

Aus der Abteilung für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie
des CharitéCentrums 3 für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

In-vitro-Untersuchung zur Wirksamkeit eines Diodenlasers,
von gasförmigem Ozon, Chlorhexidindigluconat-Gel oder Kalziumhydroxid
gegenüber Biofilmen von *Candida albicans* in Wurzelkanälen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Sarah Walkenbach
aus Düsseldorf

Gutachter: 1. Prof. Dr. Andrej M. Kielbassa
2. Prof. Dr. Michael Hülsmann
3. Prof. Dr. Dr. Ulf Göbel

Datum der Promotion: 19.11.2010

Anzeige einer Präsentation:

Auszüge der Ergebnisse der vorliegenden Studie wurden anlässlich der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zahnerhaltung (DGZ) am 15.05.2009 in Hannover präsentiert:

Noetzel J ^a, Moter A ^b, Walkenbach S ^a, Schulze J ^b, Neumann K ^c, Kielbassa AM ^a
Wirksamkeit von Ozon und einem Diodenlaser auf Biofilme von *Candida albicans* im
Wurzelkanal. Autoreferate-Band der Deutschen Gesellschaft für Zahnerhaltung,
Abstraktnummer 40, ISBN-978-3-86611-433-3, S. 96, 2009

^a Abteilung für Zahnerhaltung und Parodontologie, CharitéCentrums 3 für Zahn-, Mund-
und Kieferheilkunde der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

^b Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät Charité -
Universitätsmedizin Berlin

^c Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Erkrankungen der Pulpa und des Periapex.....	2
2.2 Keimspektren endodontischer Infektionen	3
2.2.1 Primäre Infektionen	3
2.2.2 Reinfektionen	5
2.2.3 <i>Candida albicans</i>	6
2.3 Desinfektion des Wurzelkanalsystems.....	10
2.3.1 Spülung des Wurzelkanals	10
2.3.2 Medikamentöse Einlagen	11
2.4 Laser	13
2.4.1 Physikalische Grundlagen	13
2.4.2 Laser in der Zahnmedizin	14
2.4.3 Diodenlaser	15
2.5 Ozon	16
2.5.1 Chemische Grundlagen.....	16
2.5.2 Ozon in der Zahnmedizin	17
3 Fragestellung	19
4 Material und Methoden	20
4.1 Studiendesign	20
4.2 Vorbereitung der Versuchsproben	21
4.3 Versuchsdurchführung	26
4.4 Untersuchungsmethoden	29
4.4.1 Quantitative Untersuchung	29
4.4.1.1 Bestimmung der Endkeimzahl des Kanalinhalt (Endkeimzahl 1).....	29
4.4.1.2 Bestimmung der Endkeimzahl des Kanalwanddentins (Endkeimzahl 2).....	31
4.4.2 Qualitative Untersuchung	31
4.5 Statistische Auswertung.....	32

5 Ergebnisse	34
5.1 Quantitative Auswertung	34
5.1.1 Ausgangskeimzahl	34
5.1.2 Endkeimzahl 1	36
5.1.3 Endkeimzahl 2	40
5.1.4 Keimzahlreduktion	43
5.2 Qualitative Auswertung	47
6 Diskussion	49
6.1 Diskussion von Material und Methoden	49
6.2 Diskussion der Ergebnisse	55
7 Schlussfolgerungen	65
8 Zusammenfassung	66
9 Abstract	67
10 Literaturverzeichnis	68
11 Anhang	76
11.1 Materialliste	76
11.2 Danksagung	78
11.3 Lebenslauf	79
11.4 Erklärung an Eides statt	80

1 Einleitung

Voraussetzung für eine erfolgreiche endodontische Therapie ist die Reduktion von Mikroorganismen im Wurzelkanal vor dessen suffizienter Füllung [Sjogren *et al.* 1997, Sundqvist *et al.* 1998]. Obwohl die chemomechanische Aufbereitung sowie die Verwendung von medikamentösen Einlagen zur Reduktion der Bakterienzahl führt [Law *et al.* 2004], verbleiben Mikroorganismen in anatomischen Nischen des Wurzelkanalsystems und in Dentinkanälchen [Peters *et al.* 2001]. Diese können trotz adäquater Wurzelkanalfüllung die Erfolgsrate mindern [Sjogren *et al.* 1997] und Ursache für eine Reinfektion des Kanals sein. Mit endodontischen Misserfolgen sind jedoch nicht nur Reservoirs überlebender Bakterien assoziiert [Oguntebi 1994], sondern auch das Auftreten resistenter Spezies. Bei endodontischen Primärinfektionen treten gemischte Populationen von Anaerobiern auf [Sundqvist 1994]; sekundäre Infektionen werden meist von Spezies wie Enterokokken oder *Candida albicans* (*C. albicans*) ausgelöst [Waltimo *et al.* 1997, Sundqvist *et al.* 1998, Pinheiro *et al.* 2003]. Für den klassischen Wirkstoff Kalziumhydroxid ist gegen diese Pathogene eine zum Teil geringe Effektivität gezeigt worden [Waltimo *et al.* 1999, Siqueira *et al.* 2004, Siren *et al.* 2004]. Um die Desinfektion des Wurzelkanalsystems zu optimieren, werden alternative Verfahren gesucht, die zudem die Behandlung in einer Sitzung ermöglichen können.

Laserstrahlen besitzen antimikrobielle Eigenschaften [Hardee *et al.* 1994, Moritz *et al.* 1997, Mehl *et al.* 1999, Schoop *et al.* 2007] und können *in vivo* effektive endodontische Keimreduktion erzielen [Moritz *et al.* 1997]. Ozon ist bekannt als ein wirksames Oxidationsmittel mit antibakteriellen, fungiziden und virusinaktivierenden Eigenschaften [Kim *et al.* 1999], allerdings liegen bislang für die Anwendung in der Endodontie nur wenige evidenzbasierte Studienergebnisse vor [Azarpazhooh *et al.* 2008].

Ziel der vorliegenden Untersuchung war, Erkenntnisse zur Wirksamkeit der Bestrahlung mit dem Diodenlaser und der Applikation von gasförmigem Ozon in endodontischer Keimreduktion zu erzielen. Die Wirksamkeit wurde gegenüber Biofilmen von *C. albicans* in humanen Wurzelkanälen untersucht.

2 Literaturübersicht

2.1 Erkrankungen der Pulpa und des Periapex

Der Begriff Pulpitis bezeichnet die Entzündung der Pulpa, deren Einteilung nach histologischen oder klinischen Parametern erfolgen kann. Prinzipiell liegen die Gesetzmäßigkeiten einer Entzündung zugrunde; allerdings verursacht die besondere Topographie charakteristische Verlaufsformen. Eine Pulpitis wird bakteriell oder iatrogen (durch mechanische, thermische oder biochemische Reize) verursacht.

Im klinischen Alltag steht die fortgeschrittene kariöse Dentinläsion als Ursache für eine Pulpitis im Vordergrund. Voraussetzung für eine Infektion ist das Eindringen von Mikroorganismen [Kakehashi *et al.* 1969]; Infektionswege stellen exponierte Dentinkanälchen und Seitenkanäle sowie die freigelegte Pulpa selbst dar. Aufgrund der Permeabilität des Dentins, die je nach Struktur und Weite der Kanälchen unterschiedlich hoch ist, gelangen biologisch aktive Substanzen (z. B. bakterielle Enzyme, Endotoxine, somatische Antigene, Chemotaxine, Immunkomplexe, organische Säuren) durch das noch gesunde Dentin in die Pulpa [Bergenholtz 1982]. Unmittelbare Folge der Diffusion bakterieller Stoffwechselprodukte und Toxine aus dem infizierten Dentin in Richtung Pulpa ist die allmähliche Demineralisierung angrenzender Dentinschichten. Trotz Sklerosierung von Dentinkanälchen kommt es bei fortschreitender Dentinkaries zum Eindringen bakterieller Substanzen in die vitale Pulpa.

Analog zu anderen entzündlichen Prozessen beinhaltet die initiale Antwort, im Rahmen der unspezifischen Abwehr, den Einstrom polymorphkerniger Granulozyten und Monozyten in den subodontoblastischen Raum [Stashenko *et al.* 1998]. Mit zunehmender Infektion finden sich Elemente der spezifischen Abwehr wie T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen und Plasmazellen im entzündlichen Infiltrat. Es etabliert sich eine Exsudation, ein Abszess mit Granulationsgewebsbildung [Torneck 1981] oder eine Pulpanekrose. Diese ist ein durch Zelltod und Gewebszerfall charakterisierter Endzustand, der lokal herdförmig, im sonst vitalen Pulpagewebe, oder in der gesamten Pulpa auftreten kann. Nicht durch nekrotisches Gewebe per se, sondern durch bakterielle Endotoxine wird die Induktion einer lokalen Immunantwort im angrenzenden Parodont vermittelt [Kakehashi 1969; Sundqvist 1994].

2.2 Keimspektren endodontischer Infektionen

2.2.1 Primäre Infektionen

Der Zusammenhang zwischen Mikroorganismen und Pulpaerkrankungen ist bereits 1894 durch MILLER beschrieben worden. Die Schlüsselrolle gramnegativer Anaerobier wurde durch die Entwicklung entsprechender mikrobiologischer Nachweisverfahren offenbart [Sundqvist 1976]. Auslöser der bakteriellen Pulpitis sind die Bakterien der kariösen Dentininfektion. Diese besteht aus zwei Zonen, der primären Infektionswelle an vorderster, pulpanaher Front, und der folgenden, sekundären Welle der Mischinfektion. Die Frontwelle besteht vorwiegend aus grampositiven Laktobazillen und Stäbchen (z. B. Aktinomyzeten, Eubakterienstämme) [Edwardsson 1974; Hahn *et al.* 1991], deren Stoffwechselprodukte für die initiale Pulpareaktion verantwortlich sind.

Die speziellen ökologischen Verhältnisse im Wurzelkanal führen jedoch zu einer Selektion der eindringenden Bakterien. So etabliert sich eine spezielle, pathogene Flora [Peters *et al.* 2002], die zu 90 % obligat anaerob ist [Sundqvist 1994]. Die Anzahl der bisher nachgewiesenen Spezies ist im Vergleich zum Mundhöhlenmilieu vergleichsweise gering [Haapasalo 1989]. Die insgesamt pro Wurzelkanal ermittelten Keimzahlen schwankten zwischen 10^2 und 10^7 [Peters *et al.* 2002], wobei eine nekrotische, geschlossene Pulpa bei Parodontitis periapicalis durchschnittlich 4×10^5 Bakterien enthielt [Bystrom *et al.* 1981].

Entscheidend für die Zusammensetzung einer Mischflora sind die antagonistisch oder synergistisch wirkenden Interaktionen zwischen den Bakterien, die zur Dominanz oder Suppression einzelner Spezies führen [Sundqvist 1994]. Im Endstadium der Pulpitis besteht die bakterielle Mischflora von nekrotischen Wurzelkanälen vorwiegend aus Anaerobiern und setzt sich morphotypisch aus etwa 40 % Kokken, je 25 % Stäbchen und Filamenten, 4 % Spirochäten und 6 % beweglichen Stäbchen zusammen [Thilo *et al.* 1986]. *Prevotella intermedia* und *Porphyromonas endodontalis* sind besonders häufig vertreten [Sundqvist 1994], aber mit Fusobakterien, verschiedenen anaeroben Kokken und Stäbchen vergesellschaftet. [Pantera *et al.* 1988].

Pilze wurden von verschiedenen Autoren in 2 - 40 % der primären Wurzelkanalinfektionen gefunden (Tabelle I). Sie wurden in Kombination mit Bakterien oder als Monoinfektion nachgewiesen [Borssen 1981] und gehören fast ausschließlich der Gattung *Candida* an, wobei die häufigste Art *C. albicans* ist. So konnten bei apikalen Parodontitiden in 5 - 40 % der infizierten Kanäle *Candida*-Spezies

nachgewiesen werden [Sen *et al.* 1995, Waltimo *et al.* 1997]. Diese unterscheiden sich jedoch geno- und phänotypisch von *C. albicans*-Isolaten der Mundhöhle durch spezielle Virulenzfaktoren, die die Infektion des Pulpa-Dentin-Komplexes und die Invasion und Infektion der Dentinkanäle ermöglichen [Waltimo *et al.* 2003].

Tab. I: Studien, die Pilzinfektionen bei primären endodontischen Infektionen untersuchten

Studie	Nachweisverfahren	Prävalenz in %	Anzahl in n	Nachgewiesene Pilzspezies
[Sen <i>et al.</i> 1995]	SEM ¹⁾	40	10	k. A. zur Spezies
[Debelian <i>et al.</i> 1997]	Kultur ²⁾	4	26	<i>Saccharomyces</i>
[Baumgartner <i>et al.</i> 2000]	PCR ³⁾	21	24	<i>C. albicans</i>
[Lana <i>et al.</i> 2001]	Kultur	7	27	k. A. zur Spezies
[Siqueira <i>et al.</i> 2002]	PCR	2	50	k. A. zur Spezies
[Siqueira <i>et al.</i> 2002]	SEM	7	15	k. A. zur Spezies
Mittelwert der aufgeführten Studien		13,5	25,3	

¹⁾ SEM: scanning electron microscopy, ²⁾ Kultur: Anzuchtverfahren, ³⁾ PCR: polymerase chain reaction

Nicht nur im Pulpagewebe, auch auf der Wurzelkanalwand und in den Dentinkanälchen konnten Bakterien nachgewiesen werden. In-vitro- und In-vivo-Studien zeigten, dass eine Vielzahl unbeweglicher Bakterienspezies in Dentinkanälchen vordringen können [Peters *et al.* 2001]. Sowohl die Anzahl der infizierten Kanälchen als auch die Penetrationstiefen variierten in histologischen Schnitten stark. Ein kulturmikrobiologischer Nachweis war sensitiver und wies bei zwei Drittel der untersuchten Zähne mit infizierter Pulpanekrose Bakterien bis in zementnahe Dentinschichten nach. In pulpanahen Dentinschichten wurden bei 33 % dieser Zähne mehr als 5×10^6 CFU/mg Dentin nachgewiesen (CFU: colony forming units; Koloniebildende Einheiten). In zementnahen Schichten fand sich in 24 % der Fälle diese Konzentration [Peters *et al.* 2001].

Offene, nicht durch eine Schmierschicht verlegte Dentinkanälchen fördern die bakterielle Besiedlung des Dentins. Die Penetrationstiefe war signifikant höher nach Entfernung der Schmierschicht, wenn bovines Dentin künstlich mit *E. faecalis* besiedelt wurde [Peters *et al.* 2000]. In Zusammenhang hiermit steht die Fähigkeit an Kollagen Typ I zu binden, die für *E. faecalis*, *Streptococcus mutans*, *S. gordonii* sowie *C. albicans* [Vitkov *et al.* 2002] nachgewiesen wurde. Die Invasion in das Dentin kann Bakterien und Pilzzellen vor Mechanismen der Wurzelkanalbehandlung schützen und das Auftreten von Sekundärinfektionen begünstigen [Oguntebi 1994].

2.2.2 Reinfektionen

Reinfektionen können durch erneutes Eindringen von Mikroorganismen oder durch erneutes Wachstum teilungsfähiger Zellen nach unzureichender Keimzahlreduktion im Wurzelkanalsystem entstehen. Komplexe anatomische Verhältnisse und das Auftreten resistenter Mikroorganismen, auch in Dentinkanälchen, erschweren deren vollständige Elimination. Der Verbleib von Mikroorganismen im Wurzelkanalsystem ist von entscheidender Bedeutung für das Auftreten von Reinfektionen, zumal elektronenmikroskopische Untersuchungen Bakterien und Pilze in refraktären Fällen, bei anscheinend ausreichender Qualität der Wurzelkanalfüllung, nachweisen konnten [Siqueira 2001]. Klinische Studien über einen Zeitraum von fünf Jahren haben gezeigt, dass zum Zeitpunkt der Wurzelkanalfüllung vorhandene Bakterien die Erfolgsrate negativ beeinflussten: Eine Heilung der apikalen Parodontitis wurde röntgenologisch bei 94 % der Zähne mit negativem Bakteriennachweis festgestellt, signifikant weniger (68 %) bei Zähnen mit positivem Bakteriennachweis [Sjogren *et al.* 1997].

Andere Autoren zeigten, dass weniger als 10^2 /ml vorhandene Mikroorganismen im Wurzelkanal, unabhängig von der nachgewiesenen Spezies, keinen negativen Einfluss hatten [Peters *et al.* 2002]. Dies gilt ebenso für Bakterien, die in Dentinkanälchen verblieben [Peters *et al.* 1995]. In Zusammenhang mit resistenten Fällen werden auch spezielle Mikroorganismen [Rocas *et al.* 2008] gebracht, wie *C. albicans* [Waltimo *et al.* 1997] (Tabelle II) und *E. faecalis*, sowie andere, seltener anzutreffende enteritisauslösende Stäbchen, wie *Enterobacter cloacae* [Sundqvist *et al.* 1998].

Tab. II: Studien, die Pilzinfektionen bei refraktären endodontischen Infektionen untersuchten

Studie	Nachweisverfahren	Prävalenz in %	Anzahl in n	Nachgewiesene Pilzspezies
[Nair <i>et al.</i> 1990]	LM ¹⁾ , TEM ²⁾	22	9	<i>Candida spp.</i>
[Waltimo <i>et al.</i> 1997]	Kultur ³⁾	7	692	<i>Candida spp.</i>
[Sundqvist <i>et al.</i> 1998]	Kultur	8	24	<i>C. albicans</i>
[Molander <i>et al.</i> 1998]	Kultur	4	68	<i>C. albicans</i>
[Peciuliene <i>et al.</i> 2001]	Kultur	18	33	<i>C. albicans</i>
[Hancock <i>et al.</i> 2001]	Kultur	3	34	<i>C. albicans</i>
[Cheung <i>et al.</i> 2001]	Kultur	17	12	<i>C. albicans</i>
[Pinheiro <i>et al.</i> 2003]	Kultur	4	51	<i>Candida spp.</i>
[Siqueira <i>et al.</i> 2004]	PCR ⁴⁾	9	22	<i>Candida spp.</i>
Mittelwert der aufgeführten Studien		10,2	105	

¹⁾ LM: Light microscopy, ²⁾ TEM: transmission electron microscopy, ³⁾ Kultur: Anzuchtverfahren,

⁴⁾ PCR: polymerase chain reaction

Laut einiger Autoren treten Pilze im Durchschnitt häufiger in endodontisch behandelten Zähnen auf, die revisionsbedürftig sind, als in primär infizierten Wurzelkanälen [Waltimo *et al.* 2003, Siqueira *et al.* 2004]. Dies lässt sich jedoch aus der Literatur zusammenfassend nicht ableiten (Tabellen I und II).

2.2.3 *Candida albicans*

Pilze sind eukaryotische Lebewesen mit wenig differenziertem Gewebe. Im Gegensatz zu Pflanzen und Algen sind sie chlorophyllose, nicht zur Photosynthese fähige Saprophyten, die Energie durch Ab- und Umbau von organischen Verbindungen gewinnen. Zum Teil leben sie als Parasiten oder Symbionten, wobei die humanpathogenen Arten eine Spezialisierung darstellen [Schauer *et al.* 1999]. Die meisten opportunistischen humanen Pilzinfektionen werden durch die Gattungen *Candida* und *Aspergillus* verursacht. Pilzzellen weisen Besonderheiten hinsichtlich der Zellwandbestandteile (Chitin und Glukan-Mannan-Komplexe) und der zytoplasmatischen Membran (Ergosterol) auf, die Ansatzpunkte der antimykotischen Therapie sind [Blaschke-Hellmessen 1999].

Es unterscheiden sich zwei Erscheinungsformen der Pilze: die Sprosszellen (Hefen) und die Pilzfäden (Hyphen); letztere bilden verzweigte Myzelien. Die weitaus meisten Pilze bilden diese charakteristischen fädigen Vegetationsorgane. Abhängig von der Pilzart und dem Milieu erfolgt die Vermehrung durch Hyphenwachstum oder durch Sprossung, auch als hefeartige Vermehrung bezeichnet [Schauer *et al.* 1999]. *C. albicans* allerdings verfügt über eine Wachstumsbesonderheit, denn hier findet man Sprosszellform, Pseudomyzel und echtes Hyphenwachstum. Bezeichnet wird diese Fähigkeit als Dimorphismus oder Polymorphismus [Bottone *et al.* 1993, Siqueira *et al.* 2004]. Die Hefezellen selbst werden als Blastosporen bezeichnet.

Zellen von *C. albicans* verwerten Kohlenhydrate grundsätzlich oxidativ (Assimilation), jedoch kann auch ein anaerober Metabolismus stattfinden (Gärung). In einer Studie zeigte *C. albicans* ein langsames Wachstum unter anaeroben Bedingungen (Verdoppelungszeit 248 min); es wurden Hyphen und Sprosszellen beobachtet, allerdings keine Biofilmbildung [Biswas *et al.* 2005]. Das Wachstumsverhalten wurde durch einen sauren pH-Wert gefördert.

Die Gattung *Candida* umfasst 163 Arten, davon sind etwa 10 % humanpathogen und 5 % werden häufiger nachgewiesen [Schauer *et al.* 1999]. Der primäre Standort von *C. albicans* ist der Orintestinaltrakt des Menschen und warmblütiger Tiere, es besteht

kein ubiquitäres Vorkommen in der Natur. *C. albicans* ist ein anpassungsfähiger Mikroorganismus, dies verdeutlicht sein kommensales Vorkommen in unterschiedlichen anatomischen Regionen des menschlichen Körpers mit charakteristischen Umweltbedingungen. Durch die Anpassung der Genexpression an diese Bedingungen ist sowohl ein Vorkommen bei nahezu neutralem pH-Wert im Blut (7,4) als auch bei basischem oder saurem pH-Wert (pH-Wert 4-5 im Vaginalkanal) möglich [Calderone *et al.* 2001]. Als Teil der normalen Standortflora bei gesunden Personen findet man *Candida* in der Mundhöhle (bei 30-45 % der gesunden Erwachsenen) [Lucas 1993 Bernhardt 1996], im Gastrointestinaltrakt, im Vaginalkanal und Rektum.

Diese endogene Spezies ist ein opportunistisches Pathogen. Das heißt, sie ruft nur bei Personen Erkrankungen hervor, deren Immunsystem geschwächt ist, oder deren Standortflora durch Breitspektrumantibiotika oder durch Zerstörung normaler Barrieren verändert ist. Entscheidend ist zudem die Quantität, denn erst eine verstärkte Kolonisation ermöglicht bei Resistenzminderung des Wirtes invasives Wachstum und Infektion [Blaschke-Hellmessen 1999, Schauer *et al.* 1999]. Die Infektionen reichen von oberflächlichen Hautinfektionen bis zu lebensbedrohlichen disseminierten Mykosen. Ein häufiger klinischer Befund ist die orale Candidiasis. Bei 95 % der HIV-Erkrankten kann *C. albicans* in der Mundhöhle nachgewiesen werden [Dupont *et al.* 1992].

Voraussetzung für Humanpathogenität und Virulenz von *C. albicans* ist nicht nur das Wachstum bei 37 °C und die Anpassungsfähigkeit vor allem an pH-Wert-Schwankungen, sondern zusätzlich die Produktion von proteolytischen und lipolytischen Enzymen sowie die Fähigkeit an humanen Epithel- und Endothelzellen via Adhäsion zu haften [Chaffin *et al.* 1998, Calderone *et al.* 2001]. Von entscheidender Bedeutung für die Adhäsion planktonischer Zellen an Oberflächen ist die Bildung von mikrobiellen Lektinen (zuckerbindende Proteine), die bei der Pilzadhäsion als Adhäsine bekannt sind [Vitkov *et al.* 2002]. Die Oberflächenmoleküle, die die Adhäsion auf Gewebe ermöglichen, enthalten einen Rezeptor, der homolog zum humanen CR3-Integrin, an Aminosäuren in Fibrinogen, Fibronectin, Laminin und an Kohlenhydratresten auf Epithelzellen binden kann. Zusätzlich ist die Bindung an Kollagen Typ I und Typ IV möglich [Chaffin *et al.* 1998]. Von einigen Autoren wurde die Fähigkeit von *C. albicans* beschrieben, an Bakterien wie Aktinomyzeten oder *Fusobacterium nucleatum* zu binden und somit die Plaquebildung und die Kolonisation der Mundschleimhaut und der Zahnhartgewebe zu fördern [Bagg *et al.* 1986, Holmes *et al.* 1995].

Voraussetzung für die Fähigkeit zur Gewebeinvasion ist die Expression von lytischen Enzymen wie sekretorische Aspartatprotease, Lipase, Kollagenase, Aminopeptidase, Glucosaminidase, saure und alkalische Phosphatase, Hyaluronidase und Chondroitinsulfatase. *C. albicans* ist nicht nur in der Lage an Kollagen Typ I und IV zu binden, sondern auch, durch ein kollagenolytisches Enzym, menschliches Dentin zu zersetzen [Hagihara *et al.* 1988]. Die Veränderung der Morphologie vom Blastosporen- zum Myzel- und Hyphenstadium (Polymorphismus) wird ebenso als Virulenzfaktor betrachtet. Die Transformation vom Blastosporen- zum Hyphenstadium wird häufig im Zusammenhang mit der Entwicklung vom kommensalen zum pathogenen Organismus beschrieben. Hyphen dringen in Gewebe ein und entziehen sich der Abwehr durch Makrophagen [San-Blas *et al.* 2000]. Eine Darstellung der pathogenen Eigenschaften zeigt Abbildung 1 [Calderone *et al.* 2001].

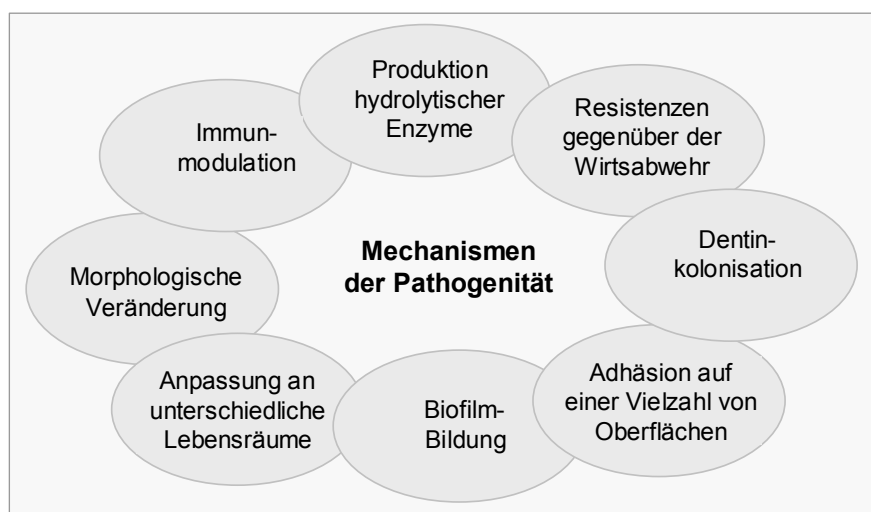


Abb. 1: Virulente Eigenschaften von *Candida albicans* (nach Calderone und Fonzi 2001).

Bei etablierten Infektionen mit *C. albicans* findet man keine planktonischen Zellen (freie einzelne Zellen in Flüssigkeit), sondern vielmehr adhärenente Zellen, die ebenso eine interzelluläre Adhäsion aufweisen. Diese als Biofilm bezeichnete organisierte Zellpopulation aus Blastosporen und Hyphen ist in eine selbstproduzierte extrazelluläre Polysaccharidmatrix eingebettet [Donlan *et al.* 2002]. Die Zellen in Biofilmen unterscheiden sich von den planktonischen Zellen durch höhere Resistenzen gegenüber Medikamenten und dem Immunsystem [Chandra *et al.* 2001, Blankenship *et al.* 2006]. So sind fungizide Medikamente wie Fluconazol und Amphotericin B gegen *Candida*-Biofilme 30-2000fach weniger effektiv als gegen planktonische Zellen [Hawser *et al.* 1995].

Für *C. albicans* wurde die Bildung von Biofilmen detailliert beschrieben [Chandra *et al.* 2001, Ramage *et al.* 2001, Blankenship *et al.* 2006]. Allerdings widersprechen sich die

Aussagen zum Teil und sie sind vor allem in Bezug auf die Angaben zum Zeitraum, den *Candida*-Zellen zur Formation eines Biofilms benötigen, sehr unterschiedlich (Stunden bis Wochen). Zudem wurden jeweils andere Oberflächen und Nährmedien genutzt. Eine Beschreibung der Formation und des Aufbaus von *Candida*-Biofilmen auf Acryloberflächen und Polymethylmethacrylat-Scheiben liefert eine In-vitro-Studie durch mikroskopische colorimetrische Untersuchungen [Ramage *et al.* 2001] (Tabelle III).

Tab. III: Entwicklung von *Candida albicans*-Biofilmen auf Acryloberflächen [Ramage *et al.* 2001]

Zeit (in Stunden)	Stadium
0 - 2	Initiale Adhäsion der Blastosporen
2 - 4	Germination und Mikrokolonie-Bildung
4 - 6	Filamentation, Hyphenbildung
6 - 8	Monolayer-Bildung
8 - 24	Proliferation
24 - 48	Maturation

Bei mikrobiologischen Untersuchungen von infizierten Wurzelkanälen ist *C. albicans* die am häufigsten isolierte Pilzart [Siqueira *et al.* 2004]. Es besteht eine Korrelation mit dem Vorkommen im Speichel; es wurden signifikant häufiger Pilzspezies aus Wurzelkanälen isoliert, wenn diese ebenfalls im Speichel der Patienten nachzuweisen waren [Egan *et al.* 2002]. *C. albicans* ist zur Invasion und Kolonisation von Dentin fähig [Sen *et al.* 1997], für andere *Candida*-Spezies (*C. glabrata*, *C. guilliermondi*, *C. parapsolis*, *C. cerevisia*) konnte diese Fähigkeit nicht nachgewiesen werden [Siqueira *et al.* 2002]. In-vitro-Untersuchungen von Rinderdentinproben, die mit verschiedenen *Candida*-Spezies infiziert wurden, zeigten, dass *C. albicans* in Dentinkanälchen penetrierte und diese besiedelte [Siqueira *et al.* 2004]. *In vitro* wurde eine Eindringtiefe der Hefezellen und Hyphen in humanes Dentin von 60 µm nachgewiesen [Waltimo *et al.* 2000]. Anatomische Grundlage ist der Aufbau des mineralisierten Hartgewebes Dentin aus von Odontoblasten mit ihren Fortsätzen gebildeten Dentinkanälchen. Diese werden während der Dentinogenese zunehmend verlängert und weisen die Form langer Röhren auf, deren Durchmesser in Pulpanähe durchschnittlich 2,9-5,2 µm beträgt [Garberoglio *et al.* 1976]. Blastosporen sind 1-6 µm groß, Hyphen weisen einen Durchmesser von 1,9-2,6 µm auf [Sevilla *et al.* 1986].

