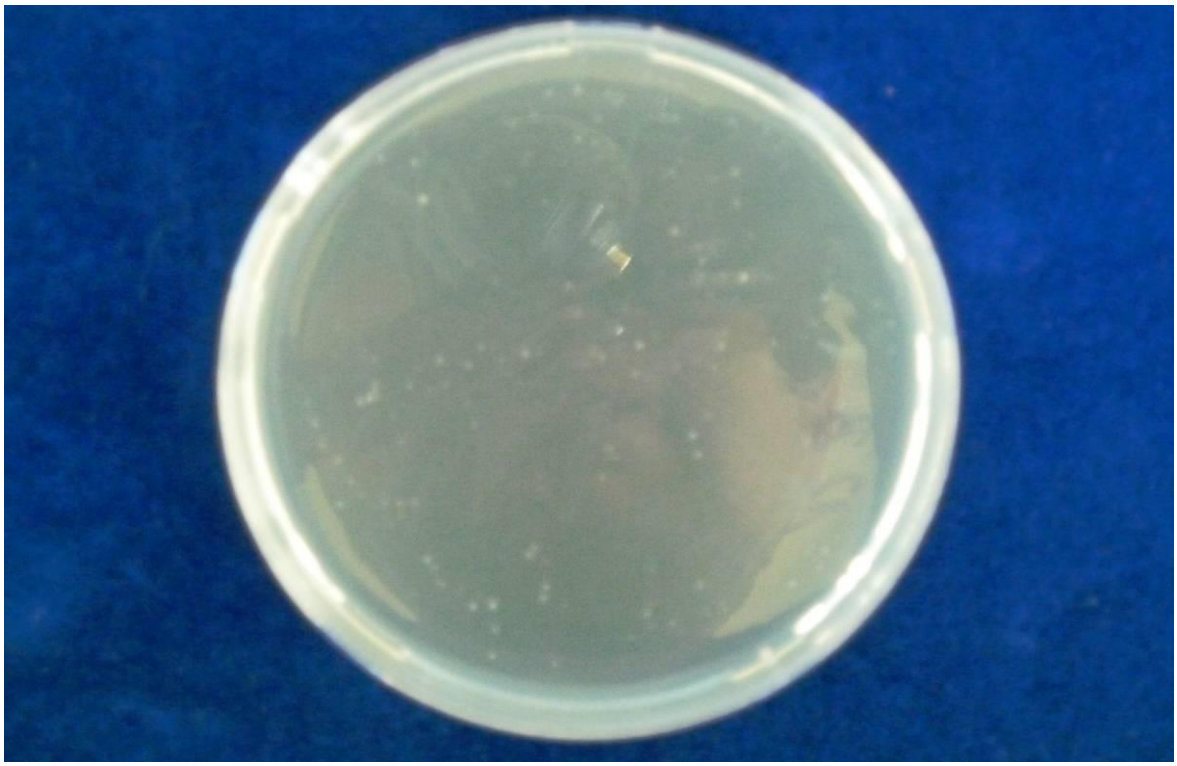

Abbildung 18: Besiedelung der Agarplatte 12 B mit E. faecalis, 25 mg/ml HSA, Photosensitizer, 90 Sekunden Laserbestrahlung

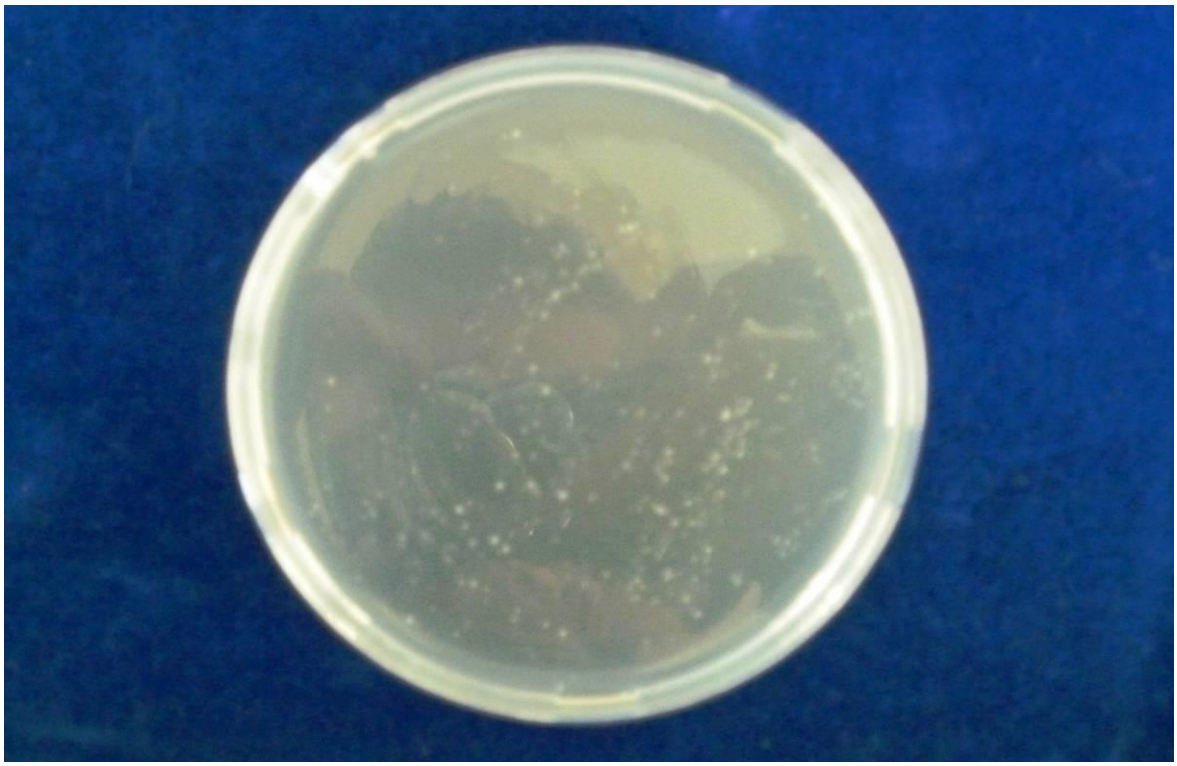

Abbildung 19: Besiedelung der Agarplatte 11A mit E. faecalis 50 mg/ml HSA, Photosensitizer, 90 Sekunden Laserbestrahlung

4.4 Versuch 4: Kontamination der Zähne mit E. faecalis / Beurteilung von PACT® im Vergleich zur Spülung mit NaCl (0,9%)

In diesem Versuch sollte die Wirkung des PACT®-200 Systems und seiner einzelnen Bestandteile, nach Spülung mit 5 ml steriler 0,9%iger NaCl-Lösung, im Vergleich zur Wurzelkanalspülung mit 5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung allein untersucht werden. Hierfür wurden PACT®-200 Diodenlaser ohne Fluid, das PACT®-200 Fluid ohne Laser, eine Kombination aus Laser und Fluid und eine manuelle Spülung mit steriler 0,9%iger NaCl-Lösung verwendet. Die Keimbesiedelungen der Kanäle vor sowie nach den Behandlungen wurden mit dem Wert der manuellen Spülung verglichen. Da jeder Kanal vor der Behandlung mit NaCl gespült wurde, musste die Keimzahl in jedem Fall unter der der Kontrolle liegen. Alle Methoden, bis auf den Laser allein, zeigten eine Reduktion der Keimbelastung (Tabelle 21 und Abbildung 20). Auch das PACT®-200 Fluid zeigte einen geringen antibakteriellen Effekt im

Vergleich zur Spülung mit NaCl allein. Die mittlere Keimzahl der Kontrollgruppe war mit 1.598.150 KBE/ml mehr als 10-mal höher als in den Versuchsgruppen.

	Kontrolle	Spülung	Laser	Photo-sensitizer	Laser + Photosens.
Mittelwert	1.598.150	125.809	95.235	38.093	36.826
Standard-abweichung	1.054.219	129.567	120.678	24.385	41.903
Median	1377000	84750	55310	39495	17415

Tabelle 21 Koloniebildende Einheiten im Wurzelkanal (KBE/ml) nach Behandlung gemäß Protokoll Versuch 4 (Mittelwert, Standardabweichung, Median)

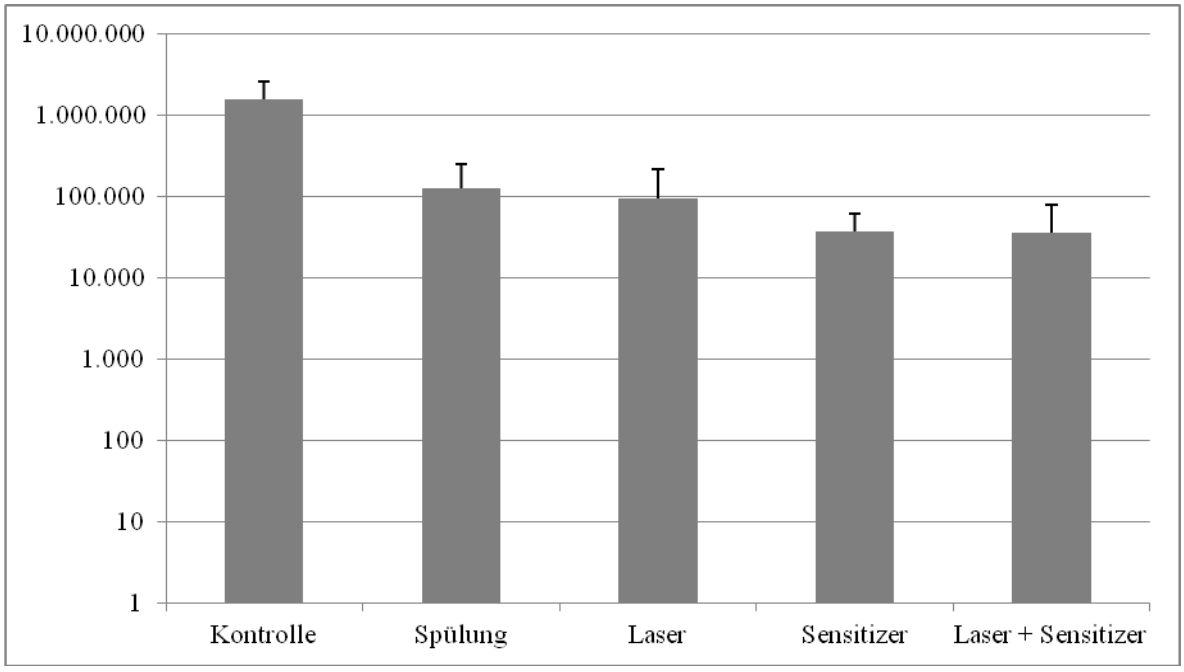

Abbildung 20: Bakterien im Wurzelkanal nach Spülung mit NaCl allein, Laser-Bestrahlung, Photosensitizer-Zugabe und Laserbestrahlung in Anwesenheit von Photosensitizer nach Infektion mit E. faecalis

Die statistische Auswertung der Daten mittels Kruskal-Wallis-Test zeigte, dass zwischen den Keimzahlen der Gruppen hochsignifikante Unterschiede bestehen (p

< 0,001). Da die zu untersuchende Fragestellung lautete, ob das PACT®-System eine bessere Keimreduktion als eine Spülung erreichen könnte, wurden die einzelnen Gruppen mittels Mann-Whitney-Test überprüft. Dabei zeigten sich zwischen der Kontrollgruppe und der Spülgruppe (Reduktion um 1,14 ± 0,23 log ^{10} KBE; p=0,001) sowie der Spülgruppe und der Laser/Photosensitizergruppe (Reduktion 0,72 ± 0,23 log ^{10} KBE; p=0,033) signifikante Unterschiede. Auch der Photosensitizer allein scheint schon eine Wirkung zu haben, wenn auch nicht signifikant im Vergleich zur Spülgruppe. Auch die Lasergruppe zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Spülgruppe (Tabelle 22).

