

Aus dem Institut für Zahnerhaltung und Präventivzahnmedizin des Centrums
für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Medizinischen Fakultät Charité -
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

In-vitro-Studie zur Effektivität von Diodenlaser, gasförmigem Ozon,
Kalziumhydroxid und Chlorhexidindigluconat-Gel gegenüber *Enterococcus*
faecalis im Wurzelkanal

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Mediha Niepel geb. Derman

aus Fritzlar

Datum der Promotion: 07.12.2018

Für Jutta und Feridun,
Sebastian,
Kian und Ava.

Veröffentlichung

Bitter, K., Vlassakidis, A., Niepel, M., Hoedke, D., Schulze, J., Neumann, K., Moter, A. & Noetzel, J. (2017). Effects of Diode Laser, Gaseous Ozone, and Medical Dressings on Enterococcus faecalis Biofilms in the Root Canal Ex Vivo. BioMed research international, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6321850>

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. Zusammenfassung | 10 |
| 2. Abstract | 12 |
| 3. Einleitung | 14 |
| 4. Literaturübersicht | 15 |
| 4.1 Endodontie | 15 |
| 4.1.1 Pulpitis | 15 |
| 4.1.2 Apikale Parodontitis | 15 |
| 4.2 Mikrobielle Flora im Wurzelkanal | 16 |
| 4.2.1 Enterococcus faecalis | 17 |
| 4.3 Wurzelkanalaufbereitung | 18 |
| 4.3.1 Mechanische Wurzelkanalaufbereitung | 18 |
| 4.3.2 Chemo-mechanische Wurzelkanalaufbereitung | 18 |
| 4.4 Desinfektionsmaßnahmen bei Wurzelkanalbehandlungen | 19 |
| 4.4.1 Spüllösungen | 19 |
| 4.4.1.1 Natriumhypochlorit | 20 |
| 4.4.1.2 Chlorhexidin (CHX) | 22 |
| 4.4.1.3 Weitere Spüllösungen | 23 |
| 4.4.2 Medizinische Einlagen | 23 |
| 4.4.2.1 Kalziumhydroxid | 24 |
| 4.4.2.2 Chlorhexidin-Gel als medikamentöse Einlage | 25 |
| 4.4.3 Adjuvante Desinfektionsmaßnahmen | 25 |
| 4.4.3.1 Ozon | 26 |
| 4.4.3.2 Laser | 28 |
| 5. Fragestellung | 30 |
| 6. Material und Methoden | 31 |
| 6.1 Methodik | 31 |
| 6.2 Vorphase der Studie | 31 |
| 6.3 Sterilitätskontrolle und Wachstumsreihe E. faecalis | 34 |
| 6.4 Qualitative Auswertung des Biofilms | 35 |
| 6.5 Hauptversuche | 36 |
| 6.5.1 Gruppeneinteilung | 36 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 6.5.2 | Beimpfung mit <i>E. faecalis</i> | 37 |
| 6.5.3 | Finale Wurzelkanalaufbereitung und finale Spülung..... | 37 |
| 6.5.4 | Unterstützende Desinfektionsmaßnahmen der Hauptgruppen..... | 38 |
| 6.6 | Erhobene Parameter | 40 |
| 6.6.1 | Ausgangsbakterienzahlbestimmung | 40 |
| 6.6.2 | Abschlussbakterienzahl im Wurzelkanal | 41 |
| 6.6.3 | Abschlussbakterienzahl im Dentin | 43 |
| 6.6.4 | Feilenabrieb der Dentinproben..... | 43 |
| 6.6.5 | Bakterielles Wachstum nach Desinfektion | 44 |
| 6.7 | Statistische Auswertung der Ergebnisse | 44 |
| 7. | Ergebnisse | 46 |
| 7.1 | Die Ausgangsbakterienzahl im Wurzelkanal..... | 46 |
| 7.2 | Fluoreszenzmikroskopische Nachweise des Biofilms..... | 49 |
| 7.3 | Die Abschlussbakterienzahl im Wurzelkanal | 52 |
| 7.3.1 | Versuchsreihe 1 – ohne chemo-mechanische Aufbereitung | 53 |
| 7.3.2 | Versuchsreihe 2 – Aufbereitung mit physiologischer Kochsalzlösung | 54 |
| 7.3.3 | Versuchsreihe 3 – Aufbereitung mit Natriumhypochlorit..... | 55 |
| 7.3.4 | Versuchsreihe 4 – Aufbereitung mit Chlorhexidin | 56 |
| 7.3.5 | Effektivitätsvergleich der Desinfektionsmaßnahmen..... | 57 |
| 7.3.6 | Effektivitätsvergleich der Spülprotokolle | 58 |
| 7.4. | Der Biofilm im Dentin..... | 59 |
| 7.4.1 | Versuchsreihe 1 – ohne chemo-mechanische Aufbereitung..... | 60 |
| 7.4.2 | Versuchsreihe 2 – Aufbereitung mit physiologischer Kochsalzlösung | 61 |
| 7.4.3 | Versuchsreihe 3 – Aufbereitung mit Natriumhypochlorit..... | 62 |
| 7.4.4 | Versuchsreihe 4 – Aufbereitung mit Chlorhexidin | 63 |
| 7.4.5 | Effektivität der Desinfektionsmaßnahmen – adhärente Bakterien..... | 64 |
| 7.4.6 | Effektivität der Spülprotokolle – adhärente Bakterien | 65 |
| 7.5 | Feilenabrieb der behandelten Proben..... | 66 |
| 7.6 | Bakterienwachstum in den bakterienfrei getesteten Kanälen | 67 |
| 8. | Diskussion | 68 |
| 8.1 | Diskussion des Materials | 68 |
| 8.1.1 | Probenzähne | 68 |
| 8.1.2 | <i>Enterococcus faecalis</i> | 68 |
| 8.1.3 | Desinfektionsmittel..... | 69 |

| | |
|---|------------|
| 8.2 Diskussion der Methodik..... | 70 |
| 8.2.1 Probenherstellung..... | 70 |
| 8.2.2 Probenentnahme | 71 |
| 8.2.3 Auswertung..... | 71 |
| 8.3 Diskussion der Ergebnisse | 73 |
| 8.3.1 Wirksamkeit der Desinfektionsmaßnahmen..... | 73 |
| 8.3.2 Wirksamkeit der Spüllösungen | 79 |
| 8.3.3 Abschlussbakterienzahl im Dentin | 81 |
| 8.3.4 Feilenabrieb der Dentinspäne | 82 |
| 8.3.5 Bakteriellles Wachstum nach Desinfektion | 82 |
| 8.3.6 Konsequenzen für den klinischen Alltag..... | 83 |
| 9. Schlussfolgerung | 86 |
| 10. Literaturverzeichnis..... | 88 |
| 11. Anhang | 103 |
| 11.1 Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung..... | 103 |
| 11.2 Tabellarischer Lebenslauf..... | 105 |
| 11.3 Danksagung | 106 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abb. 1: 3D-Darstellung der Wurzelkanäle eines oberen Molars. | 15 |
| Abb.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Enterococcus faecalis</i> | 17 |
| Abb. 3: HealOzone® Gerät..... | 27 |
| Abb. 4: Dekapitierter Zahn mit planer Oberfläche..... | 32 |
| Abb. 5: (A) Bohrung in eine Wurzel. (B) Entstandenes Reservoir. | 32 |
| Abb. 6: Mit Nagellack überzogener, zur Einbettung vorbereiteter Zahn. | 33 |
| Abb. 7: (A) In Epoxidharzkunststoff eingebettete Wurzel. (B) Individualisierter Deckel..... | 34 |
| Abb. 8: Wurzelkanal. | 35 |
| Abb. 9: Cryo-Tubes mit individuell angepasster Silikon-Kappe. | 37 |
| Abb.10: Ozonapplikation mit Handstück..... | 39 |
| Abb. 11: Einbringen der Laserfaser in den Wurzelkanal..... | 39 |
| Abb. 12: Ausstreichen von 20 µl der Bakterienkulturen auf einer Agarplatte..... | 41 |
| Abb. 13: Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Endbakterienzahl. | 42 |
| Abb. 14: Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Endbakterienzahl bei Kanälen mit NaCl..... | 42 |
| Abb. 15: Ausgangsbakterienzahl im Wurzelkanal (in CFU/ml). | 46 |
| Abb. 16: Übersichtsdarstellung des Wurzelkanallumens..... | 49 |
| Abb. 17: Vergrößerung des Biofilmausschnittes von Abb. 16..... | 50 |
| Abb. 18: Anschnitt eines von <i>E. faecalis</i> infiltrierten akzessorischen Kanals..... | 50 |
| Abb. 19: Anschnitt der Dentintubuli. DT: Dentintubuli..... | 51 |
| Abb. 20: Abschlussbakterienzahl im Wurzelkanal (in CFU/ml); Versuchsreihe 1. | 53 |
| Abb. 21: Abschlussbakterienzahl im Wurzelkanal (in CFU/ml); Versuchsreihe 2. | 54 |
| Abb. 22: Abschlussbakterienzahl im Wurzelkanal (in CFU/ml); Versuchsreihe 3. | 55 |
| Abb. 23: Abschlussbakterienzahl im Wurzelkanal (in CFU/ml); Versuchsreihe 4. | 56 |
| Abb. 24: Abschlussbakterienzahlen (in CFU/ml) nach Desinfektionsmaßnahmen. .. | 57 |
| Abb. 25: Abschlussbakterienzahlen (in CFU/ml) nach Spüllösungen sortiert. | 58 |
| Abb. 26: Abschlussbakterienzahl im Dentin (in CFU/mg), Versuchsreihe 1 | 60 |
| Abb. 27: Abschlussbakterienzahl im Dentin (in CFU/mg), Versuchsreihe 2. | 61 |
| Abb. 28: Abschlussbakterienzahl im Dentin (in CFU/mg, Versuchsreihe 3..... | 62 |

| | |
|--|----|
| Abb. 29: Abschlussbakterienzahl im Dentin (in CFU/mg); Versuchsreihe 4. | 63 |
| Abb. 30: Abschlussbakterienzahlen (in CFU/mg) nach Desinfektionsmaßnahmen sortiert..... | 64 |
| Abb. 31: Abschlussbakterienzahlen (in CFU/mg) nach Spüllösungen sortiert. | 65 |
| Abb. 32: Feilenabrieb (in mg) der verschiedenen Versuchsreihen und Untergruppen..... | 66 |
| Abb. 33: Häufigkeit des Bakterienwachstums der vorher als bakterienfrei klassifizierten Wurzelkanäle (in %). | 67 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tab. 1: Übersicht der Versuchsreihen 1 bis 4 mit jeweiligen Untergruppen..... | 36 |
| Tab. 2: Übersicht Bakterienzahlklassen an Papierspitze und Dentin..... | 45 |
| Tab. 3: Darstellung der Effizienz der verschiedenen Desinfektionsmaßnahmen..... | 48 |
| Tab. 4: Klassifikation der Bakterienbelastung zum Versuchsende im Wurzelkanal.. | 52 |
| Tab. 5: Klassifikation der Bakterienbelastung zum Versuchsende (Dentin)..... | 59 |

1. Zusammenfassung

Bakterielle Reinfektionen nach Wurzelkanalbehandlungen werden oft in Zusammenhang mit dem Auftreten des Fäkalbakteriums *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) diskutiert. Endodontische Behandlungen können ein- (one-visit) als auch zweizeitig (multiple-visit) durchgeführt werden.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war ein Effektivitätsvergleich zwischen Diodenlaser und Ozongas als One-visit-Methode gegenüber *E. faecalis*-Biofilmen im Vergleich zu den Multiple-visit-Standardmethoden bei Verwendung der medikamentösen Einlagen Kalziumhydroxid ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) und Chlorhexidindigluconat (CHX) Gel.

Für die Versuchsreihen wurden 240 intakte humane Oberkiefereckzähne in vier Hauptgruppen unterteilt. In Gruppe 1 wurden die Zähne komplett final aufbereitet (MAF-ISO (International Organization for Standardization) 60, Kontrollgruppe). Gruppe 2 bis 4 erhielt eine initiale Aufbereitung (MAF-ISO 40). Nach Beimpfung und siebentägiger Inkubation mit *E. faecalis* (Typstamm ATCC 29212) wurde die Ausgangsbakterienzahl (Mittelwert $2,5 \times 10^6$ CFU/ml) bestimmt. Zusätzlich wurde die Biofilmbildung an exemplarischen Proben fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Die Gruppen 2 bis 4 erhielten die finale Aufbereitung mit unterschiedlichen Spüllösungen: Hauptgruppe 2: Isotone Kochsalzlösung 0,9%, Hauptgruppe 3: Natriumhypochlorit 1 %, Hauptgruppe 4: Chlorhexidin (CHX) 0,2 %. Danach erfolgten die Desinfektionsmaßnahmen Diodenlaserbestrahlung (40 s), Ozonapplikation (2 x 60 s) sowie die Chlorhexidindigluconat-Gel- (1 %) und Kalziumhydroxideinlagen mit einer Liegedauer von je sieben Tagen für jede Hauptgruppe. Die Endbakterienzahl wurde im Wurzelkanal und Dentin erhoben.

Im Wurzelkanal zeigte die Kontrollgruppe ohne Spülprotokoll signifikante Unterschiede zwischen den Desinfektionsmaßnahmen ($p < 0,0005$; ANOVA): Die Mittelwerte der logarithmischen Reduktionsfaktoren \pm Standardabweichung waren bei Ozon $1,4 \pm 1,0$, und Laser $1,1 \pm 1,1$ signifikant geringer als bei den medikamentösen Einlagen mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ $3,3 \pm 0,4$ und CHX-Gel $2,3 \pm 1,1$. Sobald Natriumhypochlorit angewendet wurde, konnten keine Unterschiede festgestellt ($p=0,062$, ANOVA) und die Reduktionsfaktoren weiter erhöht werden (Ozon $3,4 \pm 0,6$, Laser $3,7 \pm 0,3$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ $3,8 \pm 0,7$, CHX-Gel $3,1 \pm 1,2$).

Vergleichbare Resultate wurden bei den adhärennten Bakterien in den Dentinproben ermittelt.