Eine weitere Untersuchung zeigte, dass die Penetrationstiefe der Pilzzellen ins Dentin geringer war, wenn eine Schmierschicht die Öffnung der Dentinkanälchen verschloss. In diesem Fall konnte allerdings ein Biofilm auf der Oberfläche nachgewiesen werden, die Adhäsion der Pilzzellen war gefördert durch freiliegende organische Bestandteile

[Sen *et al.* 1997]. Manche Autoren bezeichnen *C. albicans* als dentinophilen Mikroorganismus [Sen *et al.* 1997].

2.3 Desinfektion des Wurzelkanalsystems

2.3.1 Spülung des Wurzelkanals

Die Verwendung von Spüllösungen während der Aufbereitung der Wurzelkanäle hat folgende Ziele: Die Elimination von Mikroorganismen aus dem Wurzelkanalsystem, die Auflösung und Entfernung von Material (Zelltrümmer, Pulpareste, nekrotisches Gewebe, Dentinspäne) sowie die Unterstützung der mechanischen Aufbereitung. Aufgrund dieser Anforderungen werden bakterizide und gewebeauflösende Eigenschaften der Spüllösungen, geringe Oberflächenspannung sowie biologische Verträglichkeit gefordert [2006].

Natriumhypochlorit (NaOCl) in Konzentrationen zwischen 0,5 und 5,25 % gilt als Spüllösung der ersten Wahl. Es verfügt über gewebeauflösende Eigenschaften [Andersen *et al.* 1992] und eine antimikrobielle Wirkung auf die Mehrzahl der endodontisch relevanten Keime [Bystrom *et al.* 1985]. Die oxidierende und bleichende Wirkung des basischen Natriumhypochlorits (NaOCl 5,25 %: pH-Wert 12,12) beruht auf dem Gehalt an HOCl-Molekülen. Freie OH⁻, Cl⁻ und OCl⁻-Ionen wirken korrodierend. Beim Kontakt mit organischem Material wird NaOCl durch den Zerfall in Na⁺- und Cl⁻-Ionen inaktiviert, wobei nekrotisches und vitales Gewebe aufgelöst wird. Von Bedeutung ist zudem das Vermögen Endotoxine (Lipopolysaccharide) aufzulösen [Buttler *et al.* 1982].

Chlorhexidin (CHX) ist ein kationisches Bis-guanid, ein lipophiles Molekül, das mit negativen Phosphatgruppen und Lipopolysacchariden auf bakteriellen Zellmembranen interagiert. Dadurch wird deren Permeabilität erhöht und der Wirkstoff dringt in die Zellen ein. Wenn dieser mit cytoplasmatischen Komponenten präzipitiert, wird der Zelltod verursacht. Eine weitere vorteilhafte Eigenschaft des CHX ist dessen Substantivität am Dentin [Kanisavaran 2008] bei guter Bioverträglichkeit. Die Substantivität entsteht durch die Bindung an Hartgewebe und der Abgabe reaktiver Bestandteile über den Zeitraum der Applikation hinaus.

Die Verwendung von Chlorhexidindigluconat (CHX, Wirkstoff Chlorhexidin) als Spüllösung gewinnt an Bedeutung, denn obwohl es weder gewebeauflösend wirkt, noch Endotoxine zu neutralisieren vermag, verfügt es über entscheidende Eigenschaften: Es zeigt in Konzentrationen zwischen 0,2 und 2 % antimikrobielle

Wirkung vor allem gegen grampositive Keime (wie Enterokokken) und Pilze [Emilson 1977, Waltimo *et al.* 1999, Siqueira *et al.* 2003]. Somit wird es als finale Zusatzspülung empfohlen, um eine Wirkung gegen Keime zu erzielen, die gegen NaOCl resistent sein können [2006]. Wenn die Entfernung der Schmierschicht gefordert ist, ist der Einsatz von NaOCl oder CHX nicht ausreichend, statt dessen werden Zitronensäure oder chelatbildende Stoffe wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) benutzt [Fraser 1974]. Für die Kombination von NaOCl (5 %) und EDTA (10 %) wurde eine bakterizide Wirksamkeit bis in 130 µm tiefe Dentinschichten nachgewiesen [Berutti *et al.* 1997]. Gegenüber *C. albicans* wurde eine fungizide Wirkung von NaOCl [Radcliffe *et al.* 2004] und von verschiedenen Autoren auch von CHX gezeigt [D'Arcangelo *et al.* 1999, Radcliffe *et al.* 2004, Vianna *et al.* 2004, Ruff *et al.* 2006]. CHX-Lösung und CHX-Gel (je 2 %) töteten Zellen von *C. albicans* bei direktem Kontakt innerhalb von 15 Sekunden [Vianna *et al.* 2004].

2.3.2 Medikamentöse Einlagen

Medikamentöse Einlagen zwischen den Behandlungssitzungen kommen zum Einsatz um die Keimreduktion zu optimieren. Eine Literaturübersicht zeigte, dass nach chemomechanischer Aufbereitung noch bei 62 % und nach zusätzlicher medikamentöser Einlage noch bei 27 % der Wurzelkanäle Bakterienwachstum nachzuweisen war [Law *et al.* 2004]. Das bekannteste Medikament ist Kalziumhydroxid ($\text{Ca}(\text{OH})_2$). Es ist ein seit den 1920er Jahren vielseitig eingesetzter, etablierter Wirkstoff in der Zahnheilkunde. In der reinen Form hat es einen alkalischen pH-Wert von 12,5. Es wirkt antibakteriell [King *et al.* 1965] und besitzt die Fähigkeit, die Mineralisation von Knochen und Dentin zu fördern [Foreman *et al.* 1990]. Der Wirkmechanismus basiert auf der Dissoziation von Hydroxylionen (OH^-) im wässrigen Milieu, die in der anionischen Form als Radikale bakterizide Wirkung haben. Diese erfolgt über die Zerstörung der bakteriellen Zellwand, die Proteindenaturierung und DNA-Schädigung. Wenn Hydroxylionen durch Reaktion verbraucht werden, wird Kalziumhydroxid gelöst und erneut dissoziierte Ionen lassen die Wirkung anhalten. Diese kann sich *in vitro* bis in 130 µm tiefes Dentin erstrecken [Haapasalo *et al.* 1987], da Hydroxylionen in Dentin einzudringen vermögen [Nerwich *et al.* 1993]. Es gibt allerdings Hinweise, dass Dentin durch dessen Pufferkapazität die antibakterielle Wirkung von Kalziumhydroxid inaktivieren kann [Haapasalo *et al.* 2000].

Der pH-Wert selbst ermöglicht zudem nur wenigen Mikroorganismen das Überleben; *C. albicans* jedoch tolerierte *in vitro* pH-Werte bis 12,5 [Brandle *et al.* 2008].

In-vitro-Studien zur Wirksamkeit von Kalziumhydroxid gegenüber *C. albicans* unterscheiden sich in Fragestellung, Versuchsaufbau sowie Ergebnis, so dass sich ein einheitliches Fazit nicht formulieren lässt (Tabelle IV). Allerdings wurde für die Kombination von Kalziumhydroxid mit anderen Wirkstoffen sowie für die Anwendung von CHX oder EDTA häufig eine höhere Wirksamkeit nachgewiesen [Sen *et al.* 2000, Siqueira *et al.* 2003, Menezes *et al.* 2004].

Tab. IV: *In-vitro*-Studien zur Wirksamkeit von Kalziumhydroxid und anderen Wirkstoffen gegenüber *C. albicans*

Studie	Untersuchte Wirkstoffe	Untersuchungsmethode	Studienergebniss
[Sen <i>et al.</i> 1999]	a) Chlorhexidin (0,12 %) b) Natriumhypochlorit (1 %) c) Natriumhypochlorit (5 %)	Künstlich infizierte Wurzelkanäle, Nachweis durch Kultur ¹⁾	a),b),c) <i>C. albicans</i> resistenter, wenn eine Schmierschicht vorliegt
[Sen <i>et al.</i> 2000]	a) EDTA b) Nystatin c) Ketoconazol d) Chlorhexidinglukonat (1,5 %) e) NaOCl (5 %)	Agar-Diffusionstest	a) höchste Wirksamkeit durch Beeinflussung der Adhäsion und des Wachstums
[Valera <i>et al.</i> 2001]	a) CPMC ²⁾ b) Kalziumhydroxid in Glycolpolyethylen c) Kalziumhydroxid in CPMC d) NaOCl	Künstlich infizierte Wurzelkanäle, Nachweis durch Kultur	Anzahl negativer Zellnachweise: a) 100 % b) 30 % c) und d) 70 %
[Ferguson <i>et al.</i> 2002]	a) NaOCl b) Wasserstoffperoxid c) Chlorhexidinglukonat d) Kalziumhydroxidpaste e) Kalziumhydroxid in wässriger Lösung	Direkter Kontakt mit <i>C. albicans</i> , Nachweis durch Kultur und MIC ³⁾	Kalziumhydroxidpaste bei direktem Kontakt effektiv, e) keine Wirksamkeit
[Siqueira <i>et al.</i> 2003]	a) Kalziumhydroxid/ Glycerin-Paste b) Kalziumhydroxid in CPMC/Glycerin c) Kalziumhydroxid in Glycerin d) Chlorhexidin e) Chlorhexidin/Zinkoxid	Experimentell infizierte bovine Dentinzyylinder, Nachweis durch Kultur	a) Es wurden nach 7 Tagen keine Zellen mehr nachgewiesen b)-e) Es wurden nach 1 Stunde keine Zellen mehr nachgewiesen
[Menezes <i>et al.</i> 2004]	a) CPMC b) Kalziumhydroxid c) Kalziumhydroxid in CPMC d) NaOCl 2,5 % e) CHX 2 %	Künstlich infizierte Wurzelkanäle, Nachweis durch Kultur	Kalziumhydroxid in CPMC signifikant effektiver als Kalziumhydroxid
[Brandle <i>et al.</i> 2008]	a) Kalziumhydroxid in direkter Exposition (100 min, pH 12,5)	Planktonische und Biofilmmzellen, Nachweis durch Kultur	Planktonische und sessile Zellen waren resistent

¹⁾ Kultur: Anzuchtverfahren auf Nährmedien, ²⁾ CPMC: Camphorated paramonochlorophenol,

³⁾ MIC: Minimale inhibitorische Konzentration

Klinische Untersuchungen zeigten, dass die Mikroorganismen im Wurzelkanalsystem nach siebentägiger Applikation einer Kalziumhydroxideinlage effektiv eliminiert wurden

[Sjogren *et al.* 1991]; allerdings wurde nach vierwöchiger Kalziumhydroxidapplikation die Zunahme der Bakterienanzahl beobachtet [Peters *et al.* 2002]. Zwei Reviews klinischer Studien konnten zeigen, dass durch die Applikation von medikamentösen Einlagen die Bakterienzahl verringert werden kann [Law *et al.* 2004]. Allerdings kann anhand kulturmikrobiologischer Nachweise nicht davon ausgegangen werden, dass Kalziumhydroxid vorhandene Bakterien in humanen Wurzelkanälen vollständig eliminiert [Sathorn *et al.* 2007]. In Bezug auf die Erfolgsrate endodontischer Therapien zeigten verschiedene klinische Studien keinen Vorteil durch die Verwendung von Kalziumhydroxid als medikamentöse Einlage [Weiger *et al.* 2000, Peters *et al.* 2002, Waltimo *et al.* 2005].

Einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von persistierenden apikalen Parodontitiden und dem Nachweis von *C. albicans* in den betroffenen Wurzelkanälen sehen manche Autoren [Waltimo *et al.* 1999, Siqueira *et al.* 2004] aufgrund der Ergebnisse verschiedener In-vitro-Studien bestätigt, die die Ineffektivität von Kalziumhydroxid gegenüber *C. albicans* sowie verschiedenen gram-positiven Kokken zeigten [Stevens *et al.* 1983, Haapasalo *et al.* 1987, Waltimo *et al.* 1999].

2.4 Laser

2.4.1 Physikalische Grundlagen

Per Definition bedeutet Laser die Lichtverstärkung durch stimulierte Emission von Strahlung, wobei das Wort Laser ein Akronym für „Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation“ ist. Bei dieser physikalischen Methode wird durch induzierte Emission von Atomen im Lasermedium ein Lichtstrahl mit extrem hoher Energiedichte erzeugt. Voraussetzung für die Auslösung eines Laserprozesses ist ein Lasermedium, welches charakteristisch für den Laser ist. Es werden Festkörper-, Gas-, Dioden- oder Flüssigkeitslaser unterschieden [Pierce 1997, Steiner *et al.* 1999]. Praktisch erreicht wird dieser Prozess, indem das mittels elektrischer Leistung einer Blitzröhre erzeugte Licht im Lasermedium mithilfe von Spiegeln hin und her gepumpt wird. Wenn es vielfach verstärkt ist, wird es durch eine Sammellinse fokussiert als Laserstrahl genutzt. Die Betriebsart des Lasers bestimmt die Form, in der das Laserlicht abgegeben wird. Man unterscheidet kontinuierliche (cw: continuous wave), getaktete, gepulste und gütegeschaltete Leistungsabgabe [Steiner *et al.* 1999].

2.4.2 Laser in der Zahnmedizin

Seit 1960 von Th. H. Maiman in den USA der erste funktionstüchtige Laser konstruiert wurde, findet die Lasertherapie in der Zahnheilkunde wissenschaftliches und klinisches Interesse. Dieser erste Festkörper-Rubinlaser wurde bereits vier Jahre später experimentell zur Kariestherapie eingesetzt [Goldman *et al.* 1964]. Seitdem hat die Technologie der Laser- und Applikationssysteme eine deutliche Entwicklung erfahren, wobei vor allem in der Weichgewebe-Chirurgie gesicherte wissenschaftliche Erkenntnisse und langjährige klinische Erfahrungen vorliegen. Hier haben der CO₂-, der Nd:YAG- und der Diodenlaser ihre Hauptindikation. Andere Einsatzgebiete sind die lasergestützte Kariesdiagnostik, die Präparation von Zahnhartsubstanz sowie die Parodontaltherapie mit dem Er:YAG-Laser. Je nach Anwendungsbereich kommen unterschiedliche Laser mit den für sie typischen Wellenlängen zum Einsatz, da die Wellenlänge des emittierten Lichtes die Absorption im Gewebe und entsprechend die Eindringtiefe der Laserstrahlen bestimmt [Steiner *et al.* 1999]. Der erste in der Endodontie getestete Laser war ein CO₂-Laser zum Verschluss des apikalen Foramens [Weichman *et al.* 1971].

Die Form der biophysikalischen Interaktion zwischen Laser und Gewebe bestimmen die Wellenlängen der Laserstrahlen, die Einstellungen des Lasers sowie das Gewebe selbst. Bei der Bestrahlung von Gewebe wird das Licht reflektiert, remittiert, im Gewebe gestreut oder absorbiert. Je höher die Absorption, desto tiefer die Eindringtiefe des Lichtes und umfangreicher die thermischen Begleiterscheinungen. Einfluss darauf hat der Absorptionskoeffizient und Wärmeleitkoeffizient des Gewebes sowie das Umgebungsmedium. Damit ein biologischer Effekt eintritt, muss die Energie absorbiert werden. Wenn die Wellenlänge des Lasers mit dem Absorptionsspektrum einer Gewebekomponente übereinstimmt, tritt ein vorhersehbarer Effekt ein. Dieser kann eine chemische, thermische oder ionisierende Wirkung oder ein nichtlinearer Effekt sein. Die thermischen Effekte sind Photohyperthermie (37-60 °C), Photokoagulation (60-100 °C), Photokarbonisation (100-400 °C) und Photovaporisation (>400 °C). Mit nichtlinearen Effekten werden Photoablation und Photodisruption bezeichnet, also der thermomechanische Abtrag von Gewebe [van Hillegersberg 1997].

So hängt der erzielte Effekt auf der Dentinoberfläche von der Art der Laserbestrahlung (Wellenlänge, Emissionsmodus, Energiestärke, Pulsation und Potenz), von der eingesetzten Kühlung (Wasser oder Luft, keine Kühlung) und dem Bestrahlungswinkel ab. Zahlreiche mikroskopische Untersuchungen zeigen für die verschiedenen Laser die

unterschiedlichsten morphologischen Veränderungen im Dentin: Die Schmierschicht kann durch CO₂- und Nd:YAG-Laser entfernt werden [Kimura *et al.* 2000]; die Dentinpermeabilität kann durch das Eröffnen der Dentinkanälchen erhöht werden (Er:YAG-Laser) oder durch den Verschluss der Kanälchen (durch Verschmelzung der Oberfläche) herabgesetzt werden (CO₂-, Nd:YAG-Laser) [Miserendino *et al.* 1995].

Die bakterizide Wirkung von Laserstrahlen wird durch Erhitzung und Verdampfung der intrazellulären Flüssigkeit und das Zerplatzen der Bakterienzellen erzielt [Mehl *et al.* 1999]. Antibakterielle Effekte der verschiedenen Laser im Dentin sind auf unterschiedlichste Art untersucht: Die Bestrahlung mit Nd:YAG-Laser von künstlich beimpften Wurzelkanälen erzielte bei planktonischen Zellen von *E. faecalis* eine Abtötung von 99,7 %, allerdings keine Sterilisation [Bergmans *et al.* 2006]. Bei *Actinomyces naeslundii* und *Streptococcus anginosus* konnten keine Zellen mehr nachgewiesen werden. Liegen bakterielle Biofilme vor, kann die Laserbestrahlung Zellen bis in tiefere Zellschichten töten [Bergmans *et al.* 2006], allerdings sind diese Zellen selbst bei direkter Exposition schwieriger zu eliminieren. Für den Er:YAG-Laser ist gegenüber *E. faecalis* eine mediane Reduktion der Bakterienzahl um 10² CFU/ml gezeigt worden, wenn dieses Bakterium drei Tage in humanen Wurzelkanälen inkubiert wurde [Noetzel *et al.* 2009]. Andere Studien zeigen eine höhere Effektivität gegen *E. faecalis* im Wurzelkanal (Keimzahlreduktion um 10³) [Schoop *et al.* 2006], für den Diodenlaser sogar eine vollständige Desinfektion [de Souza *et al.* 2008].

Gegenüber *C. albicans* liegen Untersuchungen mit dem Er:YAG- und Diodenlaser vor: *In vitro* wurde in einem Biofilm-Modell auf Glas- und Titanoberflächen eine signifikant höhere Reduktion nach Laserbestrahlung im Vergleich zu nicht bestrahlten Proben nachgewiesen. Hier wurde eine höhere Wirksamkeit für den Er:YAG-Laser gezeigt, unabhängig von direkter oder indirekter Bestrahlung. Mit dem 810 nm-Diodenlaser war die Bestrahlung bei direktem Kontakt gegen *C. albicans* effektiver, bei indirekter Bestrahlung zeigte sich kein Einfluß auf den Biofilm [Sennhenn-Kirchner *et al.* 2009].

2.4.3 Diodenlaser

Die Wellenlängen von Diodenlasern liegen im nahen Infrarotspektrum (810-980 nm). Das erzeugte Licht kann mit flexiblen Glasfasern (Durchmesser: 200/300 µm) weitergeleitet werden, dies ermöglicht den Einsatz im Wurzelkanal. Bislang gibt es wenig Studienergebnisse zum Einfluss der Bestrahlung mit dem 980 nm-Diodenlaser auf die Wurzeldentinmorphologie und zu dessen bakteriziden Wirkung im Dentin. Die

Untersuchung von Rinderdentinproben verschiedener Schichtdicken zeigte für den Diodenlaser mit 980 nm Wellenlänge bei kontinuierlicher Bestrahlung eine Reduktion der Bakterienzahl um 95 % (1,75 W) bis 97 % (2,8 W) bei 100 µm Dentin, bei 500 µm Dentin wurde eine Reduktion um 57 % (1,75 W) und 86 % (2,8 W) erzielt [Gutknecht *et al.* 2004]. Bovine Dentinproben, die einseitig mit *E. faecalis* besiedelt wurden, zeigten bei Bestrahlung von der anderen Seite in einer Probendicke von 500 µm eine Keimreduktion um 74 % [Gutknecht *et al.* 2000], bei 1 mm dicken Proben eine mittlere Keimzahlreduktion von 10^3 [Schoop *et al.* 2006]. Die Untersuchung humaner Dentinproben, die mit *E. faecalis* infiziert wurden, zeigte sogar eine komplette Desinfektion bis in 1 mm tiefe Dentinschichten nach chemomechanischer Aufbereitung und Bestrahlung mit einem 830 nm-Diodenlaser [de Souza *et al.* 2008].

Abhängig von der Energiestärke und dem Emissionsmodus sowie zuvor verwendeter Spüllösungen (H₂O, NaOCl, EDTA), wiesen Dentinoberflächen, die mit einem 980 nm-Diodenlaser bestrahlt wurden, die Entfernung der Schmierschicht bis zur Verschmelzung (Karbonisation) der Oberfläche auf [Alfredo *et al.* 2009]. Bei künstlich infizierten Wurzelkanälen wurde nach Bestrahlung mit einem 810 nm-Diodenlaser der Verschluß der Dentinkanälchen, kein positiver Bakteriennachweis sowie ein Temperaturanstieg auf der äußeren Wurzeloberfläche von 6 °C beobachtet [Moritz *et al.* 1997]. Für den 810 nm-Diodenlaser wurde bei Bestrahlung des Wurzelkanals (10 s, 0,6-1 W cw) kein kritischer Temperaturanstieg über 7 °C auf der äußeren Wurzeloberfläche festgestellt [Gutknecht *et al.* 2005].

Grundlegende Probleme der Anwendung von Laserstrahlen im Wurzelkanal entstehen durch die Topographie, die eine direkte Bestrahlung nicht ermöglicht und dadurch die Effektivität herabsetzen kann. Die Bestrahlung mit einem 810 nm-Diodenlaser war bei direktem Kontakt gegen *C. albicans* signifikant effektiver als bei indirekter Bestrahlung [Sennhenn-Kirchner *et al.* 2009].

2.5 Ozon

2.5.1 Chemische Grundlagen

Ozon ist ein dreiatomiges Sauerstoffmolekül (O₃; Trisauerstoff). Es ist je nach Konzentration ein farbloses bis blaues, äußerst giftiges Gas bzw. eine dunkelblaue Flüssigkeit mit einem Schmelzpunkt von -192,5 °C und einem Siedepunkt von -111,9 °C. Ozon ist wasserlöslich und zerfällt spontan in ein Sauerstoffmolekül und ein

Sauerstoffradikal ($O_3 \rightarrow O_2 + \frac{1}{2} O_2$; $Q = -284$ kJ). Es gilt als das stärkste Oxidationsmittel [Broadwater *et al.* 1973], wobei sich seine elektrophilen Moleküle durch selektive Reaktivität auszeichnen.

Die bakterizide Wirkung basiert auf einer Oxidation durch die Sauerstoffradikale. Zellwände von Mikroorganismen und zytoplasmatischen Membranen sowie die Sulfhydryl- und Aminogruppen in bakteriellen Enzymen werden durch irreversible Oxidation inaktiviert [Dyas *et al.* 1983]. Zusätzlich werden verschiedene Moleküle zerstört, die Bakterien als Nahrung dienen oder die in der Matrix von bakteriellen Biofilmen enthalten sind.

2.5.2 Ozon in der Zahnmedizin

Ozon wird aufgrund seiner bakteriziden, fungiziden und virusinaktivierenden Eigenschaften in der Medizin und Trinkwasserhygiene zur Desinfektion angewendet [Kim *et al.* 1999]. Nach seiner Entdeckung 1839 durch den Chemiker C. F. Schönbein dauerte es fast 100 Jahre, bis Ozon in der Zahnmedizin zum Einsatz kam. Der Einsatz von Ozon in der Medizin ist dagegen etabliert, zum einem als direktes Therapeutikum bei externen Ulzera und Hautläsionen, zur Blutgerinnung sowie zur Therapie von Infektionen oder Tumorerkrankungen. Zum anderen wird es zur Dekontamination von medizinischen Instrumentarien, Geräten und Räumen eingesetzt [Dyas *et al.* 1983, Berrington *et al.* 1998].

In der Zahnmedizin beschäftigte sich E. A. Fisch seit 1934 intensiv mit der Ozon-Behandlung gangränöser Wurzelkanäle. Später wurde der Einsatz bei Periimplantitis [Sandhaus 1969], Wurzelkaries [Baysan *et al.* 2005], endodontischen Infektionen und zur Sterilisation von Dentaleinheiten untersucht. Derzeit kann die Begasung mit Ozon zur Desinfektion von Kavitäten und Wurzelkanälen, bei Mineralisationsstörungen, vor Fissurenversiegelungen, bei frühkindlicher Karies oder bei Wurzelkaries eingesetzt werden [Huth *et al.* 2005]. Bei kariösen Läsionen konnte durch die Begasung mit Ozon in Kombination mit der Verwendung eines Remineralisationskits eine Arretierung in einem Versuchszeitraum von 12 Monaten festgestellt werden [Holmes 2003, Huth *et al.* 2005].

Der Einsatz von Ozon in der Endodontie ist bislang wenig untersucht und wirft nicht nur die Frage nach der Effektivität im Wurzelkanal auf, sondern zusätzlich nach der Biokompatibilität und der Auswirkung auf apikale Gewebe. Der Einfluß von Ozon auf die Vitalität humaner Zellen und deren Wachstum bzw. Teilungsfähigkeit wurde

exemplarisch an Zementblasten und Fibroblasten frisch extrahierter Zähne untersucht. Eine zweiminütige Applikation von ozoniertem Wasser zeigte keine Zytotoxizität [Ebensberger *et al.* 2002]. Der Einfluss von ozoniertem Wasser auf Mäusefibroblasten hatte ebenfalls keine schädigende Wirkung [Nagayoshi *et al.* 2004]. Bei der Untersuchung von Implantatoberflächen konnte sogar ein stimulierender Effekt auf die Regeneration von umgebenden Geweben festgestellt werden [Matsamura *et al.* 2002]. Zur Wirksamkeit der Ozonapplikation gegen Mikroorganismen endodontischer Infektionen liegen wenige, zum Teil widersprüchliche Daten vor. So wurden *in vitro* geringe antibakterielle Effekte von ozoniertem Wasser und gasförmigem Ozon bei planktonischen Zellen von *E. faecalis* und nahezu keine Effekte nachgewiesen, wenn die Zellen in Biofilmen organisiert sind [Hems *et al.* 2005].

Hingegen zeigten andere Studien eine deutliche Keimzahlreduktion bei Besiedlung von *E. faecalis* auf bovinem Dentin [Nagayoshi *et al.* 2004], bzw. eine mediane Keimzahlreduktion um vier Zehnerpotenzen bei alleiniger Behandlung mit gasförmigem Ozon bei einer Monoinfektion mit *E. faecalis* im Wurzelkanal [Noetzel *et al.* 2009]. Im Vergleich zur Behandlung mit steriler Kochsalzlösung zeigte sich in künstlich infizierten Wurzelkanälen eine signifikant höhere Keimzahlreduktion von *C. albicans* und *E. faecalis* durch Behandlung mit ozoniertem Wasser, allerdings ohne langanhaltende Wirkung; nach sieben Tagen wurden höhere Keimzahlen festgestellt [Cardoso *et al.* 2008]. In derselben In-vitro-Studie zeigte sich keine Wirkung gegenüber Endotoxinen von *Escherichia coli*. Eine weitere Studie zeigte eine dosisabhängige Wirkung von gasförmigem Ozon [Huth *et al.* 2009]; hier wurden Zellen von *C. albicans* nach dreiwöchiger Anzucht im Wurzelkanal durch die Applikation von gasförmigem Ozon (1 g/m^3) nach 2,5 Minuten bzw. nach einer Minute bei höherer Konzentration (53 g/m^3) vollständig eliminiert.

3 Fragestellung

Ziel einer endodontischen Therapie ist es, einerseits keine teilungsfähigen Mikroorganismen im Wurzelkanalsystem zu belassen und andererseits ein erneutes Eindringen von Bakterien zu verhindern. Durch chemomechanische Aufbereitung und medikamentöse Einlagen wird eine deutliche Reduktion der Keimzahlen erreicht [Law *et al.* 2004], jedoch keine Keimfreiheit. In klinischen Studien wurde die Erfolgsrate durch die Anwendung von Kalziumhydroxid nicht positiv beeinflusst [Weiger *et al.* 2000, Peters *et al.* 2002]. Für diesen klassischen Wirkstoff sind zum Teil widersprüchliche Ergebnisse zur Wirksamkeit gegenüber *C. albicans* beschrieben worden [Siqueira *et al.* 2003, Brandle *et al.* 2008]. Diese Pilzspezies wurde häufig bei refraktären Fällen nachgewiesen [Siqueira *et al.* 2004].

Um die Erfolgsrate endodontischer Behandlungen weiter zu verbessern, sind neue Strategien zur Desinfektion des Wurzelkanalsystems erforderlich, die auch bei der Keimzahlreduktion von Problemkeimen effektiv sind. Diese sollten die Behandlung in einer Sitzung ermöglichen, um zugleich das Risiko von Rekontaminationen zu verringern.

Das Ziel dieser In-vitro-Studie war, die Wirksamkeit der Bestrahlung mit einem Diodenlaser und von gasförmig appliziertem Ozon gegenüber Monospezies-Biofilmen von *Candida albicans* in humanen Wurzelkanälen zu untersuchen, bei alleiniger Behandlung oder in Kombination mit chemomechanischer Aufbereitung. Zugrunde liegt die Annahme, dass die bakterizide Wirkung des Diodenlasers bis ins Dentin reicht [Moritz *et al.* 1997, Gutknecht *et al.* 2000]. Die Applikation von gasförmigem Ozon mit erwiesenem Desinfektionspotential [Kim *et al.* 1999] ist besonders interessant im Hinblick auf schwer zugängliche Bereiche des Wurzelkanalsystems.

Die Arbeitshypothese dieser In-vitro-Studie besagte, dass die Bestrahlung mit dem Diodenlaser sowie die Applikation von gasförmigem Ozon höhere Keimzahlreduktionen bewirken als die medikamentösen Einlagen, vor allem in Kombination mit geeigneten Spüllösungen und daraus resultierenden synergistischen Effekten. Als Nullhypothese wurde angenommen, dass die Behandlungen gleichwertig sind, sowohl im Hinblick auf die Keimzahlreduktion im Wurzelkanal und im Dentin, als auch auf die Anzahl der negativen Nachweise von *C. albicans* nach der Behandlung.