	Spülgruppe -Kontrolle	**Spülgruppe – Laser**	**Spülgruppe – Photosensitizer**	**Spülgruppe – Laser und Photosensitizer**
p-Wert	0,001	0,910	0,082	0,033

Tabelle 22: p-Werte bei den paarweisen Vergleichen der Mittelwerte der KBE/ml (Mann-Whitney-Test)

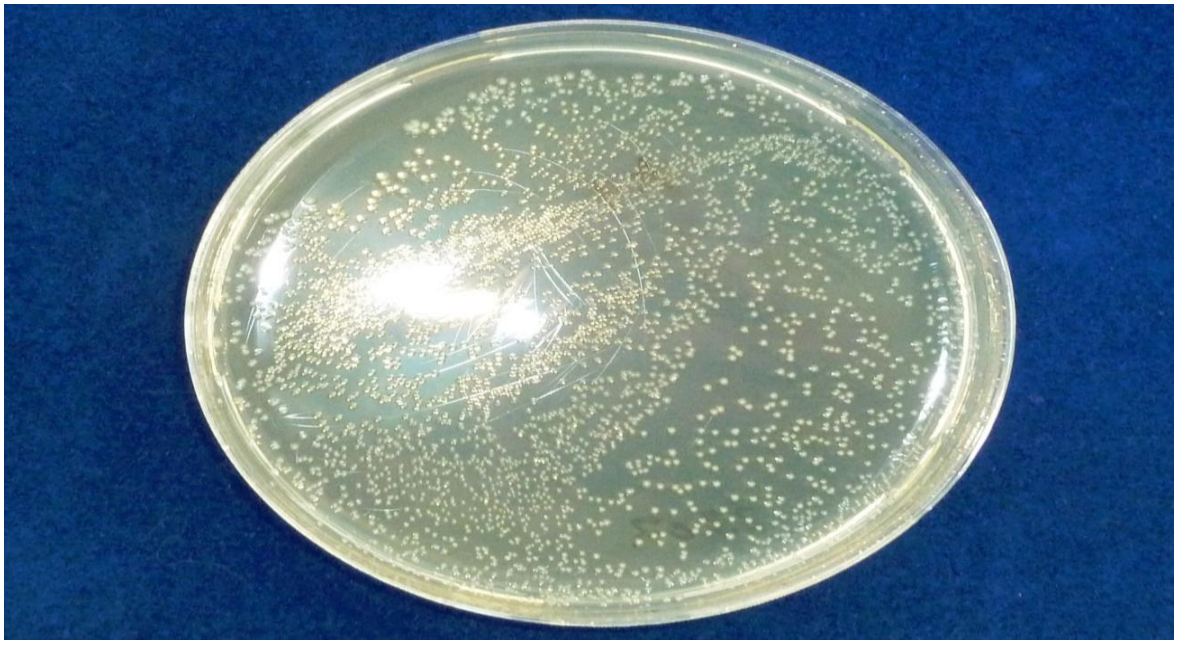

Abbildung 21: Besiedelung der Agarplatte mit E. faecalis (Kontrollgruppe)

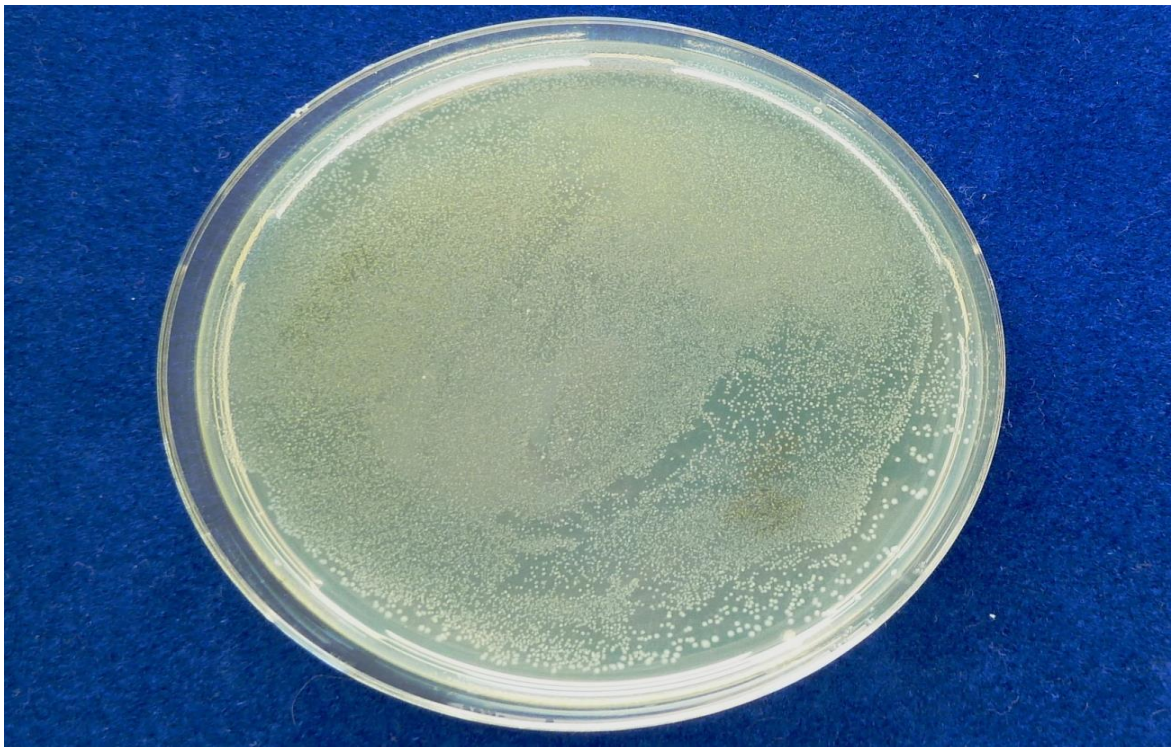

Abbildung 22: Besiedelung der Agarplatte mit E. faecalis nach manueller Wurzelkanalspülung mit NaCl

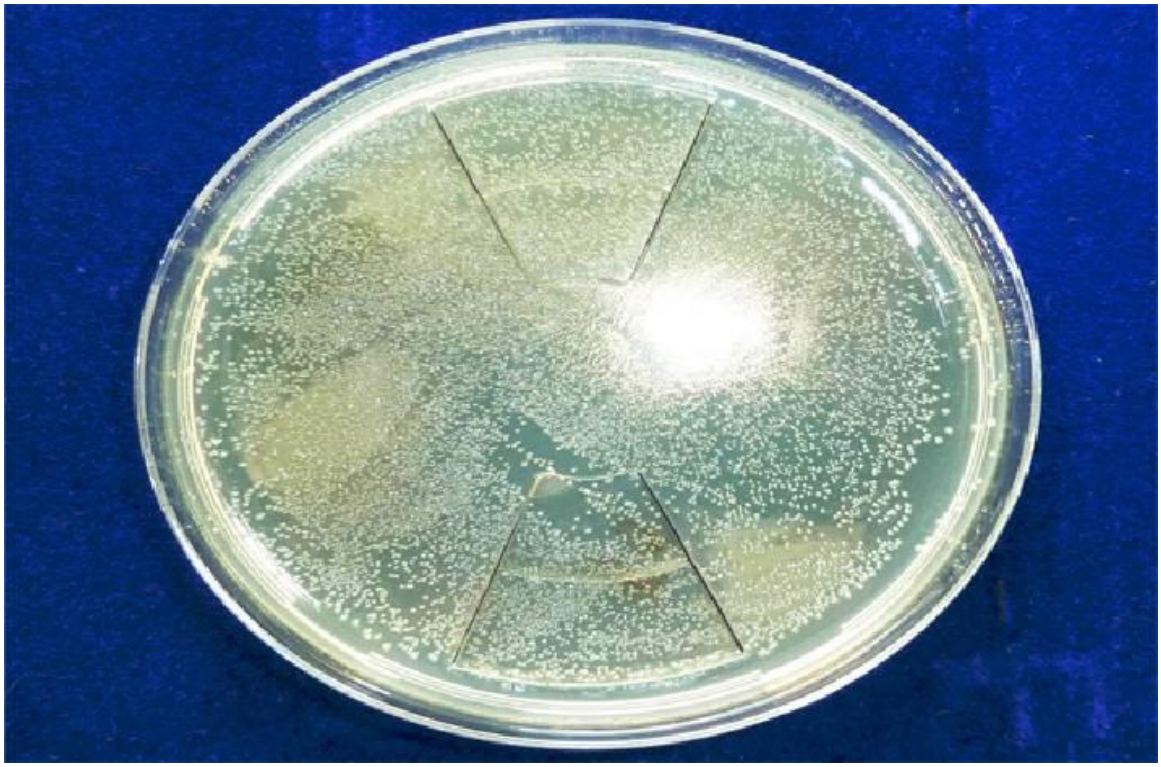

Abbildung 23: Besiedelung der Agarplatte mit E. faecalis nach Spülung mit NaCl und Anwendung von PACT®-200 Photosensitizer

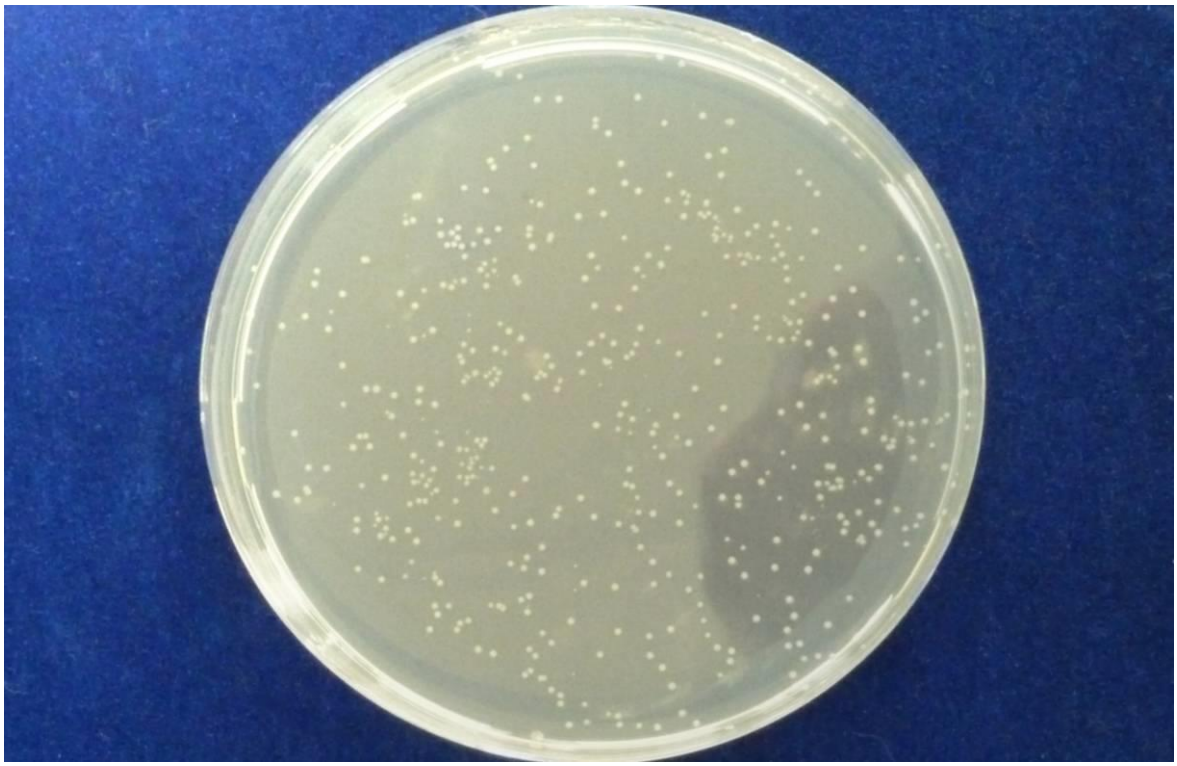

Abbildung 24: Besiedelung der Agarplatte mit E. faecalis nach Anwendung von PACT®-200 Photosensitizer und Laser

4.5 Versuch 5-7: Kontamination mit unterschiedlichen Keimfloren / Überprüfung der chemischen Wirkung von NaOCl-Spülung und PACT®-200 gegen NaCl- und NaOCl-Spülung

Die Abbildungen 25 bis 27 fassen die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung bezüglich der Elimination unterschiedlicher Keime bzw. Keimspektren im Zeitverlauf zusammen. Die Einzelwerte sind im Anhang unter Tabelle 28 - 30 aufgeführt. Es erfolgte keine statistische Auswertung, da die Keimbesiedelung bereits am zweiten Tag durchweg den Maximalwert von mehr als 500 KBE/ml betrug.

In den Abbildungen ist für jeden der 10 Wurzelkanäle für jeden Untersuchungstag die Keimbesiedelungs-Kategorie in Abhängigkeit von der antimikrobiellen Behandlung (Kontrolle, Spüllösung oder PACT®-200 System) farbig dargestellt. In allen Wurzelkanälen der Kontrollgruppe zeigte sich durchgehend ein Bakterienwachstum von mehr als 500 KBE/ml.