Die Unterschiede der Bakterienreduktion innerhalb der Kontrollgruppe waren signifikant ($p \leq 0.004$, Chi-Quadrat-Test). Unter Verwendung der desinfizierenden Spüllösungen Natriumhypochlorit und Chlorhexidin, lag die Majorität der Proben unterhalb der Nachweisgrenze. Innerhalb der verschiedenen Spüllösungen waren die Unterschiede nicht signifikant ($p \geq 0.0083$, Chi-Quadrat-Test).

Auf Grundlage der Ergebnisse dieser In-vitro-Studie, kann die Anwendung der adjuvanten Desinfektionsmaßnahmen Ozon- und Laseranwendung in Kombination mit einem antibakteriellen Spülprotokoll bei der One-visit-Behandlung in Erwägung gezogen werden. Ob die Desinfektion mit Ozon oder Diodenlaser zusätzlich zur chemo-mechanischen Aufbereitung mit Natriumhypochlorit oder Chlorhexidin als Spüllösung einen Einfluss auf das Behandlungsergebnis nach One-visit-Wurzelkanalbehandlungen hat, müssen entsprechende In-vivo-Langzeituntersuchungen zeigen.

2. Abstract

Reinfections after root canal treatments are often discussed in connection with the appearance of *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*). Therapeutic approaches comprise one- and multiple-visit treatment regimens. The aim of the present study was to compare reductions of *Enterococcus faecalis* biofilms in root canals using diode laser treatment or application of gaseous ozone in comparison to medical dressing applications using calcium hydroxide and chlorhexidine digluconate (CHX) gel.

For this purpose, 240 complete, non-treated human canine teeth from the upper jaw were divided into four groups: Group 1 (control) contained teeth that had been treated according to MasterApicalFile (MAF) ISO 60. Groups 2 to 4 experienced an initial MAF ISO 40 treatment. Before treatment, all teeth were inoculated with a defined number (average $2,5 \times 10^6$ CFU/ml) of *Enterococcus faecalis* (strain ATCC 29212) and incubated for seven days. After the incubation period, groups 2 to 4 were treated until MAF ISO 60 was achieved using the following irrigation solutions: group 2: isotonic saline solution (NaCl) 0.9 %, group 3: sodium hypochlorite (NaOCl) 1 %, group 4: CHX solution 0.2 %. Subsequently, each group received the following disinfection treatments, respectively: radiation with a diode laser for 40 s, gaseous ozone twice for 60 s, intracanal dressing with CHX gel (1%) or calcium hydroxide. Finally, the total number of bacteria in the root canal and adherent bacteria were determined.

Group 1 (root canal) without irrigation protocol showed significant differences between the disinfection procedures ($p < 0.0005$; ANOVA). The mean relative bacterial reduction (log scale) was most efficient for calcium hydroxide (3.3 ± 0.4) and chlorhexidine gel (2.3 ± 1.1), followed by ozone (1.4 ± 1.0) and laser (1.1 ± 1.1). Using NaOCl for irrigation, no differences were detected between the different disinfection protocols ($p = 0.062$, ANOVA) and relative bacterial reduction was increased (ozone 3.4 ± 0.6 , laser 3.7 ± 0.3 , calcium hydroxide 3.8 ± 0.7 , CHX gel 3.1 ± 1.2).

The data for adherent bacteria in dentin were comparable to the root canal results.

Significant differences in bacterial reduction were identified within group 1.

($p < 0.004$, chi-square test). Using the disinfecting irrigations NaOCl and CHX, the majority of samples were found to be below detection limit. No differences between the irrigation protocols were found ($p \geq 0.0083$, chi-square test).

The additional use of ozone or laser with disinfective irrigation protocols may be suitable for one-visit root canal treatments. Long-term in vivo studies are necessary to

clarify the clinical relevance of disinfection procedures using gaseous ozone and diode laser in combination with an antibacterial irrigation regimen using NaOCl and CHX in one-visit treatments.

3. Einleitung

Durch Wurzelkanalbehandlungen ist es möglich, Zähne mit entzündetem pulpaalem Gewebe nicht nur schmerzfrei zu machen, sondern auch über viele Jahre zu erhalten. Die möglichst vollständige Entfernung der Bakterien aus dem erkrankten Wurzelkanalsystem ist eine der wichtigsten Voraussetzungen für eine erfolgreiche Wurzelkanalbehandlung, da das Verbleiben von Mikroorganismen häufig mit einem endodontischen Misserfolg verbunden ist [Gambal *et al.* 2003]. Insbesondere die Vielfalt der ortsständigen Mikroorganismen macht diese Behandlungen schwierig. Vor allem durch das Persistieren des grampositiven Bakteriums *Enterococcus faecalis* [*E. faecalis*] kann eine Wurzelbehandlung erschwert sein oder sogar misslingen [Gomes *et al.* 2006].

Obwohl Ozon als wirksames Oxidationsmittel antibakterielle, fungizide und virusinaktivierende Eigenschaften besitzt [Kim *et al.* 1999], liegen für den Bereich der Endodontie wenige Studienergebnisse vor [Kishen 2012; Azarpazhooh *et al.* 2008]. Die Anwendung der Diodenlaserbestrahlung wurde von Mathew als wirksames, ergänzendes antibakterielles Desinfektionsmittel im Wurzelkanal vorgeschlagen [Mathew *et al.* 2014]. Die genannten adjuvanten Desinfektionsmaßnahmen lassen eine erhöhte Desinfektionswirkung vermuten. Sie können unterstützend im Rahmen der sogenannten One-visit-Behandlung angewendet werden. Dadurch soll das Rekontaminationsrisiko reduziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Medizingeräte und Medikamente zur Bakterienreduktion von mit *E. faecalis* infizierten Wurzelkanälen bzw beziehungsweise (bzw.) des infizierten Wurzeldentins verglichen. Das Ziel der Untersuchung war es, die Wirksamkeit der Bestrahlung mit dem Diodenlaser und der Applikation von gasförmigem Ozon auf die Reduktion bzw. Elimination von *E. faecalis* zu beurteilen.

4. Literaturübersicht

4.1 Endodontie

Die Endodontie beschäftigt sich mit dem „Inneren“ des Zahnes bzw. mit der Vorbeugung und Verhinderung von Erkrankungen und der Behandlung der inneren Gewebe des Zahnes.

Der Zahn ist kein in sich geschlossenes System. Über das *Foramen apicale* ziehen Blut- und Lymphgefäße sowie Nervenbündel in die Wurzelpulpa und steigen zur Kronenpulpa auf, in der sich die Gefäße in feinste Netzwerke aufspalten (Abb.1).



Abb. 1: 3D-Darstellung der Wurzelkanäle eines oberen Molars.

Quelle: <http://www.dr-leyk.de/css/img/rinse.png>

4.1.1 Pulpitis

Die Pulpa-Dentin-Einheit stellt entwicklungsgeschichtlich, biologisch und funktionell eine Einheit dar. Bei Entzündungen von Teilstrukturen ist daher der gesamte Komplex betroffen [Schroeder 1987].

Die Pulpitis ist eine Entzündung des Zahnnerfs im Zahnkronenbereich und kann durch physikalische, chemische und toxische Reize ausgelöst werden. Klinisch imponiert ein stechender, gut lokalisierbarer Schmerz. Ist die pathogene Reizeinwirkung zeitlich und lokal begrenzt, kann die Pulpa regenerieren und ausheilen (reversible Pulpitis).

4.1.2 Apikale Parodontitis

Die apikale Parodontitis stellt eine Entzündung des Parodonts im Bereich der Wurzelspitze dar. In den meisten Fällen entsteht die apikale Parodontitis aufgrund einer Kariesprogression mit bakterieller Infektion der Pulpa, die in einer Nekrose des

gesamten pulpalen Komplexes endet. Iatrogene Auslöser können eine misslungene Pulpitistherapie oder eine insuffiziente Wurzelkanalfüllung sein. In allen Fällen kommt es zu einer Bakterienverbreitung über das *Foramen apicale* in die periapikale Region und dort zu lokal-destruktiven Prozessen [Schäfer 2001].

4.2 Mikrobielle Flora im Wurzelkanal

Die Behandlung des Wurzelkanals ist in erster Linie eine mikrobiologische und in zweiter Linie eine anatomische und technische Herausforderung [Hülsmann 2001]. Nicht nur das pulpale Weichgewebe, sondern auch das zirkumpulpaie Dentin der Wurzelkanalwand kann mit Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukten (Endotoxinen) kontaminiert sein [Peters 2003]. Das Bakterienprofil im infizierten Kanal variiert interindividuell stark in Qualität und Quantität. Jedes Individuum zeigt eine einzigartige mikrobielle Flora, die nicht nur reich an Arten, sondern auch an Erregerzahlen ist [Rocas *et alii* (*et al.*) 2008].

Das Endodont eines Zahns mit nekrotischer Pulpa weist bis zu 100 Millionen Bakterien auf [Hülsmann 2001]. Sassone und Kollegen untersuchten mittels DNA-Proben das bakterielle Profil der nekrotischen Pulpa [Sassone *et al.* 2007]. Sie fanden in absteigender Reihenfolge: *Enterococcus faecalis* (89.3 %), *Campylobacter gracilis* (89.3 %), *Leptotrichia buccalis* (89.3 %), *Neisseria mucosa* (87.5 %), *Prevotella melaninogenica* (86.6 %), *Fusobacterium nucleatum ssp. vincentii* (85.7 %), *Eubacterium saburreum* (75.9 %), *Streptococcus anginosus* (75,0 %), und *Veillonella parvula* (74,1 %) [Sassone *et al.* 2007]. 90 % der gefundenen Bakterien waren obligate Anaerobier, wobei Kokken mit ca. 40 % den Hauptanteil stellten. Dahingegen wurden Pilze (*Candida albicans*) nur vereinzelt nachgewiesen [Borssen *et al.* 1981].

Bei der Wurzelkanalbehandlung werden die Primärinfektionen mit nekrotischem Gewebe von den Sekundärinfektionen bei endodontischem Misserfolg unterschieden [Gängler *et al.* 2010]. Bei der Primärinfektion mit einer nekrotischen Pulpa besteht die bakterielle Flora zum größten Teil aus obligat anaeroben Bakterien [Gängler *et al.* 2010]. Es handelt sich hierbei in den meisten Fällen um fortgeleitete Infektionen von kariösen Läsionen, ohne dass eine Behandlung der Pulpa vorausgegangen ist [Heidemann 2001].

Sekundärinfektionen entstehen nach erfolgter Wurzelkanalbehandlung durch Bakterienpersistenz oder durch Reinfektion. Dies kann durch unzureichende Aufbereitung der Kanäle, ungenügende chemische Desinfektion, anatomische

Varianzen, unzureichende Hygienemaßnahmen während der Wurzelkanalbehandlung oder unzureichende insuffiziente koronale Verschlüsse bedingt sein [Heidemann 2001]. Sekundärinfektionen werden auch als endodontische Misserfolge bezeichnet. Hier dominieren grampositive fakultativ anaerobe Bakterien, von denen der *Enterococcus faecalis* am häufigsten auftritt. Dieser gilt in der Endodontie als Problembakterium und ist mit konservativen Desinfektionsmaßnahmen nur schwer zu bekämpfen [Gängler *et al.* 2010].

4.2.1 *Enterococcus faecalis*

Enterokokken sind grampositive, meist paarweise angeordnete Streptokokken, die sich bei einem pH-Wert von 9,6 in einem Medium mit 6,5 % Kochsalz vermehren. Sie sind gegen Temperatureinflüsse (10-45 °C) und Gallensalze weitgehend unempfindlich. Die Aesculinspaltung ist eine charakteristische Stoffwechsellistung, die zum Bakteriennachweis genutzt wird. Die häufigsten Vertreter der Enterokokken sind: *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium*. Sie machen mehr als 50 % der physiologischen aeroben Darmflora aus [Hof *et al.* 2005] (Abb.2).

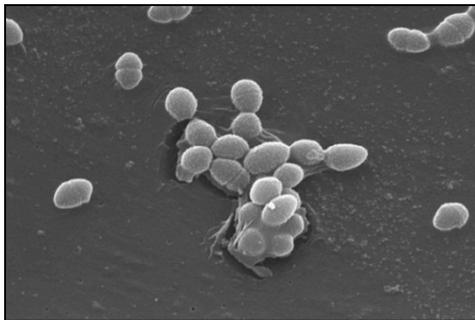


Abb.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Enterococcus faecalis*. Quelle: http://www.genome.gov/Images/press_photos/highres/20024-300.jpg

In der Zahnmedizin wird dieser Mikroorganismus häufig bei asymptomatisch persistierenden endodontischen Infektionen beobachtet [Stuart *et al.* 2006]. Gomes und Kollegen führten PCR-Analysen von Proben aus Wurzelkanälen mit nekrotischen Pulpen und von Proben endodontischer Misserfolge durch. Dabei wurde gezeigt, dass *E. faecalis* in lediglich 4 % der Proben aus nekrotischen Pulpen, aber in 42 % der Proben aus endodontischen Misserfolgen nachweisbar war [Gomes *et al.* 2006]. Aussagen zur Prävalenz dieses Bakteriums im infizierten Kanal variieren zwischen 24 und 77 % [Stuart *et al.* 2006]. Der pulpenlose Kanal scheint ein perfektes Biotop für dieses Bakterium zu sein [Zehnder *et al.* 2009].

Das ist durch die Virulenzfaktoren des *E. faecalis* erklärbar: Zum einen kann er in die Dentintubuli migrieren, andererseits konkurriert er erfolgreich mit anderen Mikroorganismen und kann trotz Nährstoffmangel lange Zeit im Kanal überleben [Stuart *et al.* 2006].

4.3 Wurzelkanalaufbereitung

Die Wurzelkanalaufbereitung gehört zu den elementaren Voraussetzungen einer erfolgreichen Wurzelkanalbehandlung. Ob die Aufbereitung nun manuell oder maschinell durchgeführt wird, ist weniger relevant als die Tatsache, dass überhaupt mechanisch aufbereitet wird [Hülsmann 2001]. Bei einer defizitären oder fehlenden Wurzelkanalaufbereitung vor der definitiven Wurzelkanalfüllung ist die sekundäre Infektion des Kanalsystems unaufhaltbar.