4 Material und Methoden

4.1 Studiendesign

Im Rahmen der Hauptfragestellung wurden vier Behandlungen durchgeführt; dies ergab die Einteilung in die Untergruppen. In den Untergruppen 1 erfolgte die Bestrahlung mit dem Diodenlaser (GENTLEray 980; KaVo). In den Untergruppen 2 erfolgte die Applikation von gasförmigem Ozon (HealOzone; KaVo). Die siebentägige Einlage von wässriger Kalziumhydroxidpaste (UltraCal XS; Ultradent) erfolgte in den Untergruppen 3 sowie die siebentägige Einlage von Chlorhexidindigluconat-Gel (Chlorhexamed 1 % GEL, GlaxoSmithKline) in den Untergruppen 4. Jede dieser vier Behandlungen wurde in alleiniger Anwendung (Hauptgruppe 1) und in Kombination mit drei verschiedenen Begleittherapien (Hauptgruppen 2-4) untersucht, (zweifaktorielles Studiendesign). Insgesamt wurden somit 16 Studiengruppen gebildet (Tabelle V). Pro Studiengruppe wurde eine Probenzahl von 15 gewählt ($n = 15$); daraus resultierte eine Gesamtprobenzahl von 240.

Tab. V: Bezeichnung der Studiengruppen

		Hauptgruppe (n = 60)			
		1	2	3	4
Untergruppe (n = 15)		ohne Aufbereitung	Aufbereitung mit NaCl-Spülung	Aufbereitung mit NaOCl-Spülung	Aufbereitung mit CHX-Spülung
1	Laser	1.1	2.1	3.1	4.1
2	Ozon	1.2	2.2	3.2	4.2
3	Ca(OH) ₂	1.3	2.3	3.3	4.3
4	CHX-Gel	1.4	2.4	3.4	4.4

Vor Beginn der Versuchsreihe erfolgte in Hauptgruppe 1 die komplette Aufbereitung der Wurzelkanäle bis zur ISO-Größe 60 (MAF), während in den Hauptgruppen 2 bis 4 die Wurzelkanäle initial bis ISO-Größe 40 aufbereitet wurden (Flexmastersystem; VWD, München, Deutschland). Die komplette Aufbereitung (ISO-Größe 60) mit alternierender Spülung erfolgte hier während der Versuche: In Hauptgruppe 2 mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %; Apotheke der Charité), in Hauptgruppe 3 mit Natriumhypochlorit (NaOCl 1 %; Apotheke der Charité) und mit Chlorhexidindigluconat (CHX 0,2 %; Apotheke der Charité) in Hauptgruppe 4.

Die Untergruppen 3 und 4 dienten zusätzlich der positiven Kontrolle. Zur negativen Kontrolle der Studiengruppen dienten die ermittelten Keimzahlen der zuvor durchgeführten Wachstumsreihe über 21 Tage. Diese entsprechen derer ohne Therapie

im maximalen Versuchszeitraum (14 Tage Bebrütung plus 7 Tage medikamentöse Einlage). Tabelle VI zeigt den Ablauf der Studie.

Tab. VI: Ablauf der Studie

Hauptgruppe 1	Hauptgruppe 2	Hauptgruppe 3	Hauptgruppe 4
Reinigung Sterilisation Einbettung in Tubes			
Aufbereitung ISO 60 NaCl-Spülung	Initiale Aufbereitung ISO 40 NaCl-Spülung		
Sterilisation Einsatz von <i>Candida albicans</i> Inkubation			
Ausgangskeimzahl (CFU/ml)			
Keine weitere Aufbereitung	Vollständige Aufbereitung ISO 60		
	NaCl-Spülung	NaOCl-Spülung	CHX-Spülung
1.1	2.1	3.1	4.1
1.2	2.2	3.2	4.2
1.3	2.3	3.3	4.3
1.4	2.4	3.4	4.4
Endkeimzahl 1 (CFU/ml) Endkeimzahl 2 (CFU/mg Dentin)			

4.2 Vorbereitung der Versuchsproben

Die 240 Zähne wurden nach vollständiger Reinigung mit Ultraschallansätzen (SONICFlex, KaVo) mit Ethylenoxid sterilisiert (Herzzentrum der Charité). Sie wurden mit Diamantbohrern (Diamantbohrer Komet; Gebr. Brasseler, Lemgo, Deutschland) dekapitiert und auf eine einheitliche Länge von 19 mm gekürzt (Abbildung 2). Im Zeitraum zwischen den Bearbeitungsschritten wurden die Proben in physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %; Apotheke der Charité) gelagert. Die Aufbereitung der Wurzelkanäle erfolgte auf eine einheitliche Länge von 18 mm (Flexmaster System; VDW).

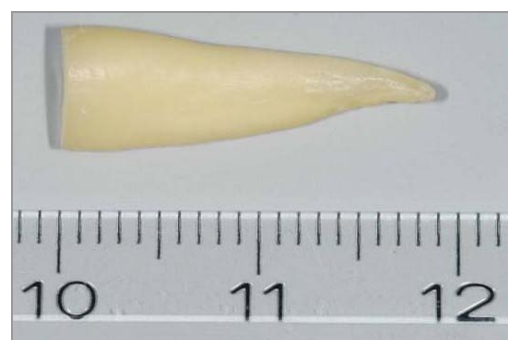


Abb. 2: Dekapitierter Zahn (19 mm)

Die Wurzelkanäle der Gruppe 1 sind zunächst im koronalen Bereich mit Gates Bohrern der ISO-Größen 150 und 130 erweitert worden (Gates Glidden Bohrer Größe 6 und 5; VDW), die der Gruppen 2 bis 4 mit den ISO-Größen 130 und 110 (Gates Glidden Bohrer Größe 5 und 4; VDW).

In den Proben der Gruppe 1 erfolgte dann eine vollständige Aufbereitung bis MAF ISO-Größe 60 (Flexmaster System; VDW, Flexmasterfeile 02/60; VDW), in den Gruppen 2 bis 4 erfolgte zunächst eine initiale Aufbereitung bis MAF ISO-Größe 40 (Flexmasterfeile 02/40; VDW). Alle Wurzelkanäle wurden zusätzlich mit Flexmasterfeilen der Größe 06/30 aufbereitet, um eine insgesamt konische Aufbereitungsform zu erreichen und um eine Stufenbildung zu vermeiden (Abbildung 3). Während der Aufbereitung wurden die Proben mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %; Apotheke der Charité) gespült um Detritus und Dentinspäne zu entfernen. Dies erfolgte mit sterilen Einmalspritzen (Omnifix 5 ml; Braun, Melsungen, Deutschland) und sterilen Einmalkanülen mit 0,35 mm Durchmesser (VMK-Endoneedle; Vedefar, Dilbeek, Belgien). Die Schmierschicht wurde durch die zusätzliche Verwendung von

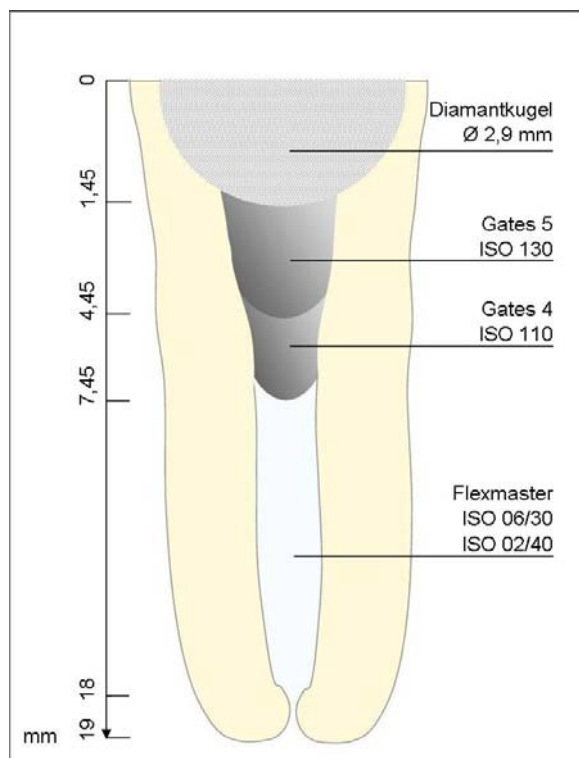


Abb. 3: Schematischer Längsschnitt eines aufbereiteten Wurzelkanals der Hauptgruppen 2 bis 4.

Ethylendiamintetraessigsäure (File Care EDTA; VDW) während der Aufbereitung entfernt.

Um eine einheitliche Bohrtiefe und Aufbereitung zu erreichen, wurden die Gates Bohrer mit Stoppfern aus Kunststoff (Technovit 4071; Heraeus Kulzer) versehen. Die initiale Aufbereitung der Gruppen 2 bis 4 gewährleistet die Entfernung von nekrotischem Gewebe sowie annähernd einheitliche Volumina der Wurzelkanäle (ca. 30 μ l Fassungsvermögen). Am koronalen Ende aller Kanäle wurde durch eine Bohrung mit einem kugelförmigen Diamantbohrer mit 2,9 mm Durchmesser (Diamantkugel 029 Komet; Gebr. Brasseler) bis zu

dessen Äquator ein Raum für ein Flüssigkeitsreservoir geschaffen. Zur Entfernung von Rückständen des EDTA wurden die Zahnproben unmittelbar nach der Aufbereitung mit

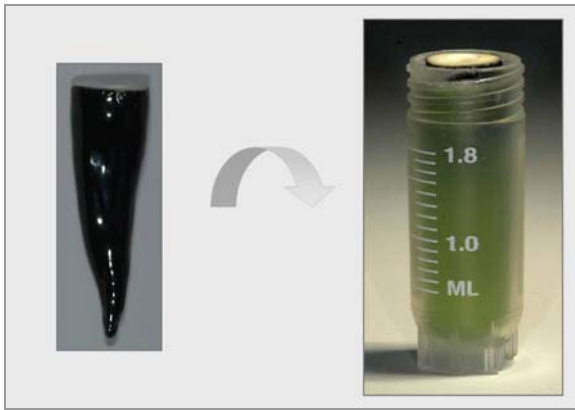


Abb. 4: Die Wurzeloberfläche wurde mit Nagellack versiegelt, die obere Seite der Tubes nach Einbettung der Zahnwurzeln plan geschliffen.

jeweils 10 ml steriler Kochsalzlösung gespült und anschließend 14 Tage in steriler Kochsalzlösung mit täglich wechselnder Lösung gelagert (NaCl 0,9 %; Apotheke der Charité).

Der Versiegelung der äußeren Wurzeloberflächen mit Nagellack (Nail Polish catrice; cosnova, Frankfurt, Deutschland) folgte die Einbettung der Zähne mit Kunststoff (Technovit 4071; Heraeus Kulzer) in verschließbare

Kunststofftubes (Cryo-Tubes; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland). Die Proben wurden, um eine glatte Oberfläche an der Tubeöffnung zu erzielen, plan geschliffen (Mikroschleifsystem Exakt 400 CS, Schleifpapier P 1200; Exact Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) (Abbildung 4). Der Einbettung der Proben schloss sich deren erneute Sterilisation mit Ethylenoxid an (Herzzentrum der Charité).

Vor Beginn der Einsaat wurden exemplarisch Sterilitätskontrollen durchgeführt. Hierzu wurde in zehn Proben eine sterile Universalnährlösung (Tryptone Soya broth; Oxoid, Basingstoke Hampshire, England) gegeben und die Proben 14 Tage bei 37 °C inkubiert (Brutschrank Heraeus Function Line; W. C. Heraeus). Anschließend wurde die enthaltene Flüssigkeit entnommen und auf Universalmedium (Columbia agar with sheep blood; Oxoid) ausplattiert und die Medien für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich wurden Dentinproben mit Hedströmfeilen (Hedström ISO 40; VDW) entnommen, in physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %; Apotheke der Charité) aufgelöst, ausplattiert und inkubiert.

Nach Überprüfung der Sterilität bei exemplarischen Zähnen wurden je 30 µl einer Suspension von *C. albicans* in Sabouraud-Dextrose-Lösung (*C. albicans* ATCC 90028, Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité, Sabouraud Liquid Medium; Oxoid) in die Wurzelkanäle aller Zahnproben gegeben. Die Startkonzentration (Mc Farland Scale 2) entsprach 10^5 CFU/ml. Die Proben wurden 14 Tage bei 37 °C inkubiert (Brutschrank Heraeus Function Line; W.C. Heraeus); täglich wurde steriles Nährmedium (Sabouraud Liquid Medium; Oxoid) zugegeben. Die Deckel der Cryo-Tubes wurden lose adaptiert (eine halbe Umdrehung des Deckelgewindes).

Vor Beginn der Hauptversuche wurde eine Wachstumsreihe bei exemplarischen Proben ($n = 21$) über 21 Tage durchgeführt. Eine mittlere Keimzahl von $10^8/\text{ml}$ wurde nach einem Inkubationszeitraum von 14 Tagen erreicht. Hierzu wurde eine Suspension von *C. albicans* (*C. albicans* ATCC 90028; Institut für Mikrobiologie der Charité, in Sabouraud-Dextrose-Lösung: Sabouraud Liquid Medium; Oxoid) in den hergestellten Proben bei täglicher Zugabe von steriler Nährlösung bei 37°C inkubiert (Brutschrank Heraeus Function Line; W. C. Heraeus). Im Abstand von drei Tagen wurden jeweils die Keimzahlen im Wurzelkanal von drei Proben bestimmt. Zusätzlich sind exemplarisch die Ausgangskeimzahlen im Dentin der Wurzelkanalwand ermittelt worden.

Die Einsaat, die tägliche Zugabe von Nährlösung sowie die Probenentnahme zur Keimzahlbestimmung wurden unter einer Abluftlamina durchgeführt (laminar flow antair BSK; anthos Mikrosysteme, Köln, Deutschland), um Kontaminationen zu vermeiden und die Hygienerichtlinien einzuhalten. Alle Flüssigkeiten sind mit einer Pipette (Eppendorf Reference; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) mit sterilen Einmalspitzen (Pipettenspitze $200\ \mu\text{l}$; Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) transportiert worden.

Zur Bestimmung der Ausgangskeimzahlen in den Wurzelkanälen wurde mit jeweils einer Papierspitze (Paperpoint ISO 40; VDW) ein Probenvolumen von $5\ \mu\text{l}$ entnommen und mit einer Verdünnung von 1:4 000 000 ausplattiert. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 37°C (Brutschrank Heraeus Function Line; W.C. Heraeus) wurden die entstandenen Kolonien gezählt und die Anzahl der vorhandenen Mikroorganismen im Wurzelkanal pro Milliliter Flüssigkeit (CFU/ml) anhand der Verdünnung berechnet. Die Multiplikation der Anzahl der gezählten Kolonien mit 4 000 000 ergibt die Keimzahl pro Milliliter (Abbildung 5). Zur Berechnung der Keimzahlen pro Milliliter anhand des Verdünnungsfaktors muss das Probenvolumen, welches aus den Wurzelkanälen entnommen wird, bekannt sein. Daher ist das mittlere Fassungsvermögen der Papierspitzen (Paperpoint ISO 40; VDW) zuvor bestimmt worden. Vorpipettierte Volumina von $5\ \mu\text{l}$, $10\ \mu\text{l}$ und $100\ \mu\text{l}$ wurden mit Papierspitzen bis zu einer einheitlichen Markierung aufgesogen. Anhand der benötigten Anzahl wurde errechnet, wie viel Flüssigkeit (μl) eine einzelne fasst. Eine bis zur 18 mm-Markierung vollgesogene Papierspitze fasst $5\ \mu\text{l}$ Flüssigkeit.

Die Verdünnung wurde erreicht, indem die Papierspitzen mit aufgesogenem Probenmaterial zunächst in verschließbare Tubes (Safeseal Microtube 2 ml PP; Sarstedt) gegeben wurden, die 1,995 ml sterile Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %; Apotheke der Charité) enthielten, und diese 30 s gevortext wurden (Heidolph REAX Vortex-Mixer;

Heidolph Instruments, Hamburg, Deutschland). Dieser Lösung wurden 10 µl mit einer Pipette entnommen (Eppendorf Reference; Eppendorf), in 0,99 ml sterile Kochsalzlösung gegeben und ebenfalls 30 Sekunden lang gevortext. 10 µl daraus wurden mit sterilen Glasspateln auf Selektiv-Nährmedien (Sabouraud-Glukose-Hefeextrakt-Selektiv-Nährboden, Oxoid) ausplattiert. So wurde eine Verdünnung von 1:4 000 000 erreicht (Abbildungen 5 und 6).

Pipettierte Volumina		Verdünnungs-faktor
5 µl (Papierspitze) in 1995 µl NaCl		× 400
	10 µl Lsg. in 990 µl NaCl	× 100
	10 µl Lsg. ausplattiert (pro ml)	× 100
		□ 4.000.000 (4×10^6)

Abb. 5: Verdünnungsfaktor zur Bestimmung der Ausgangskeimzahl



Abb. 6: Selektivnährboden mit 53 Candida-Kolonien nach 24 Stunden Inkubation: dies entspricht einer Konzentration von $2,12 \times 10^8$ CFU/ml.

Die Keimzahlbestimmung erfolgte auf Selektivnährböden für Pilze (Sabouraud-Glukose-Hefeextrakt-Selektiv-Nährboden; Oxoid). Um die Besiedelung der Proben mit

Mikroorganismen, die auf diesen Medien keine Kolonien bilden können, auszuschließen, wurden während der Ausgangs- und Endkeimzahlbestimmung jeweils bei drei Proben jeder Untergruppe zusätzlich Kontaminationskontrollen auf Universalnährböden (Columbia agar with sheep blood; Oxoid) durchgeführt.

4.3 Versuchsdurchführung

Unmittelbar nach der Probenentnahme zur Bestimmung der Ausgangskeimzahl erfolgte die Durchführung der Hauptversuche: Die Proben der Gruppen 2 bis 4 wurden komplett aufbereitet bis ISO-Größe 60 mit je einer sterilen Flexmasterfeile (Flexmastersystem, Flexmasterfeile 02/60; VDW) und koronal zusätzlich erweitert mit sterilen Gates-Bohrern der ISO-Größe 150 und 130 (Gates Glidden Bohrer Größe 6 und 5; VDW). Die Spülung mit je 10 ml Lösung wurde alternierend durchgeführt: 3 ml zu Beginn der Aufbereitung, nach jeder Feile je 2 ml, bzw. nach der letzten Feile 3 ml. In Gruppe 2 wurde physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %, Apotheke der Charité) verwendet, in Gruppe 3 Natriumhypochlorit (NaOCl 1 %; Apotheke der Charité) und in Gruppe 4 Chlorhexidindigluconat (CHX 0,2 %; Apotheke der Charité).

In Gruppe 1 erfolgte keine weitere Aufbereitung. Die *Candida*-Suspension wurde mit 2 ml Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %, Apotheke der Charité) entfernt. Für sämtliche Spülungen wurden für jede Probe eine sterile Einmalspritze (Omnifix 5 ml; Braun) und eine sterile Einmalkanüle mit einem Durchmesser von 0,35 mm benutzt (VMK-Endoneedle; Vedefar).

Nach der Aufbereitung wurden alle Wurzelkanäle mit je drei Papierspitzen (Paperpoint ISO 40; VDW) getrocknet. Entsprechend der Einteilung in die Untergruppen wurden die Proben anschließend wie folgt behandelt: In Untergruppe 1 erfolgte die Bestrahlung mit einem Diodenlaser (GENTLEray 980, KaVo, Biberach, Deutschland), der Laserstrahlen einer Wellenlänge von 980 nm bei einer maximalen Leistung von 6 Watt cw erzeugt. Die Einstellungen des Diodenlasers im Hauptmenü („Endodontie adj.“) entsprachen einer gepulsten Leistung von maximal 2,5 Watt und durchschnittlich 0,8 Watt mit 25 ms Pulsdauer und jeweils 50 ms Pause. In die getrockneten Wurzelkanäle wurde die Faser (200 µm Bare Fiber NIR Q 200K; Asclepion Laser Technologies, Jena, Deutschland) des Diodenlasers mit dem zugehörigen Handstück auf 17 mm Länge in die Wurzelkanäle eingebracht. Mit einer Geschwindigkeit von 3 mm/s wurde die Faser 10 s lang spiralförmig entlang der Dentinoberfläche von apikal nach koronal geführt (Abbildung 7).

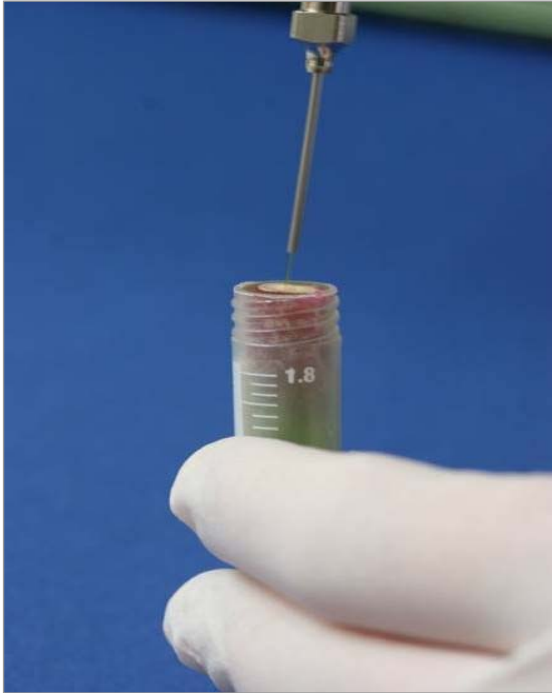


Abb. 7: Laserbestrahlung eines Wurzelkanals.

Dieser Vorgang wurde vier Mal wiederholt, so dass die Applikationsdauer insgesamt 40 s betrug.

In der Untergruppe 2 erfolgte die Applikation von gasförmigem Ozon mit einem Ozongenerator (HealOzone; KaVo). Dieser Generator nutzt zur Herstellung des gasförmigen Ozons die Umgebungsluft. Die angesaugte und getrocknete Luft wird mit dem von einem Generator aus Sauerstoff hergestellten Ozon bis zu einer Konzentration von 2100 ppm angereichert.

Die Ozonapplikation erfolgt mittels eines Handstücks (HealOzone Plus 2131C; KaVo) mit aufsteckbaren Silikonkappen

(HealOzone Delivery Cup; KaVo), die dicht am Applikationsort abschließen und die Erzeugung eines Unterdrucks ermöglichen. Dieser Unterdruck ist Voraussetzung für die Ozonapplikation. So ist sichergestellt, dass kein Ozon in die Umgebung austritt. Eine zweite Düse am Handstück saugt während der Applikation das Gas ab. Anschließend wird durch einen Ozonneutralisator O_3 zu O_2 reduziert und an die Umgebungsluft abgegeben.

Auf das Handstück (HealOzone Plus 2131C; KaVo) des Ozongenerators wurde je eine sterile Applikationskanüle von 25 mm Gesamtlänge (HealOzone Applikationskanüle; KaVo) und ein steril verpackter Einmalaufsatz zur Abdichtung (HealOzone Delivery Cup, 6 mm; KaVo) platziert (Abbildung 8).

Die Applikationskanüle wurde in den Wurzelkanal eingebracht, bis die Aufsätze plan auf der Oberfläche der Probe auflagen und das Ende der Applikationskanüle sich im apikalen Bereich des Wurzelkanals befand (die Länge der Kanüle außerhalb des Aufsatzes beträgt 17 mm).



Abb. 8: Handstück des Ozongenerators mit Applikationskanüle und -aufsatz.



Abb. 9: Plan aufliegender Aufsatz während der Ozonbegasung eines Wurzelkanals.

Das gasförmige Ozon wurde zwei Mal je 60 s lang appliziert (Abbildung 9). Die Einstellung des Ozongeräts entspricht einer Ozonapplikation von 2100 ppm bei einer Fließrate von 100 ml/min.

In der Untergruppe 3 wurde in die Wurzelkanäle Chlorhexidindigluconat-Gel (Chlorhexamed 1 % GEL; GlaxoSmithKline) als medizinische Einlage appliziert und die Proben für 7 Tage inkubiert (Brutschrank Heraeus B 6770; W.C. Heraeus). In die getrockneten Wurzelkanäle wurde das Gel mit Hilfe einer Spritze (Omnifix 5 ml; Braun) und einer sterilen Einmalkanüle mit Durchmesser 0,35 mm (VMK-Endoneedle; Vedefar) eingebracht. Die Applikation erfolgte langsam von apikal

nach koronal, um eine Blasenbildung zu vermeiden und eine vollständige Befüllung der Probe zu gewährleisten. Anschließend wurden die Deckel auf den Proben locker platziert und diese erneut bei 37 °C für 7 Tage inkubiert (Brutschrank Heraeus B 6770; W. C. Heraeus).

Analog hierzu erfolgte in den Proben der Untergruppe 4 die Applikation von wässriger Kalziumhydroxidpaste mit einem pH-Wert von 12,5 (UltraCal XS; Ultradent). Die Applikation der Kalziumhydroxidpaste erfolgte im apikalen Bereich ebenfalls mit Kanülen der geringen Durchmesser von 0,35 mm (VMK-Endoneedle; Vedefar), im koronalen Bereich erfolgte die Applikation mit Kanülen der Durchmesser 0,9 mm (Einmal-Pastenkanülen; Transcoject, Neumünster, Deutschland), da die Kanülen mit geringen Durchmessern kurz nach Applikationsbeginn verstopfen. Ebenfalls wurde eine Blasenbildung vermieden und auf komplette Befüllung geachtet. Die Deckel wurden auf den Proben platziert und diese ebenfalls erneut bei 37 °C 7 Tage lang inkubiert (Brutschrank Heraeus Function Line; W. C. Heraeus).

Zur anschließenden Probenentnahme zur Bestimmung der Endkeimzahlen wurden alle Wurzelkanäle mit 2 ml steriler Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %; Apotheke der Charité)

gespült (Omnifix 5 ml; Braun, VMK-Endoneedle; Vedefar). In den Untergruppen 1 und 2 erfolgte dies wenige Minuten nach Durchführung der Behandlungen, in den Untergruppen 3 und 4 nach der Inkubationszeit von 7 Tagen. Die Probenentnahme erfolgte mit Papierspitzen (Paperpoint ISO 40; VDW) zur Bestimmung der Endkeimzahlen im Wurzelkanal (CFU/ml). Direkt im Anschluss wurde mit Hedströmfeilen (Hedström ISO 40; VDW) Material von der Wurzelkanalwand zur Bestimmung der Endkeimzahlen im Kanalwanddentin (CFU/mg) entnommen.

4.4 Untersuchungsmethoden

4.4.1 Quantitative Untersuchung

Zum Vergleich der einzelnen Behandlungen wurden in allen Proben drei Parameter erfasst und statistisch ausgewertet: Die Ausgangs- und Endkeimzahl im Wurzelkanal (CFU/ml) sowie die Endkeimzahl im Dentin (CFU/mg). Die Ausgangskeimzahl des Kanalwanddentins wurde exemplarisch erhoben (Tabelle VII).

Tab. VII: Untersuchungsparameter

Untersuchungsparameter	Methode der Probenentnahme	Anzahl der untersuchten Proben	Untersuchungszeitpunkt
Ausgangskeimzahl (CFU/ml)	per Paperpoint	240	unmittelbar vor Versuchsdurchführung
Endkeimzahl 1 (CFU/ml)	per Paperpoint	240	unmittelbar nach Versuchsdurchführung
Endkeimzahl 2 (CFU/mg)	per Hedströmfeile	240	unmittelbar nach Versuchsdurchführung
Ausgangskeimzahl des Kanalwanddentins (CFU/mg)	per Hedströmfeile	4	Proben vor Beginn der Versuche

4.4.1.1 Bestimmung der Endkeimzahl des Kanalinhalt (Endkeimzahl 1)

Aufgrund der vorausgegangenen Wachstumsreihe konnte mit einer mittleren Ausgangskeimzahl von 10^8 CFU/ml gerechnet werden. Auf diesen Wert konnte der Verdünnungsfaktor abgestimmt werden, so dass die Zahl der gebildeten Kolonien auf den Nährmedien für die quantitative Bestimmung optimal war. Diese Berechnung war für die Endkeimzahlbestimmung nicht möglich, da kein zu erwartender Wert bekannt war.

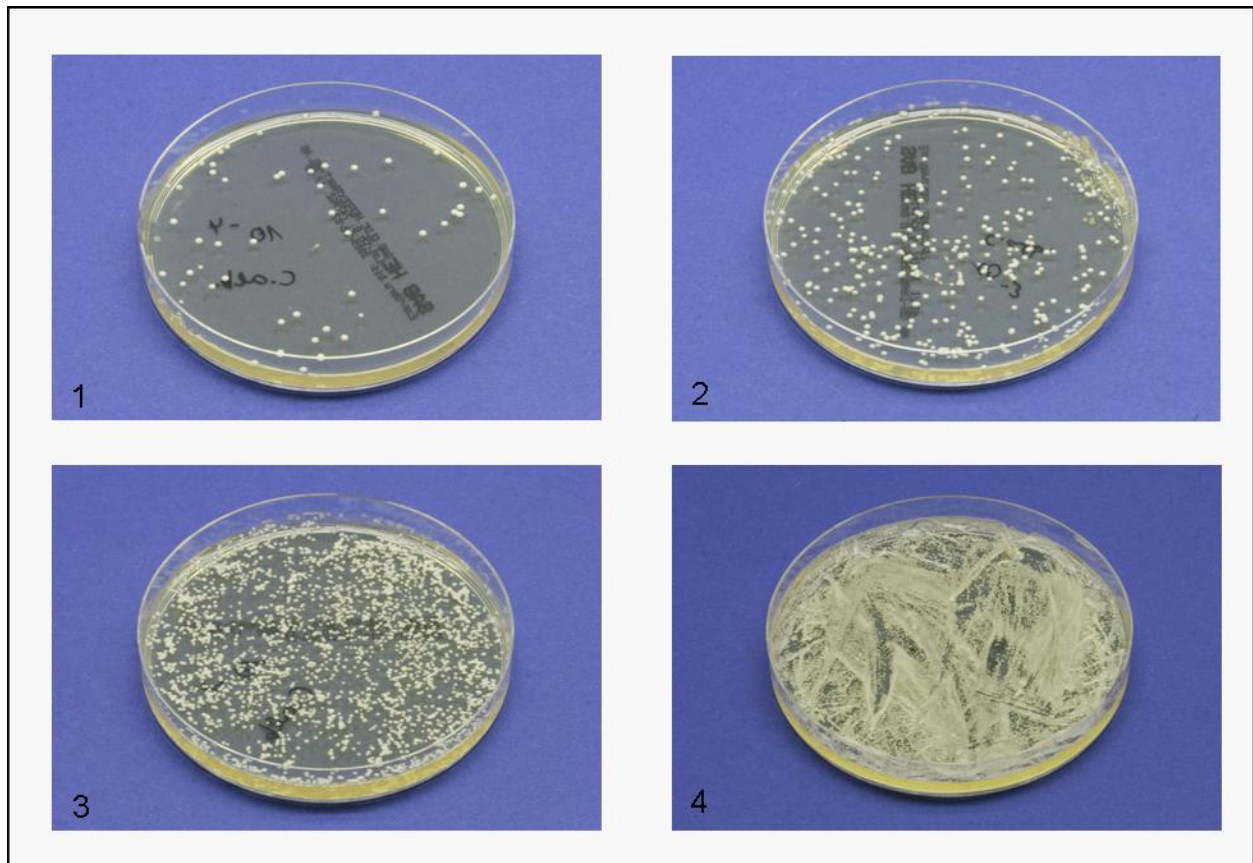


Abb. 10: Die unterschiedlichen Verdünnungsfaktoren und die resultierende Anzahl von Kolonien auf Selektivnährböden (Von 1 bis 4 absteigende Verdünnungen bei gleicher Konzentration).