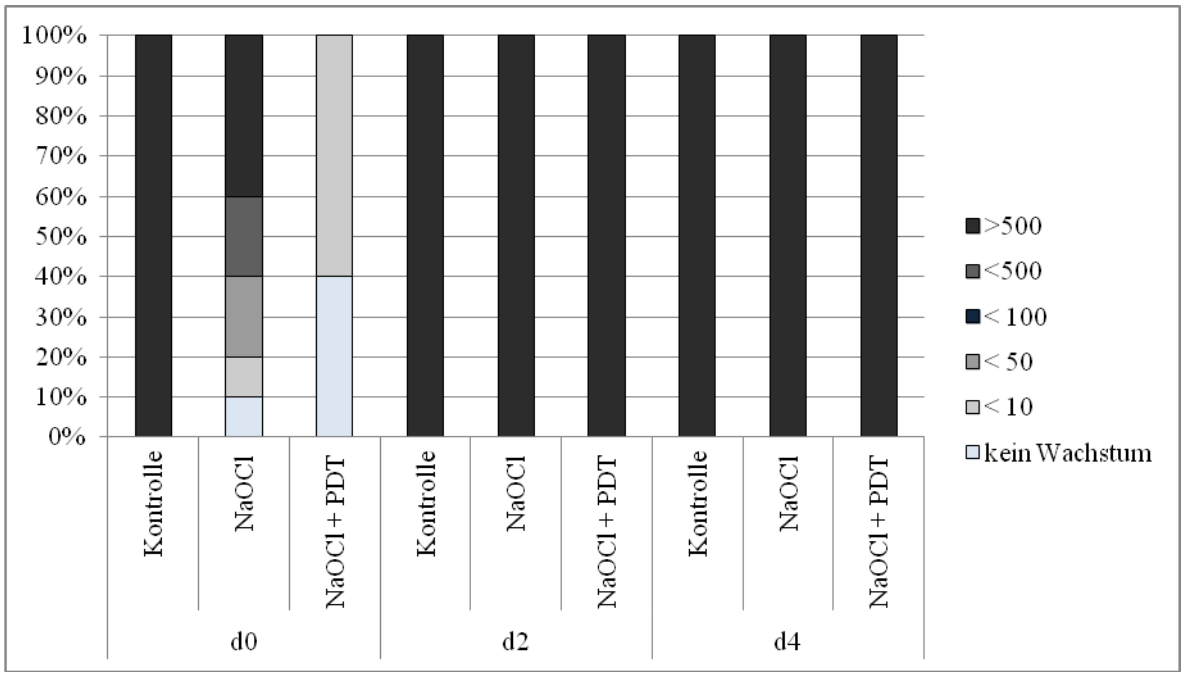

Abbildung 25: Verteilung der Keimanzahl-Kategorien in zuvor mit E. faecalis infizierten Wurzelkanälen nach Behandlung mit unterschiedlichen Spüllösungen und Photoaktivierter Chemotherapie

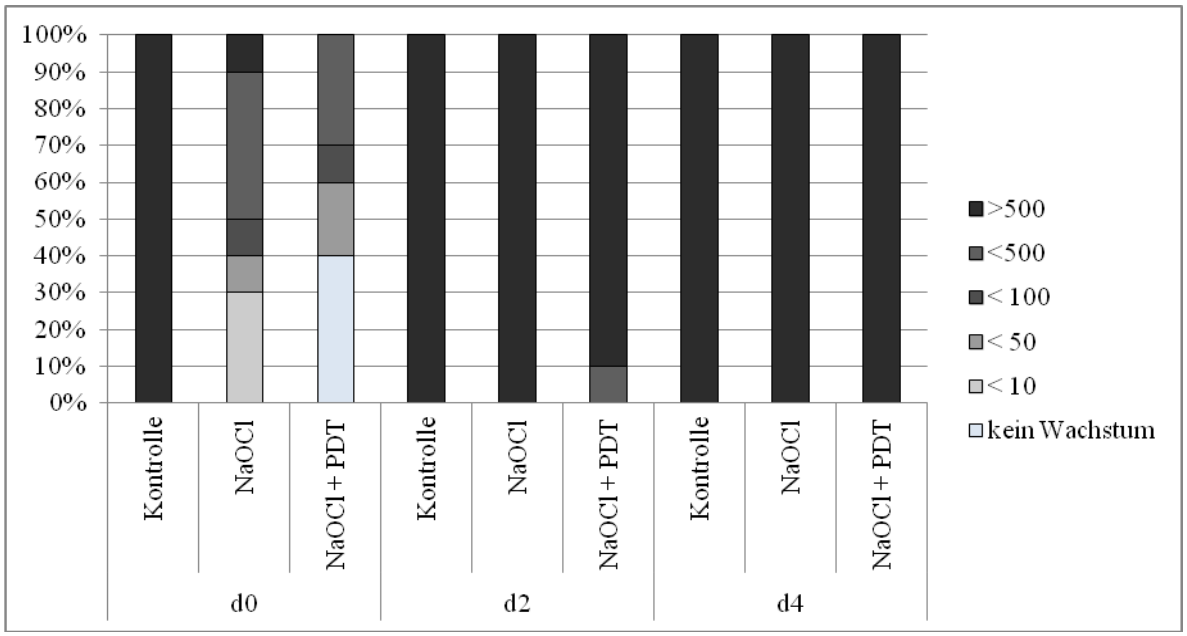

Abbildung 26: Verteilung der Keimanzahl-Kategorien in zuvor mit aerober Mischinfektion infizierten Wurzelkanälen nach Behandlung mit unterschiedlichen Spüllösungen und Photoaktivierter Chemotherapie

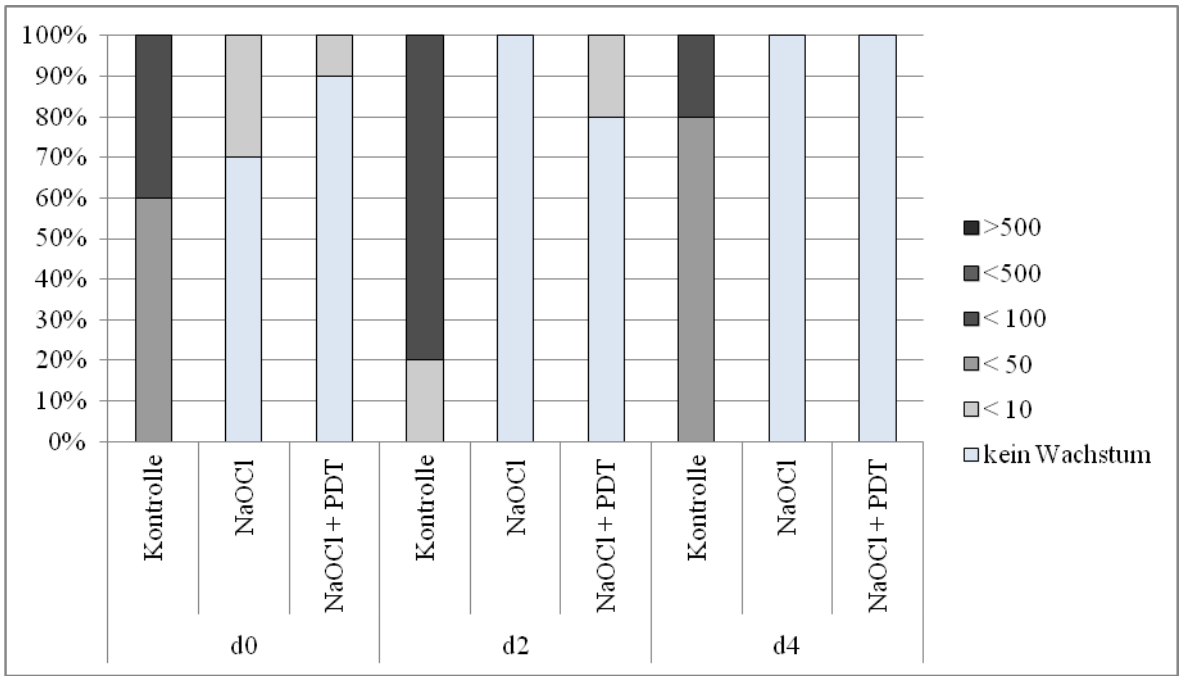

Abbildung 27: Verteilung der Keimanzahl-Kategorien in zuvor mit anaerober Mischinfektion infizierten Wurzelkanälen nach Behandlung mit unterschiedlichen Spüllösungen und Photoaktivierter Chemotherapie

Die Grafiken zeigen, dass die NaOCl-Spülung und das PACT®-200 System direkt nach der Anwendung zu einer deutlichen Keimklassen-Reduktion führen, wobei das PACT®-System nach NaOCl-Spülung zu einer noch stärkeren Reduktion führt. Eine längere Wirkung beider Verfahren auf die Keimreduktion ist jedoch nur bei der anaeroben Mischkultur ersichtlich.

Die Abbildungen 28 und 29 zeigen beispielhaft Agarplatten des fünften Versuchs mit bakteriellen E. faecalis-Kolonien, die Abbildungen 30 und 31 die des sechsten Versuchs (aerobe Mischkultur) sowie die Abbildungen 32 und 33 die des siebten Versuchs (anaerobe Mischkultur).

Abbildung 28: Mit E. faecalis besiedelte Agarplatte: Kontrollgruppe, Tag 0 (Versuch 5)

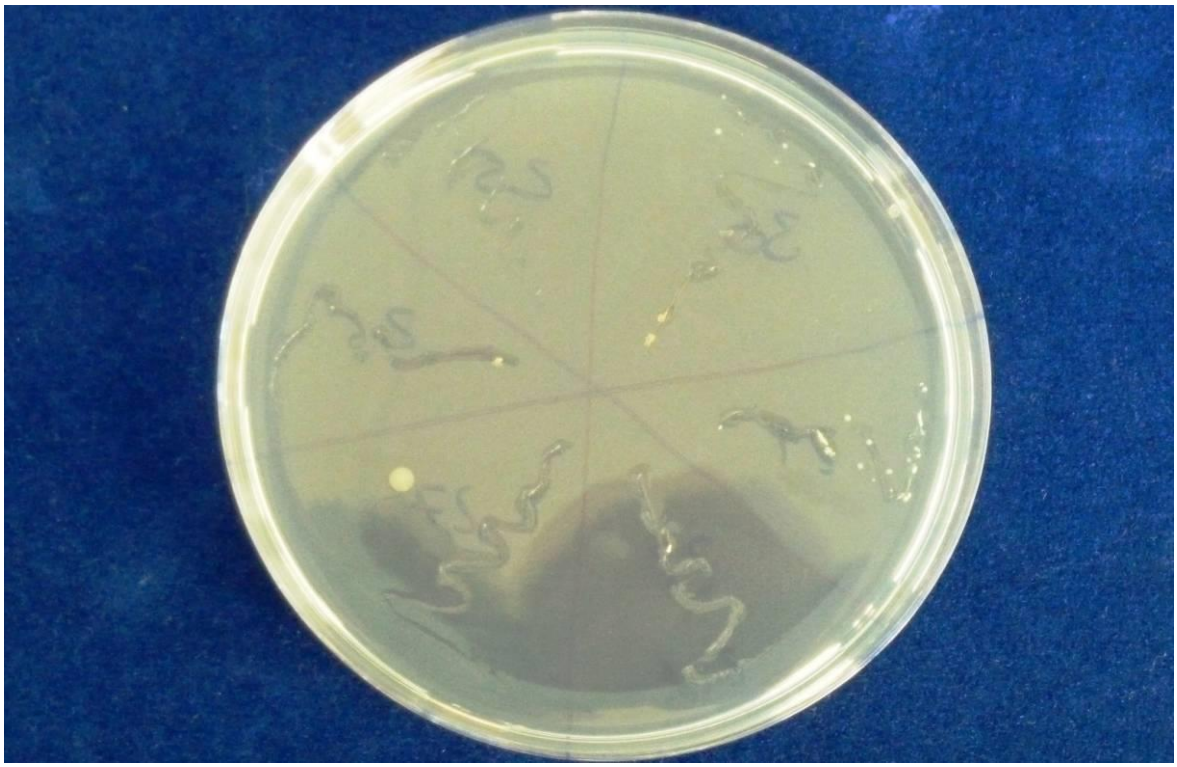

Abbildung 29: Mit E. faecalis besiedelte Agarplatte, 3. Gruppe: Spülung mit 2,5 ml steriler 0,9%iger NaCl- Lösung und 1,5%iger NaOCl-Lösung, Behandlung mit PACT®-System, Tag 0 (Versuch 5)

Abbildung 30: Mit aerober Mischkultur besiedelte Agarplatte, 3. Gruppe, Tag 0 (Versuch 6)