4.3.1 Mechanische Wurzelkanalaufbereitung

Bei der mechanischen Wurzelkanalaufbereitung wird die bakteriell infizierte Dentinwand entlang des ursprünglichen Wurzelkanals abgetragen, wobei dieser Abtrag der Wand nicht zu einer übermäßigen Schwächung des Zahnes bzw. der Wurzel selbst führen sollte. Dafür ist die Einhaltung der anatomischen Form eines Kanals während der Behandlung entscheidend.

Allgemein wird die manuelle von der maschinellen Wurzelkanalaufbereitung unterschieden.

4.3.2 Chemo-mechanische Wurzelkanalaufbereitung

Der Goldstandard der Wurzelkanalaufbereitung ist die chemo-mechanische Präparation, eine Kombination aus mechanischer Aufbereitung und Spülung des Wurzelkanals mittels antimikrobieller Lösungen. Die Spüllösungen werden zwischen den einzelnen Aufbereitungsgrößen und -schritten angewendet. Bei Betrachtung der Anatomie des Wurzelkanals wird verständlich, warum die chemo-mechanische Aufbereitung die größte Effizienz zeigt: Die Pulpa-Dentin-Einheit ist durch die Dentintubuli miteinander verbunden. Verschiedene Mikroorganismen können sich in diesen Dentintubuli festsetzen, wobei Penetrationstiefen von bis zu 200 µm erreicht werden [Shovelton 1964]. *Enterococcus faecalis* kann sogar bis zu 400 µm in die Dentinkanälchen eindringen [Ørstavik und Haapasalo 1990].

Akzessorische Kanäle, die sich in laterale und Furkationskanäle unterteilen lassen, erschweren die mechanische Aufbereitung. Es ist bekannt, dass anatomische Gegebenheiten wie Dentintubuli und akzessorische Kanäle sich nicht mit alleiniger mechanischer Technik erreichen und reinigen lassen. Zudem muss davon ausgegangen werden, dass nicht alle Bereiche eines Wurzelkanals gleichmäßig bearbeitet werden können. Es bleiben immer unterschiedlich ausgedehnte nicht-instrumentierte Wandbezirke zurück [Hülsmann 2001].

4.4 Desinfektionsmaßnahmen bei Wurzelkanalbehandlungen

Da die Wurzelkanalbehandlung darauf abzielt, eine dauerhafte Bakterienfreiheit zu gewährleisten, wird neben der mechanischen Aufbereitung auch der Einsatz von Desinfektionsmitteln im Sinne der chemo-mechanischen Präparation postuliert. Zu den Desinfektionsmaßnahmen gehören in erster Linie die Spüllösungen, die während einer Wurzelkanalaufbereitung eingesetzt werden.

4.4.1 Spüllösungen

Spüllösungen sind ein zentraler Bestandteil der chemo-mechanischen Aufbereitung von Wurzelkanälen. Es wird empfohlen, nach jeder verwendeten Feile und Feilung 2-5 ml Natriumhypochlorit-Spüllösung zu verwenden. Eine Abschlussspülung sollte mit 10-20 ml nach einer Aufbereitung von mindestens ISO-Größe 35-40 im apikalen Wurzeldrittel stattfinden [Hülsmann *et al.* 2000]. Um die Gefahr der apikalen Extrusion der Spüllösung zu verringern, darf es zu keiner Klemmwirkung der Nadel im Kanal kommen [Hülsmann *et al.* 2000, Bradford *et al.* 2002, Serper *et al.* 2004].

Hülsmann (2001) hat hinsichtlich ihrer primären Bedeutung folgende Anforderungen an endodontische Spüllösungen entwickelt:

1. Auflösung organischen und anorganischen Kanalinhalt in für Wurzelkanal-instrumente schwer zugänglichen Bereichen
2. Desinfektion des Wurzelkanalsystems
3. Abtransport der Dentinspäne und dadurch Verhinderung der Blockbildung
4. Gleitmittel für die Feilen
5. Bleichwirkung auf die koronale und radikuläre Zahnhartsubstanz

4.4.1.1 Natriumhypochlorit

Natriumhypochlorit (NaOCl) hat sich in der Endodontie als Standardspüllösung durchgesetzt. Eine Vielzahl von Studien zeigte, dass NaOCl *in vivo* im Vergleich zu physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) in Kombination mit der mechanischen Aufbereitung eine deutlich höhere Bakterienreduktion erzielt [Byström *et al.* 1983, Dalton *et al.* 1998, Shuping *et al.* 1999]. Neben seinen antimikrobiellen Eigenschaften besitzt es zudem die Fähigkeit, nekrotisches Gewebe aufzulösen [Hand *et al.* 1978, Andersen *et al.* 1992, Yang *et al.* 1995, Türkün *et al.* 1997]. Je höher die Konzentration und applizierte Menge des NaOCl ist, desto gewebeauflösender wirkt es [Dakin 1915, Thé 1979]. Dabei wird durch eine Temperaturerhöhung der NaOCl-Lösung bei niedrigen Konzentrationen eine Erhöhung der gewebeauflösenden Wirkung hervorgerufen. Zudem bewirkt NaOCl eine Neutralisation der Bakterienzellwände [Buttler *et al.* 1982, Haight Ponce 1999]. Die bleichende und oxidierende Wirkung des basischen Natriumhypochlorits (NaOCl 5,25 %: pH-Wert 12,12) beruht auf dem Gehalt an HOCl-Molekülen. Die freien OH⁻, Cl⁻ und OCl⁻-Ionen wirken korrodierend, d.h. sie zerstören allmählich Gewebe in der Umgebung. NaOCl wird durch den Zerfall in Na⁺- und Cl⁻-Ionen, bei Kontakt mit organischem Material, inaktiviert. Dabei wird nekrotisches und vitales Gewebe aufgelöst.

Siqueira und Kollegen bestätigten die Aussage von Hülsmann, dass die Konzentration der verwendeten Spüllösung eminent weniger Einfluss auf die Effektivität der Spülung hat als die Quantität der verwendeten Lösung. Sie untersuchten den Einfluss der Konzentration von NaOCl auf die Bakterienreduktion an extrahierten Zähnen [Siqueira *et al.* 2000]. Dabei konnten keine Unterschiede in der Effektivität von 1-, 2,5- und 5,25-%igem NaOCl festgestellt werden, auch nicht in Bezug auf die Reduktion von *Enterococcus faecalis* [Siqueira *et al.* 2000]. Bedeutend ist nicht nur, dass NaOCl ein breites antimikrobielles Spektrum abdeckt, sondern auch die Fähigkeit zur Auflösung von nekrotischem Restgewebe hat [Zehnder 2006].

NaOCl reagiert mit Proteinen unter Bildung von Chloramin. Dabei zerfallen die Proteine, was dementsprechend auch zu einem Zerfall von Pus und nekrotischem Gewebe führt [Hülsmann 2001]. Die gewebeauflösenden Eigenschaften des NaOCl nehmen mit ansteigender Konzentration und applizierter Menge zu. Zudem ist die lytische Potenz auch abhängig von der Beschaffenheit des aufzulösenden Gewebes und dauert nur so lange an, wie freies Chlor in der Lösung vorhanden ist [Grawehr *et al.* 2003].

Bei Konzentrationen unter 1 % wird NaOCl bei Kontakt zu vitalem Gewebe durch das Blut fortgeschwemmt, ohne toxische Wirkungen zu hinterlassen [Baumgartner 1992, Hülsmann 2001].

Je höher die Konzentration des Hypochlorits, desto höher ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass vitales Gewebe geschädigt wird [Spångberg *et al.* 1973]. Dabei ist die Liegedauer des NaOCl von Bedeutung. Im Vergleich zu Chlorhexidin, Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Zitronensäure und Phosphorsäure gelingt es NaOCl schon nach einer Minute, einen vitalen Biofilm, wie er auch im Bereich der Wurzelkanäle zu finden ist, zu zerstören [Arias-Moliz 2009, Vianna *et al.* 2009]. Peters und Wesselink zeigten, dass nach vollständiger Instrumentierung und intensiver Spülung mit NaOCl zwischen 50 und 70 % der infizierten Kanäle von kultivierbaren Bakterien befreit wurden [Peters und Wesselink 2002]. Anatomisch bedingt nimmt die Desinfektionskraft durch die konische Form des Kanals von koronal nach apikal und von zentral nach peripher stark ab [Buck *et al.* 2001].

Wenn konzentriertes NaOCl über den Apex hinaus gepresst wird, kann es zu schweren Schäden wie postoperativer Schwellung, Schmerzen und Nekrosen im Bereichen des Apex kommen [Calişkan *et al.* 1994, Cymbler *et al.* 1994, Brown *et al.* 1995]. Zudem besteht die Gefahr der Entstehung eines Emphysems; auch ein allergisches Potenzial ist nicht zu negieren [Jeansonne *et al.* 1994, Yesilsoy *et al.* 1995, Sen *et al.* 1995, Segura *et al.* 1999]. Um potenzielle Schädigungen bei der Apexübertretung zu vermeiden, wird häufig niedrig konzentriertes NaOCl als Kanalspülung empfohlen, da es hierbei nur zu einer diskreten Gewebsantwort kommt [Reeh und Messer 1989]. Eine ausreichende Vorsicht bei der Verwendung von NaOCl wird gefordert [Joffe *et al.* 1991].

Eine weitere positive Eigenschaft des NaOCl ist die Fähigkeit zur Inaktivierung von Endotoxinen. Endotoxine sind Zerfallsprodukte von Bakterien, die im Körper verschiedene physiologische Reaktionen, meist Entzündungsreaktionen oder Apoptose, auslösen [Buttler *et al.* 1982]. Endotoxine werden durch NaOCl blockiert [Buttler *et al.* 1982] und die Wurzeloberfläche wird von deren Aktivität befreit [Sarbinoff *et al.* 1983].

NaOCl weist Eigenschaften auf, die für die Endodontie von zentraler Bedeutung sind: die desinfizierende und die gewebeauflösende Wirkung sowie den Endotoxin-neutralisierenden Effekt. In Kombination mit einer ultraschallaktivierten Aufbereitung

erhöht sich dieser Effekt; vor allem im apikalen Drittel der Wurzel können der Biofilm inaktiviert und die Dentintubuli freigelegt werden [Mozo *et al.* 2014].

4.4.1.2 Chlorhexidin (CHX)

Die Abkürzung CHX steht für Chlorhexidin, ein zweifach positiv geladenes Biguanid. Für medizinische Behandlungen wird zumeist das Gluconat, ein Anion der Gluconsäure, verwendet. 1970 wurde die plaqueunterbindende Wirkung erstmals beschrieben [Löe und Schiott 1970]. Diese beruht auf der starken Affinität zu Anionen und damit auf der Blockade der Bindungsstellen der oralen Mikroorganismen an den Zähnen [Ayhan *et al.* 1999]. Die antiseptische Wirkung des CHX gründet auf der Fähigkeit, sich in bakterielle Membranen einzufügen und so die Bakterienzellmembran zu zerstören und damit den Verlust kleiner Moleküle und die Ausfällung zytoplasmatischer Proteine zu provozieren. CHX wirkt vor allem gegen grampositive Kokken, in höheren Dosen auch gegen gramnegative Bakterien, Pilze und Viren [Greenstein *et al.* 1986, Johnson 1995].

Ein Effizienzvergleich zwischen CHX und NaOCl weist widersprüchliche Ergebnisse auf: Mehrere Studien weisen CHX in der endodontischen Anwendung eine äquivalente Desinfektionskraft wie NaOCl nach [Seichter *et al.* 1987, Jeansonne *et al.* 1994, White *et al.* 1999]. Ørstavik und Haapasalo verglichen eine 0,2%ige CHX- und 5,25%ige NaOCl-Lösung. Sie stellen fest, dass es keine Unterschiede bezüglich der Desinfektionstiefe in den Dentintubuli gibt [Ørstavik und Haapasalo 1990]. CHX und NaOCl wurden bei einer Studie von Komorowski und Kollegen (2000) mit einer Einwirkzeit von 5 Minuten getestet, ohne dass sich Unterschiede zeigten [Komorowski *et al.* 2000]. Während Gomes und Kollegen nach sieben Tagen Einwirkzeit von CHX und NaOCl, eine Überlegenheit von CHX nachwiesen [Gomes *et al.* 2000], beschrieben Ayhan und Kollegen eine Überlegenheit von 5,25%igem NaOCl im Vergleich mit 2%iger CHX-Lösung [Ayhan *et al.* 1999]. Die Wirkung von CHX ist wie die von NaOCl konzentrationsabhängig: Eine schnellere Bakterienelimination kann mit einer höher konzentrierten Lösung von CHX erzielt werden, wobei eine Konzentration von 2 % dieser Lösung effektiver ist als eine Konzentration von 0,2 % [Wennberg *et al.* 1980].

CHX ist zu einem unverzichtbaren Wirkstoff in der Zahnmedizin geworden und wird auch als bedeutendes Desinfiziens in der Endodontie gewertet [Klimm *et al.* 1989, Guldener *et al.* 1993]. Wird es in Kombination oder als Wechselspülung mit NaOCl

verwendet, sollte zwischen beiden Lösungen eine Zwischenspülung stattfinden, da beide Substanzen chemisch miteinander reagieren und sich dadurch ein schwer lösliches Zerfallsprodukt, Parachloranilin, an der Dentinoberfläche präzipitiert und dadurch die Dentintubuli verschließen kann [Basrani *et al.* 2007, Bui *et al.* 2008].

Da CHX keine gewebsauflösenden Eigenschaften zeigt, Endotoxine nicht neutralisieren kann und auch das Kanalsystem nicht chemisch reinigt, ist es dem NaOCl gegenüber benachteiligt [Zehnder 2006]. Durch die Substantivität am Dentin, die gute Bioverträglichkeit und die antimikrobielle Wirkung ist es als Zusatzspülung trotzdem unverzichtbar geworden [White *et al.* 1999]. Wenn es, wie oben beschrieben, in einer Konzentration von 0,2 bis 2 % verwendet wird, kann CHX als Zusatzspülung eingesetzt werden. Besonders effizient ist der Wirkstoff bei Revisionen, da hier Bakterien und Fungi auftreten, die gegen NaOCl resistent sein können [Barthel *et al.* 2006].