Wählt man eine geringe Verdünnung bei hoher Konzentration, so entstehen viele Kolonien (>1000), die schlecht zählbar sind und deren Wachstumsverhalten auf den Nährmedien eingeschränkt ist. Eine geringe Verdünnung bietet allerdings die Möglichkeit, die Nachweisgrenze auf 5×10^2 CFU/ml zu senken. Um eine niedrige Nachweisgrenze von 5×10^2 CFU/ml zu erhalten, und um Proben höherer Konzentrationen ebenso quantifizieren zu können, wurden jeweils zwei Verdünnungen hergestellt und ausplattiert (Abbildungen 11 und 12). Somit konnte jede Konzentration von 5×10^2 bis 10^8 CFU/ml quantitativ nachgewiesen werden.

Pipettierte Volumina		Verdünnungs- faktor
5 μ l (Papierspitze) in 45 μ l NaCl		$\times 10$
	20 μ l Lsg. pro ml	$\times 50$
		□ 500 (5×10^2)

Abb. 11: Verdünnungsfaktor 1

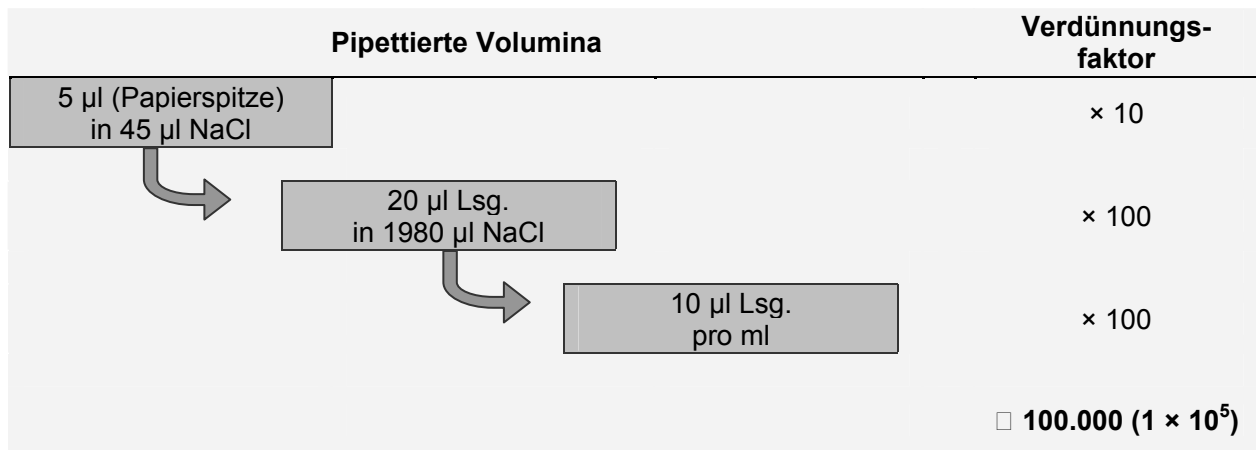


Abb. 12: Verdünnungsfaktor 2

4.4.1.2 Bestimmung der Endkeimzahl des Kanalwanddentins (Endkeimzahl 2)

Zur Bestimmung der Keimzahlen im Dentin der Wurzelkanalwand wurde mit jeweils einer Hedströmfeile (Hedström ISO 40; VDW) durch dreimaliges Führen der Feile entlang der Kanalwand Material entnommen (Endkeimzahl 2). Die Feile wurde in verschließbare Tubes (Safeseal Microtube 2 ml; Sarstedt) mit 50 µl steriler Kochsalzlösung gegeben und diese 30 s gevortext (Heidolph REAX Vortex-Mixer; Heidolph Instruments). Aus den Tubes wurden 20 µl mit einer Pipette (Eppendorf Reference, Eppendorf) entnommen und auf Selektiv-Nährmedien (Sabouraud-Glukose-Hefeextrakt-Selektiv-Nährboden; Oxoid) gegeben und mit sterilen Glasspateln ausgestrichen. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 37 °C wurden die entstandenen Kolonien gezählt (CFU). Anhand des Verdünnungsfaktors wurde die Anzahl der vorhandenen Mikroorganismen pro Milligramm Dentin berechnet. Zuvor wurden zehn Feilen mit und ohne Dentinabtrag gewogen und das mittlere entnommene Probengewicht von 0,0003 g errechnet. Die Multiplikation der Anzahl der gezählten Kolonien mit 2,5 ergibt die Keimzahl pro 50 µl, da 20 µl ausplattiert wurden. Dies entspricht der Keimzahl im Probengewicht (0,0003 g) und die Division durch 0,3 ergibt die Keimzahl pro Milligramm (CFU/mg).

4.4.2 Qualitative Untersuchung

Exemplarisch wurde die Ausgangssituation von *C. albicans* in den Wurzelkanälen mikroskopisch untersucht. Die hierzu genutzten Probenzähne wurden zunächst beimpft und inkubiert. Nach Fixation (Ethanol; Apotheke der Charité) erfolgte eine unspezifische DNA-Anfärbung mit einem blau fluoreszierenden Farbstoff (Farbstoff DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid; Institut für Mikrobiologie der Charité). Die

Zähne wurden anschließend in Kunststoff eingebettet (Technovit 4071; Heraeus Kulzer), quer gesägt (Innenlochkreissäge: Sägemikrotom Leitz 1600; Leica Micro Microsystems, Wetzlar, Deutschland) und plan geschliffen (Mikroschleifsystem Exakt 400 CS, Schleifpapier P 1200; Exact Apparatebau). Die optische Analyse der Schriffe erfolgte mit dem Lichtmikroskop (Axioplan 2; Zeiss, Jena, Deutschland).

4.5 Statistische Auswertung

Zur quantitativen Auswertung wurden drei Variablen herangezogen:

1. Endkeimzahl 1 (CFU/ml)
2. Endkeimzahl 2 (CFU/mg)
3. Keimzahlreduktion (Endkeimzahl 1/Ausgangskeimzahl in %)

Zunächst wurden die Werte der Ausgangskeimzahlen aller 240 Proben ermittelt (Baseline) und mit dem Kruskal-Wallis-Test auf Unterschiede getestet ($p \leq 0,05$). Zusätzlich zu den Endkeimzahlen 1 und 2 wurde die relative Keimzahlreduktion (prozentualer Anteil nachher zu vorher) im Wurzelkanal jeder einzelnen Probe ermittelt (Variable 3). Da die Endkeimzahlen innerhalb der Untergruppen sich entweder unter der Nachweisgrenze befanden oder hohe Werte annahmen, wurden sowohl für die Endkeimzahlen als auch für die relative Keimzahlreduktion drei Klassen gebildet (unterhalb der Nachweisgrenze, mittlere Werte, hohe Werte). Alle statistischen Analysen erfolgten für diese klassierten Variablen. Die Verteilung auf diese drei Klassen in den 16 Studiengruppen wurde in Kreuztabellen erfasst und für jede Hauptgruppe grafisch dargestellt: Die Endkeimzahlen 1 sind anhand von Balkendiagrammen (Abbildungen 16-19) dargestellt, die Endkeimzahlen 2 in Kreuztabellen (Tabellen IX-XII), die Keimzahlreduktionen ebenfalls in Balkendiagrammen pro Behandlungsgruppe (Abbildungen 21-25).

Die Studiengruppen wurden bezüglich verbliebener Endkeimzahlen im Wurzelkanal (Variable 1) und im Dentin (Variable 2) sowie der Keimzahlreduktion (Variable 3) in jeder Probe miteinander verglichen. Die einzelnen Behandlungen, getrennt nach Aufbereitungsgruppen, sowie die verschiedenen Aufbereitungen, getrennt nach Behandlungsgruppen, wurden mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson gegeneinander getestet. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % gesetzt.

Zusätzlich wurde die Auswertung der auf drei Stufen klassierten Endkeimzahl und der relativen Keimzahlreduktion mit zweifaktorieller (Hauptbehandlungen und Begleittherapien), ordinaler, logistischer Regressionsanalyse durchgeführt. Da für jede

Variable zwölf Paarvergleiche (Kontraste) zwischen den einzelnen Gruppen durchgeführt wurden, wurde das Signifikanzniveau für diese Vergleiche nach Bonferroni auf $\alpha = 0,0042$ abgesenkt. Die ordinale logistische Regressionsanalyse erfolgte mit SAS Version 9.1 (SAS Version 9.1; SAS Institute; Cary, N. C., USA), alle anderen statistischen Auswertungen mit SPSS Version 16.0 (SPSS 16.0 für Windows; SPSS, München, Deutschland).

Die Ausgangskeimzahlen im Dentin wurden exemplarisch ermittelt. Die Endkeimzahlen im Dentin (Variable 2) wurden in jeder Probe erhoben und die Ergebnisse der Studiengruppen gegeneinander getestet ($p \leq 0,05$; Chi-Quadrat-Test). Zusätzlich wurde geprüft, ob zwischen der Endkeimzahl im Wurzelkanal und der Endkeimzahl im Dentin der Proben eine Korrelation besteht.

5 Ergebnisse

5.1 Quantitative Auswertung

Vor Beginn der Versuche wurde während einer Wachstumsreihe bei exemplarischen Zahnproben, ausgehend von einer Startkonzentration von 10^5 CFU/ml, eine Konzentration von 10^8 CFU/ml nach 14 Tagen erreicht. Im Bereich dieser Zehnerpotenz wurde die Konzentration bis zum 21. Tag gehalten (Abbildung 13). Der Inkubationszeitraum der *Candida*-Suspension in den Versuchsproben wurde auf 14 Tage festgelegt.

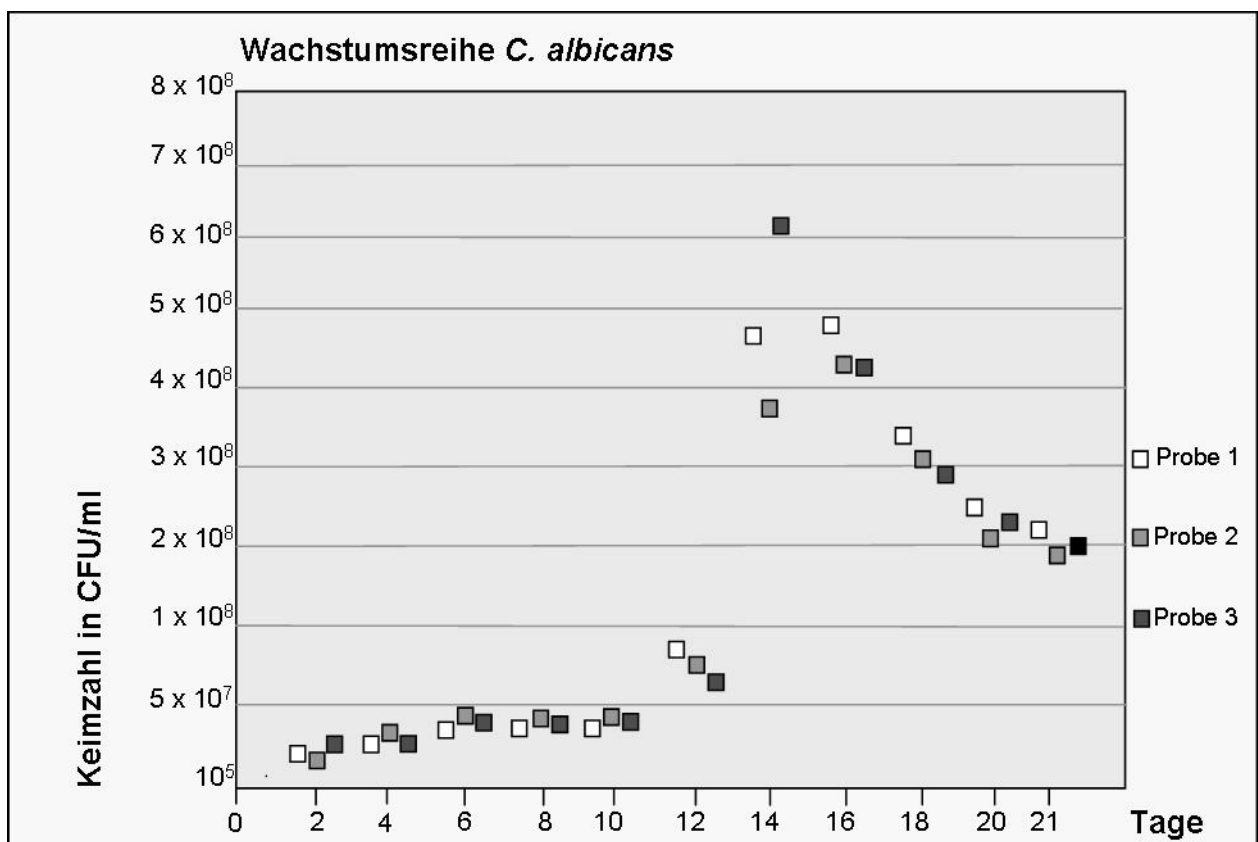


Abb. 13: Wachstumsreihe von *C. albicans* über 21 Tage: Logarithmische Darstellung der entstandenen Keimzahlen in den Versuchsproben, ausgehend von einer Startkonzentration von 10^5 CFU/ml.

5.1.1 Ausgangskeimzahl

Zu Beginn der Versuche wurde die Ausgangskeimzahl im Wurzelkanal jeder der 240 Zahnproben ermittelt. Der Medianwert betrug $3,66 \times 10^8$ CFU/ml; (Q1: $1,73 \times 10^8$; Q3: $5,87 \times 10^8$), wobei der geringste Einzelwert 8×10^6 CFU/ml und der höchste $1,28 \times 10^9$ CFU/ml betrug (Abbildung 14).

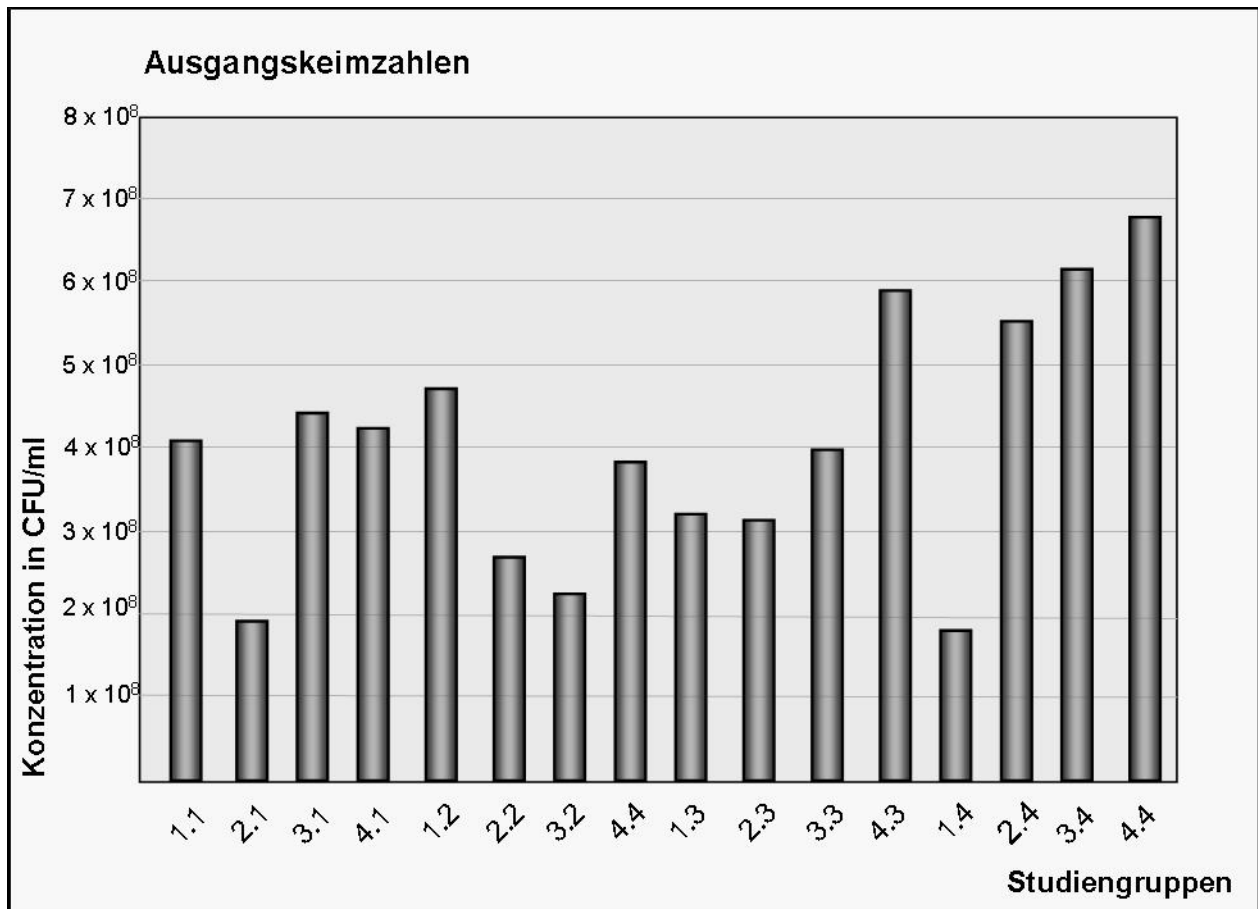


Abb. 14: Ausgangskeimzahlen der Studiengruppen (Medianwerte).

Die Ausgangskeimzahlen im Dentin sind lediglich exemplarisch ermittelt worden: Dazu wurden vier zusätzliche Proben analog mit *C. albicans* beimpft und 14 Tage inkubiert. Die Keimzahlen sind im Wurzelkanal sowie in Dentinproben von der Wurzelkanalwand ermittelt worden (Tabelle VIII).

Tab. VIII: Ausgangskeimzahlen im Wurzelkanal und im Dentin exemplarischer Proben

Probe	Ausgangskeimzahl im Wurzelkanal	Ausgangskeimzahl im Dentin
1	3,84 × 10 ⁸ CFU/ml	7,10 × 10 ³ CFU/mg
2	2,04 × 10 ⁸ CFU/ml	1,02 × 10 ⁵ CFU/mg
3	9,60 × 10 ⁸ CFU/ml	9,83 × 10 ⁴ CFU/mg
4	2,56 × 10 ⁸ CFU/ml	6,80 × 10 ⁴ CFU/mg
Mittelwert	4,51 × 10 ⁸ CFU/ml	8,48 × 10 ⁴ CFU/mg

5.1.2 Endkeimzahl 1

Die Endkeimzahlen 1 im Wurzelkanal wurden in allen Proben ermittelt. Da diese sich entweder unter der Nachweisgrenze befanden oder im obersten Bereich, wurden zur statistischen Analyse drei Klassen gebildet:

Unterhalb der Nachweisgrenze:	$< 5 \times 10^2$ CFU/ml
Mittlere Werte:	$5 \times 10^2 - 4 \times 10^3$ CFU/ml
Hohe Werte:	$> 4 \times 10^3$ CFU/ml

Abb. 15: Klassierte Wertebereiche der Endkeimzahlen 1.

Ausgehend vom geringsten Wert der Ausgangskeimzahlen der 240 Proben von 8×10^6 CFU/ml ist in den Proben, deren Endkeimzahlen unter der Nachweisgrenze von 5×10^2 CFU/ml lagen, eine Keimzahlreduktion um $7,99 \times 10^6$ erreicht worden. Die Verteilung der Endkeimzahlen 1 auf die drei Wertebereiche in den einzelnen Gruppen wurde erfasst und die Ergebnisse wurden gegeneinander getestet ($\alpha = 0,05$; Chi-Quadrat-Test nach Pearson). Zur Veranschaulichung der prozentualen Verteilung der Ergebnisse auf die Wertebereiche wurde die Verteilung getrennt nach Hauptgruppen anhand von Balkendiagrammen dargestellt (Abbildungen 16-19). Hierbei entspricht die Angabe von 100 % der Gesamtanzahl der Proben jeder Untergruppe (n = 15).

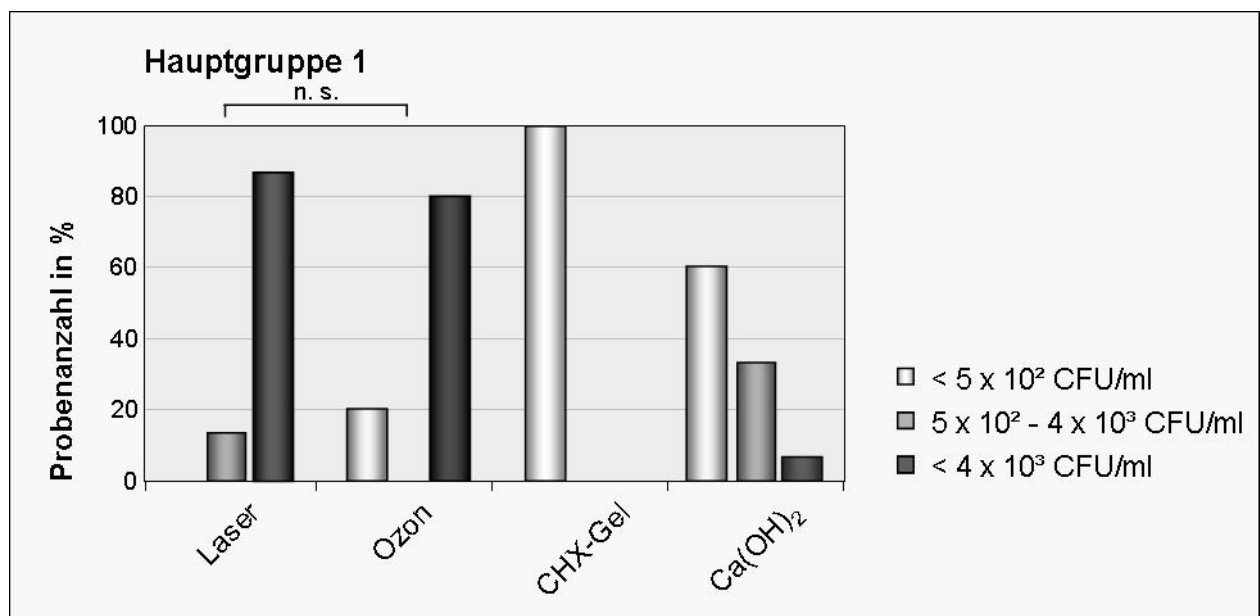


Abb. 16: Endkeimzahl 1: Prozentuale Verteilung der Ergebnisse auf die klassierten Wertebereiche innerhalb der vier Studiengruppen der Hauptgruppe 1.

Durch die alleinige Verwendung (Hauptgruppe 1) von CHX-Gel als medikamentöse Einlage konnten in 100 % der untersuchten Proben keine Zellen von *C. albicans* mehr

nachgewiesen werden. Bei der Verwendung von Kalziumhydroxid war dies in 60 % der Proben der Fall, 33,3 % lagen im mittleren Nachweisbereich. Bei der Behandlung mit Ozon lagen 20 % der Proben unter der Nachweisgrenze, die restlichen 80 % lagen oberhalb des Wertes von 4×10^4 CFU/ml. Durch die Bestrahlung mit dem Diodenlaser konnte in keiner Probe die Nachweisgrenze unterschritten werden: In allen untersuchten Proben waren noch Zellen nachzuweisen, in 86,7 % der Proben lag der Wert oberhalb von 4×10^4 CFU/ml (Abbildung 16).

Nach Laserbestrahlung und Ozonbegasung verblieben durchschnittlich höhere Keimzahlen im Wurzelkanal, hierin unterschieden sich diese beiden Behandlungen jeweils signifikant von CHX-Gel und Kalziumhydroxid ($p < 0,001$). Laser- und Ozonbehandlung unterschieden sich nicht signifikant ($p = 0,109$). Durch die Verwendung von CHX-Gel wurde signifikant häufiger ($p = 0,017$) eine niedrige Endkeimzahl als durch Kalziumhydroxid erreicht.

Durch die zusätzliche Aufbereitung und Verwendung von physiologischer Kochsalzlösung als Spüllösung (Hauptgruppe 2) verschob sich die Verteilung bei Kalziumhydroxideinlage, Ozon- und Laserbehandlung in Richtung niedriger nachgewiesener Keimzahlen (Abbildung 17).

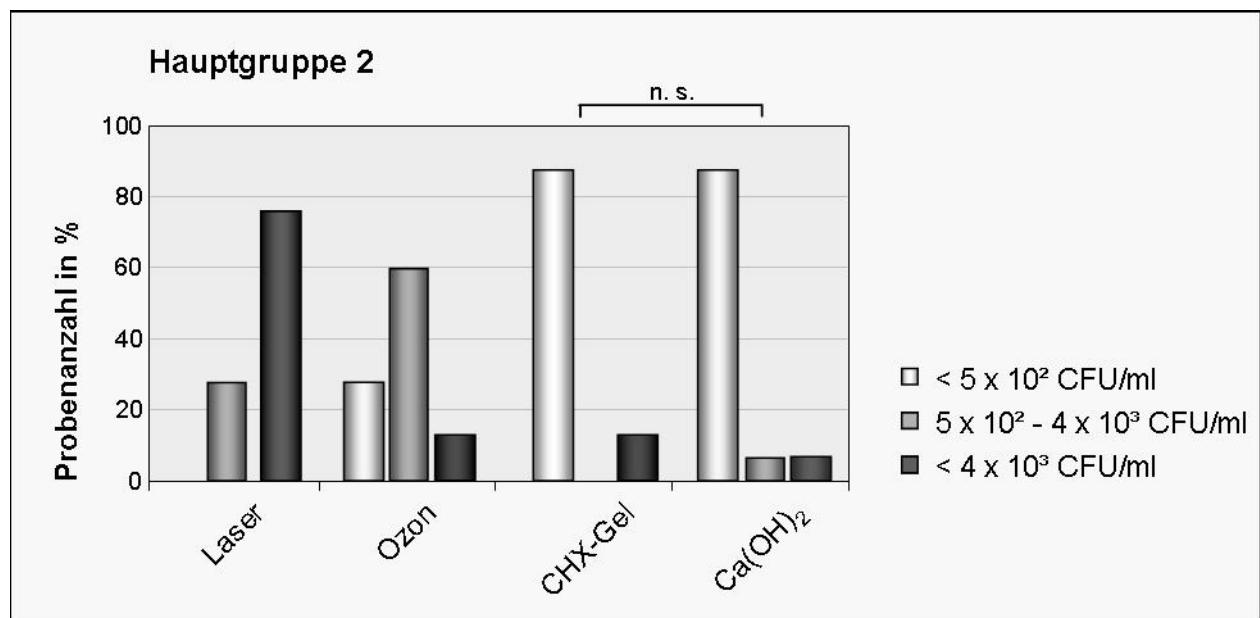


Abb. 17: Endkeimzahl 1: Prozentuale Verteilung der Ergebnisse auf die klassierten Wertebereiche innerhalb der vier Studiengruppen der Hauptgruppe 2.

Lediglich in der CHX-Gel-Gruppe ist eine größere Anzahl von Proben positiv getestet worden. Die Verwendung von CHX-Gel und Kalziumhydroxid unterschied sich nicht signifikant voneinander; beide Behandlungen erreichten zu 86,7 % Keimzahlen unterhalb der Nachweisgrenze. Die Behandlung mit Ozon erreichte mit 26,7 % diesen

Wert signifikant weniger häufig ($p < 0,001$). Durch die Laserbestrahlung wurden in keiner Probe Keimzahlen unterhalb der Nachweisgrenze ermittelt, somit signifikant weniger gegenüber Ozon ($p = 0,002$), Kalziumhydroxid ($p < 0,001$) und CHX-Gel ($p = 0,003$).

Durch die Verwendung von Natriumhypochlorit als Spüllösung (Hauptgruppe 3) wurde die Anzahl der Zähne ohne nachweisbare Zellen von *C. albicans* bei Laser- und Ozonbehandlung sowie Kalziumhydroxid nochmals erhöht. Lediglich in der Laser-Gruppe wurden noch Werte oberhalb von 4×10^4 CFU/ml festgestellt (Abbildung 18). Zwischen Laser- und Ozonbehandlung liegt allerdings kein signifikanter Unterschied vor ($p = 1,000$). Durch die Kombination von CHX-Gel oder Kalziumhydroxid mit chemomechanischer Aufbereitung und Spülung mit Natriumhypochlorit wurden in allen behandelten Proben die Keimzahlen bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Bei dieser Aufbereitung unterschieden sich CHX-Gel und Kalziumhydroxid jeweils signifikant von der Laserbestrahlung ($p = 0,042$) und der Begasung mit Ozon ($p = 0,042$).

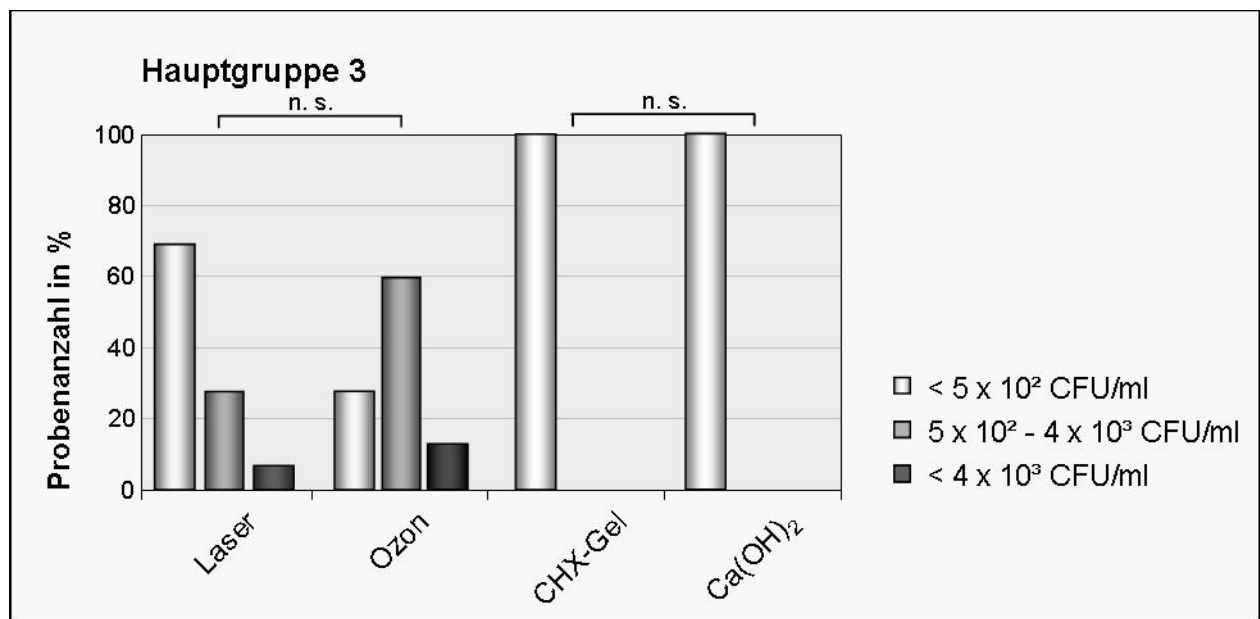


Abb. 18: Endkeimzahl 1: Prozentuale Verteilung der Ergebnisse auf die klassierten Wertebereiche innerhalb der vier Studiengruppen der Hauptgruppe 3.