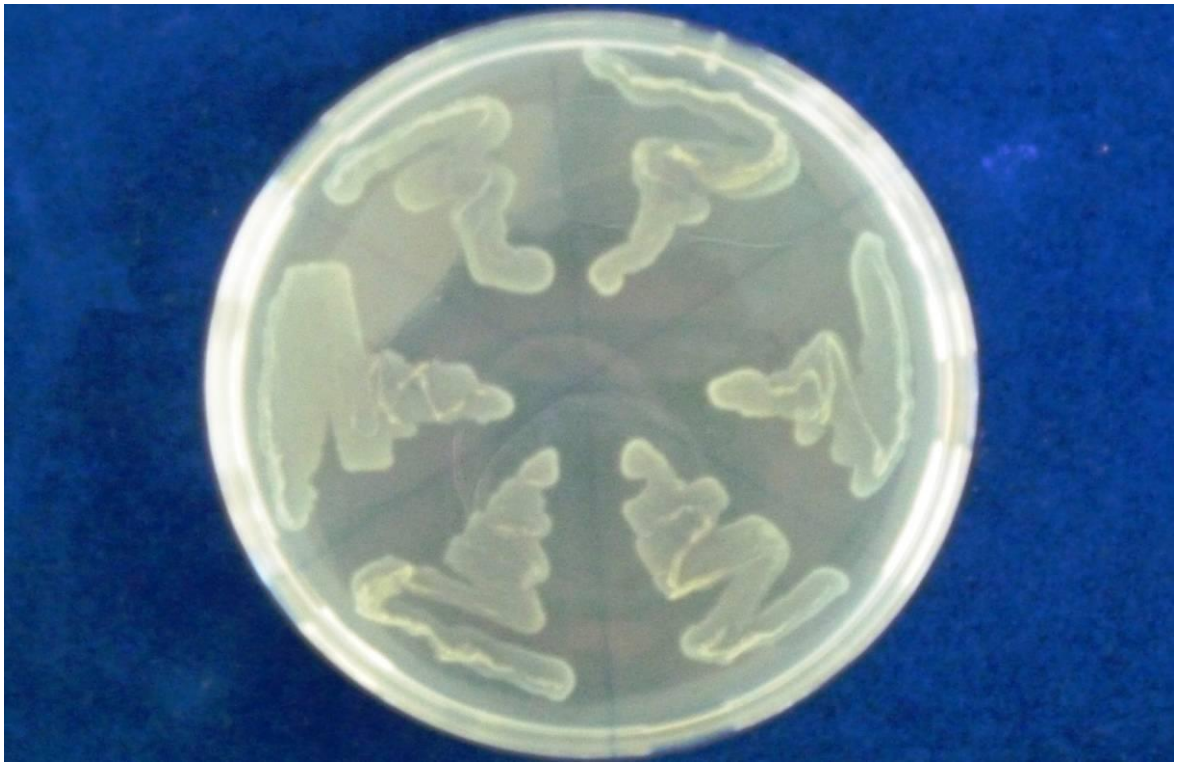

Abbildung 31: Mit aerober Mischkultur besiedelte Agarplatte 3. Gruppe, Tag 2 (Versuch 6)

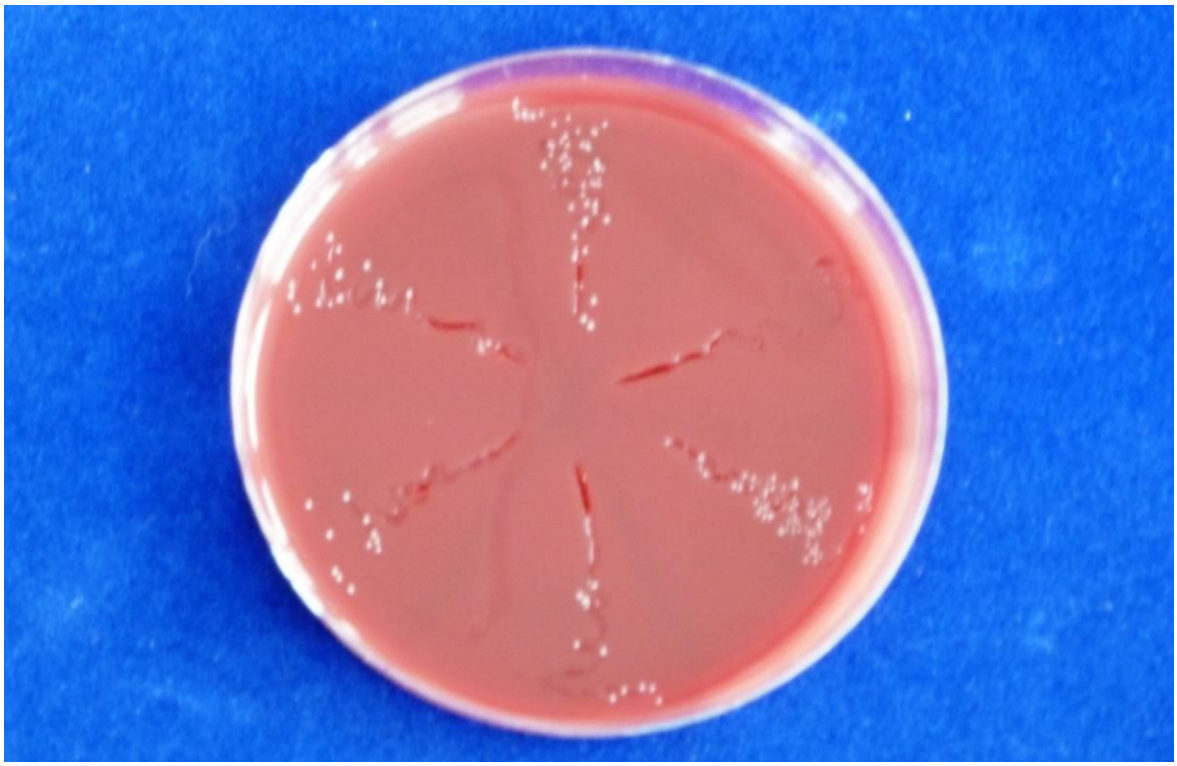

Abbildung 32: Mit anaerober Mischkultur besiedelte Agarplatte Kontrolle, Tag 0 (Versuch 7)

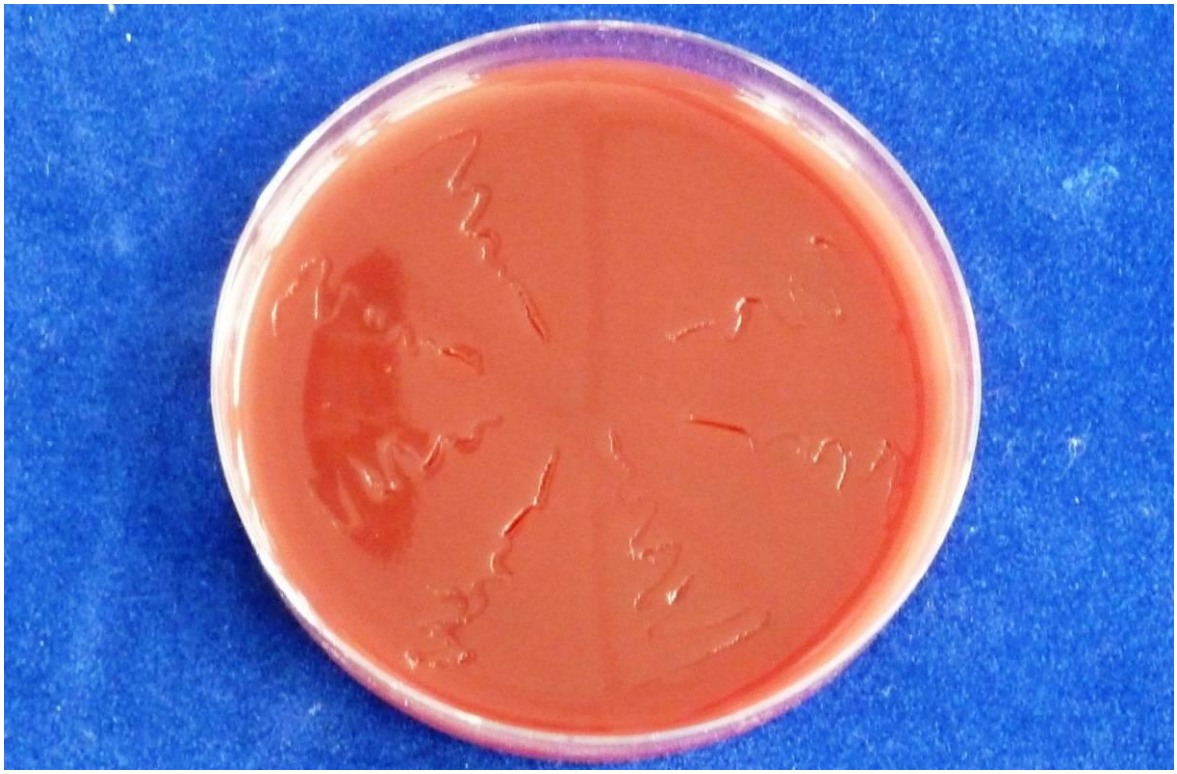

Abbildung 33: Mit anaerober Mischkultur besiedelte Agarplatte, 3. Gruppe, Tag 0 (Versuch 7)

4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im ersten Versuch wurde die Wirkung des PACT®-200 Systems auf eine Bakteriensuspension überprüft. Hier zeigte das PACT®-200 System eine erhebliche Keimreduktion, deren Eliminationsleistung mit einer längeren Belichtungszeit zunimmt. Bereits nach einer Bestrahlungszeit von 60 s konnten alle Bakterien eliminiert werden. Die Anwesenheit von inaktiviertem Serum oder inaktiviertem humanem Serumalbumin steigert die Wirksamkeit des PACT®-200 Systems deutlich, was in den Versuchen 2 und 3 deutlich wurde. Mit Serum konnte eine Bakterienreduktion von 100% innerhalb von 30 s erreicht werden. Bei 25 mg/ml und 50 mg/ml inaktiviertem humanem Serumalbumin, der größten Fraktion innerhalb des Serums, lag die Eliminationsrate nach 30 s bei über 99,9%. Allerdings nahm die Rate mit zunehmender Bestrahlungsdauer im Gegensatz zur Bestrahlung ohne Serum oder Serumalbumin ab.

In Versuch 4, bei dem Wurzelkanäle extrahierter Zähne mit E. faecalis kontaminiert und dann mittels PACT®-200 System oder NaCl-Spülung bearbeitet wurden, konnte das PACT®-200 System eine signifikante Verbesserung der Bakterienelimination im Vergleich zu einer Spülung mit sterilem 0,9%igem NaCl erreichen. Gegenüber der Kontrollgruppe waren die Bakterieneliminationen der Spülung wie auch des PACT®-Systems hochsignifikant.

In den Versuchen 5-7 zeigte die NaOCl-Spülung mit nachfolgender Photoaktivierter Desinfektion direkt nach der Anwendung im kontaminierten Wurzelkanal eine bessere Keimelimination als die NaOCl-Spülung alleine. Die Spülung mit NaOCl erzielte eine bessere Wirkung als die Spülung mit NaCl, wie sie in der Kontrollgruppe vorgenommen wurde. Dies war bei allen Keimen bzw. Keimspektren gleichsam der Fall. Eine länger andauernde Wirkung der NaOCl-Spülung allein sowie auch in Kombination mit der Photodynamischen Desinfektion konnte weder für E. faecalis noch die aerobe Mischkultur nachgewiesen werden. Lediglich in der Gruppe der langsam wachsenden anaeroben Mischkultur zeigten die Spülung mit NaOCl und das PACT®-System eine länger andauernde Wirkung.

5 Diskussion

Das Ziel dieser Studie war, die Photoaktivierte Chemotherapie in vitro auf ihre Wirksamkeit in infizierten Wurzelkanälen hin zu untersuchen. Die Versuche 1 bis 3 wurden mit Eppendorf-Gefäßen durchgeführt, wobei hier der Frage nachgegangen wurde, ob das PACT®-200 System die vom Hersteller angegebene Wirkung auf Bakterien hat. Auch wurde hier überprüft, ob im Wurzelkanal vorhandenes Serum oder seine Hauptfraktion, das humane Serumalbumin, einen modulierenden Einfluss auf die keimreduzierende Wirkung haben können.

Für die Versuche 4 - 7 wurden Wurzelkanäle aufbereitet und mit E. faecalis und aeroben bzw. anaeroben Mischkulturen kontaminiert und mit Spüllösungen oder der Photoaktivierten Desinfektion behandelt, bevor jeweils die keimreduzierende Wirkung über einen Zeitraum von vier Tagen untersucht wurde.

5.1 Diskussion der Methode

Bei dem Untersuchungsmaterial handelte es sich um humane, aus verschiedenen Gründen extrahierte Zähne, die nach zuvor definierten Kriterien ausgewählt wurden (HAUSER 2006). Die Krone wurde abgetrennt und die Wurzel auf eine vom Apex gemessene definierte Länge von 15 mm gekürzt und manuell auf eine ISO-Größe 40 aufbereitet. Dadurch sollten sowohl das Kanallumen als auch die Arbeitslänge aller Wurzelkanäle angepasst werden, um ähnliche anatomische Voraussetzungen zu erreichen. Das Erreichen identischer Verhältnisse kann, obwohl das Zahnmaterial einheitlich aufbereitet wurde, jedoch nicht gewährleistet werden, da die menschlichen Zahnwurzeln über laterale Kanäle, Dentintubuli und andere anatomische Besonderheiten verfügen können. Diese anatomischen Besonderheiten können die Aufbereitung wie auch die chemische Desinfektion des Wurzelkanals deutlich erschweren, wenn nicht gar unmöglich machen. Hierin liegt aber zugleich der Vorteil begründet, dass die Desinfektionsmaßnahmen in einer Umgebung angewendet werden, die den klinischen Gegebenheiten entspricht. Ein artifizieller Probekörper, der die Beschaffenheit des menschlichen Wurzelkanals

simulieren soll, kann solche anatomischen Gegebenheiten nicht ausreichend berücksichtigen und muss unter diesem Gesichtspunkt kritisch bewertet werden (LEE et al. 2004).