4.4.1.3 Weitere Spüllösungen

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) gehört zur Gruppe der Chelatoren und ist ein Komplexbildner. 1957 wurde EDTA von Nygaard Östby in die Endodontie eingeführt, um Dentin zu erweichen, die Schmierschicht zu entfernen und dadurch die Aufbereitung zu erleichtern. EDTA wirkt in Konzentrationen von 10 bis 17 % in wässriger Lösung als potenter Chelatbildner [Baumgartner *et al.* 1987] und ist in der Lage, Kalzium aus dem Dentin herauszulösen. Durch die Auflösung der Schmierschicht werden die Eingänge der Dentinkanälchen freigelegt, was die Penetrationstiefe anderer desinfizierender Lösungen erhöht. Durch die geringe Zytotoxizität ist es eine biokompatible Spülung, die adjuvant zu anderen desinfizierenden Spüllösungen eingesetzt wird [Hata *et al.* 2001, Guerisoli *et al.* 2002].

4.4.2 Medizinische Einlagen

Medizinische Einlagen sind unterstützende Maßnahmen bei der Wurzelkanalbehandlung im Sinne einer Langzeitdesinfektion. Vor allem wenn der betroffene Zahn bzw. das periapikale Gewebe akut entzündet sind, können medizinische Einlagen eine schmerzlindernde Möglichkeit darstellen, eine weitere Bakterienreduktion zu erreichen [Vera *et al.* 2012]. In direktem Kontakt wirken medizinische Einlagen in hohen Verdünnungen (z. B. Agardiffusionstest) effektiv gegen Bakterien [Spångberg 1981, Gomes *et al.* 2003].

Bei gramnegativen Bakterien (wie *E. faecalis*) wird die desinfizierende Wirkung durch die Schädigung der äußeren Bakterienmembran erzeugt. Der Trend in der Endodontie bewegt sich aber weiter weg von den Multiple-visit-Behandlungen mit Unterstützung einer medizinischen Einlage. Im Rahmen der Multiple-visit-Therapie besteht das Risiko einer Rekontamination durch eine undichte provisorische Füllung sowie einer unvollständigen Entfernung des Kalziumhydroxids [Ma *et al.* 2015a, Ma *et al.* 2015b]. Das One-visit-Protokoll sieht vor, dass als alleinige chemische Behandlungsmaßnahme in Kombination mit der Aufbereitung Spüllösungen eingesetzt werden und so die im Wurzelkanal befindlichen Bakterien durch die Spülung mit einem antibakteriell wirksamen Spülprotokoll, welches primär NaOCl enthält, abgetötet werden [Hope *et al.* 2010, Waltimo *et al.* 2005].

4.4.2.1 Kalziumhydroxid

Kalziumhydroxid ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) wird in der Endodontie als wässrige Suspension benutzt. Durch die anerkannte antimikrobielle Wirkung ist es das Mittel der Wahl für eine desinfizierende Wurzelkanaleinlage. Die stark alkalische Eigenschaft des Medikaments (pH 12) bewirkt, dass es in wässriger Lösung zu Kalzium- und Hydroxylionen dissoziiert. Hydroxylionen sind stark oxidierend wirkende, freie Radikale. Diese reagieren mit zahlreichen organischen Stoffen. Die desinfizierende Wirkung wird durch die Permeabilitätsschädigung der Zellmembran der Bakterien, durch Proteinschädigung und durch die Blockade von Bakterienenzymssystemen erreicht. Sie ist durch die konstante Abgabe von Hydroxylionen ins Dentin bedingt. Neben der antibakteriellen Wirkung ist das $\text{Ca}(\text{OH})_2$ in der Lage, eine gewebeauflösende Wirkung zu entfalten [Muschol 1981, Wadachi *et al.* 1998, Grawehr *et al.* 2003], Knochenneubildung anzuregen [Sjögren *et al.* 1991], Lipopolysaccharide zu neutralisieren [Estrela *et al.* 2001] und bakterielles Wachstum zu hemmen [Damaschke *et al.* 2005]. Dabei wird der pH-Wert an der Wurzeloberfläche nicht so stark erhöht, dass das umliegende Gewebe geschädigt wird [Schäfer *et al.* 1999, Haapsalo *et al.* 2000].

Die spezielle antimikrobielle Wirkung wird bis heute kontrovers diskutiert. Einerseits gibt es Wissenschaftler, die die Wirkung von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ gegenüber *Enterococcus faecalis* als gering erachten [Tronstad *et al.* 1981, Ørstavik und Haapasalo 1990, Nerwich *et al.* 1993, Schäfer *et al.* 2005]; andere wiederum bestätigen eine

Wirksamkeit von Ca(OH)_2 gegen *Enterococcus faecalis* [Safavi und Nichols 1993, Barnhart *et al.* 2005, Lana *et al.* 2009].

Eine Erklärung für die unterschiedliche Einschätzung der bakterienreduzierenden Wirkung von Ca(OH)_2 lässt sich durch die Tatsache erklären, dass Ca(OH)_2 im Kontakt zum Dentin in seiner stark alkalischen Natur deutlich abgepuffert und dadurch in seiner Wirkung eingeschränkt wird [Lana *et al.* 2009]. Andererseits wird den Bakterien durch die Absorption des Kohlendioxids durch Ca(OH)_2 eine lebenswichtige Grundsubstanz geraubt. Eine Kombination aus Chlorhexidin und Ca(OH)_2 kann in zwei Tagen den Bestand von *Enterococcus faecalis* aus dem Wurzelkanal stark reduzieren [Schäfer *et al.* 2005]. Ein großer Vorteil von Kalziumhydroxid ist, dass es lediglich eine schwache Toxizität besitzt und somit eine wertvolle Ergänzung zur Wurzelkanalspülung darstellt [Koçkapan *et al.* 2003]. Nachteil dieser medikamentösen Einlage ist die schwere Entfernbarekeit aus Kanalwandbezirken, die nur schwer zu instrumentieren oder durch Spüllösungen kaum zu erreichen sind. Dadurch können bis zu 45 % der Kanaloberfläche durch Kalziumhydroxid bedeckt sein [Lambrianidis *et al.* 1999]. Dies könnte zu einer unzureichenden Penetration des Sealers in die Dentintubuli und dadurch zu einer verringerten Dichtigkeit der Wurzelkanalfüllung [Margelos *et al.* 1997] führen. Eine Rekontamination wäre daher nicht ausgeschlossen.

4.4.2.2 Chlorhexidin-Gel als medikamentöse Einlage

Die Bakterieneliminierung im Wurzelkanal wird zunehmend durch die Anwendung von CHX-Gel unterstützt. Durch sie können Resistenzbakterien erreicht werden, die mit lokalen Antibiosen und der Verwendung von Ca(OH)_2 nicht zu eliminieren sind [Schäfer *et al.* 2005]. Untersuchungen zur Biokompatibilität konnten zeigen, dass Konzentrationen von 0,1 bis 2 % CHX im Wurzelkanal toxikologisch unbedenklich sind [Yesilsoy *et al.* 1995]. In einer Studie von 2005 wurde die Effektivität von 2%igem CHX in Kombination mit Ca(OH)_2 und als alleinige Maßnahme gegenüber *Enterococcus faecalis* geprüft; dabei zeigte CHX-Gel als alleinige Einlage die besten Resultate hinsichtlich der Bakterienreduktion [Schäfer und Bössmann 2005].

4.4.3 Adjuvante Desinfektionsmaßnahmen

In der Medizin wird fortwährend nach Möglichkeiten zur optimalen Desinfektion gesucht. Bei den adjuvanten Desinfektionsmaßnahmen handelt es sich um

unterstützende Desinfektionsmaßnahmen des Wurzelkanals. Die in dieser Arbeit untersuchten Desinfektionsmaßnahmen sind die Ozon- und Laserapplikation.

4.4.3.1 Ozon

Ozon (O_3) ist in der organischen Chemie das klassische Reagenz für die Spaltung einer Kohlenstoff-Doppelbindung. Es handelt sich um ein unbeständiges, farbloses bis blaues, hochgiftiges Gas. Schon in großen Verdünnungen wird der Geruch als unangenehm wahrgenommen [Bringmann 1954, Filippi 1999]. Durch den Zerfall eines Sauerstoffmoleküls (O_2) entsteht atomarer Sauerstoff O, der die Grundlage der Ozonwirkung darstellt.

Der atomare Sauerstoff ist hochreaktiv und verbindet sich sofort mit O_2 zu Ozon. Ozon kann auch photochemisch durch Strahlen kurzer Wellenlänge gebildet werden. Vor allem die ultravioletten Strahlen wandeln einen Teil des Sauerstoffs in Ozon um. Die Inaktivierung von Bakterien durch Ozon wird durch eine Oxidationsreaktion erreicht, wobei freie Radikale an der Bakterienmembran reagieren. Viren verlieren bei Kontakt mit Ozon ihre Replikationsfähigkeit. Bei der Bekämpfung gegen Cholera- und Typhusbakterien wurde Ozon zur Wasserdesinfektion eingesetzt [Fischer *et al.* 1978], da Ozon, verglichen mit Chlor, im Wasser eine schnellere Wirkung entfaltet [Prucha 1986, Wallhäußer 1995]. Jedoch sind nicht alle Mikroorganismen gleich stark ozonempfindlich. Ozon nimmt heute einen großen Platz in der Aufbereitung von Wasser ein, da die Qualitätssicherung von Trinkwasser, Schwimmbadwasser und Abwasser durch Ozon erreicht wird [Wolff 1920, Rice *et al.* 1981, Joret *et al.* 1982, Filippi *et al.* 1991, Masschelein 1995]. Zudem wird durch die Ozonbehandlung des Wassers gleichzeitig eine Verbesserung der organoleptischen Eigenschaften wie Farbe, Geschmack und Geruch erreicht [Wolff 1920, Filippi *et al.* 1991, Masschelein 1995]. Die Ozonbehandlung von nekrotischen Wurzelkanälen wurde schon Anfang des letzten Jahrhunderts untersucht und später auch durchgeführt [Overdiek und Honrath 1951].

Heute findet Ozon in der Zahnmedizin verschiedene Anwendungsmöglichkeiten: zur Desinfektion herausnehmbarer Prothesen, zur adjuvanten Behandlung kariöser Kavitäten und exponierter Wurzelkariesoberflächen, bei bakteriellen Erkrankungen des Wurzelkanals, präventiv bei hohem Kariesrisiko und während der Therapie mit Multibandapparatur in der Kieferorthopädie [Henriques und Moritz 1947, Baysan 2002, Abu-Naba'a *et al.* 2003, Huth *et al.* 2004, Santoro *et al.* 2005, Millar und Hodson 2007,

Stoll *et al.* 2008, Johansson *et al.* 2009]. Aufgrund der Toxizität muss bei der Behandlung von Ozon sehr sorgfältig vorgegangen werden, um Schäden am Patienten zu verhindern. Eine Studie von 2006 zeigte, dass Ozongasgeräte in der Zahnmedizin unbedenklich sind, sofern sie akkurat und vorschriftsmäßig genutzt werden [Millar und Hodson 2007]. 2003 wurde von der Firma KaVo das Ozongasgerät, HealOzone, auf den Markt gebracht (Abb.3).



Abb. 3: HealOzone® Gerät.

Quelle:<http://www.31108281.com/upload/image/HealOzone.jpg>

Die Ozonkonzentration bei diesem Gerät liegt bei 2100 ppm. Über eine sterile Einmal-Silikonkappe wird der zu behandelnde Zahn gegenüber der Umgebungsluft abgedichtet. Nachdem unter der Silikonkappe durch eine Pumpe ein stabiler Unterdruck erzeugt wird, kann das Ozon freigesetzt werden. Erzeugt wird das Ozon in einem Ozongenerator. Über einen Schlauch wird es in das Handstück geleitet, aus dem es dann mit einer Geschwindigkeit von 5 m/s austritt. Bei Unterbrechung des Unterdrucks kommt es zu einem sofortigen Stopp der Ozonzufuhr. Dadurch wird gewährleistet, dass Ozon nicht unerkannt in den Mund oder in die Umgebungsluft entweicht. Ist die Behandlung beendet, wird das überschüssige Ozon wieder abgesaugt und in Sauerstoff umgewandelt. Eine Studie von 2009 beschäftigte sich mit der dosisabhängigen Wirkung des gasförmigen Ozons: Nach dreiwöchiger Anzucht von *C. albicans* im Wurzelkanal konnte durch die Applikation von gasförmigem Ozon nach 2,5 Minuten und einer Konzentration von 1 g/m³ als auch bei einer Konzentration von 53 g/m³ und einer Applikationsdauer von einer Minute eine vollständige Bakterienelimination stattfinden [Huth *et al.* 2009].

Dagegen konnten in einer weiteren Untersuchung lediglich geringe antibakterielle Erfolge des Ozons gegenüber *E. faecalis* erreicht werden [Hems *et al.* 2005]. Andere Studien, die sich auf das Problembakterium *E. faecalis* fokussierten, zeigten

abweichende Resultate: Bei bovinem Dentin, das mit *E. faecalis* besiedelt war, konnte durch die antibakterielle Wirkung eine Bakterienzahlreduktion nachgewiesen werden [Nagayoshi *et al.* 2004]; ebenso konnte bei alleiniger Behandlung mit gasförmigem Ozon eine mediane Bakterienzahlreduktion um vier Zehnerpotenzen im Wurzelkanal erzielt werden [Noetzel *et al.* 2009 b]. Die Ergebnisse zur Anwendung und therapeutischen Wirkung des Ozons in der Endodontie sollten jedoch durch weitere Versuchsreihen gefestigt werden.