Durch die zusätzliche chemomechanische Aufbereitung mit Chlorhexidindigluconat (Hauptgruppe 4) wurden in den Untergruppen Kalziumhydroxid, Laser und Ozon signifikant ($p < 0,001$) mehr Zahnproben mit Keimzahlen unterhalb der Nachweisgrenze ermittelt als durch alleinige Behandlung ohne zusätzliche Aufbereitung und Spülung. Dieser Effekt wurde bei Kalziumhydroxid und Laser in 40 % der Proben nachgewiesen, bei Ozon in 26,7 %. In den Gruppen der medikamentösen Einlagen lagen alle Proben mit zusätzlicher CHX-Spülung unterhalb der Nachweisgrenze, für CHX-Gel war dies

schon ohne Aufbereitung der Fall. Laser- und Ozonbehandlung unterschieden sich auch in dieser Hauptgruppe nicht signifikant voneinander. Es lagen bei Laser ($p = 0,001$) und bei Ozon ($p = 0,002$) signifikant weniger Proben unterhalb der Nachweisgrenze als bei Kalziumhydroxid und CHX-Gel. Für diese beiden Behandlungen wurden zu 100 % Werte unter der Nachweisgrenze ermittelt (Abbildung 19).

Insgesamt wurde durch die zusätzliche chemomechanische Aufbereitung mit CHX oder NaOCl die Anzahl negativer Nachweise signifikant erhöht ($\alpha = 0,0042$; Chi-Quadrat-Test und Korrektur nach Bonferroni, ordinale logistische Regressionsanalyse) gegenüber keiner Aufbereitung und der Aufbereitung mit Kochsalzlösung ($p < 0,001$).

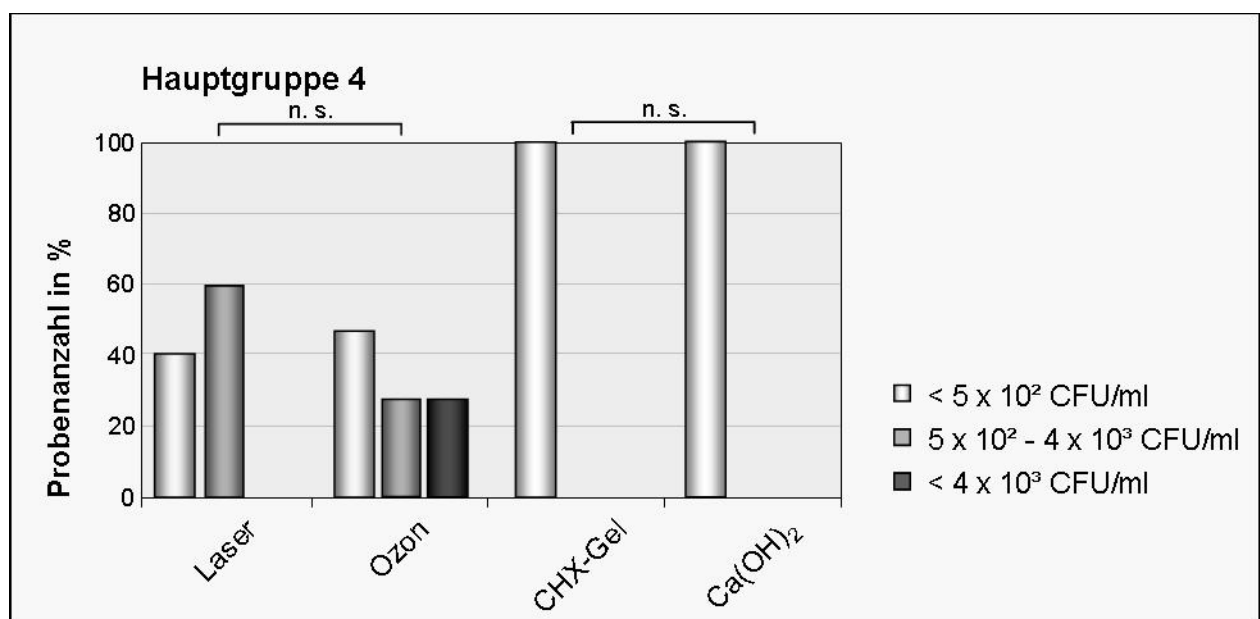


Abb. 19: Endkeimzahl 1: Prozentuale Verteilung der Ergebnisse auf die klassierten Wertebereiche innerhalb der vier Studiengruppen der Hauptgruppe 4.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Nachweisgrenze von $5 \times 10^2 \text{ CFU/ml}$ zu 100 % unterschritten wurde durch die Applikation von CHX-Gel ohne weitere Aufbereitung sowie in Kombination mit Aufbereitung und CHX- oder NaOCl-Spülung. In Kombination mit NaCl-Spülung war dies in 86,7 % der untersuchten Proben der Fall. Die unterschiedlichen Aufbereitungsmethoden (Hauptgruppen 1-4) unterschieden sich bei CHX-Gel-Applikation nicht signifikant voneinander ($\alpha \leq 0,05$; Chi-Quadrat-Test). Bei Kalziumhydroxid ($p = 0,019$), Laser- und Ozonbehandlung ($p < 0,001$) wurden signifikant unterschiedliche Ergebnisse in den einzelnen Aufbereitungskombinationen nachgewiesen. Durch die Anwendung von Kalziumhydroxid wurde die Nachweisgrenze zu 100 % in Kombination mit NaOCl- oder CHX-Spülung unterschritten, bei alleiniger Anwendung zu 60 %. Somit unterschieden sich Kalziumhydroxid- und CHX-Gel-

Applikation lediglich in Hauptgruppe 1 signifikant voneinander ($p = 0,017$), in den Hauptgruppen 3 und 4 waren die Ergebnisse beider Wirkstoffe identisch. In den Gruppen, in denen Laserbestrahlung und Ozonbegasung untersucht wurden, lag die Anzahl der Proben in keiner Hauptgruppe zu 100 % unterhalb der Nachweisgrenze. In Kombination mit NaOCl und CHX wurde die Nachweisgrenze jeweils zu 66,7 %, bei alleiniger Anwendung von Ozonbegasung in 20 % der Proben, bei Laserbestrahlung in keiner der Proben unterschritten. Die Verwendung von Laser oder Ozon unterschied sich hinsichtlich der erreichten Endkeimzahlen im Wurzelkanal lediglich in der Hauptgruppe 2 signifikant voneinander. Hier lagen signifikant weniger Proben unterhalb der Nachweisgrenze durch Laserbestrahlung ($p = 0,002$).

Alle Aufbereitungskombinationen zusammenfassend war der Anteil der Zähne ohne nachweisbare Mikroorganismen in der Gruppe CHX-Gel am höchsten mit 96,7 %; in der Gruppe Kalziumhydroxid lag der Vergleichswert bei 86,7 %. Nach der Anwendung von gasförmigem Ozon lag der Anteil der negativen Nachweise bei 40,0 %, nach Bestrahlung mit dem Diodenlaser bei 26,7 %. Dieser Vergleich der Behandlungen zeigt signifikante Unterschiede ($\alpha = 0,0042$; Chi-Quadrat-Test und Korrektur nach Bonferroni) von Laser- oder Ozonbehandlung gegenüber Kalziumhydroxid- oder CHX-Gel-Applikation ($p < 0,001$).

5.1.3 Endkeimzahl 2

Da die Ergebnisse der Endkeimzahl 2 gleichfalls variierten, wurden sie in drei Wertebereiche geteilt, deren Verteilung in Kreuztabellen dargestellt ist (Tabellen IX - XII).

Tab. IX: Verteilung der Endkeimzahlen 2 in Hauptgruppe 1

Hauptgruppe 1 Keine Aufbereitung		Behandlung				Gesamt
		Laser	Ozon	CHX-Gel	Ca(OH) ₂	
<Nachweisgrenze	Anzahl	0	2	15	11	28
	% von Behandlung	0,0 %	13,3 %	100,0 %	73,3 %	46,7 %
8,33 bis 4999	Anzahl	0	2	0	4	6
	% von Behandlung	0,0 %	13,3 %	0,0 %	26,7 %	10,0 %
>5000	Anzahl	15	11	0	0	26
	% von Behandlung	100,0 %	73,3 %	0,0 %	0,0 %	43,3 %
Gesamt	Anzahl	15	15	15	15	60
	% von Behandlung	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %

Tab. X: Verteilung der Endkeimzahlen 2 in Hauptgruppe 2

Hauptgruppe 2 NaCl		Behandlung				
		Laser	Ozon	CHX-Gel	Ca(OH) ₂	Gesamt
<Nachweisgrenze	Anzahl	0	3	15	13	31
	% von Behandlung	0,0 %	20,0 %	100,0 %	86,7 %	51,7 %
8,33 bis 4999	Anzahl	1	12	0	2	15
	% von Behandlung	6,7 %	80,0 %	0 %	13,3 %	25,0 %
>5000	Anzahl	14	0	0	0	14
	% von Behandlung	93,3 %	0 %	0 %	0 %	23,3 %
Gesamt	Anzahl	15	15	15	15	60
	% von Behandlung	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %

Tab. XI: Verteilung der Endkeimzahlen 2 in Hauptgruppe 3

Hauptgruppe 3 NaOCl		Behandlung				
		Laser	Ozon	CHX-Gel	Ca(OH) ₂	Gesamt
<Nachweisgrenze	Anzahl	11	12	15	15	53
	% von Behandlung	73,3 %	80,0 %	100,0 %	100,0 %	88,3 %
8,33 bis 4999	Anzahl	4	3	0	0	7
	% von Behandlung	26,7 %	20,0 %	0,0 %	0,0 %	11,7 %
Gesamt	Anzahl	15	15	15	15	60
	% von Behandlung	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %

Tab. XII: Verteilung der Endkeimzahlen 2 in Hauptgruppe 4

Hauptgruppe 4 CHX		Behandlung				
		Laser	Ozon	CHX-Gel	Ca(OH) ₂	Gesamt
<Nachweisgrenze	Anzahl	11	5	15	15	46
	% von Behandlung	73,3 %	33,3 %	100,0 %	100,0 %	76,7 %
8,33 bis 4999	Anzahl	3	10	0	0	13
	% von Behandlung	20,0 %	66,7 %	0,0 %	0,0 %	21,7 %
>5000	Anzahl	1	0	0	0	1
	% von Behandlung	6,7 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	1,7 %
Gesamt	Anzahl	15	15	15	15	60
	% von Behandlung	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %

Durch die Bestrahlung mit dem Diodenlaser wurden in den Hauptgruppen 1 und 2 keine Ergebnisse unter der Nachweisgrenze ermittelt, in den Hauptgruppen 3 und 4 jeweils zu 73,3 %. Durch die Applikation von gasförmigem Ozon wurden in den Hauptgruppen 1 und 2 in 13,3 % bzw. 20 % der Fälle Werte unter der Nachweisgrenze festgestellt, in

Hauptgruppe 3 in 80 % und in Hauptgruppe 4 in 33,3 %. Nach der medikamentösen Einlage mit CHX-Gel wurden in den Dentinproben aller Hauptgruppen keine Zellen mehr nachgewiesen. Nach Kalziumhydroxideinlage war dies in den Hauptgruppen 3 und 4 der Fall. In der Hauptgruppe 1 fand man in 73,3 %, in Hauptgruppe 2 in 86,7 % der Proben keine Zellen mehr in den Dentinproben nach Kalziumhydroxideinlage (Abbildung 20).

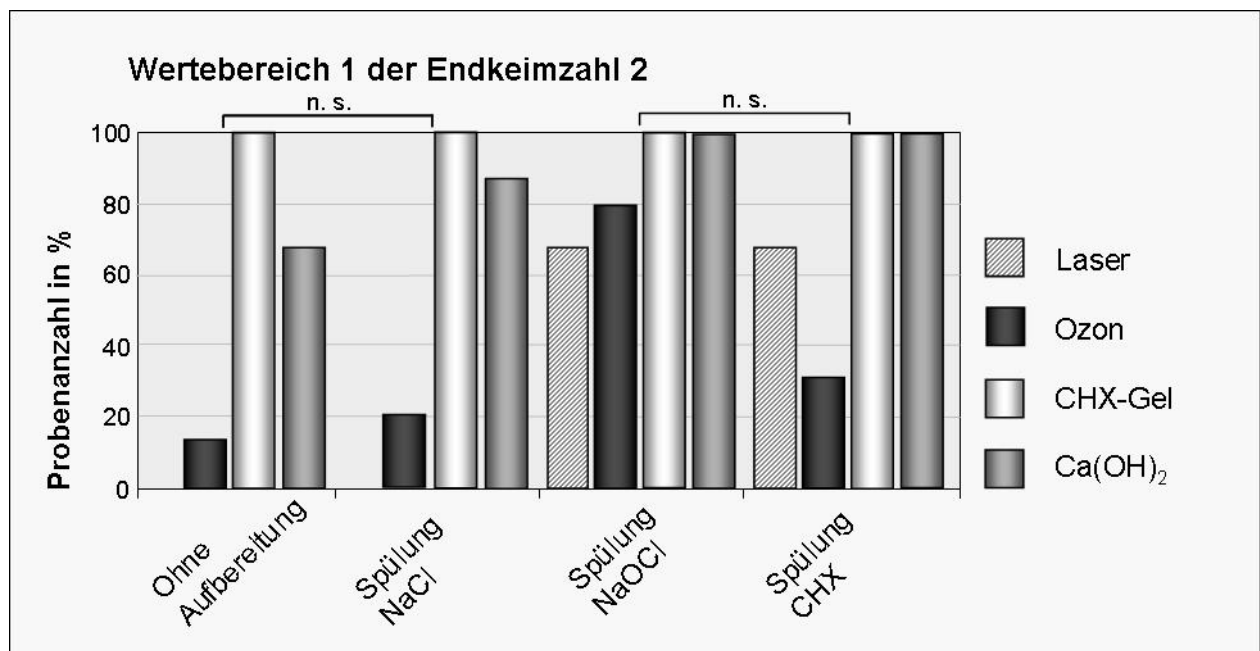


Abb. 20: Anzahl der Proben, deren Endkeimzahlen im Dentin unterhalb der Nachweisgrenze liegen.

Die Aufbereitungen wurden innerhalb der Hauptgruppen mit dem Chi-Quadrat Test nach Pearson gegeneinander getestet ($\alpha = 0,05$). In der Hauptgruppe 1 unterschieden sich CHX-Gel und Kalziumhydroxid im Vergleich zu Laser- und Ozonapplikation jeweils signifikant voneinander ($p < 0,001$). Laser- und Ozonapplikation unterschieden sich nicht signifikant voneinander, ebenso Kalziumhydroxid und CHX-Gel. In Hauptgruppe 2 unterschieden sich die Behandlungen jeweils signifikant voneinander ($p \leq 0,001$), lediglich für Kalziumhydroxid und CHX-Gel konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. In den Hauptgruppen 3 und 4 waren die Ergebnisse von Kalziumhydroxid und CHX-Gel identisch, es wurden jeweils keine Zellen mehr nachgewiesen. In diesen beiden Hauptgruppen unterschieden sich die Behandlungen nicht signifikant voneinander, lediglich die Behandlungen mit Ozon unterschieden sich signifikant von den medikamentösen Einlagen ($p < 0,001$) und Laser ($p < 0,025$) in der Hauptgruppe 4. In der Hauptgruppe 3 wurden insgesamt keine Keimzahlen oberhalb von 5000 CFU/mg Dentin ermittelt.

Zwischen der Endkeimzahl 1 der planktonischen Zellen im Wurzelkanal und der Endkeimzahl 2 der adhärennten Zellen der Dentinproben besteht eine hohe Korrelation ($R = 0,855$) für jede einzelne Probe. Von 147 Proben ohne Nachweis von *Candida*-Zellen im Wurzelkanal konnten lediglich in zehn Fällen in Dentinproben Zellen nachgewiesen werden (6,8 %). Sechs dieser Fälle traten nach Bestrahlung mit dem Diodenlaser auf, vier nach Ozonapplikation.

5.1.4 Keimzahlreduktion

Für jede Versuchsprobe wurde die Keimzahlreduktion durch den Vergleich Endkeimzahl 1 zu Ausgangskeimzahl in Prozent ermittelt. Die Ergebnisse der 16 Studiengruppen wurden gegeneinander getestet ($\alpha \leq 0,05$; Chi-Quadrat-Test nach Pearson). Die Einteilung der Einzelwerte in drei Klassen wurde auch hier durchgeführt:

Unterhalb der Nachweisgrenze:	< 0,00625 %
Mittlere Werte:	0,00625 - 0,024 %
Hohe Werte:	> 0,024 %

Abb. 21: Klassierte Wertebereiche der Keimzahlreduktion.

Die Werte entsprechen dem prozentualen Anteil der Endkeimzahl 1 von der Ausgangskeimzahl: Lagen die Werte der Endkeimzahl unterhalb der Nachweisgrenze, so sind minimal 0,00625 % des Ausgangswertes verblieben. Gemessen am kleinsten Wert der Ausgangskeimzahlen von 8×10^6 CFU/ml und der Nachweisgrenze von 5×10^2 CFU/ml entspricht dies einer Keimzahlreduktion von mehr als $7,99 \times 10^6$ CFU/ml. Im Bereich 3 sind mehr als 0,024 % des Ausgangswertes verblieben, die Reduktion beträgt weniger als $2,08 \times 10^6$.

Die Reduktion um mehr als $7,99 \times 10^6$ CFU/ml lag in der Gruppe mit alleiniger CHX-Gel-Applikation zu 100 %, in der Kalziumhydroxidgruppe zu 60 % und in der Ozongruppe zu 20 % vor, lediglich in der Lasergruppe wurden diese Werte in keiner Probe ermittelt.

Die relative Keimzahlreduktion ist im Folgenden getrennt nach Behandlungsgruppen dargestellt (Abbildungen 22-25). Für jede Aufbereitungskombination sind die prozentualen Anteile der Wertebereiche 1-3 angegeben.

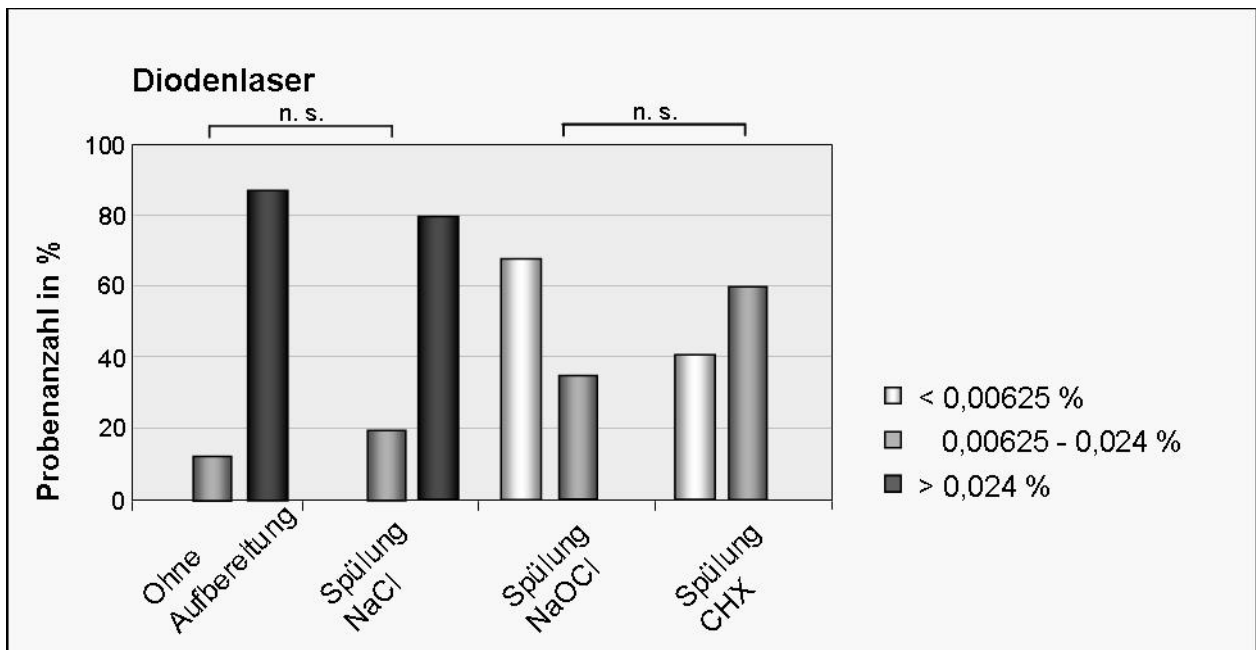


Abb. 22: Keimzahlreduktionen nach Bestrahlung mit dem Diodenlaser.

Durch die Bestrahlung mit dem Diodenlaser wurden lediglich in Kombination mit NaOCl-Spülung (66,7 %) oder CHX-Spülung (40 %) Keimzahlreduktionen im Bereich 1 erreicht. Bei alleiniger Anwendung des Diodenlasers lag die Keimzahlreduktion zu 86,7 % im Wertebereich 3, die Reduktion war geringer als $2,08 \times 10^6$ CFU/ml.

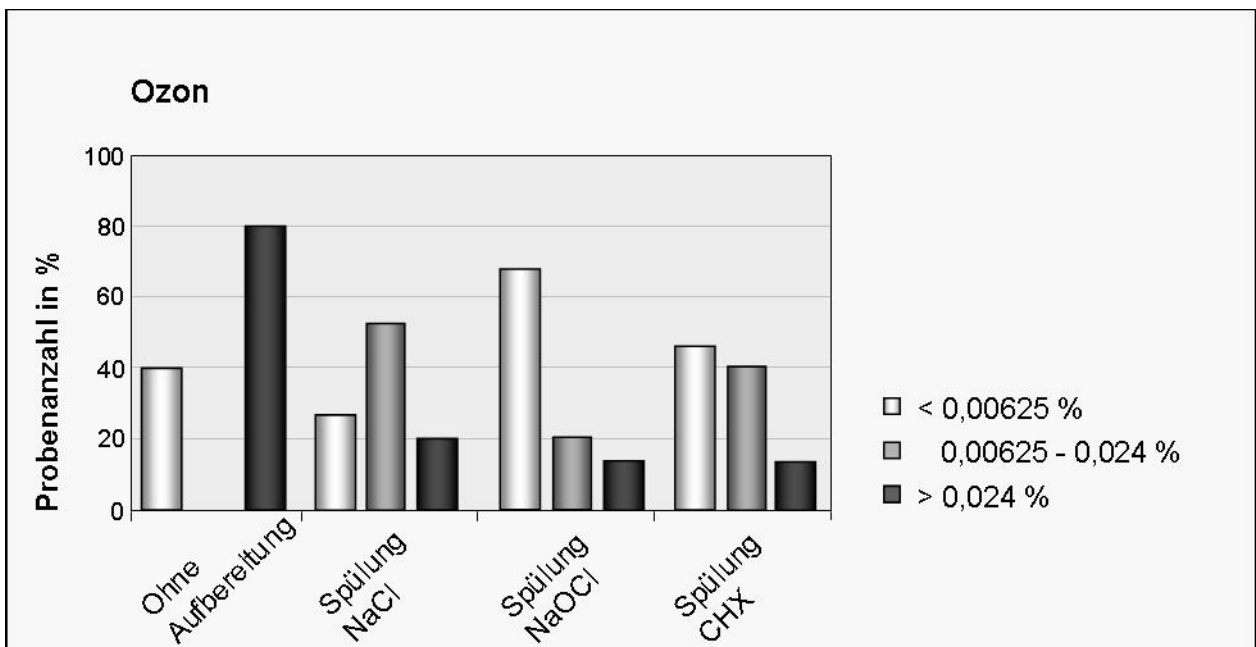


Abb. 23: Keimzahlreduktionen nach Begasung mit Ozon.

Durch die Begasung mit Ozon wurden in allen Hauptgruppen häufiger höhere Keimzahlreduktionen erreicht als durch die Laserbestrahlung. Durch die 7-tägige Einlage von CHX-Gel wurden in den Hauptgruppen 1, 3 und 4 zu 100 % höhere

Keimzahlreduktionen als $7,99 \times 10^6$ erreicht. In Kombination mit Aufbereitung und NaCl-Spülung war dies zu 86,7 % der Fall (Abbildung 24).

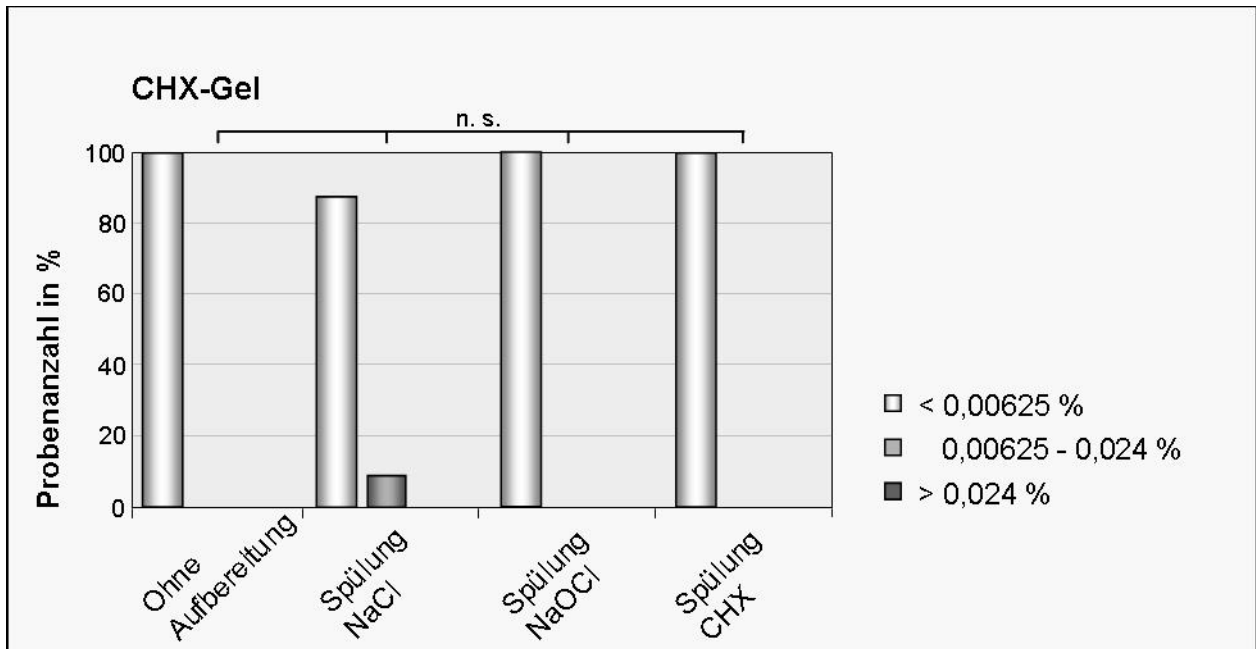


Abb. 24: Keimzahlreduktionen nach Applikation von CHX-Gel.

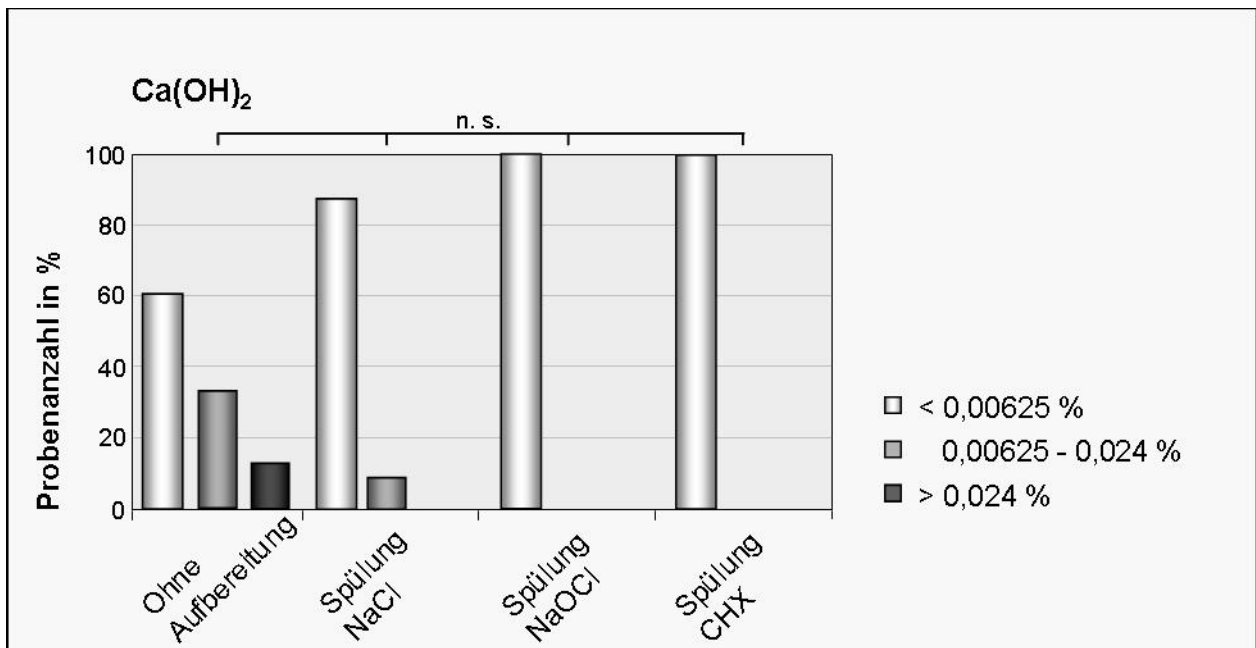


Abb. 25: Keimzahlreduktionen nach Applikation von Kalziumhydroxid.