Bei den Versuchen mit menschlichem Zahnmaterial wurde auf gekrümmte und weitlumige Wurzelkanäle verzichtet, um Unregelmäßigkeiten möglichst zu verhindern. Ein Einfluss des Zahnmaterials auf die Ergebnisse kann dennoch nicht ausgeschlossen werden. Es wurden daher nur einwurzelige Frontzähne genutzt, die zufällig auf die Versuchsgruppen verteilt wurden, um möglichst gleiche Versuchsbedingungen zu gewährleisten.

Trotz dieser Maßnahmen, mit denen ein Verfälschen der Ergebnisse vermieden werden sollte, kann die manuelle Kanalaufbereitung und -spülung ein weiterer Einflussfaktor sein. Die Reproduzierbarkeit der Versuchsschritte kann nur bei einer maschinellen Durchführung gewährleistet werden. Da humanes Zahnmaterial verwendet wurde, konnte dies aber nicht realisiert werden. Jegliche durchgeführte Spülungen wie auch Laserbehandlungen unterlagen aber einem in der Abfolge und zeitlich strikt einzuhaltenden Protokoll. Zudem wurden alle Versuche nur von einem Behandler durchgeführt, um Handhabungsunterschiede zu vermeiden.

Die Versuche 1 bis 3 wurden mit Eppendorf-Gefäßen durchgeführt, somit können Unregelmäßigkeiten, die bei humanem Zahnmaterial auftreten können, ausgeschlossen werden und die Bedingungen sind reproduzierbar. Der Vorteil stellt aber gleichzeitig einen Nachteil dar, da die Laborbedingungen, wie oben beschrieben, die anatomischen Bedingungen nicht ausreichend berücksichtigen bzw. wiedergeben werden können. Die Versuche 2 und 3 wurden unter gleichen kontrollierten Bedingungen erneut durchgeführt, wobei sich die Ergebnisse bestätigten.

Die Messung der optischen Dichte beruht auf der Eigenschaft von in Suspension befindlichen Bakterien, einen Lichtstrahl zu absorbieren oder abzulenken. Die Anzahl der in Suspension befindlichen Bakterien kann auf diese Weise erfasst werden. Allerdings ist es technisch nicht möglich, zwischen lebenden oder toten Bakterien zu unterscheiden (Hirsch-Kauffmann et al. 2009).

In Versuch 4 wurden die Keimzahlen quantitativ unter Errechnung von Mittelwerten erfasst und Unterschiede statistisch mittels Kruskal-Wallis-Test überprüft, wobei das Erreichen statistischer Signifikanzschranken nach Bonferroni korrigiert wurde.

In diesem Versuch wurden die infizierten Wurzeln mit NaCl gespült und dann mit einzelnen Bestandteilen des PACT®-200 Systems behandelt. Die Kanäle wurden dann mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Die Fragestellung dieser Untersuchung war, ob das PACT®-200 System die vom Hersteller angegebene Wirkung im Wurzelkanal entfalten würde. Das sollte ohne den Einfluss von anderen potenten Spüllösungen, wie zum Beispiel NaOCl, geschehen, da sich die desinfizierenden Einflüsse überlagern können. Daher wurde, entgegen der praxisüblichen Methodik, nur mit NaCl gespült.

Das PACT®-Fluid der Firma Cumdente wird nur unsteril verkauft. Um einen Einfluss auf das Ergebnis durch eine mögliche Kontamination des Photosensitizers auszuschließen, wurde zum einen eine Kontrollprobe genommen und auf einer Blutagarplatte für 24 h im Brutschrank inkubiert, zum anderen wurde der weitere Farbstoff bei 95°C keimfrei gemacht. So kann auch eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleistet werden.

Die Wurzelkanäle wurden in den Versuchen 4 bis 7 mit E. faecalis kontaminiert. Dieser Keim wird am häufigsten mit endodontischen Misserfolgen in Verbindung gebracht (BYSTRÖM und SUNDQVIST 1981, ØRSTAVIK und HAAPASALO 1990, PATAKY et al. 2002, KLIMM 2003). Die Verwendung nur eines Keimes entspricht nicht immer den In-vivo-Bedingungen einer endodontischen Läsion, eine primäre Läsion wird in der Regel durch eine vielfältige mikrobielle Flora gekennzeichnet und kann sehr variabel sein (BYSTRÖM und SUNDQVIST 1981, ØRSTAVIK und HAAPASALO 1990, PATAKY et al. 2002, KLIMM 2003). Bei wurzelkanalgefüllten Kanälen mit persistierender apikaler Parodontitis ist E. faecalis jedoch häufig als Monokultur nachweisbar (SUNDQVIST et al. 1998, PECIULIENE et al. 2001).

Um den realen klinischen Gegebenheiten näher zu kommen, wurden in den Versuchen 5 bis 7 neben E. faecalis eine anaerobe und eine aerobe Mischinfektion verwendet. Bei den Bakterienkulturen der anaeroben und aeroben Mischinfektion handelte es sich um Probenmaterial aus menschlichen, endodontisch erfolglos behandelten Zähnen, bei denen mit den üblichen, in der Praxis gängigen Methoden,

keine Symptom- und Keimfreiheit erreicht werden konnte. Dies ermöglicht eine sehr differenzierte Dokumentation der Wirkungen des PACT®-200 Systems. Da es wichtig ist, die Effizienz einer Methode auch über einen längeren Zeitraum abzuschätzen, wurden diese Versuche auf vier Kontrolltage angelegt, wobei die Gefahr einer Superinfektion der Versuchskeime mit der Länge des Versuchszeitraumes korreliert.

Die Spülungen wurden bei den Versuchen 5 bis 7 mit 5 ml 1,5%iger NaOCl-Lösung durchgeführt, da sie die am häufigsten eingesetzte Wurzelkanalspüllösung ist (BYSTROEM und SUNDQVIST 1983, SHABAHANG und TORABINEJAD 2003, CARSON et al. 2005). Die Spülzeit wurde, der Vergleichbarkeit wegen, einheitlich auf eine Minute festgelegt. Eine längere Einwirkzeit der Spüllösung könnte mit einer höheren Keimreduktion einhergehen (FERREIRA et al. 2004, BARTHEL et al. 2006).

Die Anzahl der überlebenden koloniebildenden Einheiten wurde in den Versuchen 5 bis 7 semiquantitativ erfasst, wobei der Quantität des Bakterienwachstums eine Keimzahl-Kategorie zwischen 0 (kein Wachstum) und 5 (>500 KBE/ml) zugewiesen wurde. Dies ermöglicht eine differenzierte Beurteilung und Darstellung der nachgewiesenen Keimzahl. Eine umfangreichere Auswertung unter Berechnung von Mittelwerten, wie in den Versuchen 1 und 2, wurde aufgrund des Mehraufwandes, der durch die Erstellung von Verdünnungsreihen entstanden wäre, nicht durchgeführt, zumal in ähnlichen Untersuchungen nachgewiesen werden konnte, dass mit der semiquantitativen Bestimmung aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen sind (ALTENHOF 2011).

Die für die Versuchsdurchführung notwendige Kultivierung der bakteriellen Proben erfolgte mit Schaedleragarplatten. Lediglich die anaeroben Keime wurden mittels Blutagarplatten kultiviert. Alle durchgeführten Arbeiten erfolgten unter einer sterilen Werkbank. Eine Superinfektion mit Fremdkeimen hat nicht stattgefunden.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

In den In-vitro-Versuchen, die in Reagenzgefäßen durchgeführt wurden, zeigte sich eine deutliche Keimreduktion mit Hilfe des PACT®-200 Systems in Abhängigkeit von der Laser-Bestrahlungszeit. In Anwesenheit von inaktiviertem humanem Serum

konnte die Bakterienelimination noch einmal deutlich gesteigert werden. Dies war auch bei Gegenwart nur eines Serumbestandteils, des inaktivierten humanen Serumalbumins der Fall, wobei hier mit Verlängerung der Bestrahlungszeit eine Abnahme der Elimination zu verzeichnen war. Dieses Phänomen lässt sich möglicherweise damit erklären, dass es durch den aktivierten Photosensitizer zu einer Oxidation von Proteinen kommt, die ihrerseits durch Bildung freier Radikale toxisch auf die Keime wirken (PINHEIRO et al. 2009). Mit zunehmender Bestrahlungsdauer könnte es zu einer Zerstörung dieser Proteine kommen, was eine geringere Keimelimination zur Folge hätte. Die Proteine scheinen auch kurz nach Ende der Bestrahlung noch einen abtötenden Effekt auf die Bakterien zu haben, da ansonsten die Keimreduktion mit humanem Serumalbumin, egal bei welcher Bestrahlungszeit, gleich bliebe.

In allen Versuchen mit menschlichem Zahnmaterial zeigte eine Wurzelkanalspülung, ungeachtet welche Spüllösung verwendet wurde, eine signifikante Keimreduktion gegenüber der Kontrollgruppe. Bereits die Spülung mit NaCl brachte eine Keimreduktion. Dies trifft auch für das PACT®-200 System und seinen Einzelkomponenten, mit Ausnahme des Lasers allein, zu. Selbst das PACT®-Fluid, ein modifiziertes Toloniumchlorid, zeigte eine signifikante Keimreduktion. Auch die Spülung mit NaOCl erbrachte gegenüber der NaCl-Spülung eine signifikant höhere Keimreduktion. In der Fragestellung, ob das PACT®-200 System besser als die Spüllösung alleine sei, zeigte sich ein signifikanter Einfluss des Systems. So überlebten bei alleiniger Spülung im Mittel 125.809 KBE/ml, bei dem PACT®-System hingegen nur 36.826 KBE/ml. Es zeigte sich damit eine signifikant bessere Keimreduktion als bei der mechanischen Keimreduktion durch eine Spülung allein. In der Anwendung einer NaOCl-Spülung und der Photodynamischen Desinfektion zusammen zeigte sich im Langzeitversuch zumindest am ersten Tag eine bessere desinfizierende Wirkung als mit der NaOCl-Spülung allein. Dies kann daraus resultieren, dass der Photosensitizer eine geringere Oberflächenspannung besitzt und in Dentinkanälchen eindringen kann, die für das NaOCl unerreichbar erscheinen (BERUTTI 1997, MORITZ et al. 2006)

Klinisch könnte die Erkenntnis, dass Serum und seine Bestandteile die Effektivität der Photoaktivierten Chemotherapie steigern, von erheblicher Bedeutung sein. Gerade im Bereich der Parodontologie ist dies von Wichtigkeit, da in den Taschen

laut KINANE (2001) Serum enthalten ist, welches wiederum mit dem PACT®-System reagiert und zu erheblichen Keimeliminationen führt. Die vom Hersteller angegebene starke keimreduzierende Wirkung in der parodontalen Tasche kann mit diesem Effekt mit erklärt werden. Wie weit der Photosensitizer allerdings in die bakteriellen Biofilme einzudringen vermag, muss noch untersucht werden.

Wie effektiv das System unter In-vivo-Bedingungen im Wurzelkanal arbeitet, kann hier nicht geklärt werden, da nur mit extrahierten Zähnen gearbeitet wurde, in denen keinerlei Serum oder Serumbestandteile enthalten waren. Dass Serum auch im vitalen Wurzelkanal enthalten ist, zeigt die Studie von KNUTSSON et al. (1994), wobei bis heute die exakte Zusammensetzung ungeklärt ist (KNUTSSON et al. 1994). Es könnte vermutet werden, dass das System unter In-vivo-Bedingungen möglicherweise ähnliche Keimeliminationsraten wie in den Versuchen 1 bis 3 erreichen könnte. Bisher ungeklärt ist außerdem, wieweit der Photosensitizer in die Seitenkanälchen und das Dentin einzudringen vermag. Auch hierzu sind noch weitere Studien nötig.

Die Wirkdauer der Spülung wie auch die des PACT®-200 Systems wurde in den Versuchen 5 bis 7 an extrahierten Zähnen überprüft. Am ersten Tag der Versuchsauswertung zeigte das PACT®-200 System in Kombination mit Spülungen durch 0,9%ige NaCl-Lösung und 1,5%ige NaOCl-Lösung eine etwas bessere desinfizierende Wirkung als die aufeinander folgenden Spülungen mittels steriler 0,9%iger NaCl-Lösung und 1,5%iger NaOCl-Lösung allein. Dies war sowohl bei E. faecalis, der aeroben Mischinfektion als auch der anaeroben Mischinfektion der Fall. An den folgenden Versuchstagen, Tag 2 und Tag 4, zeigte sich bei E. faecalis und der aeroben Mischinfektion jedoch schon ein starkes Keimwachstum von mehr als 500 KBE/ml. Allerdings war in der aeroben Mischinfektion auch E. faecalis enthalten. Es ist also durchaus möglich, dass bis auf E. faecalis alle anderen enthaltenen Keime abgetötet wurden, da keine qualitative Unterscheidung der verbliebenen Keime unternommen wurde. Bei der anaeroben Mischinfektion zeigte sich hingegen auch am vierten Versuchstag eine deutliche Keimreduktion im Vergleich zur Kontrolle.