4.4.3.2 Laser

Neben der Parodontologie und der Chirurgie kommt der Laser auch im Bereich der Endodontie zum Einsatz. Aufgrund der Morphologie der Wurzelkanäle kommt es oftmals zu einer unvollständigen mechanischen Aufbereitung [Frentzen *et al.* 1991]. Hier bietet der Einsatz des Lasers Vorteile, da dessen Strahlen ungehindert in kleinste Bereiche vordringen können. In der Endodontie wurde vor allem die Beseitigung der Schmierschicht durch Einschmelzung mit Infrarotlasern untersucht [Weichmann *et al.* 1971, Frentzen 2002]; Kimura und Kollegen (2000) zeigten, dass durch den CO₂- und Nd:YAG-Laser die Schmierschicht entfernt werden konnte [Kimura *et al.* 2000]. Um mit den verschiedenen Lasergeräten im Wurzelkanal arbeiten zu können, muss ein dünnes flexibles Übertragungssystem vorhanden sein [Giardino *et al.* 2009], durch das der Laserstrahl appliziert wird. Dabei ist ein Durchmesser von 200 µm optimal. Die Entwicklung graziler Lichtleiter, die für die Übertragung hoher Energiedichten geeignet sind, ermöglicht klinisch relevante Manipulationen im Wurzelkanal [Frentzen 2002]. Laseranwendungen tragen adjutant zur konventionellen Wurzelkanalaufbereitung dazu bei, den klinischen Behandlungserfolg zu verbessern [Müller 1995]. Sie sind als alleiniges Mittel nicht einsetzbar, da die individuell gekrümmten Wurzelkanäle keine vollständige Aufbereitung durch den Laser zulassen.

In der Lasertechnologie gibt es eine Vielzahl von verschiedenen Lasersystemen, die nach Art des Lasermediums eingeteilt werden:

- Helium-Neon-Laser
- Edelgasionenlaser
- CO₂-Laser
- Er:YAG-Laser
- Diodenlaser

Die Helium-Neon-Laser, welche zu den Neutralatomlasern gehören, und die Edelgasionenlaser haben den Vorteil, dass sie über eine gute Strahlenqualität verfügen, weil sie verlustärmer und auch homogener sind. Zu den Edelgaslasern gehören der Argon- und der Kryptonionenlaser. Beim CO₂-Laser handelt es sich um einen Molekülgaslaser mit hoher Ausgangsleistung und entsprechend hohem Wirkungsgrad. Der Erbium:YAG-Laser (Er:YAG) ist ein Festkörperlaser, welcher aus einem Halbleitermaterial besteht, das in ein Yttrium-Aluminium-Garnet-Metallgitter eingelagert ist. Die Energie dieses Lasers wird an fast allen Oberflächen von Biomaterialien absorbiert. Durch Erhitzen und Verdampfen der intrazellulären Flüssigkeit und das daraus resultierende Zerplatzen der Bakterien wird die bakterizide Wirkung der Laserstrahlen erreicht [Mehl *et al.* 1999].

Der in der vorliegenden Untersuchung verwendete Diodenlaser findet in der Medizin Anwendung in der Diagnostik, des Weiteren auch als therapeutisches Instrument und als Positionierungshilfe bei medizintechnischen Geräten. Hier wird elektrische Energie in kohärente Strahlung umgewandelt. Damit gehört er zu den effizientesten Energieumwandlern. Zusätzlich sind der große Wirkungsgrad, die Kompaktheit und die lange Lebensdauer als besondere Vorteile des Diodenlasers zu nennen [Mohammadi 2009]. Bergmans und Kollegen zeigten, dass durch die Laserbestrahlung Zellen bakterieller Biofilme bis in tiefere Zellschichten abgetötet werden können [Bergmans *et al.* 2006]. Während Noetzel und Kollegen in ihrer Studie zur Elimination des *E. faecalis* feststellten, dass durch den Er:YAG-Laser nach dreitägiger Inkubationszeit eine mediane Reduktion der Bakterienzahl um 10² CFU/ml (*colony-forming units* pro Milliliter) erreicht werden konnte [Noetzel *et al.* 2009 b], wurde für den Diodenlaser sogar eine vollständige Bakterienentfernung von *E. faecalis* nachgewiesen [De Souza *et al.* 2008].

5. Fragestellung

Die Persistenz von Mikroorganismen ist oft mit einem endodontischen Misserfolg verbunden [Gambal *et al.* 2003]. *E. faecalis* wird in der Endodontie als sogenanntes „Problembakterium“ diskutiert, das häufig bei Sekundärinfektionen nachgewiesen wird, aber auch bei Primärinfektionen vorkommt. Verschiedene Studien zeigen, dass dieses Bakterium besonders schwierig zu eliminieren ist, was es zu einer veritablen Zielgröße für eine Effektivitätsuntersuchung eines Aufbereitungsprotokolls macht [Haapasalo *et al.* 2000, Komorowski *et al.* 2000, Kaufman *et al.* 2005].

Das Wurzelkanalsystem muss so bearbeitet werden, dass vorhandene teilungsfähige Mikroorganismen aus den Wurzelkanälen entfernt werden. Dazu wird standardmäßig der infizierte Wurzelkanal mechanisch aufbereitet und mit desinfizierenden Spüllösungen (NaOCl, CHX) gespült. Oft ist dies nicht ausreichend, um die mikrobielle Flora der erkrankten Zähne komplett zu eliminieren [Vera *et al.* 2012].

Adjuvant stehen heute verschiedene Maßnahmen zur Verfügung, die eine weitere Bakterienreduktion im Wurzelkanal herbeiführen sollen; die Applikation von gasförmigem Ozon zeigte in einer Studie eine erhöhte Reduktion von *E. faecalis*-Biofilmen im Vergleich zu Spüllösungen [Case *et al.* 2012]. Auch die Anwendung des Diodenlasers konnte in therapeutisch unzugänglichen Bereichen effektive Resultate [Gutknecht *et al.* 1999] bis hin zu einer totalen Bakterienfreiheit erreichen [de Souza *et al.* 2008].

Das Ziel dieser In-vitro-Studie war es, die Wirksamkeit von gasförmig appliziertem Ozon und die Anwendung eines Diodenlasers auf die Reduktion von *E. faecalis*-Biofilmen in humanen Zahnproben zu untersuchen. Im vorliegenden Studiendesign wurde die Wirksamkeit dieser adjuvanten Desinfektionsmaßnahmen im Vergleich zur Anwendung medizinischer Einlagen sowohl als alleiniger Behandlungsschritt als auch in Kombination mit der chemo-mechanischen Aufbereitung untersucht.

Die erste Nullhypothese dieser Studie besagt, dass es zwischen den medizinischen Einlagen und der Laser- und Ozon-Behandlung sowohl in Kombination mit der chemo-mechanischen Aufbereitung als auch ohne diese keinen Unterschied in der Wirksamkeit gegenüber Biofilmen von *E. faecalis* gibt. Die zweite Nullhypothese besagt, dass es keinen Unterschied zwischen den verwendeten Spüllösungen im Hinblick auf die Reduktion von *E. faecalis* Biofilmen *ex vivo* gibt.

6. Material und Methoden

6.1 Methodik

Die vorliegende Untersuchung wurde als kontrollierte In-vitro-Studie durchgeführt. Die Vorbereitung der Zähne fand in der Zahnklinik, Aßmannshauer Straße in 14197 Berlin, statt. Die Versuche wurden im Robert-Koch-Haus, Dorotheenstraße in 10117 Berlin, durchgeführt.

Insgesamt wurden vier Behandlungsabläufe mit jeweils vier Begleittherapien untersucht, was 16 Untergruppen mit einer Probenzahl von jeweils 15 Wurzelkanälen ergab.

6.2 Vorphase der Studie

Im Rahmen der gesamten Untersuchung wurden insgesamt 270 Wurzelkanäle (= Prüfkörper) benötigt. Davon wurden 30 für die Vorversuche und die restlichen 240 Wurzelkanäle für die Hauptversuche verwendet. Zur Herstellung der Prüfkörper wurden extrahierte, intakte, menschliche obere Eckzähne verwendet. Es wurden Zähne gewählt, deren Wurzeln mindestens eine Länge von 19,5 mm hatten und die einen möglichst runden Querschnitt aufwiesen. Zähne mit kariösen Läsionen oder vorangegangenen Wurzelkanalbehandlungen wurden nicht verwendet.

Die extrahierten Zähne wurden vor der Behandlung mit einem Ultraschallgerät und den entsprechenden Aufsätzen (SONICFlex®, KaVo, Biberach/Riß, Deutschland) von Knochenresten, Gingiva, Zahnstein und sonstigen Ablagerungen befreit.

Die gereinigten Zähne wurden mit Ethylenoxid (Ethylenoxidsterilisator des Herzzentrums der Charité) 10-12 h gassterilisiert. Dafür wurden die Zähne in gasdurchlässige Folien (Sterilisationsverpackung gemäß den Anforderungen der DIN, mit Dampf- und EO-Gas-Indikator) verpackt. Durch die chemische Sterilisation wurde der thermolabile Zahn schonend bakterienfrei gemacht. Um alle Zahnwurzeln auf eine einheitliche Länge von 19,5 mm zu reduzieren, wurden die Zahnkronen mit einer speziellen Bandsäge (0,2 mm; Exakt, dia-plus, Walter Messner GmbH, Oststeinbeck, Deutschland) von den Wurzeln dekapitiert. Im Anschluss wurden die Schnittflächen plan geschliffen (Abb. 4).

Hierzu wurde eine Schleifmaschine (Phoenix Alpha, Wirtz-Bühler, Düsseldorf, Deutschland, 150/300 U/min, universelle Schleif- und Poliermaschine) mit speziellem

Schleifpapier (Silicon Carbide Grinding Paper, Grit 600/P1200, Wirtz-Bühler, Düsseldorf, Deutschland) verwendet.



Abb. 4: Dekapitierter Zahn mit planer Oberfläche.

Die Wurzelkanäle wurden mit Reamern (ISO 6, 8 oder 10, Antaeos, VDW GmbH, München, Deutschland) sondiert, bis die Feile apikal gerade sichtbar war. Von den ermittelten Längen konnte 1 mm abgezogen werden, um die benötigte Arbeitslänge zu erhalten. Mit den berechneten Längen konnten die Wurzelkanäle mit Handinstrumenten bis ISO-Größe 15 bzw. bei großen Kanälen bis ISO-Größe 20 aufbereitet werden. Im Anschluss wurde mit einem kugelförmigen Diamantbohrer (Diamantbohrer Komet 030, Gebr. Brasseler GmbH & Co. KG, Lemgo, Deutschland) im koronalen Kanaleingang ein 3 mm tiefes Reservoir präpariert. Hierfür wurde der Bohrer zentrisch in Richtung der Wurzelachse geführt und bis zum Äquator des rotierenden Instruments versenkt (Abb. 5A). Diese Bohrung diente später als Flüssigkeitsreservoir (Abb. 5B).

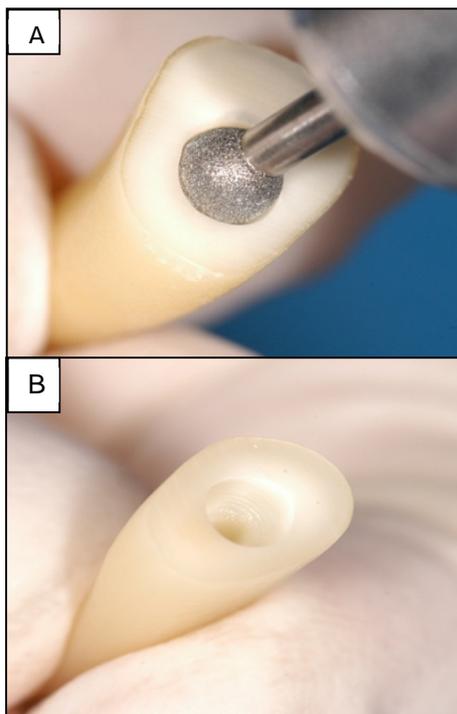


Abb. 5: (A) Bohrung in eine Wurzel mithilfe eines kugelförmigen Diamanten. (B) Entstandenes Reservoir zur Gewährleistung des nötigen Flüssigkeitspegels.

Zur koronalen Erweiterung des Kanals wurde ein Gates-Glidden-Bohrer der ISO-Größe 110 (GG-Bohrer Größe 4, VDW GmbH) ab der Schnittfläche 6 mm versenkt. Die weitere Aufbereitung erfolgte maschinell mit dem Flexmaster-System bis zur Arbeitsgröße ISO 30 (EndoStepper mit Flexmaster System, VDW GmbH, Flexmasterfeile 06/30). Die apikale Ausformung der Wurzelkanäle wurde bei 180 Zähnen mit dem Flexmaster-System und der MAF ISO-Größe 40 (Flexmaster System, VDW GmbH, Flexmasterfeile 02/40) durchgeführt. 60 der 240 Zähne wurden auf die MAF ISO-Größe 60 (Flexmaster System, VDW GmbH, Flexmasterfeile 02/60) aufbereitet. Die Einhaltung der Arbeitslängen wurde über die Verwendung von Silikonstoppfern an den Endodontie-Instrumenten erreicht.

Während der Aufbereitung wurden die Kanäle mittels steriler Einmalkanülen (Durchmesser: 0,35 mm, VMK Endoneedle, Vedefar, Dilbeek, Belgien) mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %, Institut für Mikrobiologie, Charité) von Dentinspan und Debris befreit. Um eine bessere Kanalgängigkeit zu erreichen und um den „Smear layer“ von der bearbeiteten Dentinwand zu entfernen, wurde Ethylendiamintetraessigsäure-Gel (FileCare EDTA 15 %, VDW GmbH) eingesetzt. Im Anschluss fanden erneut eine Spülung und die Einlagerung für vier Wochen in steriler Kochsalzlösung statt. Das Lagerungsmedium wurde täglich gewechselt. Nach der Lagerung wurden die Zähne ein weiteres Mal gassterilisiert (Gassterilisationsdauer 10-12 h).

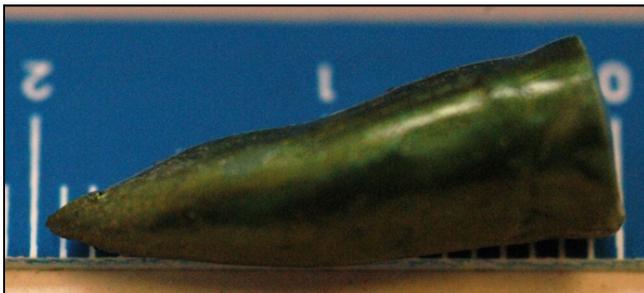


Abb. 6: Mit Nagellack überzogener, zur Einbettung vorbereiteter Zahn.

Im nächsten Schritt wurden die Wurzeln an ihrer Außenfläche mit zwei Schichten handelsüblichen Nagellacks (Kron, Liliput Nagellack „Efeu“) überzogen (Abb.6).