Im Bezug auf die Keimzahlreduktion lassen sich folgende Unterschiede der Behandlungsgruppen beschreiben ($\alpha \leq 0,05$; Chi-Quadrat-Test nach Pearson): Durch Laserbestrahlung wurden häufiger geringe Reduktionen als durch Ozonbehandlung erreicht, in Hauptgruppe 2 war dieser Unterschied signifikant ($p = 0,002$). Nach Ozonbehandlung wurden in allen Hauptgruppen signifikant geringere

Keimzahlreduktionen ermittelt als nach Kalziumhydroxideinlage: Hauptgruppe 1 ($p < 0,001$), Hauptgruppe 2 ($p = 0,003$), Hauptgruppe 3 ($p = 0,042$), Hauptgruppe 4 ($p = 0,002$). Durch die Verwendung von Kalziumhydroxid wurden geringere Reduktionen erreicht als durch CHX-Gel (Abbildungen 24 - 25), allerdings war der Unterschied nur in Hauptgruppe 1 signifikant ($p = 0,017$).

Die Auswertung der relativen Keimzahlreduktion wurde zusätzlich mit zweifaktorieller (Hauptbehandlungen und Aufbereitungen) ordinaler logistischer Regressionsanalyse durchgeführt. Somit sind Paarvergleiche angestellt worden, um sowohl die Hauptbehandlungen, unabhängig von den jeweiligen Aufbereitungen, als auch die Aufbereitungsmethoden, unabhängig von den Hauptbehandlungen, vergleichen zu können. Testet man die ermittelten Werte der Keimzahlreduktion gegeneinander (Variable 3: Endkeimzahl 1 zu Ausgangskeimzahl in Prozent), so ist ein direkter Vergleich möglich ($\alpha = 0,0042$; Chi-Quadrat-Test und Korrektur nach Bonferroni). Nicht signifikant unterschieden sich die Behandlungen mit CHX-Gel und Kalziumhydroxid voneinander ($p = 0,051$), ebenso waren die Behandlungen mit Ozon und Laser nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,043$). Eine signifikant höhere Keimzahlreduktion zeigte sich bei der Behandlung mit CHX-Gel gegenüber der Laserbestrahlung ($p < 0,001$) und der Applikation von Ozon ($p < 0,001$). Für Kalziumhydroxid wurde ebenfalls eine signifikant höhere Keimzahlreduktion als für Laser- und Ozonbehandlung ($p < 0,001$) festgestellt.

Der Vergleich der Aufbereitungsmethoden, unabhängig von der durchgeführten Hauptbehandlung, zeigt, dass sich die Keimzahlreduktion der Gruppen mit Aufbereitung und Verwendung von physiologischer Kochsalzlösung (Hauptgruppe 2) nicht signifikant von den Gruppen ohne Aufbereitung (Hauptgruppe 1) unterschied ($\alpha = 0,0042$; Chi-Quadrat-Test und Korrektur nach Bonferroni). In Hauptgruppe 1 konnte in 45 % der Zahnproben ($n = 60$) die Keimzahlreduktion für Bereich 1 erreicht werden, in Hauptgruppe 2 war dies der Fall bei 50 % der Proben. In Hauptgruppe 3 erreichten 83,3 % aller Proben diesen Wert, bei Hauptgruppe 4 71,7 %. Ebenfalls kein signifikanter Unterschied bestand zwischen CHX (Hauptgruppe 4) und NaOCl (Hauptgruppe 3) als Spüllösung. Beide Wirkstoffe jedoch erhöhten die Keimzahlreduktion jeweils gegenüber keiner Aufbereitung und Aufbereitung mit NaCl signifikant ($p = 0,001$).

5.2 Qualitative Auswertung

Der optische Nachweis der Zellen von *C. albicans* wurde durch eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung bei exemplarischen Proben erbracht. Hierzu wurden die Zellkerne durch einen unspezifischen DNA-Farbstoff angefärbt (Abbildungen 26 und 27).

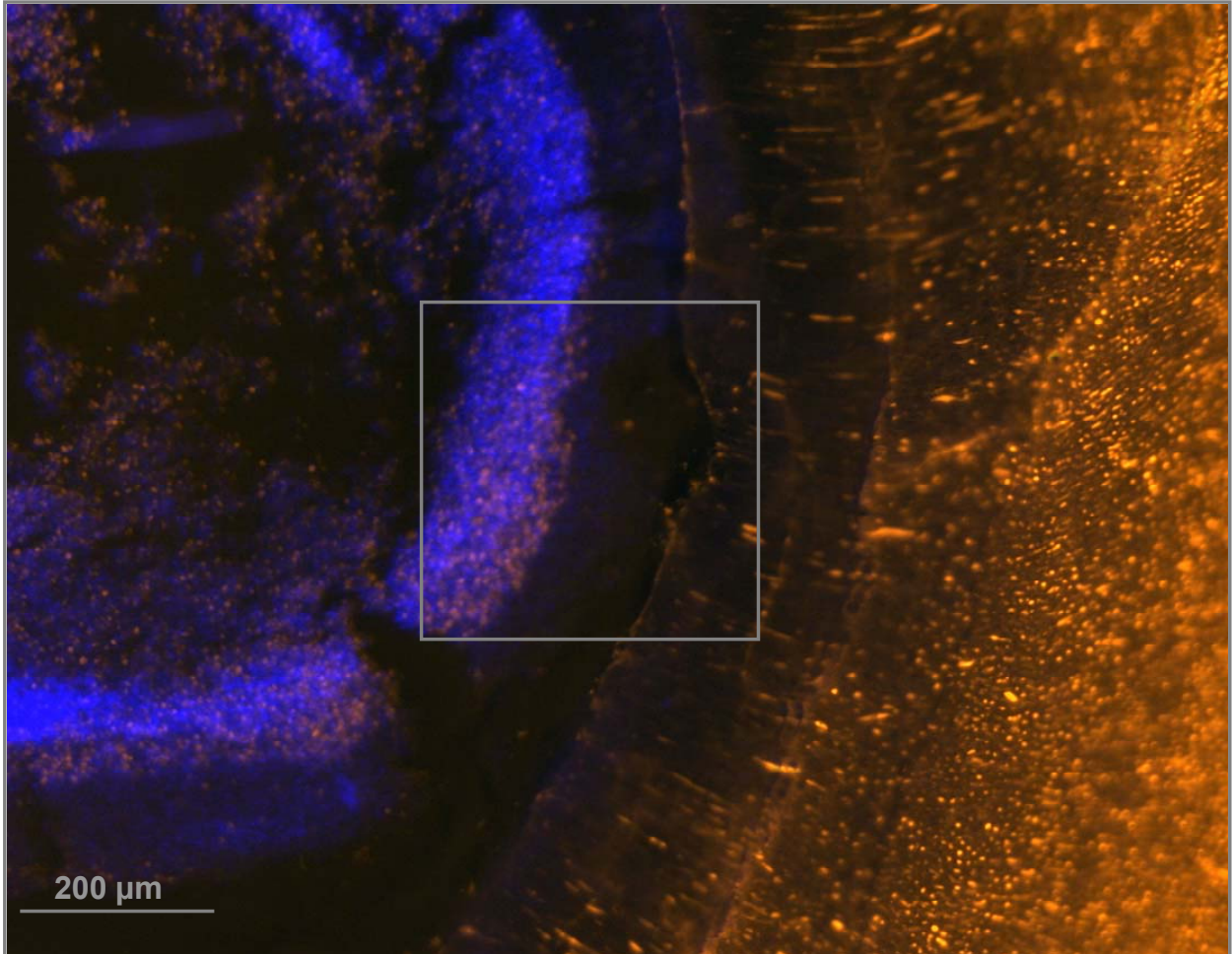


Abb. 26: Darstellung des blau fluoreszierenden Biofilms von *C. albicans* in den Versuchszähnen: Die Anfärbung erfolgte mit Hilfe des DNA-Farbstoffs DAPI. Dieser Querschnitt eines Zahnes auf Höhe des mittleren Wurzeldrittels zeigt das Wurzelkanallumen und die besiedelte Wurzelkanaloberfläche. Die Spaltbildung zwischen dieser Zellschicht und der Dentinoberfläche ist als Artefakt durch die Fixation anzusehen. In tieferen Dentinschichten wurden keine Zellen nachgewiesen.

Eine unspezifische Anfärbung konnte durchgeführt werden, da bei Kontaminationskontrollen zu keinem Zeitpunkt Fremderreger nachgewiesen wurden. Entlang der Wurzelkanalwand stellte sich eine mehrlagige Zellschicht dar. Die Besiedelung der Dentinoberfläche wird als Biofilm bezeichnet, da eine derart dichte und stabile Formation der Zellen lediglich durch die Produktion von extrazellulärer Matrix zustande kommen kann.

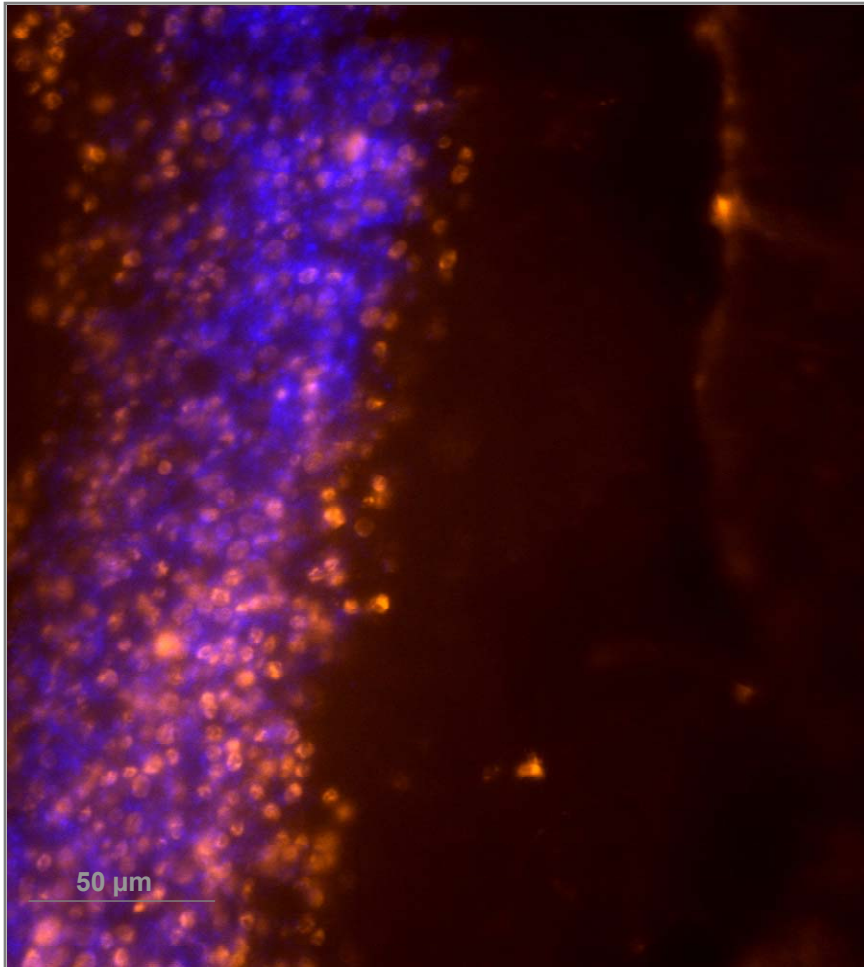


Abb. 27: Dieser vergrößerte Ausschnitt aus Abbildung 23 zeigt den Biofilm von *C. albicans*. Die Blastosporen stellen sich hellorange dar, die Zellkerne hellblau.

Bei Sterilitätskontrollen vor Beginn der Einsaat wurden keine Mikroorganismen in den Zahnproben nachgewiesen. Auf Universalnährmedien wurde während der Versuche nur Wachstum von *C. albicans* beobachtet, das heißt, es hat weder vor Beginn noch während der Versuche eine Kontamination mit Mikroorganismen vorgelegen.

6 Diskussion

6.1 Diskussion von Material und Methoden

Für diese Untersuchung wurde ein Biofilm von *C. albicans* in Wurzelkanälen humaner Zahnwurzeln gezüchtet. Von verschiedenen Pilzspezies wurde *C. albicans* am häufigsten aus Wurzelkanälen revisionsbedürftiger, wurzelkanalgefüllter Zähne isoliert und gilt als resistent gegenüber vielen Wirkstoffen [Siqueira *et al.* 2004].

Um unterschiedliche Therapien gegenüber Mikroorganismen reproduzierbar untersuchen zu können, wurden In-vitro-Biofilmmodelle auf verschiedenen Oberflächen (Glas, Titan, Kunststoff) etabliert [Chandra *et al.* 2001, Nikawa *et al.* 2003, Suci *et al.* 2003]. In der vorliegenden Untersuchung wurde humanes Dentin in Form kompletter Zahnwurzeln als Versuchsmaterial genutzt. Durch Lagerung ausschließlich in Kochsalzlösung wurde die Dentinmorphologie erhalten. Ähnliche Modelle wurden bereits in anderen Studien benutzt [Mehl *et al.* 1999, Noetzel *et al.* 2009] und bieten Vorteile gegenüber Untersuchungen von Mikroorganismen in Flüssigkeiten, in bovinen Dentinproben oder von Biofilmen auf künstlichen Materialien. Anhand dieses Modells konnten verschiedene Behandlungen parallel verglichen werden und die Pilzzellen in reproduzierbaren Versuchsbedingungen sowie in Bedingungen ähnlich der klinischen Situation bei einer Infektion des Wurzelkanals untersucht werden. Diese geht mit der Adhäsion auf der Dentinoberfläche und der Besiedlung anatomischer Nischen des Wurzelkanalsystems und daraus resultierenden höheren Resistenzen gegen fungizide Wirkstoffe einher [Siqueira *et al.* 2002, Waltimo *et al.* 2003, Siqueira *et al.* 2004].

Es gibt Hinweise, dass in Gegenwart von Dentin die antibakterielle Wirksamkeit von Kalziumhydroxid sowie von Spüllösungen im Vergleich zu Testbedingungen auf künstlichen Oberflächen eingeschränkt ist [Haapasalo *et al.* 2000, Portenier *et al.* 2001]. Somit ist es bei Studien zu bakteriziden und fungiziden Wirkstoffen zusätzlich von Bedeutung, die Mikroorganismen in Dentinproben zu untersuchen.

C. albicans kann einen Biofilm auf der Wurzelkanaloberfläche bilden [Sen *et al.* 1997] und die Dentinkanälchen besiedeln [Waltimo *et al.* 2003]. Die Voraussetzung für das Eindringen der Zellen und die Kolonisation des Dentins bilden offene, nicht durch eine Schmierschicht verlegte, durchgängige Dentinkanälchen. Eine Studie zeigte, dass die Bildung eines Biofilms auf der Dentinoberfläche begünstigt war durch das Vorliegen einer Schmierschicht [Sen *et al.* 1997]. Freiliegende Zellbestandteile und freie Kalziumionen der Schmierschicht können die Adhäsion fördern [Vitkov *et al.* 2002].

Bei den Versuchszähnen wurde während der initialen Aufbereitung der Wurzelkanäle EDTA zur Entfernung der Schmierschicht benutzt. Dies erfolgte, um, analog zur klinischen Situation nekrotischer und infizierter Wurzelkanäle, die Dentinkanälchen zu öffnen und die Schmierschicht zu entfernen. Da eine Studie Hinweise auf eine fungizide Wirkung von EDTA zeigte [Sen *et al.* 2000], wurden Rückstände dieses Wirkstoffs entfernt. Dazu wurden die Zahnproben unmittelbar nach der Aufbereitung mit jeweils 10 ml steriler Kochsalzlösung gespült. Anschließend sind sie 14 Tage mit täglich wechselnder Lösung in steriler Kochsalzlösung gelagert worden.

Die Einbettung der Zähne in Kunststoff war aus mehreren Gründen erforderlich. Zum einen, damit die flüssige Nährlösung nicht aus dem Wurzelkanal austreten konnte, und zum anderen, damit die mikrobielle Besiedelung sich nicht auf die äußere Dentinoberfläche erstreckte. Letztlich war nur so die Hygiene zu gewährleisten und die Kontamination von Labormaterialien und der Umgebung zu vermeiden. Um eine suffiziente Abdichtung zu erreichen und um eine Spaltbildung zwischen Zahnwurzeloberfläche und Kunststoff durch dessen Polymerisationsschrumpfung zu verhindern, wurde die äußere Oberfläche der Zahnwurzeln vor der Einbettung versiegelt.

Im Rahmen der Vorversuche wurde anhand einer Wachstumskurve und fluoreszenzmikroskopischer Nachweise gezeigt, dass die Wachstumsbedingungen für *C. albicans* ausreichend waren, um nach 14 Tagen Inkubation in den hergestellten Proben einen Biofilm sowie planktonische Keimzahlen von 10^8 CFU/ml zu bilden. Während der Hauptversuche stieg die Konzentration von 10^5 CFU/ml zum Zeitpunkt der Beimpfung auf einen Medianwert von $3,66 \times 10^8$ CFU/ml. Lediglich in neun der 240 Zahnproben kam es erst nach einer erneuten Beimpfung zu Wachstum. Die Verwendung von kompletten Zahnwurzeln zur Untersuchung eignete sich nicht nur aus dieser Sicht, sondern die untersuchten Behandlungen konnten auch analog zum klinischen Vorgehen im Wurzelkanal durchgeführt werden (z. B. Anstellwinkel der Laserfaser auf der Dentinoberfläche, von Ozon begastes Volumen des Kanals, Applikation der medikamentösen Einlagen).

Biofilme von Mikroorganismen sind organisierte Zellpopulationen, die in eine selbstproduzierte extrazelluläre Polysaccharidmatrix eingebettet sind [Donlan *et al.* 2002]. Variierende Literaturangaben zur Biofilmbildung von *C. albicans* auf Dentin sowie zu dessen Nachweis ließen keine eindeutige Folgerung zu, die auf diese Untersuchung übertragen werden konnte. Die Bildung von Biofilmen bei *C. albicans*

wird beeinflusst von Faktoren wie Temperatur, Nährmedium, Flüssigkeitsbewegung, Sauerstoffzufuhr [Ramage *et al.* 2001, Blankenship *et al.* 2006] und Oberflächenbeschaffenheit der Probe [Lamfon *et al.* 2003]. Zu Biofilmen auf Dentin wurde gezeigt, dass das Vorliegen der Schmierschicht die Biofilmbildung positiv beeinflussen kann, das Eindringen von Hyphen in Dentinkanälchen jedoch erschweren kann [Sen *et al.* 1997].

Der eindeutige mikrobiologische Nachweis eines Biofilms von *C. albicans* kann durch den Nachweis von extrazellulärer Matrix und Hyphenbildung erbracht werden [Ramage *et al.* 2001]. Untersuchungen zur Biofilmbildung von *C. albicans* auf PMMA-Scheiben zeigten das Vermögen, nach 48 Stunden Biofilme zu bilden [Chandra *et al.* 2001]. Dies zugrunde legend, bezeichnen andere Autoren ihre Untersuchung als Biofilm-Modell [Sennhenn-Kirchner *et al.* 2009] und gehen ohne dessen Nachweis, lediglich aufgrund des Anzuchtzeitraumes, vom Vorliegen eines Biofilms aus. Zu Beginn der vorliegenden Studie wurde mittels mikroskopischer Untersuchung exemplarischer Zahnproben der optische Nachweis von adhärennten, mehrlagigen Zellschichten auf der Dentinoberfläche des Wurzelkanals erbracht. Nicht allein aufgrund der 14-tägigen Anzucht, sondern insbesondere aufgrund der dichten Formation ist davon auszugehen, dass trotz des fehlenden direkten Nachweises von extrazellulärer Matrix und Hyphenbildung ein Biofilm von *C. albicans* vorgelegen hat. Die vitalen Hefezellen wurden in den Versuchsreihen mittels CFU auf Selektivnährböden und in Vorversuchen mittels DNA-Anfärbung nachgewiesen.

Studien, die bakterizide und fungizide Effekte in Wurzelkanälen untersuchten, unterscheiden sich in den Nachweismethoden der Mikroorganismen (Kultur, PCR, Mikroskopie, optische Dichtemessung, Fluoreszenzmarkierung). Selbst die kulturmikrobiologischen Verfahren unterscheiden sich hinsichtlich der Probenentnahme: Teilweise wurden Flüssigkeiten entnommen (mit planktonischen Zellen), teilweise Dentinspäne, oder die gesamte Probe wurde untersucht. Die Probenentnahme durch Bearbeitung der Dentinwände mit Instrumenten oder durch Papierspitzen zur Entnahme des Kanalinhalt lässt Interpretationsspielraum bei quantitativen Bestimmungen, denn mit Instrumenten kann das Kanalwanddentin nicht vollständig zirkumferent entnommen werden, so wenig wie der komplette Kanalinhalt mit Papierspitzen. Pipettenspitzen zur Flüssigkeitsentnahme konnten in dieser Untersuchung aufgrund der engen Kanallumina der Zahnproben nicht zum Einsatz kommen. Die angewendete Methode zur Probenentnahme aus dem Wurzelkanal wurde daher in Vorversuchen auf

Reproduzierbarkeit geprüft. Anhand von *Candida*-Suspensionen mit bekannter Konzentration (anhand der McFarland-Skala) wurde gezeigt, dass durch das Aufsaugen dieser Suspension mit Papierspitzen Werte ermittelt werden, die sowohl der bekannten Konzentration als auch der mit Pipettenspitzen entnommenen und ermittelten Konzentration entsprechen.

Ein klassisches mikrobiologisches Nachweisverfahren ist die Anzucht von Mikroorganismen auf Nährmedien und die Auszählung der entstandenen koloniebildenden Einheiten (CFU); es ist in der Mikrobiologie etabliert und liefert zuverlässige Ergebnisse. Als Nachteil dieses Verfahrens muss jedoch angesehen werden, dass es zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann, wenn die Keimzahlen unter der Nachweisgrenze liegen [Wu *et al.* 2006]. Zudem können vitale aber nicht kultivierbare Zellen nicht nachgewiesen werden. Eine Untersuchung zeigte, dass sich nach vierwöchiger Kalziumhydroxideinlage koloniebildende Einheiten in primär infiziertem Wurzelkollagen nicht mehr nachweisen ließen. Nach selektiver Fluoreszenzmarkierung mit Vitalfarbstoffen fand man jedoch neben toten auch vitale Mikroorganismen [Weiger *et al.* 2002]. Welche klinische Bedeutung solche vitalen, aber nicht kultivierbaren, nicht teilungsaktiven Bakterien haben ist nicht geklärt, zumal diese eventuell vorhandenen Zellen *in vivo* keinesfalls idealen Wachstumsbedingungen ausgesetzt werden sondern der sich anschließenden Wurzelkanalfüllung.

In der vorliegenden Untersuchung wurde eine möglichst niedrige Nachweisgrenze zur Minimierung von falsch negativen Nachweisen gewählt. Es wurde jedoch keine weitere Untersuchung durchgeführt, die belegen könnte, dass keine vitalen Zellen mehr vorhanden waren. Der Verzicht darauf entspricht einerseits der Fragestellung zur Keimzahlreduktion und andererseits zeigten bereits klinische Studien, dass verbliebene Keimzahlen in Größenordnung der hier gewählten Nachweisgrenze keinen negativen Einfluss auf die Erfolgsrate der Behandlung hatten [Peters *et al.* 2002]. Die Probenentnahme zur Bestimmung der Endkeimzahlen wurde unmittelbar nach Durchführung der Behandlungen durchgeführt, dies entspricht zum einem dem klinischen Zeitpunkt unmittelbar vor der Wurzelkanalfüllung. Zum anderen ist die Angabe von Keimzahlreduktionen nur auf diese Weise möglich, da es bei einer erneuten Inkubation mit Nährmedien zu einem Anstieg der Keimzahlen kommt. Somit war bei Meta-Analysen von Studien zur Wirksamkeit von medikamentösen Wurzelkanaleinlagen eine spätere Probenentnahme ein Ausschlusskriterium [Law *et al.* 2004, Sathorn *et al.* 2007]. Zudem konnten Kritiker der unmittelbaren Probenentnahme

[Reit *et al.* 1988] nicht zeigen, dass eine erneute Inkubation Vorteile hinsichtlich der Anzahl falsch negativer Nachweise bietet: Bei der mikrobiologischen Untersuchung von Wurzelkanälen, die zuvor medikamentöse Einlagen enthielten, zeigten sieben zunächst negativ getestete Proben nach einer Woche erneut Wachstum; ebenso viele positiv getestete Proben zeigten nach diesem Zeitraum kein Wachstum mehr [Reit *et al.* 1999]. Zu beachten sind mögliche wachstumsinhibierende Effekte auf den Nährmedien, die durch die Übertragung des Wirkstoffs der medikamentösen Einlagen erfolgen könnten. Im Gegensatz zur vorliegenden Untersuchung wurden daher in verschiedenen Studien die medikamentösen Einlagen nicht allein mit physiologischer Kochsalzlösung entfernt und neutralisiert, sondern zusätzlich mittels einer Neutralisationslösung. Im Falle von Kalziumhydroxid wurde Zitronensäure verwendet [Orstavik *et al.* 1991, Sjogren *et al.* 1991, Peters *et al.* 2002]. Dieses Verfahren ist jedoch kritisch zu bewerten, da die Neutralisationslösung ebenso auf die Medien übertragen wird und selbst negativen Einfluss auf die Teilungsfähigkeit der Zellen haben könnte.

Die potentielle Übertragung von fungizider Wirksamkeit auf das Nährmedium ist ein grundsätzliches Problem bei der Anzucht auf Nährmedien und kann auch in der vorliegenden Studie letztlich nicht ausgeschlossen werden. Jedoch nehmen im Laufe der Inkubationszeit die fungizide Wirksamkeit der Wirkstoffe und damit das Risiko einer Wachstumseinschränkung durch Übertragung ab. Für Kalziumhydroxid wurde in einem Agar-Diffusionstest gezeigt, dass die bakterizide Wirkung nach 48 Stunden bereits nachlässt [Neelakantan *et al.* 2007]. Wachstumsinhibierende Faktoren waren nach 7 Tagen Inkubation der Proben auf den Nährmedien nicht feststellbar. Zumindest in den Hauptgruppen 1 und 2 wies ein geringer Teil der Nährmedien Keimzahlen aus den Bereichen 2 und 3 auf. Zudem zeigt die hohe Korrelation der Endkeimzahlen im Wurzelkanal und im Dentin innerhalb der einzelnen Studiengruppen keine inhibierenden Faktoren. Diese wären bei der Untersuchung des Kanalinhalt stärker ausgeprägt als bei der Untersuchung des Biofilms in den Dentinproben, denn obwohl die Wirkstoffe oberflächlich in Dentin eindringen [Haapasalo *et al.* 1987] dürfte deren Übertragung bei der Entnahme von Dentinproben geringer sein. Auf einen weiteren wichtigen Punkt wurde bereits eingegangen: Die in dieser Untersuchung ermittelten Keimzahlen entsprechen derer, die klinisch zum Zeitpunkt unmittelbar vor der Wurzelkanalfüllung vorhanden sind. Somit liegen mögliche inhibierende Faktoren durch Rückstände der medikamentösen Einlagen *in vivo* ebenfalls vor und beeinflussen die Bewertung der untersuchten Verfahren nicht.

Die Bestimmung der Ausgangskeimzahl und der Endkeimzahl 1 im Wurzelkanal (CFU/ml) wurde unter identischen Bedingungen durchgeführt und diente der Ermittlung der Keimzahlreduktion durch die verschiedenen Behandlungen. Die Verteilung der Ergebnisse auf drei klassierte Bereiche ist sicherlich nicht so anschaulich wie die Angabe von Mittelwerten in CFU/ml, wie sie in anderen Studien zu finden ist. Allerdings ist zur qualitativen Beurteilung lediglich die Anzahl der Werte jeweils aus Bereich 1 relevant, höhere Keimzahlen sind mit den Anforderungen an eine endodontische Behandlung nicht vereinbar. Zudem ist die Aussage, ein Wirkstoff habe eine Keimzahlreduktion von 10^5 CFU/ml oder um 90 % erreicht, solange nicht von Bedeutung, wie der erreichte Endwert unbekannt ist.

Die Bestimmung der Endkeimzahl 2 im Kanalwanddentin, ohne einen entsprechenden Ausgangswert in jeder Probe, diente der Bewertung der Wirksamkeit der untersuchten Verfahren gegenüber Biofilm-Zellen, jedoch ohne eine quantitative Keimzahlreduktion zu ermitteln. Vor den Behandlungen wurde eine Entnahme von Dentinspänen zur Erhebung eines Ausgangswertes im Dentin der Proben nicht durchgeführt, da dies zum Abtrag von adhären Zellen geführt, den *Candida*-Biofilm zerstört und somit die Ausgangssituation verändert hätte. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse der untersuchten Behandlungen durch Substanzabtrag mit den Hedströmfeilen zu vermeiden, ist darauf verzichtet worden. Die Erhebung eines Ausgangswertes der Konzentration der adhären Zellen war zudem nicht von entscheidendem Interesse, da die Bearbeitung der Dentinwände mit Instrumenten zur Probenentnahme nur exemplarisch die Besiedelung der Kanalwand und des Dentins darstellt und eine quantitative Auswertung dieser Keimzahlen somit weniger exakt ist.

Interessanter schien es, die Frage zu klären, ob eine Korrelation zwischen den planktonischen Endkeimzahlen des Wurzelkanals und den Endkeimzahlen der adhären Zellen des Biofilms auf der Dentinoberfläche besteht. Diese wurde hier gezeigt und trat auch in der Hauptgruppe 1 auf, die auf eine weitere mechanische Wurzelkanalaufbereitung verzichtete. Somit kann nicht davon ausgegangen werden, dass lediglich der mechanische Abtrag der Zellen in den anderen Studiengruppen für die Zerstörung des Biofilms verantwortlich war. Diese Korrelation scheint zunächst der Annahme zu widersprechen, dass in Biofilmen organisierte Zellen generell resistenter sind als planktonische Zellen [Ramage *et al.* 2001]. Allerdings wurde innerhalb des Biofilms keine Ausgangskeimzahl ermittelt, lediglich die Endkeimzahl, so dass keine Keimzahlreduktion gemessen wurde, die einen direkten Vergleich der Wirksamkeit

gegenüber planktonischen Zellen mit der Wirksamkeit gegenüber den Biofilmzellen zuließe.

Wird eine quantitative Keimzahlbestimmung im Dentin vor und nach den Versuchen gewünscht, wäre ein völlig anderer Versuchsaufbau nötig. Beinhaltet dieser die Teilung der Proben, so kann die eine Probenhälfte der Bestimmung des Ausgangswertes dienen, die andere zur Ermittlung der Endkeimzahlen. Auf einen derartigen Versuchsaufbau ist aufgrund der Fragestellung verzichtet worden und weil jede mechanische Manipulation der Proben die empfindlichen Mikroorganismen zerstören und die Ergebnisse verfälschen kann. Der exemplarisch erhobene Ausgangswert der Keimzahlen im Dentin (Mittelwert $8,48 \times 10^4$ CFU/mg) lässt jedoch bei den Behandlungen, die Werte unter der Nachweisgrenze von 8,33 CFU/mg erreichten, ein Reduktionsvermögen um 10^4 /mg vermuten.