Wie hoch die Eindringtiefe des Photosensitizers in die Dentintubuli war, und ob in den Dentintubuli eine Bakterienelimination erfolgte, kann nicht geklärt werden. Dass das System der Photodynamischen Therapie einen hemmenden Einfluss auf das

Keimwachstum von verschiedenen Keimen hat, zeigt sich in allen Versuchen. Gerade der Versuch mit humanem Serum und dessen Bestandteilen erscheint vielversprechend, da er zeigt, dass die keimreduzierende Wirkung der Photodynamischen Therapie noch weiter gesteigert werden kann und nicht nur auf den Faktoren Photosensitizer und Laser beruht.

5.3 Schlussfolgerungen

Die In-vitro-Studie zur Überprüfung der Wirksamkeit der Photodynamischen Therapie erlaubt folgende Schlussfolgerungen:

- In Wurzelkanälen humanen Ursprungs reduziert die durch das PACT®-200 System vermittelte Photodynamische Therapie die Keimzahl im Vergleich zu einer Wurzelkanalspülung mit verschiedenen Spüllösungen signifikant. Die Studie deutet somit darauf hin, dass eine Optimierung der Wurzelkanalbehandlung mit Hilfe der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie möglich ist.
- Serum und sein Hauptbestandteil Serumalbumin verstärken (im Reagenzgefäß) signifikant die Effektivität der Photodynamischen Desinfektion mit Keimeliminationen von mehr als 99,9%. Dieses Resultat ist von klinischer Relevanz, wobei in vivo möglicherweise durch unterschiedliche anatomische Gegebenheiten abweichende Ergebnisse erzielt werden. Für die orientierende Abschätzung der Wirksamkeit im Wurzelkanal in vivo ist dieses Ergebnis dennoch bedeutsam.

Die der Studie zugrunde gelegten Hypothesen können somit wie folgt beantwortet werden:

- Die antimikrobielle Photodynamische Therapie führt im infizierten Wurzelkanal zu einer erhöhten Keimreduktion.
- In Anwesenheit von Serum bzw. Serumalbumin ist die Effektivität der Photoaktivierten Desinfektion verstärkt.

6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser In-vitro-Studie war, die Wirksamkeit der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie (PDT) auf endodontische Problemkeime zu ermitteln. Hierzu wurden neben Versuchen in Eppendorf-Gefäßen auch Versuche in Wurzelkanälen extrahierter menschlicher Zähne durchgeführt. Die Photodynamische Therapie erfolgte mit Hilfe des PACT®-200 Systems, das aus den Komponenten Photosensitizer (PACT®-Fluid) und PACT®-200 Laser besteht.

In den Versuchen 1 bis 3 wurde die PACT®-Wirkung in vitro in einer E. faecalis-Suspension allein oder in zusätzlicher Gegenwart von inaktivem humanem Serum und verschiedenen Konzentrationen von inaktiviertem humanem Serumalbumin überprüft. Dabei wurde eine E. faecalis-Bakteriensuspension auf Eppendorf-Gefäße verteilt und in Kontrollgruppe sowie Gruppen mit Laserbelichtung allein für 30s, 60s, 90s sowie Laserbelichtung mit Photosensitizer mit identischen Belichtungszeiten eingeteilt. Nach Laserbestrahlung wurden die Suspensionen auf einer Agarplatte ausgestrichen und 24 Stunden bebrütet. Danach wurden die Kolonien mittels manuellem Zählwerk registriert und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten pro Milliliter berechnet. In Versuch 2 wurde Serum hinzugegeben. In Versuch 3 wurde an Stelle von Serum humanes Serumalbumin in den Konzentrationen von jeweils 25 mg/ml und 50 mg/ml verwendet, da dieses den Serumhauptbestandteil darstellt. Der Photosensitizer wurde zugegeben und eine Laserbestrahlung von 30s, 60s oder 90s durchgeführt. Die weitere Probenverarbeitung entsprach Versuch 1.

Ab einer Bestrahlungszeit von 60s zeigte sich ohne humanes Serum oder Serumalbumin eine Keimabtötung von 100%. In Anwesenheit von inaktivem humanem Serum wurde dies bereits nach 30s erreicht. In Gegenwart von 25 mg/ml oder 50 mg/ml inaktiviertem humanem Serumalbumin, dem Hauptanteil des Serums, wurden nach 30s die meisten Keime abgetötet, mit Verlängerung der Laserbestrahlung nahm die Anzahl der getöteten Keime jedoch ab.

In Versuch 4 wurde der Einfluss der mechanischen Komponente einer Wurzelkanalspülung auf die Bakterienreduktion (E. faecalis) überprüft und mit der Wirksamkeit der Photodynamischen Therapie verglichen. Hierzu wurden die Wurzelkanäle von 50 extrahierten einwurzeligen Zähnen manuell aufbereitet und

mit E. faecalis kontaminiert. Die keimreduzierende Wirkung der Photoaktivierten Desinfektion wurde mit der der manuellen Spülung verglichen. Nach Spülung mit steriler 1,5%iger NaCl-Lösung wurden die verschiedenen Anteile des PACT®-Systems und das gesamte System eingesetzt und im Vergleich zu alleiniger Spülung auf seine Wirksamkeit hin überprüft. Die aus den behandelten Wurzelkanälen extrahierten Keime wurden auf Agarplatten ausgespatelt und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten pro ml wurde bestimmt. Die Spülung wie auch das PACT®-System zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Keimreduktion, wobei die Kombination von Photosensitizer und Laserbestrahlung am wirkungsvollsten war und signifikant mehr Keime abtötete als die alleinige Spülung.

In den Versuchen 5 bis 7 sollte neben der kurzfristigen Wirkung die Langzeitwirkung des PACT®-Systems im Vergleich zur Spülung mit 1,5%iger NaOCl-Lösung untersucht werden, da E. faecalis im Wurzelkanal außerordentlich resistent und unter den verschiedensten Bedingungen überlebensfähig ist. Die einwurzeligen Zähne wurden dazu randomisiert auf verschiedene Gruppen verteilt und mit verschiedenen Keimfloren (E. faecalis, aerobe Mischkultur, anaerobe Mischkultur) kontaminiert. Je Keimflora wurde es eine Kontrollgruppe, eine Spülgruppe (Spülung mit 2,5ml steriler 0,9%iger NaCl-Lösung und 1,5%iger NaOCl-Lösung) sowie eine Gruppe mit zusätzlich nach der Spülung erfolgter Behandlung mit dem PACT®-200 System eingesetzt. Die aus den Wurzelkanälen gewonnen Proben wurden auf Agarplatten ausgespatelt und kultiviert. Daraufhin erfolgte die semiquantitative Auswertung der koloniebildenden Einheiten. Nach weiteren 2 und 4 Tagen wurden erneut Proben genommen und ausgewertet.

Direkt nach der Behandlung zeigte sich die zusätzlich zur Spülung mit NaOCl durchgeführte antimikrobielle Photodynamische Therapie der alleinigen Spülung überlegen. Dies war bei allen untersuchten Keimfloren der Fall. An Tag 2 und 4 konnte zwischen der Spülung und der Photodynamischen Therapie bei E. faecalis und der aeroben Mischkultur kein Unterschied mehr festgestellt werden. Die Anzahl koloniebildender Einheiten betrug jeweils mehr als 500/ml. Eine langfristig desinfizierende Wirkung scheint daher mit beiden Methoden nicht möglich zu sein. In der Gruppe der anaeroben Mischkultur zeigte sich an den Tagen 2 und 4 ein deutlich geringeres Wachstum als in der Gruppe der Aerobier. An Tag 4 war mit der

anaeroben Mischkultur in der NaOCl- und in der PDT-Gruppe kein Wachstum mehr festzustellen. Anscheinend sind die anaeroben Keime gegenüber einer Spülung oder der Photodynamischen Therapie weniger resistent als aerobe Keime.

Die Studie weist im statistischen Vergleich zwischen der PDT und der Spülung mit NaOCl im Wurzelkanal signifikante Differenzen zugunsten der Photodynamischen Therapie nach. Eine andere wichtige Erkenntnis der Arbeit ist, dass die desinfizierende Wirkung der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie in Anwesenheit von Serum oder Serumbestandteilen beträchtlich gesteigert zu sein scheint. Dies sollte in anschließenden Versuchen weiter abgeklärt werden.

7 Literatur

Ahmad M, Pitt Ford TR, Crum LA (1987) Ultrasonic debridement of root canals: acoustic streaming and its possible role. J Endod 13:93-101

Ahmad M, Pitt Ford TR, Crum LA, Walton AJ (1988) Ultrasonic debridement of root canals: acoustic cavitation and its relevance. J Endod 14:486-493

Altenhof S (2009) Effektivität der hydrodynamischen und der ultraschallgestützten Wurzelkanalspülung im In-vitro-Vergleich. Med Diss, Hamburg

Andersen M, Lund A, Andreasen JO, Andreasen FM (1992) In vitro solubility of human pulp tissue in calcium hydroxide and sodium hypochlorite. Endod Dent Traumatol 8:104-108

Babich H, Wurzburger BJ, Rubin YL, Sinensky MC, Blau L (1995) An in vitro study on the cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to human gingival cells. Cell Biol Toxicol 11:79-88

Baker NA, Eleazer PD, Averbach RE, Seltzer S (1975) Scanning electron microscopic study of the efficacy of various irrigating solutions. J Endod 1:127-135

Barthel C, Georgi M, Schäfer E, Petschelt A, Flachsenberg S, Neuber T, Kockapan C, Weiger R, Hülsmann M (2006) Stellungnahme der DGZMK: Die Wurzelkanalspülung. Zahnärztl Mitt 96:50-51 DGZMK Webseite Stand: 17.02.13

Baumann A, Beer R (2008) Endodontie. Thieme, Stuttgart, New York

Baumgartner JC, Cuenin PR (1992) Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. J Endod 18:605-612

Baumgartner JC, Falkler WA Jr (1991) Bacteria in the apical 5mm of infected root canals. J Endod 17:380-383

Baumgartner JC, Mader CL (1987) A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens. J Endod 13:147-157

Becker TD, Woollard GW (2001) Endodontic irrigation. Gen Dent 49:272-276

Beer R, Keitel S, Gängler P, Wutzler P, Pfister W (1988) Biologische und mikrobiologische Prüfung chlorhaltiger Wurzelkanalspülungen. Stomatol DDR 38:513-519

Beer R, Baumann MA, Kielbassa AM (2006) Pocket Atlas of Endodontics. Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R (2012) Duale Reihe Physiologie. Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Berber VB, Gomes BPFA, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ (2006) Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing Enterococcus faecalis within root canals and dental tubules. Int Endod J 39:10-17

Berutti E, Marini R, Angeretti A (1997) Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. J Endod 23:725-727

Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M (1997) Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitisation of Porphyromonas gingivalis in vitro. Photochem Photobiol 65:1026-1031

Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M (1998) A study of the uptake of Toluidine Blue O by Porphyromonas gingivalis and the mechanism of lethal photosensitization. Photochem Photobiol 68:370-376

Bhatti M, MacRobert A, Henderson B, Shepherd P, Cridland J, Wilson M (2000) Antibody-targeted lethal photosensitization of Porphyromonas gingivalis. Antimicrob Agents Chemother 44: 2615-2618

Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S (2008) Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol 23:384-90

Boyce ST, Warden GD, Holder IA (1995) Cytotoxicity testing of topical antimicrobial agents on human keratinocytes and fibroblasts for cultured skin grafts. Burn Care Rehabil 16:97-103

Braham P, Herron C, Street C, Darveau R (2009) Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms. J Periodontol 80:1790-1798

Brauckhoff G, Kocher T, Holtfreter B, Bernhardt O, Splieth C, Biffar R, Saß AC (2009) Gesundheitsberichterstattung des Bundes; Heft 47: Mundgesundheit. Robert Koch-Institut in Zusammenarbeit mit dem Statistischen Bundesamt. Berlin

Byström A, Sundqvist G (1981) Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. Scand J Dent Res 89:321-328

Byström A, Sundqvist G (1983) Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 55:307-312

Byström A, Sundqvist G (1985) The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. Int Endod J 18:35-40

Byström A, Happonen RP, Sjögren U, Sundqvist G (1987) Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. Endod Dent Traumatol 3:58-63

Çalt S, Serper A (2000) Smear layer removal by EGTA. Int Endod 26:459-461

Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R: Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. J Eur Acad Dermatol Venereol 2007, 21: 293–302

Cameron JA (1995) The choice of irrigant during hand instrumentation and ultrasonic irrigation of the root canal; a scanning electron microscope study. Aust Dent J 40:85-90

Carson KR, Goodell GG, McClanahan SB (2005) Comparison of the antimicrobial activity of six irrigants on primary endodontic pathogens. J Endod 31:471-473

Castellucci A (2004) Endodontics, 1. Aufl., Il Tridente, Florenz

Chavez De Paz LE, Dahlen G, Molander A, Moller A, Bergenholtz G (2003) Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. Int Endod J 36:500-508