Dadurch wurden die Wurzeln versiegelt, sodass Flüssigkeit weder ein- noch austreten konnte. Die vorbereiteten Wurzeln wurden mit speziellem Epoxid-Einbettkunststoff (Technovit 4071, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) in verschließbare Kunststoffhülsen (CryoTubes, Karl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) eingebettet. Die Wurzeloberkante wurde so platziert, dass sie gerade am Rand der

Kunststoffhülse zu liegen kam (Abb. 7A). Mit steriler Watte und verformbarem Wachs (Boxingwax, VDW GmbH, München, Deutschland) wurde der zuvor mit einer Bohrung vergrößerte Kanal provisorisch verschlossen, um ein Einfließen von Kunststoff zu verhindern. Die passenden Schraubverschlüsse zu den Kunststoffhülsen wurden an der Innenseite des Deckels mit Silikon (Dimension Garant L, 3M ESPE AG, Seefeld, Deutschland) gefüllt (Abb. 7B) und auf die jeweiligen vorpräparierten Hülsen gesetzt. Abschließend wurden vorhandene Überschüsse entfernt.

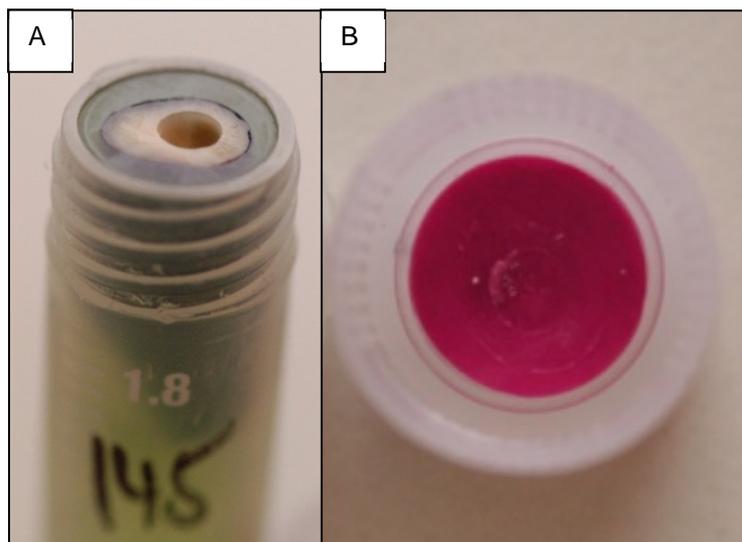


Abb. 7: (A) In Epoxidharzkunststoff eingebettete Wurzel in verschließbarer Kunststoffhülse. (B) Individualisierter Deckel zum Verschließen der Kunststoffhülse.

Durch das Silikon in der Deckelinnenseite erhielten die Hülsen einen individuell angepassten Verschluss (Abb. 7B). Die eingebetteten Wurzeln in den Kunststoffhülsen und ihre entsprechenden Silikondeckel wurden beschriftet, um später die Zugehörigkeit zu sichern, und nochmals gassterilisiert (Gassterilisationsdauer 10-12 h).

6.3 Sterilitätskontrolle und Wachstumsreihe *E. faecalis*

Vor Beginn der Hauptversuche wurde eine Sterilitätskontrolle an zehn Zähnen durchgeführt. Dazu wurde eine sterile Universalnährlösung in die Zähne gegeben und sieben Tage bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die verbliebene Flüssigkeit auf Universalmedien (Columbia agar with sheep blood, BD, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA) ausplattiert. Diese wurden erneut für 24 Stunden inkubiert und auf Bakterienwachstum kontrolliert. Es konnte kein Wachstum in den vorhandenen Sterilitätsproben mehr nachgewiesen werden.

In exemplarischen Proben wurde vor Beginn der Hauptversuche eine siebentägige Wachstumsreihe durchgeführt, um das Wachstum des *E. faecalis* unter den Versuchsbedingungen zu dokumentieren. Das TSB (Tryptic soy broth)-Medium wurde mit einer Kolonie *E. faecalis* (Typstamm ATCC 29212) bei 37 °C im sterilen Wurzelkanal bebrütet (Abb. 8) und danach ausplattiert. Es wurde zusätzlich zu Beginn die optische Dichte (OD-Messung) am Photometer (Eppendorf BioPhotometer®, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bewertet. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C führte eine Kolonie des *E. faecalis* im sterilen TSB-Medium zu einer Bakterienzahl von 10^5 pro ml. Die OD-Messungen ergaben bei dieser Bakterienzahl einen Wert von 0,1. In regelmäßigen Abständen wurden mittels Paperpoints Proben entnommen, diese wurden dann gevortext und ausplattiert. Somit konnte das Wachstum von *E. faecalis* unter Versuchsbedingungen nachgewiesen werden. Mithilfe der Wachstumsreihe wurde festgelegt, dass die Zähne sieben Tage bebrütet werden sollten.

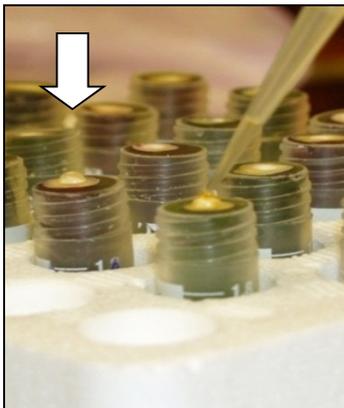


Abb. 8: Der Pfeil weist auf einen mit Nährmedium gefüllten Wurzelkanal.

6.4 Qualitative Auswertung des Biofilms

Der Biofilm wurde mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie (AxioPlan2 Fluorescence Microscope, ZEISS, Jena, Deutschland) exemplarisch nachgewiesen. Die dafür verwendeten Proben wurden analog zu den Versuchszähnen mit *E. faecalis* beimpft und inkubiert. Nach der siebentägigen Inkubationszeit wurden die Proben mit Paraformaldehyd (3,7 %) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Verhältnis 3:1) für 24 Stunden bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden die Proben mit steriler PBS gespült und in einer Mischung aus Ethanol (100 %) und PBS (Verhältnis 1:1) gelagert. Anschließend erfolgte eine Einbettung der Proben in kaltpolymerisierenden Kunststoff (Technovit 8100, Hereaus Kulzer, Hanau, Deutschland) sowie eine Füllung der Wurzelkanäle mit diesem Material. Die Zähne wurden horizontal getrennt mit einer

Innenlochsäge (Leitz 1600, Leica, Microsysteme, Wetzlar, Deutschland) und poliert (Schleifpapier der Körnung 400, Exakt Schleifsystem, Exakt Apparatebau). Im Anschluss erfolgte mit einem blau fluoreszierenden Nukleinsäurefarbstoff (Farbstoff DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindol, BIOZOL[®], Institut für Mikrobiologie der Charité) die unspezifische Anfärbung der DNA. Die Proben konnten durch das Mikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Jena, Deutschland) optisch analysiert werden.

6.5 Hauptversuche

6.5.1 Gruppeneinteilung

Die 240 vorbereiteten Tube-Zähne für die Hauptversuche wurden in vier Hauptgruppen (je n = 60) aufgeteilt. Diese unterschieden sich in der vorausgegangenen chemo-mechanischen Aufbereitung und in der Art der verwendeten Spüllösung (Gruppe 1 = keine Spülung und weitere chemo-mechanische Aufbereitung, Aufbereitung bis ISO 60; Gruppe 2 bis 4 = chemo-mechanische Aufbereitung mit 0,9%iger NaCl-Spülung (Gruppe 2), mit 1%iger NaOCl-Spülung (Gruppe 3) und mit 0,2%iger CHX-Spülung (Gruppe 4), alle initial bis ISO 40 aufbereitet).

Jede dieser Hauptgruppen wurde in die vier Untergruppen a bis d (je n = 15) unterteilt. Diese unterschieden sich durch die Art der weiteren Desinfektionsmaßnahmen (a = Ozongasapplikation, b = Diodenlaser-Behandlung, c = Kalziumhydroxid-Einlage, d = CHX-Gel-Einlage).

Der Untersuchungsablauf, die verschiedenen Untersuchungsreihen (je n = 60) sowie deren Untergruppen (je n = 15) sind in Tabelle 1 dargestellt:

Tabelle 1: Übersicht der Versuchsreihen 1 bis 4 mit jeweiligen Untergruppen.

| Versuchsreihe | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|--------|--------|--------|--------|
| Zähne (n =) | 60 | 60 | 60 | 60 |
| Primäre Aufbereitung | ISO 60 | ISO 40 | ISO 40 | ISO 40 |
| Beimpfung mit <i>E. faecalis</i> | Ja | Ja | Ja | Ja |
| Finale Aufbereitung | keine | ISO 60 | ISO 60 | ISO 60 |
| Spülung (10 ml) | keine | NaCl | NaOCl | CHX |
| Adjuvante Desinfektionsmaßnahmen und Untergruppen (je n = 15) | | | | |
| Ozon | 1a | 2a | 3a | 4a |
| Diodenlaser | 1b | 2b | 3b | 4b |
| Kalziumhydroxid | 1c | 2c | 3c | 4c |
| CHX-Gel | 1d | 2d | 3d | 4d |

6.5.2 *Beimpfung mit E. faecalis*

Alle Zähne der vier Hauptgruppen wurden mit 30 µl *E. faecalis*-Bouillon beimpft. Diese bestand aus TSB-Medium mit 0,25%iger Glukose und einer Kolonie Enterokokken (Typstamm ATCC 29212). Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die tägliche Zugabe der Nährlösung und auch die Einsaat unter einer Abluftlamina durchgeführt (laminar flow antair BSK, anthos Mikrosysteme, Köln, Deutschland). Nach 24-stündiger Inkubation in einem 37 °C warmen Brutschrank wurden die Zähne ein weiteres Mal nach dem gleichen Ablauf beimpft (Abb. 9). Alle Versuche wurden mit einer Pipette (Eppendorf Reference, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und sterilen Einmalspitzen (Pipettenspitze 200 µl, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) ausgeführt. Anschließend wurden die Proben sechs weitere Tage bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Um ein Austrocknen der Kanäle und damit einen Rückgang der *E. faecalis*-Kolonien in den Wurzelkanälen zu verhindern, wurde täglich steriles Nährmedium in die zu verschließenden Tubes bzw. Wurzelkanäle eingeführt.

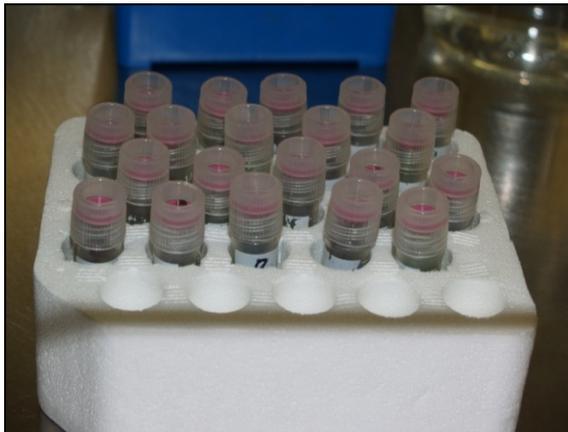


Abb. 9: Cryo-Tubes mit individuell angepasster Silikon-Kappe im verschließbaren Deckel, vorbereitet zur Inkubation im Brutschrank.

6.5.3 *Finale Wurzelkanalaufbereitung und finale Spülung*

Die vorbereiteten Zähne wurden nach der Inkubationszeit weiterbehandelt, um die Desinfektionsmethoden zu vergleichen:

Versuchsreihe 1:

Bei den Zähnen der ersten Versuchsreihe erfolgte nach den verschiedenen Behandlungen keine weitere mechanische Aufbereitung und keine desinfizierende Spülung. Nach der Beimpfung mit der *E. faecalis*-Lösung und der entsprechenden

Inkubationszeit wurde diese lediglich mit 2 ml NaCl (0,9 %) aus dem Kanal herausgespült.

Versuchsreihen 2 bis 4:

Nach der erfolgten Beimpfung wurden die Wurzelkanäle elektro-mechanisch mit sterilen Flexmaster-Feilen bis ISO-Größe 60 und koronal zusätzlich mit sterilen Gates-Bohrern der ISO-Größe 150 und 130 aufbereitet (Gates-Glidden-Bohrer Größe 5 und 6; VDW, MAF 02760, EndoStepper mit Flexmaster System, VDW GmbH). Während der Aufbereitung wurde in den verschiedenen Gruppen mit den entsprechenden desinfizierenden Lösungen gespült: Bei Versuchsreihe 2 wurde NaCl-Lösung (0,9 %) verwendet, bei Versuchsreihe 3 NaOCl-Lösung (1 %) und bei der 4. Versuchsreihe eine CHX-Lösung (0,2 %). Die verschiedenen Spüllösungen wurden vor der Aufbereitung, während der mechanischen Bearbeitung und nach der Behandlung als Abschlussspülung alternierend eingesetzt. Die Spülung erfolgte jeweils mit sterilen Einmalspritzen und Kanülen. Es wurde ein Spülvolumen von 10 ml verwendet. Nach dem letzten Spülvorgang erfolgte die Trocknung der Kanäle mittels sechs steriler Papierspitzen (Paperpoint ISO 40, VDW GmbH).

6.5.4 Unterstützende Desinfektionsmaßnahmen der Hauptgruppen

Die getrockneten Wurzelkanäle wurden im Anschluss sofort weiterbehandelt, um eine Kontamination der Kanäle zu verhindern:

Untergruppe a - Ozon:

Die Ozonapplikation wurde über das HealOzone-Gerät (KaVo) gesteuert. Dabei wandelt ein Generator den Sauerstoff aus der Umgebungsluft in Ozon um. Die Applikation erfolgte mit dem zugehörigen Handstück (HealOzone plus 2131C, KaVo) unter Verwendung von sterilen, einmal verwendbaren Silikonkappen (HealOzone Delivery Cup, 6 mm, KaVo). Mit den zugehörigen sterilen endodontischen Kanülen (HealOzone Applikationskanüle, 24mm, KaVo) wurde das Ozon direkt in den Kanal geleitet (Abb.10). Durch die Silikonkappen konnte ein Unterdruck erzeugt und dadurch ein Austreten des Ozons an die Umgebung verhindert werden. Die Ozonapplikation erfolgte zwei Mal für je 60 Sekunden, sodass eine Gesamtapplikationszeit von 120 Sekunden erreicht wurde. Über eine zweite Öffnung am Handstück wurde das Ozon wieder abgesaugt und im Neutralisator zu O₂ reduziert und an die Umgebung abgegeben.