Zusätzliche optische Untersuchungen in nachfolgenden Studien können Informationen über die Lokalisation der *Candida*-Zellen und über deren Morphologie liefern. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zum Beispiel ist ein Verfahren zum eindeutigen molekulargenetischen Nachweis von bestimmten Mikroorganismen. Dieses Verfahren entdeckt Nukleinsäuren von Mikroorganismen mit einer fluoreszenzmarkierten RNA-Sonde, die speziesspezifisch mit ihrer komplementären Zielsequenz in der intakten Zelle hybridisiert und welche dadurch mikroskopisch untersucht werden kann. Mithilfe dieser Methode konnten Mikroorganismen in ihrem Lebensraum oder im infizierten Gewebe identifiziert, lokalisiert, sowie deren Anzahl bestimmt werden [Moter *et al.* 2000].

Zur negativen Kontrolle der Proben, die mit den medikamentösen Einlagen 7 Tage lang inkubiert wurden, diente die vorausgegangene Wachstumskurve. Die Konzentration von *C. albicans* war im selben Zeitraum ohne Behandlung nicht unter 10^8 CFU/ml gesunken, so dass nicht davon ausgegangen werden kann, dass wachstumslimitierende Einflüsse in den Zahnproben vorlagen.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

Mittels standardisierter Aufbereitung, identischer Startlösung, Nährlösung und Inkubation wurden vergleichbare Ausgangssituationen (bezüglich der Keimzahl und der Dentinbesiedelung) in allen untersuchten Zähnen erreicht. Es wurden zu keiner Zeit Fremderreger nachgewiesen. Nach zweiwöchiger Anzucht mit angepassten Nährbedingungen (37° C, Selektivnährmedium) wurde eine mittlere Ausgangskeimzahl

von $3,66 \times 10^8$ CFU/ml erreicht (Q1: $1,73 \times 10^8$; Q3: $5,87 \times 10^8$) mit einer Standardabweichung von $2,728 \times 10^8$. Diese Varianz der Ausgangskeimzahlen entstand durch die Verwendung von humanen Zähnen mit unterschiedlicher Dentinmorphologie und der 14-tägigen Wachstumszeit von *C. albicans* in den Wurzelkanälen, trotz identischer Konzentration zum Zeitpunkt der Probenbeimpfung und identischer Probenherstellung. Der Unterschied der Ausgangskeimzahlen wurde bei der statistischen Auswertung berücksichtigt, indem die Keimzahlreduktion für jede Probe separat ermittelt wurde. Die Abweichung der Ausgangswerte innerhalb der 240 Zähne ist aus mikrobiologischer Sicht bemerkenswert gering, da die Medianwerte aller Studiengruppen im Bereich einer Zehnerpotenz lagen (10^8 CFU/ml).

Bei einem Probenvolumen von 30 μ l pro Wurzelkanal lag die errechnete Gesamtkeimzahl bei $1,2 \times 10^7$ CFU. Diese liegt oberhalb der in klinischen Fällen nachgewiesenen Keimzahl von 4×10^5 CFU [Bystrom *et al.* 1981]. Die exemplarisch erhobene mittlere Ausgangskeimzahl in oberflächlichen Dentinschichten von $8,48 \times 10^4$ CFU/mg liegt unterhalb der Konzentration von 5×10^6 CFU/mg, die in klinischen Fällen von infizierten Wurzelkanälen ermittelt wurde [Peters *et al.* 2001].

Durch die Anzucht waren die *Candida*-Zellen am Dentin adhärent und konnten sich in anatomische Nischen des Wurzelkanalsystems ausbreiten, ähnlich der klinischen Situation. Besiedelte akzessorische Wurzelkanäle und Dentinkanälchen können ein bedeutendes Reservoir für überlebende Bakterien darstellen, die sich der körpereigenen Abwehr, der chemomechanischen Behandlung und der systemischen Antibiotikatherapie entziehen und somit Ursache für Reinfektionen sein können [Oguntebi 1994]. Biofilmuntersuchungen zeigten, dass adhärente Zellen sich von planktonischen Zellen unterscheiden durch höhere Resistenzen gegenüber Medikamenten und dem Immunsystem [Chandra *et al.* 2001]. Aus diesen Gründen war die Anzucht in den Wurzelkanälen relevanter zur Untersuchung der Wirksamkeit der Therapien als eine identische Ausgangskonzentration, die nur durch den Verzicht auf eine Wachstumszeit in den Proben erreicht werden kann.

Die ermittelten Werte der Keimzahlreduktion (Variable 3: Endkeimzahl 1 zu Ausgangskeimzahl in Prozent) in der Hauptgruppe 1 dienen einem direkten Vergleich der Hauptbehandlungen. Nicht signifikant unterschieden sich die alleinigen Behandlungen mit CHX-Gel und Kalziumhydroxid voneinander ($\alpha \leq 0,0042$; Chi-Quadrat-Test und Korrektur nach Bonferroni), ebenso ist die Behandlung mit Ozon und Laser nicht signifikant unterschiedlich. Signifikant häufiger zeigten sich höhere

Keimzahlreduktionen bei der Behandlung mit CHX-Gel gegenüber der Laserbestrahlung ($p < 0,001$) und der Begasung mit Ozon ($p < 0,001$). Für Kalziumhydroxid wurde ebenfalls signifikant häufiger ($p < 0,001$) eine höhere Keimzahlreduktion als für Laserbestrahlung und für Ozonbegasung ermittelt.

Bei Betrachtung der nachgewiesenen Endkeimzahlen in den Dentinproben ergab sich hinsichtlich der Anzahl der Proben unterhalb der Nachweisgrenze dieselbe Rangfolge wie bei der Keimzahlbestimmung im Wurzelkanal: 1. CHX-Gel, 2. Kalziumhydroxid, 3. Ozon und 4. Diodenlaser. Die Endkeimzahlen der planktonischen und adhärennten Zellen weisen eine hohe Korrelation auf und zeigen zudem, dass gasförmiges Ozon und Laserstrahlen keine höhere Wirksamkeit gegenüber Biofilm-Zellen aufweisen als medikamentöse Einlagen.

Bei strenger Betrachtung ist aus der Ätiologie und Pathogenese der Pulpitis und apikalen Parodontitis die Forderung abzuleiten, Mikroorganismen vollständig aus dem Endodont zu entfernen, somit die Ursache zu eliminieren und das Risiko einer Reinfektion zu vermeiden. Obwohl nicht bekannt ist, welche absolute Keimzahl ausreichend ist, um eine Reinfektion des Wurzelkanals auszulösen, mindern verbleibende Mikroorganismen die Erfolgsaussichten von endodontischen Behandlungen [Sjogren *et al.* 1997]. Der Verbleib von Mikroorganismen unter einer Konzentration von $10^2/\text{ml}$ zum Zeitpunkt der Wurzelkanalfüllung hatte in einer klinischen Studie jedoch keinen negativen Einfluss auf die Erfolgsrate [Peters *et al.* 2002]. Von klinischer Bedeutung sind, hinsichtlich dieser Daten, die in dieser Studie untersuchten Behandlungen, deren Endkeimzahlen (unabhängig von der Ausgangskeimzahl) unterhalb der Nachweisgrenze von $5 \times 10^2/\text{ml}$ lagen. Zu hundert Prozent wurde dies durch die Applikation von Chlorhexamed-Gel alleine oder in Kombination mit Aufbereitung und Spülung des Kanals mit Natriumhypochlorit oder Chlorhexidindigluconat erreicht. Nach der Applikation von Kalziumhydroxid, kombiniert mit chemomechanischer Aufbereitung mit Natriumhypochlorit oder Chlorhexidindigluconat, wurden ebenfalls keine Zellen mehr nachgewiesen. Die wirksamsten Therapiekombinationen dieser Untersuchung, hinsichtlich der Anzahl negativer Nachweise von *C. albicans*, waren demnach medikamentöse Einlagen nach chemomechanischer Aufbereitung mit CHX oder NaOCl.

Aus den *in vitro* gewonnenen Daten gegenüber einem Monospezies-Biofilm lässt sich keine klinische Empfehlung zur Verwendung der untersuchten Behandlungen ableiten, es bleiben zusätzliche Faktoren zu berücksichtigen. Zudem, und dies beeinflusst die

Formulierung klinischer Empfehlungen ebenfalls, sind in dieser Untersuchung sterile Bedingungen eingehalten worden, womit das Risiko einer Rekontamination nahezu ausgeschlossen ist. Im klinischen Fall kann es während der Applikation und Entfernung von medikamentösen Einlagen zu Kontaminationen mit Mikroorganismen des Mundhöhlenmilieus oder des Instrumentariums kommen. Es wird spekuliert, dass mit der Zahl der Behandlungssitzungen das Risiko der Kontamination durch unsteriles Arbeiten zunimmt [Weiger *et al.* 2000]. Aus diesem Grund sollten die Ergebnisse keinesfalls direkt übertragen werden, sondern die Risiken der Rekontamination bei der Bewertung der Laser- und Ozontherapie im Vergleich zu den medikamentösen Einlagen berücksichtigt werden.

Ein Vergleich der zahlreichen Studien, die in der Endodontie genutzte Medikamente bezüglich ihrer fungiziden Wirksamkeit untersuchten, ist kritisch zu bewerten, ebenso ein mögliches Fazit, da sehr unterschiedliche Methoden angewendet wurden. Einige Studien untersuchten die Wirkung gegenüber *C. albicans* auf Nährmedien und nicht im Dentin; es wurden sowohl planktonische Zellen als auch Biofilme untersucht, wobei zum Teil unterschiedliche Definitionen des Begriffs „Biofilm“ zugrunde lagen. Unterschiede in den Nachweismethoden der *Candida*-Zellen erschweren die Formulierung von Empfehlungen bislang ebenfalls (Tabelle IV).

In dieser Untersuchung war die effektivste Behandlung gegenüber *C. albicans*, unabhängig von der Aufbereitungskombination, die medikamentöse Einlage von CHX-Gel. Eine ebenfalls höhere Wirksamkeit von CHX-Gel (2 %) im Vergleich zu Kalziumhydroxid zeigte eine Studie in künstlich mit *C. albicans* oder *E. faecalis* infizierten Wurzelkanälen [Ercan *et al.* 2006]. Widersprüchlich sind die Ergebnisse der Behandlung mit Kalziumhydroxid im Vergleich zu denen einiger anderer Studien, die für diesen Wirkstoff gegenüber *C. albicans* geringere Wirksamkeit *in vitro* zeigten [Waltimo *et al.* 1999, Waltimo *et al.* 1999, Ferguson *et al.* 2002]. Die Ergebnisse bezüglich dieses Wirkstoffs variierten in verschiedenen In-vitro-Studien (Tab. IV). Die kritische Betrachtung der Nachweismethode und Probenherstellung stellt die Ergebnisse einiger Studien in Frage. In einer Studie wurden die Versuchszähne vor Beginn der Einsaat bei 123° C autoklaviert [Valera *et al.* 2001], so dass die Dentinstruktur eventuell verändert wurde. Die Inkubationszeit von *Candida* betrug nur 48 Stunden, zudem wurde lediglich ein qualitativer Nachweis durchgeführt, bei dem in 70 % der Zähne nach 14-tägiger Kalziumhydroxideinlage Wachstum nachgewiesen wurde. Hier wurde Kalziumhydroxid nicht als Paste in wässriger Lösung appliziert, sondern in Form einer Paste mit

Glycolpolyethylen. Allerdings zeigte eine Studie, dass unterschiedliche Trägermaterialien keinen Einfluss auf die antibakterielle Wirkung von Kalziumhydroxid haben [Estrela *et al.* 2001].

Diese Überlegungen allein erklären jedoch nicht, weshalb der Wirkstoff in der vorliegenden Studie gegen *C. albicans* vergleichsweise effektiver war. Kalziumhydroxid reduzierte bei alleiniger Anwendung in dieser Untersuchung in 60 % der Zahnproben die Keimzahlen bis unter die Nachweisgrenze von 5×10^2 CFU/ml, in Kombination mit CHX- oder NaOCl-Spülung in 100 % der Proben. Dies entspricht einer mittleren Reduktion um $7,99 \times 10^6$ CFU/ml, bzw. einer Reduktion um >99,99 %. Diese Beobachtung zeigt zum einen synergistische Effekte der Wirkstoffe, zum anderen widerspricht sie der verallgemeinernden Aussage einiger Autoren, Kalziumhydroxid sei *in vitro* gegen *C. albicans* ineffektiv [Waltimo *et al.* 2003, Siqueira *et al.* 2004].

Ein Vergleich zu Studien, die planktonische Zellen von *C. albicans* in Lösung bei direktem Kontakt zu Kalziumhydroxid untersuchten, ist an dieser Stelle nicht erfolgt. Einerseits basieren die Resistenzen gegen fungizide Wirkstoffe auf der Adhäsion der Zellen auf Oberflächen und der Kolonisation des Dentins [Siqueira *et al.* 2004] und andererseits kann *in vivo* ein direkter Kontakt der medikamentösen Einlagen mit den Mikroorganismen in anatomischen Nischen des Wurzelkanalsystem nicht vollständig erfolgen. Dieser Umstand wurde in der vorliegenden Studie nachempfunden. Im Gegensatz zur klinischen Situation ist hier jedoch zu beachten, dass durch große Wurzelkanallumina eine entsprechend große Menge Kalziumhydroxid appliziert wurde, so dass die Pufferkapazität des Dentins vergleichsweise geringer sein könnte. Ebenso spielt die hier eventuell suffizientere Befüllung der Wurzelkanäle eine Rolle, die zusätzlich zu größerer Wirksamkeit beitragen kann.

Des Weiteren bleibt beim Vergleich mit anderen Studien zu beachten, dass die Interpretation der Studienergebnisse größtenteils nicht in der hier durchgeführten Art erfolgte, die Anzahl der Versuchsproben mit negativen Zellenachweisen zu vergleichen; vielmehr wurde häufig lediglich eine statistisch signifikante Reduktionsrate angegeben. Eine anscheinend hohe Reduktion um 90 % ist jedoch bei der Angabe von Konzentrationen in CFU/ml weder aus mikrobiologischer Sicht noch aus Sicht zahnärztlicher Anwendung von Bedeutung, da z. B. bei einer Ausgangskonzentration von 10^8 CFU/ml dies lediglich eine Reduktion auf 10^7 CFU/ml bedeutet. Eine Endkeimzahl im Wurzelkanalsystem in dieser Größenordnung ist bei einer endodontischen Behandlung keinesfalls vertretbar.

Zur Bestrahlung der infizierten Wurzelkanaloberfläche mit dem Diodenlaser liegen nur wenige Studien vor. Das bakterizide Potential von Diodenlasern wurde *in vitro* [Gutknecht *et al.* 2000] und *in vivo* [Moritz *et al.* 1997] gezeigt; hier wurden durch den 810 nm-Diodenlaser gegenüber Streptokokken und Staphylokokken Reduktionen um 10^3 - 10^4 erreicht. In der vorliegenden Untersuchung lassen sich bei alleiniger Anwendung des Diodenlasers weder im Wurzelkanal noch im Dentin der Versuchsproben Endkeimzahlen unterhalb der Nachweisgrenze ermitteln, sie liegen im Bereich von 10^6 CFU/ml. Diese Reduktion um zwei Zehnerpotenzen entspricht einer Reduktion von 99 %.

In-vitro-Studien zeigten zur Wirksamkeit des 810 nm-Diodenlasers gegen *E. faecalis* im Wurzelkanal eine Keimzahlreduktion um 10^3 [Schoop *et al.* 2006], für den 830 nm-Diodenlaser sogar eine vollständige Elimination von *E. faecalis* [de Souza *et al.* 2008]. Bei Bestrahlung durch 500 µm dicke bovine Dentinschichten erzielten Studien gegenüber *E. faecalis* eine Reduktion um 74 % [Gutknecht *et al.* 2000, Gutknecht *et al.* 2004]. Eine weitere In-vitro-Untersuchung gegenüber *E. faecalis* zeigte zu 100 % die Elimination der Mikroorganismen; hier waren allerdings die Ergebnisse in den Vergleichsgruppen ohne Laserbestrahlung oder Aufbereitung ebenfalls erstaunlich hoch [de Souza *et al.* 2008] und provozieren eine kritische Betrachtung der Methode.

Gegenüber *C. albicans* zeigte eine Untersuchung nach 5-tägiger Anzucht auf Glas- und Titanoberflächen eine signifikante Keimzahlreduktion, eine höhere für den Er:YAG-Laser als für den 810 nm-Diodenlaser. Die Bestrahlung mit dem Diodenlaser hatte lediglich bei direktem Kontakt einen Einfluss auf den Biofilm von *C. albicans* [Sennhenn-Kirchner *et al.* 2009]. Hier betrug die Applikationszeit vier mal 20 Sekunden mit jeweils 30 Sekunden Pause. Die Abweichungen in der Bestrahlungszeit, unterschiedliche mikrobiologische Untersuchungsmethoden sowie die Verwendung von Diodenlasern mit unterschiedlichen Wellenlängen (810-980 nm) schränken einen direkten Vergleich der Studienergebnisse ein.

In einer Untersuchung gegenüber parodontalpathogenen Keimen wurde gezeigt, dass unterschiedliche Wellenlängen von Diodenlasern die Effektivität beeinflussten [Chan *et al.* 2003]. Möglichen Einfluss auf die Ergebnisse der vorliegenden Studie hat zudem die Techniksensibilität. Dass verschiedene Mikroorganismen untersucht wurden, dürfte von geringer Bedeutung sein, da die bakterizide Wirkung durch Erhitzen und Zerplatzen der Zellen erreicht wird und nicht von spezifischen Zellbestandteilen abhängt. Gegenüber dem hitzeresistenten *Bacillus stearothermophilus*, in humanen Wurzelkanälen

angezüchtet, konnte eine Reduktion von 10^2 nach Bestrahlung mit dem Nd:YAG-Laser erreicht werden [Hardee *et al.* 1994]. Lediglich für schwarz pigmentierte Bakterien wurde gezeigt, dass diese sensitiver auf Bestrahlung mit einem Argonlaser reagierten [Henry *et al.* 1995], eventuell beeinflusst die Pigmentierung die Absorptionseigenschaften. Die Anfärbung von Bakterien mit dem Farbstoff Methyleneblau kann deren Sensitivität auf Bestrahlung mit einem Diodenlaser erhöhen [Chan *et al.* 2003].

Die Anwendung von Ozon zur Desinfektion ist in der Humanmedizin etabliert [Kim *et al.* 1999] und klinische Untersuchungen bei kariösen Läsionen [Huth *et al.* 2005] sprechen in diesem Bereich der Zahnheilkunde ebenfalls für eine Verwendung [Baysan *et al.* 2005]. Die spekulative Annahme, Ozon sei aufgrunddessen auch in endodontischer Anwendung effektiv, kann anhand der Ergebnisse dieser In-vitro-Studie gegenüber *C. albicans* nur eingeschränkt bestätigt werden. Verglichen mit den medikamentösen Einlagen waren die Ergebnisse hoch signifikant schlechter ($p < 0,001$). Dies entspricht Studien gegenüber *E. faecalis* [Hems *et al.* 2005]. Eine Studie mit ähnlichem Versuchsaufbau zeigte eine dosisabhängige Wirkung von gasförmigem Ozon [Huth *et al.* 2009]. Hier wurden Zellen von *C. albicans* nach dreiwöchiger Anzucht im Wurzelkanal durch die Applikation von gasförmigem Ozon (1 g/m^3) nach 2,5 Minuten bzw. nach einer Minute bei höherer Konzentration (53 g/m^3) vollständig eliminiert. In der vorliegenden Untersuchung wurden bei alleiniger Anwendung nach 2-minütiger Ozonapplikation (2100 ppm) in 80 % der Wurzelkanäle Keimzahlen oberhalb des Wertes von 4×10^4 CFU/ml, lediglich in 20 % Keimzahlen unterhalb der Nachweisgrenze ermittelt. Die Endkeimzahlen in den Dentinproben lagen zu 13,3 % unter der Nachweisgrenze, zu 73,3 % lagen sie oberhalb von 5×10^3 CFU/mg.

Eine hohe Korrelation wurde zwischen den Endkeimzahlen der planktonischen und den adhärennten Zellen ermittelt. In einer anderen Studie zeigte sich bei *E. faecalis* ein Unterschied, so wurden *in vitro* geringe antibakterielle Effekte von ozoniertem Wasser und gasförmigem Ozon bei planktonischen Zellen von *E. faecalis* und nahezu keine Effekte nachgewiesen, wenn die Zellen in Biofilmen organisiert waren [Hems *et al.* 2005].

In der vorliegenden Untersuchung konnte die Nullhypothese nicht bestätigt werden. Im Gegenteil, es erwiesen sich die medikamentösen Einlagen von Kalziumhydroxid oder CHX-Gel gegen *C. albicans* signifikant effektiver ($p = 0,001$; Chi-Quadrat-Test) als die Verwendung von gasförmigem Ozon oder die Verwendung des Diodenlasers.

In vitro ermittelte Daten dienen generell nicht dazu, klinische Empfehlungen auszusprechen; diese Einschränkung gilt insbesondere für die vorliegende Untersuchung, da hier ein Monospezies-Biofilm untersucht wurde, in klinischen Fällen jedoch eine Polyspezies-Besiedlung vorliegt. Die gewonnenen Ergebnisse zur Ozonbegasung gegenüber *C. albicans*, mit Keimzahlreduktionen von mehr als 10^6 CFU/ml in 66,7 % der untersuchten Proben, lassen allerdings die weitere Untersuchung in folgenden Studien sinnvoll erscheinen.

Für die Bestrahlung mit dem Diodenlaser lässt sich ein ähnliches Fazit formulieren. Bei alleiniger Anwendung sind die Ergebnisse im Vergleich zu den medikamentösen Einlagen signifikant schlechter ($p = 0,05$; Chi-Quadrat-Test), hier wurden keine Proben unter die Nachweisgrenze reduziert. In Kombination mit chemomechanischer Aufbereitung mit NaOCl, wie es dem klinischen Alltag entspricht, unterschreiten jedoch ebenfalls 66,7 % der untersuchten Proben im Wurzelkanal die Nachweisgrenze, im Dentin war dies bei 73,3 % der Proben der Fall.

Beide, Laser- und Ozonbehandlung, sollten aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse in aufbauenden Studien weiter in Bezug auf ihr fungizides und bakterizides Potential untersucht werden, zumal das vergleichsweise bessere Abschneiden der medikamentösen Einlagen in dieser Studie dadurch begünstigt sein kann, dass eine Übertragung der Wirkstoffe auf die Nährmedien nicht ausgeschlossen ist.

Die Therapie, die der Behandlungssituation im klinischen Alltag entspricht, ist die Einlage von wässrigem Kalziumhydroxid nach chemomechanischer Aufbereitung mit NaOCl oder mit NaOCl und CHX als finaler Zusatzspülung. Bei der Keimzahlreduktion im Wurzelkanal konnten für diese beiden Kombinationen zu 100 % Werte aus Bereich 1 erreicht werden, das heißt, die verbliebenen Keimzahlen lagen unter 5×10^2 CFU/ml. Die Endkeimzahlen in oberflächlichen Dentinschichten lagen ebenfalls zu 100 % unter der Nachweisgrenze von 8,33 CFU/mg. Zumindest in Bezug auf den untersuchten Mikroorganismus lassen sich keine Forderungen nach anderen Therapien stellen, wenn man davon ausgeht, dass bei der Applikation auf Sterilität geachtet wird, und die (eventuell verbliebenen) Keimzahlen bei adäquater Wurzelkanalfüllung und koronalem Verschluss akzeptabel sind [Peters *et al.* 2002]. Die Bedeutung von Keimzahlen dieser Größenordnung muss in anderen Untersuchungen geklärt werden.

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse zur guten fungiziden Wirksamkeit von Kalziumhydroxid und den untersuchten Spüllösungen stellt sich die spekulative Frage, ob das Auftreten dieser Pilzspezies bei Reinfektionen in mangelnder Wirksamkeit der

verwendeten Wirkstoffe begründet ist, oder ob der Einhaltung steriler, akkurater Vorgehensweisen während der Wurzelkanalbehandlung und der Verhinderung von koronalen Eintrittspforten mehr Aufmerksamkeit geschenkt werden muss.

Der Versuchsaufbau der vorliegenden Untersuchung wurde möglichst nahe der klinischen Situation gewählt, dies beinhaltete die Probenentnahme unmittelbar nach den Behandlungen, analog zum klinischen Zeitpunkt unmittelbar vor der Wurzelkanalfüllung. Allerdings sollten Studien folgen, die zusätzliche mikrobiologische Untersuchungen der Versuchsproben beinhalten, die hier unter der Nachweisgrenze lagen. Über die Anzahl eventuell verbliebener und nicht nachgewiesener Zellen kann hier lediglich gesagt werden, dass sie maximal im Bereich von 1 bis 499 Zellen lag. Ausgehend davon, dass der Zeitpunkt der Probenentnahme analog zu dem der Wurzelkanalfüllung ist, bleibt offen, ob es unter klinischen Bedingungen zu erneutem Wachstum kommen kann. Zumindest zeigt eine Studie, dass *C. albicans* in der Lage ist, entlang einer Wurzelkanalfüllung mit Guttapercha und Sealer (AH Plus oder AH 26) zu penetrieren [Miletic *et al.* 2002]. Interessant scheint daher eine weiterführende Studie, die negativ getestete Proben nach einer erneuten Inkubation mit Nährmedien sowie nach einer Wurzelkanalfüllung auf erneutes Zellwachstum untersucht. Die Teilungsfähigkeit zurückgebliebener Zellen, die in Seitenkanäle eingedrungen sein können, ist klinisch nur von Bedeutung wenn sie trotz Wurzelkanalfüllung auftritt und somit Reinfektionen auslösen kann.

Die Aufbereitung der Wurzelkanäle dient der mechanischen Reinigung und der Formgebung des Kanals und erfolgt mit Handinstrumenten oder maschineller Aufbereitung mit den verschiedensten Techniken. Die Ziele der Aufbereitung sind [Grossman 1988], neben der vollständigen Entfernung des vitalen und nekrotischen Pulpagewebes, die mechanische Entfernung von Mikroorganismen aus dem Wurzelkanal und der Wurzelkanalwand sowie die Erhöhung der desinfizierenden Wirkung von Spüllösungen durch Vergrößerung des Kanallumens und die Formgebung zur Ermöglichung der vollständigen Obturation [Orstavik *et al.* 1991]. Die Elimination von Mikroorganismen ist keinesfalls durch mechanischen Gewebsabtrag allein zu erzielen, da zahlreiche anatomische Irregularitäten wie Ramifikationen, Isthmus und Seitenkanäle nicht auf diese Weise erreicht werden können. Die bis in tiefere Dentinschichten vorgedrungenen Mikroorganismen entziehen sich dieser Behandlung ebenfalls. Zur Optimierung der Keimreduktion kommen geeignete Spüllösungen zum Einsatz, die zudem den Abtransport von Geweberesten sicherstellen. Der Wirkstoff

Chlorhexidin wurde empfohlen, um Keime wie *C. albicans* zu eliminieren [Emilson 1977]. Durch die Kombination der Behandlungen mit chemomechanischer Aufbereitung konnte in der vorliegenden Untersuchung zusätzlich der Einfluss verschiedener Spüllösungen dargestellt werden. Zur Untersuchung der mechanischen Aufbereitung selbst diente die Hauptgruppe 2, in der physiologische Kochsalzlösung als Spüllösung zum Einsatz kam. Es konnte kein signifikanter Unterschied ($\alpha \leq 0,042$; Korrektur nach Bonferroni) gezeigt werden bezüglich der Keimzahlreduktion zwischen Zahnproben, die nicht aufbereitet wurden, und denen, die mit NaCl als Spüllösung aufbereitet wurden. Somit scheint die mechanische Aufbereitung nur eine untergeordnete Rolle hinsichtlich der Keimreduktion zu spielen. Entscheidend sind hier vor allem antimikrobielle Spüllösungen, denn im Vergleich zu physiologischer Kochsalzlösung zeigten CHX und NaOCl in dieser Studie signifikant ($p < 0,001$) höhere Wirksamkeit. Sie erhöhten unabhängig von der Behandlung die Wirksamkeit, wobei mit NaOCl am häufigsten hohe Keimzahlreduktionen erzielt wurden.

7 Schlussfolgerungen

Medikamentöse Einlagen vermögen *in vitro* planktonische Zellen sowie Biofilm-Zellen von *C. albicans* vollständig bis unter die Nachweisgrenze zu reduzieren. Dies widerspricht der Aussage einiger Autoren, dass Kalziumhydroxid gegen *C. albicans* ineffektiv sei und macht deutlich, dass die Ursache für das Auftreten dieser Pilzspezies bei refraktären apikalen Parodontitiden nicht in der mangelnden Wirksamkeit dieses Wirkstoffs liegt.

In Kombination mit chemomechanischer Aufbereitung mit Natriumhypochlorit wurden sowohl durch die Laser- als auch durch die Ozonbehandlung Keimzahlreduktionen in Größenordnungen erreicht, die weitere Untersuchungen dieser Therapien in Bezug auf fungizides und bakterizides Potential sinnvoll erscheinen lassen. Insbesondere bieten beide Therapien die Möglichkeit des Verzichts auf weitere Behandlungssitzungen mit zusätzlichen Rekontaminationsrisiken.

Die klinische Relevanz dieser Studie liegt zusätzlich in der Beobachtung, dass hinsichtlich der Keimzahlreduktion die mechanische Wurzelkanalaufbereitung eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint, die Verwendung antimikrobieller Spüllösungen jedoch von entscheidender Bedeutung ist.

Interessant sind zudem die Ergebnisse zur Verwendung von CHX-Gel als medikamentöse Einlage, dieser Wirkstoff erwies sich als hoch wirksam gegenüber *C. albicans*, denn schon bei alleiniger Anwendung konnten keine Zellen mehr nachgewiesen werden. Die Empfehlung, den Wirkstoff Chlorhexidindigluconat zusätzlich einzusetzen, auch als finale Zusatzspülung, kann hier bekräftigt werden.

Die Untersuchung der fungiziden Wirksamkeit anhand von Keimzahlreduktionen mittels Nachweis vitaler Hefen auf Selektivnährmedien und exemplarischem Nachweis eines Biofilms mittels DNA-Anfärbung lieferte reproduzierbare Ergebnisse. Dieses Modell kann eine Grundlage darstellen für weitere Untersuchungen verschiedener antimikrobieller Therapien gegen endodontisch relevante Mikroorganismen.