Chow TW (1983) Mechanical effectiveness of root canal irrigation. J Endod 9:475-479

Cunningham WT, Balekjian AY (1980) Effect of temperature on the collagen-dissolving ability of sodium hypochlorite endodontic irrigant. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 49:175-177

Dahlén G, Pipattanagovit P, Rosling B, Möller AJ (1993) A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. Oral Microbiol Immunol 8:375-382

Dahlén G, Bergenholtz G (1980) Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. J Dent Res 59:1033-1040

Dalton BC, Ørstavik D, Phillips C, Pettiette M, Trope M (1998) Bacterial reduction with nickel-titanium rotary instrumentation. J Endod 24:763-767

Dammaschke T, Steven D, Kaup M, Ott KH (2003) Long-term survival of root-canal treated teeth: a retrospective study over 10 years. J Endod 29:638-643

De Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB Jr, Taba M Jr (2007) Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. J Periodontol 78:965-973

Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ (2002) Biofilm formation in medicated root canals. J Endod 28:689-693

Dörtbudak O, Haas R, Bernhart T, Mailath-Pokorny G (2001) Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. Clin Oral Impl Res 12:104-108

Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Peng Q (1998) Photodynamic Therapy. J Natl Cancer Inst 90:889-905

Eick S (2010) Vorlesung Orale Mikrobiologie. Universität Bern

Eldeniz AU, Ozer F, Hadimli HH, Erganis O (2007) Bactericidal efficacy of Er, Cr:YSGG laser irradiation against Enterococcus faicalis compared with NaOCl irrigation: an ex vivo pilot study. Int Endod J 40:112-119

Elstner EF (1990) Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin. B.I. Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, München

Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D (2002) Mechanisms involved in the resistance of Enterococcus faecalis to calcium hydroxide. Int Endod J 35:221-228

Fan KF, Hopper C, Speight PM, Buonaccorsi GA, Brown SG (1997) Photodynamic therapy using mTHPC for malignant disease in the oral cavity. Int J Cancer 73:25-32

Ferreira R, Alfredo E, Porto de Arreda M, Silva Sonsa Y, Sonsa-Neto M (2004) Histological analysis of the cleaning capacity of nickel-titanium rotary instrumentation with ultrasonic irrigation in root canals. Aust Endod J 30:56-58

Fouad AF (2009) Endodontic Microbiology, 1. Aufl. Wiley-Blackwell. New Jersey

Fuchs G (2006) Allgemeine Mikrobiologie, 8. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York

Giard JC, Hartke A, Flahaut S, Benachour A, Boutibonnes P, Auffray Y (1996) Starvation-induced multiresistance in Enterococcus faecalis JH2-2. Curr Microbiol 32:264-271

Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, Souza-Filho FJ (2003) Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against Enterococcus faecalis in bovine root dentine in vitro. Int Endod J 36:267-275

Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR (2004) Microbiological examination of infected dental root canals. Oral Microbiol Immunol 19:71-76

Guerisoli DM, Marchesan MA, Walmsley AD, Lumley PJ, Pecora JD (2002) Evaluation of smear layer removal by EDTAC and sodium hypochlorite with ultrasonic irrigation. Int Endod J 35:418-421

Guldener PHA, Langeland K (1993) Endodontologie: Diagnostik und Therapie, 3. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York

Gutknecht N, Moritz A, Conrads G, Sievert T, Lampert F (1996) Bactericidal effect of the Nd:YAG laser in vitro root canals. J Clin Laser Med Surg 14:77-80

Haapasalo M, Ørstavik D (1987) In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. J Dent Res 66:1375-1379

Halkiotis K, Yova D, Pantelias G: *In vitro* evaluation of the genotoxic and clastogenic potential of photodynamic therapy. Mutagenesis 1999, 14: 193–198

Hand RE, Smith ML, Harrison JW (1978) Analysis of the effect of dilution on the necrotic tissue dissolution property of sodium hypochlorite. J Endod 4:60-64

Hartke A, Giard JC, Laplace JM, Auffray Y (1998) Survival of Enterococcus faecalis in an oligotrophic microcosm: changes in morphology, development of general stress resistance, and analysis of protein synthesis. Appl Environ Microbiol 64:4238-4245

Hass R, Dortbudak O, Mensdorff-Pouilly N, Mailath G (1997) Elimination of bacteria on different implant surfaces through photosensitization and soft laser. An in vitro study. Clin Oral Implants Res 8:249-254

Hauser V (2006) Reinigung von Wurzelkanälen mit einem neuartigen hydrodynamischen Spülsystem (RinsEndo®). Med Diss, Bonn

Heidemann D (2001) Praxis der Zahnheilkunde, Band 3: Endodontie, 4. Aufl., Urban & Fischer, München, Jena

Hellwig E, Klimek J, Attin T (2007) Einführung in die Zahnerhaltung, 4 Aufl., Elsevier, München

Hennesy TD (1973) Some antibacterial properties of chlorhexidine. J Periodontol Res 8 (Suppl 12):61-67

Heppeler J, Hülsmann M (2006) Enterococcus faecalis – ein Problemkeim. Endodontie 15:137-144

Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M, Schweiger MR (2009) Biologie und molekulare Medizin, 7. Auflage, Thieme, Stuttgart

Hof H, Dörries R (2002) Duale Reihe: Medizinische Mikrobiologie, 4. Aufl., Thieme, Stuttgart

Hülsmann M (1993) Die maschinelle Aufbereitung des Wurzelkanals. Endodontie. Hanser-Verlag, München S.63-96

Hülsmann M (2000) Entwicklung einer Methodik zur standardisierten Überprüfung verschiedener Aufbereitungsparameter und vergleichende In-vitro-Untersuchung

unterschiedlicher Systeme zur maschinellen Wurzelkanalaufbereitung. Quintessenz, Berlin

Hülsmann M (2004) Die Anwendung elektro-physikalisch-chemischer Methoden in der Endodontie. ZWR 3:85-96

Hülsmann M (2005) Eine vergleichende Bewertung aktueller Studien zur Erfolgsquote endodontischer Behandlungen. Endodontie 14, 231-251

Hülsmann M (2005) Mechanical preparation of root canals: shaping goals, techniques and means. Endodontic Topics 10:30-76

Hülsmann M (2008) Endodontie. 1. Aufl., Thieme, Stuttgart

Jeansonne M, White RR (1994) A comparison of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. J Endod 20:276-278

Jensen SA, Walker TL, Hutter JW, Nicoll BK (1999) Comparison of the cleaning efficacy of passive sonic activation and passive ultrasonic activation after hand instrumentation in molar root canals. J Endod 25:735-738

Jousimies-Somer HP, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM (2002) Wadsworth-KTL Anaerobic bacteriology manual. 6th edition, Star Publ, Belmont, CA

Kantz WE, Henry CA (1974) Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of non-vital teeth in man. Archs Oral Biol 19:91-96

Khan MA, Khan MF, Khan MW, Wakabayashi H, Matsumoto K (1997) Effect of laser treatment in the root canal of human teeth. Endod Dent Traumatol 13:139-145

Kinane DF (2001) Causation and pathogenesis of periodontal disease. Periodontol 2000 25: 8-20

Klimm W (2003) Endodontologie: Grundlagen und Praxis. Deutscher Ärzteverlag, Köln

Klimm W, Pfister W, Eick S, Koch R (2001) Antimicrobial effect of low concentrations of chlorhexidine and sodium hypochlorite. J Dent Res 80 (Spec Iss); 722 (Abstr. 1565)

Knutsson G, Jontell M, Bergenholtz G (1994) Determination of plasma proteins in dentinal fluid from cavities prepared in healthy young human teeth. Archs Oral Biol 39:185-190

Kömerik N, Wilson M, Poole S (2000) The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram–negative bacteria. Photochem Photobiol 72:676-680

Kömerik N, Wilson M (2002) Factors influencing the susceptibility of gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization. J Appl Microbiol 92:618-623

König K, Teschke M, Sigusch B, Glockmann E, Eick S, Pfister W (2000) Red light kills bacteria via photodynamic action. Cel Mol Biol (Noisy-le-grand) 46:1297-1303

Konopka K, Goslinski T: Photodynamic therapy in dentistry. J. Dent. Res 2007, 86: 694–707

Le Goff A, Bunetel L, Mouton C, Bonnaure-Mallet M (1997) Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp. Oral Microbiol Immunol 12:318-322

Lee SJ, Wu MK, Wesselink PR (2004) The effectiveness of syringe irrigation and ultrasonic to remove debris from simulated irregularities within prepared root canal walls. Int Endod J 37:672-678

Lehmann J, Bell WA, Gerstein H (1981) Sodium lauryl sulfate as an endodontic irrigant. J Endod 7:381-384

Love RM (2001) Entococcus faecalis: a mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J 34:399-405

Love RM, Jenkinson HF (2002) Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. Crit Rev Oral Biol Med 13:171-183

Levy G (1984) Une nouvelle instrumentation pur realizer mecaniquement l`ensemble de la procedure endodontique: le canal finder. Rev Franc Endod 3:11-18

Lumely PJ, Walmsley AD, Laird WR (1991) Streaming patterns produced around endosonic files. Int Endod J 24:290-297

Martin H, Cunningham WT (1985) Endosonics – the ultrasonic synergistic system of endodontics. Endod Dent Traumatol 1:201-206

Mentz TC (1982) The use of sodium hypochlorite as a general endodontic medicament. Int Endod J 15:132-136

Meyer W, Scheele E. Die Anatomie der Wurzelkanäle. Dtsch Zahnärztl Z 1954:497-500

Mohammadi Z, Abbott PV (2009) Antimicrobial substantivity of root canal irrigants and medicaments: a review. Aust Endod J 35:131-139

Möller AJ, Fabricius L, Dahlén G, Ohman AE, Heyden G (1981) Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. Scand J Dent Res 89:475-484

Moorer WR, Wesselink PR (1982) Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. Int Endod J 15:187

Moritz A, Gutknecht N, Goharkhay K, Schoop U, Sperr W (1997) In vitro irradiation of infected root canals with a diode laser: results of microbiologic, infrared spectrometric, and stain penetration examinations. Quintessence Int. 28:205-209

Moritz A, Gutknecht N, Schoop U, Goharkhay K, Doertbudak O, Sperr W (1997) Irridation of infected root canals with a diode laser in vivo: results of microbiological examinations. Lasers Surg Med 21:221-226

Moritz A, Jakolitsch S, Goharkhay K, Schoop U, Kluger W, Mallinger R, Sperr W, Georgopoulus A (2000) Morpholgic changes correlating to different sensitivities of Escherichia coli and Enterococcus faecalis to Nd:YAG laser irridation through dentin. Lasers Surg Med 26:250-261

Moritz A, Schoop U, Goharkhay K, Jakolitsch S, Kluger W, Wernisch J, Sperr W (1999) The bactericidial effect of Nd:YAG, Ho:YAG, and Er:YAG laser in the root canal: an in vitro comparison. J Clin Laser Med Surg 17:161-164

Moritz A (2005) Orale Lasertherapie. 1. Aufl., Quintessenz, Berlin.

Murray PB, Baron EJ, Jorgen JH (2003) Manual of clinical microbiology. 8th edition, ASM Press, Washington, DC

Nair PN, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G (1990) Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. J Endod 16:580-588

Nair PNR, Cano V, Vera J (2005) Microbial status of root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 99:231-252

Nolden R (1994) Zahnerhaltungskunde. Thieme, Stuttgart

Nouchi, Mizokami, Tajima, Miyatsu, Sakaguchi, Yagi (2007) Verfahren zur Herstellung von humanen Serumalbumin unter Einbeziehung eines Erwärmungsschrittes. Patent Nr.: DE60125218T2. Kumamoto 869-1298, Japan.