Abb.10: Ozonapplikation mit Handstück, Silikonkappe und endodontischer Kanüle. Um auch die Wurzelspitze zu erreichen, wurden 24 mm lange Kanülen verwendet.
Quelle: <http://dentalclinic.mk/treatment-with-healozone2.html>

Untergruppe b - Laser:

Der Diodenlaser (GENTLEray 980, KaVo) wurde mit der Einstellung „Endodontie“ (maximal 2,5 W, durchschnittlich 0,8 W, Wellenlänge 980 nm) verwendet. Die Glasfaser des Diodenlasers (Bare Fiber NIR Q 300K, 200 µm, Asclepion Laser Technologie, Jena, Deutschland) wurde mit dem entsprechenden Handstück vorsichtig bis 1 mm vor Ende des aufbereiteten Kanals eingeführt (Arbeitslänge minus 1 mm: Abb.11). Anschließend wurde die Faser in kreisenden Bewegungen mit einer Geschwindigkeit von ca. 3 mm pro Sekunde für 10 Sekunden entlang der Dentinoberfläche von apikal nach koronal geführt. Dieser Vorgang wurde pro Probe vier Mal durchgeführt. Dementsprechend betrug die Gesamtapplikationsdauer pro Wurzelkanal 40 Sekunden. Während der Laserapplikation wurde eine Schutzbrille getragen.

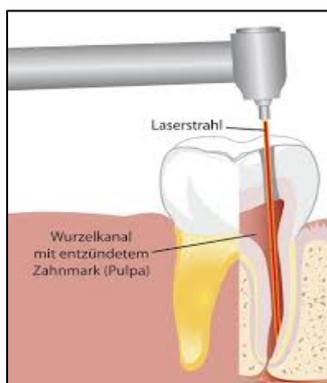


Abb. 11: Einbringen der Laserfaser in den Wurzelkanal.
Quelle: <http://www.drloesser.de/zahnarzt/zahngesund-werden/lasertherapie>

Untergruppe c – Kalziumhydroxid-Einlage:

Die wässrige $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Paste mit einem pH-Wert von 12,5 (UltraCal XS, Ultradent, South Jordan, Utah, USA) wurde mit sterilen Einmalkanülen (Durchmesser 0,35 mm, Endoneedle, Vedefar, Dilbeek, Belgien) von apikal nach koronal appliziert. Es wurde auf eine blasenfreie Applikation und das Nachsacken der Einlage geachtet. Nach

Verschluss der Proben mit dem individualisierten Deckel wurden diese für sieben Tage bei 37 °C im Brutschrank (Heraeus B6770, W.C. Heraeus Kulzer GmbH) inkubiert.

Untergruppe d - CHX-Gel-Einlage:

Das 1%ige CHX-Gel (Chlorhexamed 1 % Gel, GlaxoSmithKline) wurde mithilfe einer sterilen Einmalkanüle (Durchmesser 0,35 mm, Endoneedle, Vedefar, Dilbeek, Belgien) analog zur Ca(OH)₂-Paste von apikal nach koronal langsam und blasenfrei appliziert. Das Gel sackte nach wenigen Sekunden ab. Anschließend wurde im Bereich des Reservoirs nachappliziert. Der individualisierte Deckel wurde aufgesetzt und die Proben wurden ebenfalls für sieben Tage bei 37 °C im Brutschrank (Heraeus B6770, W.C. Heraeus Kulzer GmbH) inkubiert.

6.6 Erhobene Parameter

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden folgende quantitativen Parameter erhoben:

1. Ausgangsbakterienzahl im Wurzelkanal vor Versuchsbeginn (CFU/ml)
2. Abschlussbakterienzahl im Wurzelkanal nach den Behandlungen (CFU/ml)
3. Abschlussbakterienzahl im Dentin (CFU/mg)
4. Feilenabrieb der Dentinprobe (mg)
5. Bakteriellles Wachstum nach Desinfektion (Ja/Nein-Aussage)

Die Zählung der CFU ist eine Methode, um Bakterien oder Pilze messbar bzw. zählbar zu machen [Paetz 2011]. Entweder werden die CFUs pro Milliliter (CFU/ml) oder pro Gramm (CFU/g) angegeben. Diese Methode beruht auf der Theorie, dass sich ein einzelner Mikroorganismus (z. B. ein Bakterium) durch binäre Teilung vermehren und zu einer Kolonie werden kann.

6.6.1 Ausgangsbakterienzahlbestimmung

Die Ausgangsbakterienzahl der Wurzelkanäle wurde in CFU/ml ermittelt. Nach der siebentägigen Inkubation (vor der finalen Aufbereitung) wurden die Proben mit sterilen Papierspitzen (Paperpoint ISO 40, VDW GmbH) entnommen. Die Papierspitzen nehmen bis zur 18-mm-Markierung 5 µl Flüssigkeit auf. Dieses Probenvolumen von 5 µl wurde mit 1995 µl 0,9%iger steriler NaCl-Lösung für 30 Sekunden in

verschließbaren Tubes (Safeseal Microtube, 2 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gevortext (Heidolph REAX Vortex-Mixer, Hamburg, Deutschland).

Von diesen 2 ml wurden 100 µl mit einer Pipette entnommen und in 900 µl sterile Kochsalzlösung (NaCl, 0,9 %, Institut für Mikrobiologie der Charité) gegeben und wieder gevortext. Dieser Suspension wurden 100 µl entnommen und auf selektivem Nährboden (Columbia agar with sheep blood PLUS, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) mithilfe von Glaskolben verteilt. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37 °C wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Anhand der Verdünnung von 1:40000 konnte die Anzahl der vorhandenen Mikroorganismen im Wurzelkanal pro Milliliter Flüssigkeit (CFU/ml) berechnet werden.

6.6.2 Abschlussbakterienzahl im Wurzelkanal

Die Abschlussbakterienzahl der Wurzelkanäle wurde in CFU/ml ermittelt. Durch die vorangegangene Wachstumsreihe konnte der Verdünnungsfaktor für die Versuche so abgestimmt werden, dass eine bestmögliche quantitative Bestimmung stattfinden konnte. Bei einer hohen Konzentration und geringster Verdünnung entwickeln sich viele Kolonien, welche schlecht zählbar sind und suboptimalen Wachstumsbedingungen unterliegen. Trotzdem kann durch eine geringe Verdünnung die Nachweisgrenze auf 5×10^2 CFU/ml reduziert werden. Die Proben konnten durch die zwei Verdünnungen quantifiziert und ausplattiert werden (Abb. 13 und 14). Dadurch wurde jede Konzentration im Bereich von 5×10^2 bis 2×10^6 CFU/ml hergestellt und ausplattiert. Die Proben der medizinischen Einlagen (Ca(OH)_2 mit pH 12,5 CHX-Gel 1 %) wurden nach der Inkubationszeit von sieben Tagen mit 2 ml steriler Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %, Institut für Mikrobiologie der Charité) gespült (Endoneedle, Durchmesser 0,35 mm, Vedefar, Omnifix 5 ml, Braun, Melsungen), um die Medikamente zu entfernen. Analog zum Ablauf der Ausgangsbakterienzahlbestimmung erfolgte die Probenentnahme mit sterilen Papierspitzen (Paperpoint ISO 40, VDW).

5 µl der entnommenen Papierspitzenproben der medizinischen Einlagen wurden mit 45 µl steriler Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %, Institut für Mikrobiologie der Charité) aufgefüllt. Davon wurden 20 µl auf Nährmedium (Columbia agar with sheep blood) ausplattiert (Abb. 12) und für einen Tag bei 37 °C im Brutschrank bebrütet.



Abb. 12: Ausstreichen von 20 µl der Bakterienkulturen auf einer Agarplatte.

In Abb. 13 ist die Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Endbakterienzahl schematisch dargestellt.

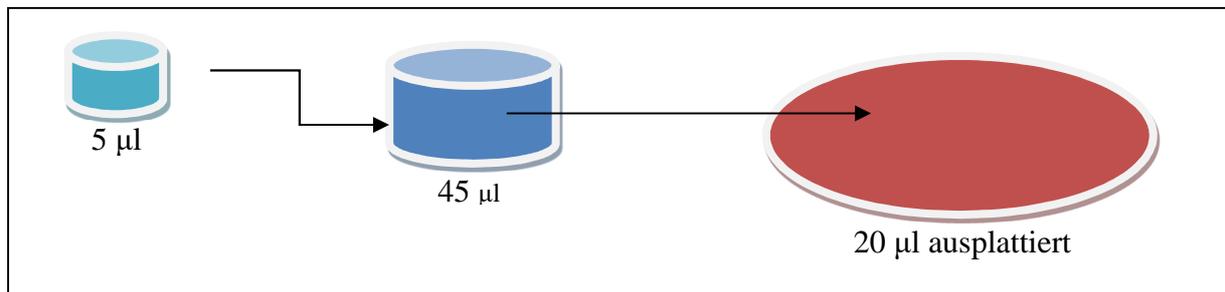


Abb. 13: Schema der Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Endbakterienzahl.

Um eine Gleichstellung der Versuchsbedingungen zu erhalten, wurden die Ozon- und Laserproben mit der gleichen Menge steriler NaCl-Lösung (0,9 %) entsprechend den medizinischen Einlagen behandelt. Die Probenentnahme erfolgte analog zum vorher beschriebenen Ablauf bei den medizinischen Einlagen mit sterilen Papierspitzen (Paperpoint ISO 40, VDW). In der Verdünnung wurden Unterschiede gemacht.

Aufgrund der fehlenden Desinfektionskraft von NaCl als Spüllösung bzw. keiner desinfizierenden Spülung wurde eine größere Verdünnung gewählt (Abb. 14), um die quantitative Bestimmung der Bakterienzahl durchführen zu können. 5 µl der entnommenen Papierspitzenproben der Medizingeräte wurden mit 995 µl steriler Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %, Institut für Mikrobiologie der Charité) aufgefüllt. Davon wurden 100 µl auf das Nährmedium (Columbia agar with sheep blood) ausgeplattiert und für einen Tag bei 37 °C im Brutschrank bebrütet. Nach der Inkubationszeit konnte die CFU/ml bestimmt werden.

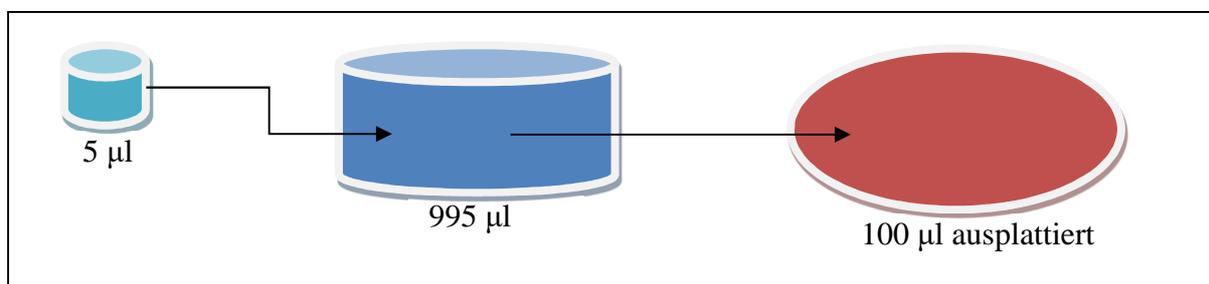


Abb. 14: Schema der Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Endbakterienzahl bei Kanälen mit NaCl als Spüllösung bzw. ohne Spüllösung.

Die Proben der CHX- und NaOCl-Spüllösung erhielten die gleiche Verdünnungsreihe wie die Proben der medizinischen Einlagen.

5 µl der entnommenen Papierspitzenproben der Medizingeräte wurden mit 45 µl steriler Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %, Institut für Mikrobiologie der Charité) aufgefüllt. Davon wurden 20 µl auf dem entsprechenden Nährmedium (Columbia agar with sheep blood) ausplattiert und für einen Tag bei 37 °C im Brutschrank bebrütet.

6.6.3 Abschlussbakterienzahl im Dentin

Die Bestimmung der Abschlussbakterienzahl im Dentin konnte anhand des Feilenabriebs in CFU/mg erhoben werden. Dazu wurden sterile Hedströmfeilen (Hedström ISO 40, VDW) bei gleichmäßigem Druck und Kraftaufwand vier Mal im Kanal von koronal nach apikal bewegt. Die Feilen mit den anhaftenden Dentinspänen wurden in mit steriler Kochsalzlösung befüllte Tubes gelegt und für 30 Sekunden gevortext. Die Ausplattierung erfolgte mittels steriler Glasspatel auf dem Nährmedium (Columbia agar with sheep blood Plus, Osoid, Basingstoke, Hampshire, England), welches für einen Tag bei 37 °C im Brutschrank lagerte. Nach der Inkubationszeit wurde die CFU/mg bestimmt.

Der Feilenabrieb der Proben mit den medizinischen Einlagen konnte bei allen Spülprotokollen in 100 µl steriler Kochsalzlösung gevortext und davon 50 µl ausplattiert werden.

Analog zur Abschlussbakterienzahl im Wurzelkanal wurden bei den Medizingeräten auch hier verschiedene Verdünnungsreihen bei den verschiedenen Spülprotokollen gewählt:

Bei NaCl als Spüllösung bzw. keiner desinfizierenden Spülung wurde der Feilenabrieb in 500 µl gevortext und 100 µl ausplattiert.

Der Feilenabrieb bei den Proben mit CHX- und NaOCl als zusätzlicher Spüllösung wurde in 100 µl steriler Kochsalzlösung gevortext, davon wurden 50 µl ausplattiert.

6.6.4 Feilenabrieb der Dentinproben

Der Feilenabrieb der Dentinproben wurde in Milligramm (mg) gemessen. Vor Entnahme der Dentinspäne wurde jede sterile Hedströmfeile auf einer speziellen Laborwaage (Sartorius analytic, Analysewaage, Sartorius, Göttingen) gewogen und das Gewicht vor Benutzung notiert (Ausgangsgewicht). Wie oben beschrieben wurde die Feile unter gleichmäßigem Druck vier Mal an der Dentinwand entlanggeführt. Nach Verwendung der Nadel im Kanal wurde sie zur Gewichtsermittlung erneut gewogen (Endgewicht). Das Ausgangsgewicht wurde vom Endgewicht subtrahiert. So konnte

der Feilenabrieb jeder Probe in mg ermittelt werden. Direkt nachfolgend wurden die Nadeln in verschließbaren Tubes positioniert.