8 Zusammenfassung

Problemstellung: Einige Mikroorganismen, insbesondere *C. albicans*, scheinen sich der chemomechanischen Aufbereitung und den Wirkstoffen einer medikamentösen Kanaleinlage entziehen zu können und somit Reinfektionen des Wurzelkanalsystems auszulösen. **Zielsetzung:** Ziel war die Untersuchung der Wirksamkeit eines Diodenlasers sowie von gasförmigem Ozon gegenüber Biofilmen von *C. albicans* in Wurzelkanälen. **Material und Methoden:** 240 humane Zahnwurzeln wurden in vier Hauptgruppen (n = 60) geteilt. In Hauptgruppe 1 erfolgte die komplette Aufbereitung der Wurzelkanäle (MAF ISO 60), in den Gruppen 2 bis 4 erfolgte die initiale Aufbereitung (MAF ISO 40). Die Proben wurden mit *C. albicans* (ATCC 90028) beimpft und 14 Tage inkubiert. Mittels DNA-Anfärbung wurde die Bildung eines Biofilms exemplarisch gezeigt. Die Ausgangskeimzahl jeder Probe wurde bestimmt (Medianwert $3,66 \times 10^8$ CFU/ml, Q1: $1,73 \times 10^8$; Q3: $5,87 \times 10^8$). Es folgte in den Hauptgruppen 2 bis 4 die komplette Aufbereitung (MAF ISO 60), in Gruppe 2 mit NaCl (0,9%), in Gruppe 3 mit NaOCl und in Gruppe 4 mit CHX (0,2 %). Anschließend erfolgte in jeder Gruppe die Bestrahlung mit einem Diodenlaser (40 s), die Applikation von gasförmigem Ozon (120 s), die 7-tägige Einlage von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ oder CHX-Gel (je n = 15). Die Endkeimzahlen wurden unmittelbar bestimmt. **Ergebnisse:** CHX-Gel und $\text{Ca}(\text{OH})_2$ waren signifikant wirksamer als Laser und Ozon ($p < 0,001$; Chi-Quadrat-Test). Die Verwendung von NaOCl oder CHX als Spüllösung erhöhte signifikant die Wirksamkeit von Laser und Ozon ($p < 0,001$; Chi-Quadrat-Test und Korrektur nach Bonferroni), hier wurden Keimzahlreduktionen von $>10^6$ CFU/ml erreicht. Die mechanische Aufbereitung zeigte keine signifikante Erhöhung der Wirksamkeit ($\alpha = 0,0042$).

Schlussfolgerungen: Der Wirkstoff CHX ist hoch wirksam gegenüber *C. albicans*. Zur Keimzahlreduktion spielt die mechanische Wurzelkanalaufbereitung eine geringere Rolle, antimikrobielle Spüllösungen sind jedoch von entscheidender Bedeutung. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ hat fungizide Wirksamkeit und erklärt nicht das Auftreten dieser Spezies bei refraktären apikalen Parodontitiden.

Schlüsselwörter: *Candida albicans*, CHX-Gel, Diodenlaser, Kalziumhydroxid, Ozon, Wurzelkanal

Klinische Bedeutung: Die chemomechanische Aufbereitung mit anschließender medikamentöser Einlage ist hinsichtlich der fungiziden Wirksamkeit weiterhin zu empfehlen, wobei auf Sterilität zu achten ist. Die Bestrahlung mit dem Diodenlaser sowie die Applikation von Ozon ermöglichen die Behandlung in einer Sitzung und sollten weiterhin untersucht werden.

9 Abstract

Aim: The aim of this study was to evaluate the efficacy of diode laser treatment, application of gaseous ozone, calcium hydroxide (Ca(OH)₂) or chlorhexidine digluconate gel (CHX). Treatments were tested either alone or combined with mechanical root canal treatment and various irrigant solutions against *C. albicans* in root canals *in vitro*. **Methodology:** 240 extracted, human, single-rooted teeth were divided into four groups (n = 60). In Group 1 root canal enlargement up to ISO-size 60 (MAF) was performed, whereas only initial shaping (MAF ISO-size 40) was carried out in Groups 2 to 4. After sterilization all teeth were inoculated with *C. albicans* (ATCC 90028) and incubated for 14 days, followed by evaluation of CFU (CFU/ml; CFU: colony forming units) in every teeth. Complete root canal enlargement up to ISO-size 60 was performed in Groups 2 to 4 using NaCl solution (0.9 %) in Group 2, NaOCl (1 %) in Group 3 and CHX (0.2 %) in Group 4. Finally, each group of 60 teeth was subdivided into four groups (n = 15 each) either using diode laser radiation for 40 seconds, application of gaseous ozone for 120 seconds or applying Ca(OH)₂ or CHX-gel for 7 days, followed by final evaluation of CFU. **Results:** The reduction of *C. albicans* after application of Ca(OH)₂ and CHX-gel was in all groups significantly higher than after diode laser treatment or application of gaseous ozone ($p < 0,001$; Chi-Quadrat-test). After diode laser irradiation or treatment with gaseous ozone in combination with chemomechanical root treatment in 66,7 % of the specimen cell concentration lower than 5×10^2 CFU/ml were detectable, this is equivalent to a reduction of $7,99 \times 10^6$ CFU/ml. The antifungal efficacy was significantly increased by the additional use of NaOCl or CHX as irrigants ($p < 0,001$; Chi-Quadrat-test), but not significantly influenced by mechanical root treatment ($\alpha = 0,0042$; Chi-Quadrat-test). CHX-gel was highly effective against *C. albicans*.

Conclusion: Both, laser and ozone, seem to be suitable for disinfection of *C. albicans* containing root canals *in vitro*. The use of NaOCl or CHX as irrigants and the application of Ca(OH)₂ or CHX-gel showed antifungal activity and should be furthermore used in endodontic therapy.

10 Literaturverzeichnis

- Alfredo E, Souza-Gabriel AE, Silva SR, Sousa-Neto MD, Brugnera-Junior A, Silva-Sousa YT: Morphological alterations of radicular dentine pretreated with different irrigating solutions and irradiated with 980-nm diode laser. *Microsc Res Tech* 2009, 72:22-7.
- Andersen M, Lund A, Andreasen JO, Andreasen FM: In vitro solubility of human pulp tissue in calcium hydroxide and sodium hypochlorite. *Endod Dent Traumatol* 1992, 8:104-8.
- Azarpazhooh A, Limeback H: The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. *J Dent* 2008, 36:104-16.
- Bagg J, Silverwood RW: Coagglutination reactions between *Candida albicans* and oral bacteria. *J Med Microbiol* 1986, 22:165-9.
- Baumgartner JC, Watts CM, Xia T: Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. *J Endod* 2000, 26:695-8.
- Baysan A, Lynch E: The use of ozone in dentistry and medicine. *Prim Dent Care* 2005, 12:47-52.
- Bergmans L, Moisiadis P, Teughels W, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P: Bactericidal effect of Nd:YAG laser irradiation on some endodontic pathogens ex vivo. *Int Endod J* 2006, 39:547-57.
- Berrington AW, Pedler SJ: Investigation of gaseous ozone for MRSA decontamination of hospital side-rooms. *J Hosp Infect* 1998, 40:61-5.
- Berutti E, Marini R, Angeretti A: Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. *J Endod* 1997, 23:725-7.
- Biswas SK, Chaffin WL: Anaerobic growth of *Candida albicans* does not support biofilm formation under similar conditions used for aerobic biofilm. *Current Microbiology* 2005, 51:100-4.
- Blankenship JR, Mitchell AP: How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol* 2006, 9:588-94.
- Blaschke-Hellmessen R: [Habitats for *Candida* in medical and hygienic respects]. *Mycoses* 1999, 42 Suppl 1:22-9.
- Bottone EJ, Hong T, Zhang DY: Basic mycology underscoring medically important fungi. *Otolaryngol Clin North Am* 1993, 26:919-40.
- Brandle N, Zehnder M, Weiger R, Waltimo T: Impact of growth conditions on susceptibility of five microbial species to alkaline stress. *J Endod* 2008, 34:579-82.
- Broadwater WT, Hoehn RC, King PH: Sensitivity of three selected bacterial species to ozone. *Appl Microbiol* 1973, 26:391-3.
- Buttler TK, Crawford JJ: The detoxifying effect of varying concentrations of sodium hypochlorite on endotoxins. *J Endod* 1982, 8:59-66.
- Bystrom A, Sundqvist G: Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 1981, 89:321-8.
- Bystrom A, Sundqvist G: The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 1985, 18:35-40.

- Calderone RA, Fonzi WA: Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2001, 9:327-35.
- Cardoso MG, de Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AO: Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008, 105:e85-91.
- Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martinez JP: Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998, 62:130-80.
- Chan Y, Lai CH: Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2003, 18:51-5.
- Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA: Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 2001, 183:5385-94.
- Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, Ghannoum MA: Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res* 2001, 80:903-8.
- Cheung GS, Ho MW: Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. *Oral Microbiol Immunol* 2001, 16:332-7.
- D'Arcangelo C, Varvara G, De Fazio P: An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic, and microaerophilic bacteria. *J Endod* 1999, 25:351-3.
- de Souza EB, Cai S, Simionato MR, Lage-Marques JL: High-power diode laser in the disinfection in depth of the root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008, 106:e68-72.
- Debelian GJ, Olsen I, Tronstad L: Observation of *Saccharomyces cerevisiae* in blood of patient undergoing root canal treatment. *Int Endod J* 1997, 30:313-7.
- Donlan RM, Costerton JW: Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002, 15:167-93.
- Dupont B, Graybill JR, Armstrong D, Laroche R, Touze JE, Wheat LJ: Fungal infections in AIDS patients. *J Med Vet Mycol* 1992, 30 Suppl 1:19-28.
- Dyas A, Boughton BJ, Das BC: Ozone killing action against bacterial and fungal species; microbiological testing of a domestic ozone generator. *J Clin Pathol* 1983, 36:1102-4.
- Ebensberger U, Pohl Y, Filippi A: PCNA-expression of cementoblasts and fibroblasts on the root surface after extraoral rinsing for decontamination. *Dent Traumatol* 2002, 18:262-6.
- Egan MW, Spratt DA, Ng YL, Lam JM, Moles DR, Gulabivala K: Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis. *Int Endod J* 2002, 35:321-9.
- Emilson CG: Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res* 1977, 85:255-65.
- Ercan E, Dalli M, Dulgergil CT: In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006, 102:e27-31.
- ESE: Quality guidelines for endodontic treatment: consensus report of the European Society of Endodontology. *Int Endod J* 2006, 39:921-30.

- Estrela C, Bammann LL, Pimenta FC, Pecora JD: Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. *Int Endod J* 2001, 34:341-5.
- Ferguson JW, Hatton JF, Gillespie MJ: Effectiveness of intracanal irrigants and medications against the yeast *Candida albicans*. *J Endod* 2002, 28:68-71.
- Foreman PC, Barnes IE: Review of calcium hydroxide. *Int Endod J* 1990, 23:283-97.
- Fraser JG: Chelating agents: their softening effect on root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974, 37:803-11.
- Garberoglio R, Brannstrom M: Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Arch Oral Biol* 1976, 21:355-62.
- Goldman L, Hornby P, Meyer R, Goldman B: Impact Of The Laser On Dental Caries. *Nature* 1964, 203:417.
- Grossman LI: *Endodontic Practice*: ed. Lea & Febiger 1988.
- Gutknecht N, Franzen R, Meister J, Vanweersch L, Mir M: Temperature evolution on human teeth root surface after diode laser assisted endodontic treatment. *Lasers Med Sci* 2005, 20:99-103.
- Gutknecht N, Franzen R, Schippers M, Lampert F: Bactericidal effect of a 980-nm diode laser in the root canal wall dentin of bovine teeth. *J Clin Laser Med Surg* 2004, 22:9-13.
- Gutknecht N, van Gogswaardt D, Conrads G, Apel C, Schubert C, Lmpert F: Diode laser irradiation and its bactericidal effect in root canal wall dentin. *J Clin Laser Med Surg* 2000, 18:57-60.
- Haapasalo HK, Siren EK, Waltimo TM, Orstavik D, Haapasalo MP: Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J* 2000, 33:126-31.
- Haapasalo M: *Bacteroides* spp. in dental root canal infections. *Endod Dent Traumatol* 1989, 5:1-10.
- Haapasalo M, Orstavik D: In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987, 66:1375-9.
- Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T: Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *J Endod* 2007, 33:917-25.
- Hagihara Y, Kaminishi H, Cho T, Tanaka M, Kaita H: Degradation of human dentine collagen by an enzyme produced by the yeast *Candida albicans*. *Arch Oral Biol* 1988, 33:617-9.
- Hancock HH, 3rd, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J: Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001, 91:579-86.
- Hardee MW, Miserendino LJ, Kos W, Walia H: Evaluation of the antibacterial effects of intracanal Nd:YAG laser irradiation. *J Endod* 1994, 20:377-80.
- Hawser SP, Douglas LJ: Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1995, 39:2128-31.
- Hems RS, Gulabivala K, Ng YL, Ready D, Spratt DA: An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2005, 38:22-9.
- Henry CA, Judy M, Dyer B, Wagner M, Matthews JL: Sensitivity of *Porphyromonas* and *Prevotella* species in liquid media to argon laser. *Photochem Photobiol* 1995, 61:410-3.

- Holmes AR, Gopal PK, Jenkinson HF: Adherence of *Candida albicans* to a cell surface polysaccharide receptor on *Streptococcus gordonii*. *Infect Immun* 1995, 63:1827-34.
- Holmes J: Clinical reversal of root caries using ozone, double-blind, randomised, controlled 18-month trial. *Gerodontology* 2003, 20:106-14.
- Huth KC, Paschos E, Brand K, Hickel R: Effect of ozone on non-cavitated fissure carious lesions in permanent molars. A controlled prospective clinical study. *Am J Dent* 2005, 18:223-8.
- Huth KC, Quirling M, Maier S, Kamereck K, Alkhayer M, Paschos E, Welsch U, Miethke T, Brand K, Hickel R: Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *Int Endod J* 2009, 42:3-13.
- Kanisavarán ZM: Chlorhexidine gluconate in endodontics: an update review. *Int Dent J* 2008, 58:247-57.
- Kim JG, Yousef AE, Dave S: Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. *J Food Prot* 1999, 62:1071-87.
- Kimura Y, Wilder-Smith P, Matsumoto K: Lasers in endodontics: a review. *Int Endod J* 2000, 33:173-85.
- King JB, Jr., Crawford JJ, Lindahl RL: Indirect pulp capping: a bacteriologic study of deep carious dentine in human teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965, 20:663-9.
- Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J: Formation of *Candida albicans* biofilms on non-shedding oral surfaces. *Eur J Oral Sci* 2003, 111:465-71.
- Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R, Garcia GD, Silva BK, Hamdan JS, Nicoli JR, Carvalho MA, Farias Lde M: Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 2001, 16:100-5.
- Law A, Messer H: An evidence-based analysis of the antibacterial effectiveness of intracanal medicaments. *J Endod* 2004, 30:689-94.
- Lucas VS: Association of psychotropic drugs, prevalence of denture-related stomatitis and oral candidosis. *Community Dent Oral Epidemiol* 1993, 21:313-6.
- Matsamura K, Ikumi K, Nakajima N: A trial of regeneration of periodontal ligament around dental implants. *J Dent Res* 2002, 81:-101.
- Mehl A, Folwaczny M, Haffner C, Hickel R: Bactericidal effects of 2.94 microns Er:YAG-laser radiation in dental root canals. *J Endod* 1999, 25:490-3.
- Menezes MM, Valera MC, Jorge AO, Koga-Ito CY, Camargo CH, Mancini MN: In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J* 2004, 37:311-9.
- Miletic I, Prpic-Mehicic G, Marsan T, Tambic-Andrasevic A, Plesko S, Karlovic Z, Anic I: Bacterial and fungal microleakage of AH26 and AH Plus root canal sealers. *Int Endod J* 2002, 35:428-32.
- Miserendino LJ, Levy GC, Rizoio IM: Effects of Nd:YAG laser on the permeability of root canal wall dentin. *J Endod* 1995, 21:83-7.
- Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T: Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998, 31:1-7.
- Moritz A, Gutknecht N, Goharkhay K, Schoop U, Wernisch J, Sperr W: In vitro irradiation of infected root canals with a diode laser: results of microbiologic, infrared spectrometric, and stain penetration examinations. *Quintessence Int* 1997, 28:205-9.

- Moritz A, Gutknecht N, Schoop U, Goharkhay K, Doertbudak O, Sperr W: Irradiation of infected root canals with a diode laser in vivo: results of microbiological examinations. *Lasers Surg Med* 1997, 21:221-6.
- Moter A, Gobel UB: Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Methods* 2000, 41:85-112.
- Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M: Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod* 2004, 30:778-81.
- Nair PN, Sjogren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G: 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* 1990, 16:580-8.
- Neelakantan P, Sanjeev K, Subbarao CV: Duration-dependent susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide and chlorhexidine gel used as intracanal medicament: an in vitro evaluation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007, 104:e138-41.
- Nerwich A, Figdor D, Messer HH: pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod* 1993, 19:302-6.
- Nikawa H, Jin C, Makihiro S, Egusa H, Hamada T, Kumagai H: Biofilm formation of *Candida albicans* on the surfaces of deteriorated soft denture lining materials caused by denture cleansers in vitro. *J Oral Rehabil* 2003, 30:243-50.
- Noetzel J, Nonhoff J, Bitter K, Wagner J, Neumann K, Kielbassa AM: Efficacy of calcium hydroxide, Er:YAG laser or gaseous ozone against *Enterococcus faecalis* in root canals. *Am J Dent* 2009, 22:14-8.
- Noetzel J, Moter A, Walkenbach S, Schulze S, Neumann K, Kielbassa AM: Wirksamkeit von Ozon und einem Diodenlaser gegenüber Biofilmen von *Candida albicans* in Wurzelkanälen. Autoreferate-Band der Deutschen Gesellschaft für Zahnerhaltung, Abstraktnummer 40, ISBN-978-3-86611-433-3, S. 96, 2009.
- Oguntebi BR: Dentine tubule infection and endodontic therapy implications. *Int Endod J* 1994, 27:218-22.
- Orstavik D, Kerekes K, Molven O: Effects of extensive apical reaming and calcium hydroxide dressing on bacterial infection during treatment of apical periodontitis: a pilot study. *Int Endod J* 1991, 24:1-7.
- Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M: Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001, 34:429-34.
- Peters LB, van Winkelhoff AJ, Buijs JF, Wesselink PR: Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. *Int Endod J* 2002, 35:13-21.
- Peters LB, Wesselink PR: Periapical healing of endodontically treated teeth in one and two visits obturated in the presence or absence of detectable microorganisms. *Int Endod J* 2002, 35:660-7.
- Peters LB, Wesselink PR, Buijs JF, van Winkelhoff AJ: Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2001, 27:76-81.
- Peters LB, Wesselink PR, Moorer WR: The fate and the role of bacteria left in root dentinal tubules. *Int Endod J* 1995, 28:95-9.
- Peters LB, Wesselink PR, Moorer WR: Penetration of bacteria in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J* 2000, 33:28-36.

- Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ: Combinations of bacterial species in endodontic infections. *Int Endod J* 2002, 35:698-702.
- Pierce LA: Laser physics and physiology. *Plast Surg Nurs* 1997, 17:123-8.
- Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ: Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 2003, 18:100-3.
- Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M: Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. *Int Endod J* 2001, 34:184-8.
- Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Habahbeh N, Qualtrough A, Worthington H, Drucker DB: Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2004, 37:438-46.
- Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL: Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 2001, 18:163-70.
- Reit C, Dahlen G: Decision making analysis of endodontic treatment strategies in teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1988, 21:291-9.
- Reit C, Molander A, Dahlen G: The diagnostic accuracy of microbiologic root canal sampling and the influence of antimicrobial dressings. *Endod Dent Traumatol* 1999, 15:278-83.
- Rocas IN, Hulsmann M, Siqueira JF, Jr.: Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. *J Endod* 2008, 34:926-31.
- Ruff ML, McClanahan SB, Babel BS: In vitro antifungal efficacy of four irrigants as a final rinse. *J Endod* 2006, 32:331-3.
- San-Blas G, Travassos LR, Fries BC, Goldman DL, Casadevall A, Carmona AK, Barros TF, Puccia R, Hostetter MK, Shanks SG, Copping VM, Knox Y, Gow NA: Fungal morphogenesis and virulence. *Med Mycol* 2000, 38 Suppl 1:79-86.
- Sandhaus S: [Ozone therapy in oral surgery and clinical dentistry]. *Zahnarztl Prax* 1969, 20:277-80.
- Sathorn C, Parashos P, Messer H: Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J* 2007, 40:2-10.
- Schauer F, Hanschke R: [Taxonomy and ecology of the genus *Candida*]. *Mycoses* 1999, 42 Suppl 1:12-21.
- Schoop U, Goharkhay K, Klimscha J, Zagler M, Wernisch J, Georgopoulos A, Sperr W, Moritz A: The use of the erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser in endodontic treatment: the results of an in vitro study. *J Am Dent Assoc* 2007, 138:949-55.
- Schoop U, Kluger W, Dervisbegovic S, Goharkhay K, Wernisch J, Georgopoulos A, Sperr W, Moritz A: Innovative wavelengths in endodontic treatment. *Lasers Surg Med* 2006, 38:624-30.
- Sen BH, Akdeniz BG, Denizci AA: The effect of ethylenediamine-tetraacetic acid on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000, 90:651-5.
- Sen BH, Piskin B, Demirci T: Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endod Dent Traumatol* 1995, 11:6-9.

- Sen BH, Safavi KE, Spangberg LS: Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. *Arch Oral Biol* 1997, 42:513-20.
- Sen BH, Safavi KE, Spangberg LS: Growth patterns of *Candida albicans* in relation to radicular dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997, 84:68-73.
- Sen BH, Safavi KE, Spangberg LS: Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals. *J Endod* 1999, 25:235-8.
- Sennhenn-Kirchner S, Schwarz P, Schliephake H, Konietzschke F, Brunner E, Borg-von Zepelin M: Decontamination efficacy of erbium:yttrium-aluminium-garnet and diode laser light on oral *Candida albicans* isolates of a 5-day in vitro biofilm model. *Lasers Med Sci* 2009, 24:313-20.
- Sevilla MJ, Odds FC: Development of *Candida albicans* hyphae in different growth media--variations in growth rates, cell dimensions and timing of morphogenetic events. *J Gen Microbiol* 1986, 132:3083-8.
- Siqueira JF, Jr., Rocas IN: Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004, 97:85-94.
- Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Lopes HP: Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002, 93:174-8.
- Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Lopes HP, Elias CN, de Uzeda M: Fungal infection of the radicular dentin. *J Endod* 2002, 28:770-3.
- Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Lopes HP, Magalhaes FA, de Uzeda M: Elimination of *Candida albicans* infection of the radicular dentin by intracanal medications. *J Endod* 2003, 29:501-4.
- Siqueira JF, Jr., Sen BH: Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004, 97:632-41.
- Siqueira JF, Rocas IN, Moraes SR, Santos KR: Direct amplification of rRNA gene sequences for identification of selected oral pathogens in root canal infections. *Int Endod J* 2002, 35:345-51.
- Siren EK, Haapasalo MP, Waltimo TM, Orstavik D: In vitro antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. *Eur J Oral Sci* 2004, 112:326-31.
- Sjogren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G: Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1997, 30:297-306.
- Sjogren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G: The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J* 1991, 24:119-25.
- Steiner R, Hibst R, Keller U: Laser in der Zahnheilkunde, Grundlagen und Praxis. *ZWR* 1999, 108:8-13.
- Stevens RH, Grossman LI: Evaluation of the antimicrobial potential of calcium hydroxide as an intracanal medicament. *J Endod* 1983, 9:372-4.
- Suci PA, Tyler BJ: A method for discrimination of subpopulations of *Candida albicans* biofilm cells that exhibit relative levels of phenotypic resistance to chlorhexidine. *J Microbiol Methods* 2003, 53:313-25.
- Sundqvist G: Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994, 78:522-30.

- Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U: Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998, 85:86-93.
- Thilo BE, Baehni P, Holz J: Dark-field observation of the bacterial distribution in root canals following pulp necrosis. *J Endod* 1986, 12:202-5.
- Valera MC, de Moraes Rego J, Jorge AO: Effect of sodium hypochlorite and five intracanal medications on *Candida albicans* in root canals. *J Endod* 2001, 27:401-3.
- van Hillegersberg R: Fundamentals of laser surgery. *Eur J Surg* 1997, 163:3-12.
- Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ: In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004, 97:79-84.
- Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Orstavik D: Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. *J Endod* 2005, 31:863-6.
- Waltimo TM, Orstavik D, Siren EK, Haapasalo MP: In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J* 1999, 32:421-9.
- Waltimo TM, Orstavik D, Siren EK, Haapasalo MP: In vitro yeast infection of human dentin. *J Endod* 2000, 26:207-9.
- Waltimo TM, Sen BH, Meurman JH, Orstavik D, Haapasalo MP: Yeasts in apical periodontitis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003, 14:128-37.
- Waltimo TM, Siren EK, Orstavik D, Haapasalo MP: Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide in vitro. *Int Endod J* 1999, 32:94-8.
- Waltimo TM, Siren EK, Torkko HL, Olsen I, Haapasalo MP: Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J* 1997, 30:96-101.
- Weichman JA, Johnson FM: Laser use in endodontics. A preliminary investigation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1971, 31:416-20.
- Weiger R, de Lucena J, Decker HE, Lost C: Vitality status of microorganisms in infected human root dentine. *Int Endod J* 2002, 35:166-71.
- Weiger R, Rosendahl R, Lost C: Influence of calcium hydroxide intracanal dressings on the prognosis of teeth with endodontically induced periapical lesions. *Int Endod J* 2000, 33:219-26.
- Wu MK, Dummer PM, Wesselink PR: Consequences of and strategies to deal with residual post-treatment root canal infection. *Int Endod J* 2006, 39:343-56.

11 Anhang

Die Durchführung der Versuche erfolgte im Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Dorotheenstraße 96, 10117 Berlin.

11.1 Materialliste

- Mat. 1 antair BSK Laminar flow; anthos Mikrosysteme, Köln, Deutschland
- Mat. 2 Autoklav Webeco E 16; Webeco, Selmsdorf, Deutschland
- Mat. 3 Axioplan 2; Zeiss, Jena, Deutschland
- Mat. 4 Bare Fiber NIR Q 300K 200µm; Asclepion Laser Technologies GmbH, Jena, Deutschland
- Mat. 5 Brutschrank Heraeus B6760; W. C. Heraeus, Hanau, Deutschland
- Mat. 6 Brutschrank Heraeus Function Line; W. C. Heraeus, Hanau, Deutschland
- Mat. 7 *Candida albicans* ATCC 90028 (ATCC: American Type Culture Collection); Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Campus Mitte, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland
- Mat. 8 Chlorhexamed 1 % GEL, GlaxoSmithKline, Bühl, Deutschland
- Mat. 9 Chlorhexidindiglukonat 0,2 %; Apotheke der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland
- Mat. 10 Columbia agar with sheep blood PLUS; Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
- Mat. 11 Cryo-Tubes; Karl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Mat. 12 Diamantkugel Größe 029 Komet; Gebr. Brasseler, Lemgo, Deutschland
- Mat. 13 Einmal-Pastenkanülen 0,9 × 23mm; transcoject Dentaltechnik, Neumünster, Deutschland
- Mat. 14 Eppendorf Reference; Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Mat. 15 Ethanol/Formalin 9:1; Apotheke der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland
- Mat. 16 FileCare EDTA 15 %; VWD, München, Deutschland
- Mat. 17 Flexmaster-System; VWD, München, Deutschland
- Mat. 18 Flexmaster-Feilen Größe 04/40, 02/60, 02/30; VWD, München, Deutschland
Gates Glidden Bohrer Größe 4 (ISO-Größe 110), 5 (ISO-Größe 130),
6 (ISO-Größe 150); VWD, München, Deutschland
- Mat. 19
- Mat. 20 GENTLEray 980; KaVo, Biberach, Deutschland
- Mat. 21 Healozone; KaVo, Biberach, Deutschland
- Mat. 22 Healozone delivery Cup 6 mm; KaVo, Biberach, Deutschland

- Mat. 23 Healozone Handstück Plus 2131 C; KaVo, Biberach, Deutschland
- Mat. 24 Hedström ISO 40; VWD, München, Deutschland
- Mat. 25 Heidolph REAX Vortex-Mixer; Heidolph Instruments GmbH, Hamburg, Deutschland
- Mat. 26 Innenlochkreissäge: Sägemikrotom Leitz 1600; Leica Micro Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland
- Mat. 27 Mikroschleifsystem Exakt 400 CS; Exact Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland
- Mat. 28 Nail Polish catrice; cosnova, Frankfurt, Deutschland
- Mat. 29 Natriumchlorid 0,9 %; Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Campus Mitte, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland
- Mat. 30 Natriumhypochlorit 1 %, Hedinger, Stuttgart, Deutschland
- Mat. 31 Omnifix 5 ml; Braun, Melsungen, Deutschland
- Mat. 32 Papierspitzen ISO 40; VWD, München, Deutschland
- Mat. 33 Pipettenspitze 200 µl; Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
- Mat. 34 Sabouraud-Glukose-Hefeextrakt-Selektiv-Nährboden; Oxoid, Wesel, Deutschland
- Mat. 35 Sabouraud-Liquid-Medium; Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
- Mat. 36 SafeSeal Reagiergefäß/ microtube 2 ml, PP, Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
- Mat. 37 SafeSeal Reagiergefäß/ microtube 1,5 ml, PP, Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
- Mat. 38 Schleifpapier P 1200; Exact Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland
SONICFlex; VWD, München, Deutschland
- Mat. 39 Technovit 4071, Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland
- Mat. 40 Tryptone Soya broth; Oxoid, Basingstoke Hampshire, England
- Mat. 41 UltraCal XS pH 12,5; Ultradent, South Jordan, USA
- Mat. 42 VMK-Endoneedle; Vedefar, Dilbeek, Belgien

11.2 Danksagung

Herrn Professor Dr. Andrej M. Kielbassa danke ich für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas sowie für die Erstellung des Erstgutachtens.

Herrn Dr. Jörn Noetzel danke ich für die wissenschaftliche Betreuung und die wertvolle Unterstützung bei der Abfassung der vorliegenden Arbeit, insbesondere für die zielführenden Anregungen.

Frau Dr. Annette Moter danke ich für die wissenschaftliche Betreuung während der Untersuchung. Mein zusätzlicher Dank gilt Ihrer Ermöglichung der Durchführung der Versuche am Institut für Mikrobiologie und Hygiene sowie dem mir entgegengebrachten Vertrauen.

Für die engagierte und gewissenhafte Unterstützung bei der Durchführung der Versuche danke ich Julia Schulze, Abteilung für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie sowie Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité - Universitätsmedizin Berlin.

Herrn Dr. Konrad Neumann, Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie, Campus Mitte, Charité - Universitätsmedizin Berlin, danke ich für die statistische Auswertung der Daten und die fachkundige Beratung.

Der Firma KaVo danke ich für die Bereitstellung des Laser- und des Ozongeräts.

11.3 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11.4 Erklärung an Eides statt

Ich, Sarah Walkenbach, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „In-vitro-Untersuchung zur Wirksamkeit eines Diodenlasers, von gasförmigem Ozon, Chlorhexidindiglukonat-Gel oder Kalziumhydroxid gegenüber Biofilmen von *Candida albicans* in Wurzelkanälen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 05.01.2010

Sarah Walkenbach