Oltramare (1892) Plötzliche Exstirpation der Zahnpulpa mittels einer durch die Bohrmaschine in Rotation versetzten Nadel. Dtsch Monatsschr Zahnheilk 32:407-409

O’Neill JF, Hope CK, Wilson M (2002) Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. Lasers Surg Med 31:86-90

O’Neill JF, Wilson M, Wainwright M (2003) Comparative antistreptococcal activity of photobactericidial agents. J Chemother 15:329-334

Ørstavik D (2003) Root canal disinfection: a review of concepts and recent developments. Aust Endod J 29:70-74

Ørstavik D, Haapasalo M (1990) Desinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. Endod Dent Traumatol 6:142-149

Pataky L, Iványi I, Grigár Á, Fazekas Á (2002) Antimicrobial efficacy of root canal preparation techniques: An in vitro comparative study. J Endod 28:603-605

Pattison DI, Rahmanto AS, Davies MJ (2012) Photo-oxidation of proteins. Photochem Photobiol Sci 11(1):38-53

Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M (2001) Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. Int Endod J 34:429-434

Piesco N (1994) Histology of dentin. In J.K. AVERY (Hrsg.): Oral Development and Histology. 2nd ed. Thieme Medical Publishers, New York

Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2003) Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. Int Endod J 36:1-11

Pinheiro SL, Schenka AA, Neto AA, de Souza CP, Rodriguez HM, Ribeiro MC (2009) Photodynamic therapy in endodontic treatment of deciduous teeth. Lasers Med Sci 24:521-526

Radschuweit AK (2002) Experimentelle Untersuchungen zur Photochemie und Phototoxikologie von Ketoprofen. Dissertation. Universität Halle

Rajesh S, Koshi E, Philip K, Mohan A (2011) Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. J Indian Soc Periodontol 15:323-327

Richman MJ (1957) The use of ultrasonics in root canal therapy and root resection. J Dent Med 12:12-18

Rollinson S, Barnett F, Stevens RH (2002) Efficacy of bacterial removal from instrumented root canals in vitro related to instrumentation technique and size. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 94:366-371

Sabins RA, Johnson JD, Hellstein JW (2003) A comparison of the cleaning efficacy of short-term sonic and ultrasonic passive irrigation after hand instrumentation in molar root canals. J Endod 29:674-678

Scelza MF, Antoniazzi JH, Scelza P (2000) Efficacy of final irrigation - a scanning electron microscopic evaluation. J Endod 26:335-338

Schäfer E, Hickel R, Geurtsen W, Heidemann D, Löst C, Petschelt A, Raab W (2000) Wurzelkanalaufbereitungen. Gemeinsame Stellungnahme DGZMK/ DGZ. Dtsch Zahnärztl Z 55:719-721

Schirrmeister JF (2008) Grenzen der Endodontie. Zahnärztl Mitt 98, Nr.9:66-70

Schumacher GH, Schmidt H, Böring H, Richter W (eds.). Anatomie und Biochemie der Zähne. Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1990:211-27

Shabahang S, Torabinejad M (2003) Effect of MTAD on Enterococcus faecalis-contaminated root-canals of extracted human teeth. J Endod 29:576-579

Shibli JA, Martins MC, Nociti FH Jr, Garcia VG, Marcantonio E Jr (2003) Treatment of ligature-induced peri-implantitis by lethal photosensitization and guided bone regeneration: a preliminary histologic study in dogs. J Periodontol 74:338-345

Siqueira JF Jr, Lima KC, Magalhães FA, Lopes HP, de Uzeda M (1999) Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. J Endod 25:332-335

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, Uzeda de M, Colombo AP (2002) Actinomyces species, Streptococci, and Enterococcus faecalis in primary root canal infections. J Endod 28:168-172

Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G (1997) Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. Int Endod J 30:297-306

Soukos NS, Mulholland SE, Socransky SS, Doukas AG (2003) Photodestruction of human dental plaque bacteria. Enhancement of the photodynamic effect by photochemical waves in an oral biofilm model. Lasers Surg Med 33:161-168

Soukos NS, Chen PS, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, Foschi F, Doucette S, Bammann LL, Fontana CR, Doukas AG, Stashenko PP (2006) Photodynamic therapy for endodontic disinfection. J Endod 32:979-984

Stamos DE, Sadeghi EM, Haasch GC, Gerstein H (1987) An in vitro comparison study to quantitate the debridement ability of hand, sonic, and ultrasonic instrumentation. J Endod 13:434-440

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB (2006) Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. J Endod 32:93-98

Sundqvist G (1976) Bacteriological studies of necrotic dental pulps. Umeå Univ Odontological Dissertations 7:1-93

Sundqvist G (1992) Ecology of the root canal flora. J Endod 18:427-430

Sundqvist G, Johansson E, Sjögren U (1989) Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. J Endod 15:13-19

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U (1998) Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 85:86-93

Tulus G, Schulz-Bongert U (2004) Die ultraschallaktivierte Wurzelkanalspülung – drei Fallberichte. Endodontie 13:147-155

Türkün M, Cengiz T (1997) The effects of sodium hypochlorite and calcium hydroxide on tissue dissolution and root canal cleanliness. Int Endod J 30:335-342

Velvart P (1987) Effektivität der Wurzelkanalaufbereitung mit Ultraschall und unter Anwendung verschiedener Spülmittel. Schweiz Monatsschr Zahnmed 97:78-95

Weichmann JA, Johnson FM (1971) Laser use in endodontics: a preliminary investigation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 31:416-420

Wainwright M (1998) Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). J Antimicrob Chemother 42:13-28

Weine FS (1989) Endodontic therapy. 4th ed. Mosby, St. Louis, pp. 222-223

Wilson M, Harvey W (1997) United States Patent, Patent Number 5,611,793

Wilson M (2004) Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. Photochem Photobiol Sci 3:412-418

Wittgow WC, Sabiston CB (1975) Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. J Endod 1:168-171

Xu Y, Young MJ, Battaglino RA, Morse LR, Fontana CR, Pagonis TC, Kent R, Soukos NS: Endodontic antimicrobial photodynamic therapy: safety assessment in mammalian cell cultures. J Endod 2009, 35: 1567–1572

Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M (1995) Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. J Endod 21:513-515

Yilmaz S, Kuru I, Kuru L, Noyan U, Argun D, Kadir T (2002) Effect of gallium arsenide diode laser on human periodontal diseases: a microbiological and clinical study. Lasers Surg Med 30:60-66

Zandbiglari T, Davids H, Schäfer E (2006) Influence of instrument taper on the resistance to fracture of endodontically treated roots. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 101:126-131

8 Anhang

Auswertung Versuch 1

	a	b	Mittelwert	Std.abw.
Kontrolle	17600	50100	33850	22981
Photosensitizer	4300	14200	9250	7000
Laser 30 s	20400	19800	20100	424
Laser 60 s	34700	17200	25950	12374
Laser 90 s	29800	41700	35750	8415
Photos. + Laser 30 s	600	700	650	71
Photos. + Laser 60 s	0	0	0	0
Photos. + Laser 90 s	0	0	0	0

Tabelle 23: Anzahl der Koloniebildenden Einheiten (KBE/ml) in Proben a und b (Doppelbestimmung), Mittelwerte und Standardabweichungen, Versuch 1

Auswertung Versuch 2

		a	b	Mittelwert	Std.abw.
ohne Serum	Kontrolle	2068000	2408000	2238000	240416
	Photos. + Laser 30 s	87500	175000	131250	61872
	Photos. + Laser 60 s	45500	21500	33500	16971
	Photos. + Laser 90 s	0	2000	1000	1414
mit Serum	Kontrolle	4480000	3736000	4108000	526087
	Photos. + Laser 30 s	0	0	0	0
	Photos. + Laser 60 s	0	0	0	0
	Photos. + Laser 90 s	0	0	0	0

Tabelle 24: Anzahl der Koloniebildenden Einheiten (KBE/ml) in Proben a und b (Doppelbestimmung), Mittelwerte und Standardabweichungen, Versuch 2

Auswertung Versuch 3

		a	b	Mittelwert	Stabw.
ohne HSA	Kontrolle	31328000	33784000	32556000	1736654
	Photos. + Laser 30 s	2648000	2515000	2581500	94045
	Photos. + Laser 60 s	654000	124000	389000	374767
	Photos. + Laser 90 s	168500	269500	219000	71418
mit 25 mg/ml HSA	Kontrolle	23036000	30940000	26988000	5588972
	Photos. + Laser 30 s	2000	500	1250	1061
	Photos. + Laser 60 s	113500	177500	145500	45255
	Photos. + Laser 90 s	323500	142000	232750	128340
mit 50 mg/ml HSA	Kontrolle	38768000	24996000	31882000	9738275
	Photos. + Laser 30 s	8000	17500	12750	6718
	Photos. + Laser 60 s	16500	54000	35250	26517
	Photos. + Laser 90 s	239500	266500	253000	19092

Tabelle 25: Anzahl der Koloniebildenden Einheiten (KBE/ml), Mittelwerte und Standardabweichungen, Versuch 3

Auswertung Versuch 4

Ansatz	Kontrolle	Spülung	Laser	Photosens.	Laser + Photosens.
1	1116000	28510	54880	42090	115890
2	697000	62710	59720	13290	1560
3	1649000	221680	55740	36900	37820
4	2389000	25590	37180	21470	67970
5	2247000	31000	426600	70670	5400
6	1212000	127550	30930	73510	8740
7	3882000	18200	50050	42730	95060
8	1422000	426600	31560	60070	25520
9	1332000	106790	142200	15370	990
10	35500	209460	63490	4830	9310

Tabelle 26: Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE/ml), Versuch 4

	Kontrolle	Spülung	Laser	Photosens.	Laser + Photosens.
Mittelwert	1598150	125809	95235	38093	36826
Stabw.	1054219	129567	120678	24385	41903

Tabelle 27: Mittelwerte und Standardabweichungen, Versuch 4

Auswertung Versuch 5 – 7

E. faecalis		Bakterienwachstum (Anzahl KBE)					
		kein Wachstum	< 10	< 50	< 100	<500	>500
d0	Kontrolle	0	0	0	0	0	5
	NaOCl	1	1	2	0	2	4
	NaOCl + PDT	4	6	0	0	0	0
d2	Kontrolle	0	0	0	0	0	5
	NaOCl	1	0	0	0	0	9
	NaOCl + PDT	0	0	0	0	0	10
d4	Kontrolle	0	0	0	0	0	5
	NaOCl	1	0	0	0	0	9
	NaOCl + PDT	0	0	0	0	0	10

Tabelle 28: Semiquantitative Auswertung Versuch 5, Unterscheidung der Versuchstage: d0 bis d4

Aerobe Mischinfektion		Bakterienwachstum (Anzahl KBE)					
		kein Wachstum	< 10	< 50	< 100	<500	>500
d0	Kontrolle	0	0	0	0	0	5
	NaOCl	0	3	1	1	4	1
	NaOCl + PDT	4	0	2	1	3	0
d2	Kontrolle	0	0	0	0	0	5
	NaOCl	0	0	0	0	0	10
	NaOCl + PDT	0	0	0	0	1	9
d4	Kontrolle	0	0	0	0	0	5
	NaOCl	0	0	0	0	0	10
	NaOCl + PDT	0	0	0	0	0	10

Tabelle 29: Semiquantitative Auswertung Versuch 6, Unterscheidung der Versuchstage: d0 bis d4

Anaerobe Mischinfektion		Bakterienwachstum (Anzahl KBE)					
		kein Wachstum	< 10	< 50	< 100	<500	>500
d0	Kontrolle	0	0	3	2	0	0
	NaOCl	7	3	0	0	0	0
	NaOCl + PDT	9	1	0	0	0	0
d2	Kontrolle	0	1	0	4	0	0
	NaOCl	10	0	0	0	0	0
	NaOCl + PDT	8	2	0	0	0	0
d4	Kontrolle	0	0	4	1	0	0
	NaOCl	10	0	0	0	0	0
	NaOCl + PDT	10	0	0	0	0	0

Tabelle 30: Semiquantitative Auswertung Versuch 7, Unterscheidung der Versuchstage: d0 bis d4

9 Danksagung

Diese Dissertation ist nur durch die freundliche Unterstützung verschiedener Personen in verschiedenen Städten und Ländern zustande gekommen. Ich möchte mich hiermit bei all diesen Personen bedanken, auch bei denen, deren Namen hier nicht genannt sind.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Ulrich Schiffner für die persönliche Betreuung, den ständigen Beistand und die Möglichkeit, meine Promotion an der Universität Hamburg durchführen zu können, bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Georg Cachovan, der mir zu jeder Zeit mit einem freundlichen Wort, großem persönlichen Engagement und vielen wertvollen Anregungen beratend zur Seite stand.

Frau PD Dr. Sigrun Eick, Leiterin des Labors für Orale Mikrobiologie der Klinik für Parodontologie, gebührt ein sehr großes Dankeschön, denn ohne ihren Enthusiasmus, die Anleitung sowie die sachkundige Hilfe bei der Versuchsdurchführung wäre diese Dissertation sicherlich nicht zustande gekommen.

Herrn Professor Dr. Dr. h.c., M.S. Anton Sculean, dem Direktor der Klinik für Parodontologie an der Universität Bern, danke ich für die Ermöglichung der Versuchsdurchführung in den Laboratorien der Klinik und dem großen Interesse an den Versuchen.

Den Laborantinnen Regula Hirschi und Marianne Weibel möchte ich auf diesem Wege ebenfalls für die immerzu freundliche Unterstützung bei meinen Versuchen ganz herzlich danken.

Auch möchte ich mich bei Herrn Dr. Frank Schynowski, dem Geschäftsführer der Cumdente GmbH, Tübingen, und Daniel Fischer, Geschäftsführer und Inhaber von ProDentis, Einsiedeln, Schweiz, für die Zurverfügungstellung des Lasers und des Zubehörs bedanken, da diese Dissertation sonst nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt des Weiteren Herrn Gerhard Schön, Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Universität Hamburg, für die statistische Beratung und die Bereitschaft, meine Fragen zu beantworten.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch einmal bei meinen Eltern, meiner Lebensgefährtin und meinem Bruder bedanken, die mich unermüdlich im Berufs- und Privatleben unterstützt haben.

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....