6.6.5 Bakteriellles Wachstum nach Desinfektion

Das bakterielle Wachstum nach Behandlung der Kanäle wurde dichotom erhoben (Ja/Nein-Entscheidung). Im Anschluss an die letzte Probenentnahme wurden die Versuchsproben, die kein bakterielles Wachstum nach erfolgter Behandlung aufwiesen, erneut mit sterilem Nährmedium versetzt und bei 37 °C inkubiert. Nach sieben Tagen wurde mit sterilen Papierspitzen (Paperpoint ISO 40, VDW) Material zum Ausplattieren entnommen. Die Ausplattierung erfolgte analog zu den anderen Versuchen auf dem Nährmedium (Columbia agar with sheep blood Plus, Osoid, Basingstore, Hampshire, England). Erneut wurde bei 37 °C für einen Tag inkubiert. Danach erfolgte die Beurteilung des bakteriellen Wachstums mit einer Ja/Nein-Entscheidung.

6.7 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Alle Analysen wurden unter Verwendung von IBM SPSS Statistics 22 (SPSS, IBM, München, Deutschland) durchgeführt. Zunächst wurden die Werte der Ausgangsbakterienzahlen aller 240 Proben ermittelt (Baseline) und mit dem Kruskal-Wallis-Test auf Unterschiede getestet ($p \leq 0,05$).

Zur quantitativen Auswertung wurden zwei Variablen herangezogen:

1. Ausgangsbakterienzahl (CFU/ml) – Kanallumen/Papierspitze
2. Endbakterienzahl 1 (CFU/ml) – Kanallumen/Papierspitze
3. Endbakterienzahl 2 (CFU/mg) – Dentin/Feilenabrieb

Ausgangs- und Endbakterienzahl der planktonischen Bakterien wurden mit einer Log₁₀-Skala transformiert und die logarithmischen Reduktionsfaktoren wurden bestimmt (Tabelle 3). Waren im Anschluss an die Therapie keine KBE nachweisbar, wurde der Mittelwert für diese Spezies mit der halben Nachweisgrenze gleichgesetzt. Die Nachweisgrenze der planktonischen Bakterien lag bei 500 KBE/ml. Darüber hinaus wurden sowohl für die Endbakterienzahl als auch für die Bakterienreduktion drei Klassen gebildet: unterhalb der Nachweisgrenze, mittlere Werte, hohe Werte (Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht Bakterienzahlklassen an Papierspitze und Dentin.

| Bakterienzahlklasse | Bakterienbelastung der Probe (Papierspitze) | Bakterienbelastung der Probe (Dentinabrieb) |
|---------------------|---|---|
| 1 | Hauptgruppe 1 und 2: < 2000 CFU/ml Hauptgruppe 3 und 4: < 500 CFU/ml | Unterhalb der Nachweisgrenze |
| 2 | ≤ 47.500 CFU/ml | ≤ 20.000 CFU/mg |
| 3 | > 47.500 CFU/ml | > 20.000 CFU/mg |

Es erfolgten statistische Analysen für diese klassierten Variablen. Die Verteilung auf diese drei Klassen in den 16 Studiengruppen wurde in Kreuztabellen mit Chi-Quadrat-Test ausgewertet. Durch die Mehrfachtestung wurde eine Bonferronikorrektur durchgeführt und der p-Wert auf $p = 0,0083$ festgesetzt.

Auf Basis der ermittelten Reduktionsfaktoren wurde eine univariate Varianzanalyse mit anschließenden Post-hoc-Tests (Tukey HSD) durchgeführt und so der Einfluss des Spülprotokolls und der Desinfektionsmethode auf die Bakterienreduktion ermittelt.

Die Ausgangsbakterienzahlen im Dentin wurden an 30 Proben exemplarisch ermittelt. Die Endbakterienzahlen im Dentin wurden mit Kreuztabellen und anschließenden Chi-Quadrat-Tests verglichen. Das Bakterienwachstum nach erneuter Beimpfung wurde ebenfalls durch Kreuztabellen mit Chi-Quadrat-Test ausgewertet.

7. Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurden sowohl qualitative als auch quantitative Auswertungen vorgenommen. Zum optischen Nachweis des Biofilms wurden fluoreszenzmikroskopische Bilder angefertigt.

Quantitativ wurden die Ausgangsbakterienzahlen im Wurzelkanal, die Abschlussbakterienzahl im Wurzelkanal und im Dentin sowie der Feilenabrieb in mg im Dentin analysiert.

Qualitativ wurde das Wachstum der Bakterien im Wurzelkanal nach der Behandlung durch eine Ja/Nein-Entscheidung bestimmt.

7.1 Die Ausgangsbakterienzahl im Wurzelkanal

Bei allen beimpften Zahnproben wurde zu Beginn der Versuchsreihe die Ausgangsbakterienzahl im Wurzelkanal bestimmt. Der Mittelwert der Ausgangsbakterienzahlen aller 240 Versuchsproben lag bei $2,5 \times 10^6$ CFU/ml (Standardabweichung $\pm 2,5$). Es wurde ein Median von $1,7 \times 10^6$ CFU/ml ermittelt. Mittels der univariaten Varianzanalyse konnte gezeigt werden, dass kein Unterschied zwischen den Ausgangsbakterienzahlen der verschiedenen Subgruppen vorlag ($p = 0,096$). Zu Untersuchungsbeginn lagen demnach vergleichbare *E. faecalis*-Konzentrationen vor (Abb.15).

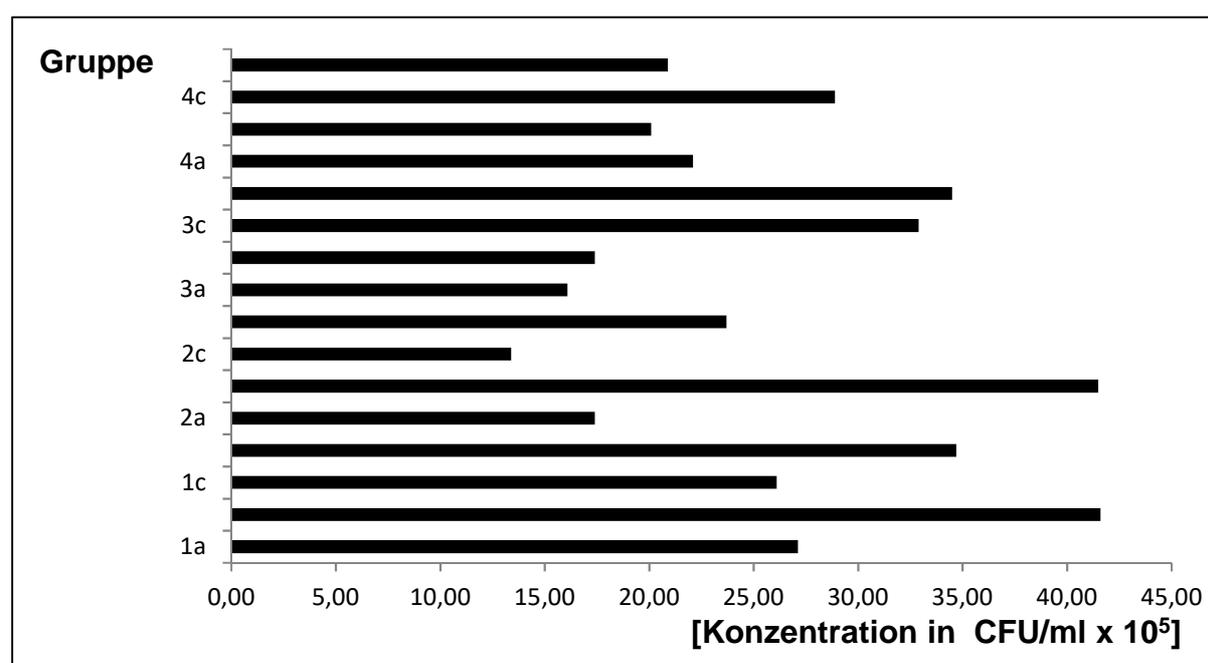


Abb. 15: Ausgangsbakterienzahl im Wurzelkanal (in CFU/ml) der verschiedenen Untergruppen.

In Tabelle 3 ist zusammenfassend der Vergleich der Ausgangsbakterienzahlen und der Endbakterienzahlen jeweils mit Median und Quartilen (Q1- erstes Quartil: 25% der Daten sind kleiner oder gleich diesem Wert, Median: 50 % der Daten sind kleiner oder gleich diesem Wert, Q3- drittes Quartil: 75 % Daten sind kleiner oder gleich diesem Wert) dargestellt. Farblich abgesetzt ist in der Tabelle der Median, dazu im Vergleich die Nachweisgrenze (NG) und ob der Wert unterhalb dieser Nachweisgrenze liegt. Der Log. Reduktionsfaktor ist als Mittelwert dargestellt \pm Standardabweichung der Haupt- und Nebengruppen.

Tabelle 3: Darstellung der Effizienz der verschiedenen Desinfektionsmaßnahmen bei den unterschiedlichen Spülprotokollen.

| Hauptgruppe | Nebengruppe | Versuchsreihe | | | | | | M Log ± SD |
|--------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|------------|
| | | ABZ | | | EBZ | | | |
| | | Q 1 | Median | Q3 | Q1 | Median | Q3 | |
| Keine Aufbereitung | Ozon | 2,2 x 10 ⁶ | 2,6 x 10 ⁶ | 4,7 x 10 ⁶ | 1,0 x 10 ⁵ | 2,7 x 10 ⁵ | 4,7 x 10 ⁵ | 1,4 ± 1,0 |
| | Laser | 5,2 x 10 ⁵ | 2,5 x 10 ⁶ | 3,9 x 10 ⁶ | 2,6 x 10 ⁴ | 2,1 x 10 ⁵ | 9,2 x 10 ⁵ | 1,1 ± 1,0 |
| | Ca(OH) ₂ | 1,2 x 10 ⁶ | 1,7 x 10 ⁶ | 3,7 x 10 ⁶ | 2,5 x 10 ² | 2,5 x 10² | 2,5 x 10 ² | 3,3 ± 0,4 |
| | CHX - Gel | 1,3 x 10 ⁶ | 2,2 x 10 ⁶ | 4,4 x 10 ⁶ | 2,5 x 10 ² | 2,5 x 10² | 5,4 x 10 ⁴ | 2,6 ± 0,9 |
| NaCl | Ozon | 8,8 x 10 ⁵ | 1,1 x 10 ⁶ | 2,1 x 10 ⁶ | 2,5 x 10 ² | 2,0 x 10³ | 3,6 x 10 ⁴ | 2,3 ± 0,9 |
| | Laser | 7,6 x 10 ⁵ | 1,0 x 10 ⁶ | 2,7 x 10 ⁶ | 2,0 x 10 ⁴ | 7,2 x 10 ⁴ | 1,7 x 10 ⁵ | 1,4 ± 0,5 |
| | Ca(OH) ₂ | 4,8 x 10 ⁵ | 1,2 x 10 ⁶ | 1,8 x 10 ⁶ | 2,5 x 10 ² | 2,5 x 10² | 2,5 x 10 ² | 2,8 ± 0,5 |
| | CHX - Gel | 9,6 x 10 ⁵ | 2,0 x 10 ⁶ | 3,6 x 10 ⁶ | 2,5 x 10 ² | 2,5 x 10² | 3,3 x 10 ⁴ | 2,7 ± 0,9 |
| NaOCl | Ozon | 8,4 x 10 ⁵ | 1,6 x 10 ⁶ | 2,0 x 10 ⁶ | 2,5 x 10 ² | 2,5 x 10² | 2,5 x 10 ² | 3,7 ± 0,3 |
| | Laser | 5,2 x 10 ⁵ | 1,3 x 10 ⁶ | 2,4 x 10 ⁶ | 2,5 x 10 ² | 2,5 x 10² | 2,5 x 10 ² | 3,4 ± 0,6 |
| | Ca(OH) ₂ | 6,8 x 10 ⁵ | 2,2 x 10 ⁶ | 8,2 x 10 ⁶ | 2,5 x 10 ² | 2,5 x 10² | 2,5 x 10 ² | 3,8 ± 0,7 |
| | CHX - Gel | 8,8 x 10 ⁵ | 2,2 x 10 ⁶ | 4,7 x 10 ⁶ | 2,5 x 10 ² | 2,5 x 10² | 4,7 x 10 ⁴ | 3,1 ± 1,2 |
| CHX | Ozon | 9,2 x 10 ⁵ | 1,4 x 10 ⁶ | 3,6 x 10 ⁶ | 2,5 x 10 ² | 2,5 x 10² | 2,5 x 10 ² | 3,8 ± 0,4 |
| | Laser | 7,6 x 10 ⁵ | 2,0 x 10 ⁶ | 3,0 x 10 ⁶ | 2,5 x 10 ² | 2,5 x 10² | 2,5 x 10 ² | 3,8 ± 0,4 |
| | Ca(OH) ₂ | 9,2 x 10 ⁵ | 2,4 x 10 ⁶ | 4,9 x 10 ⁶ | 2,5 x 10 ² | 2,5 x 10² | 2,5 x 10 ² | 3,9 ± 0,4 |
| | CHX - Gel | 6,4 x 10 ⁵ | 9,6 x 10 ⁶ | 3,5 x 10 ⁶ | 2,5 x 10 ² | 2,5 x 10² | 7,0 x 10 ³ | 3,0 ± 1,0 |

AZB Ausgangsbakterienzahl im Wurzelkanal

EZB Endbakterienzahl im Wurzelkanal

Q1

25. Quartile

Q3

75. Quartile

M Log

SD

Mittelwert des logarithmischen Reduktionsfaktors

Standardabweichung

Nachweisgrenzen nach Hauptgruppen:

„ohne Aufbereitung“ und „NaCl“ : 2,0 x 10³Nachweisgrenze für „NaOCl“ und „CHX-Gel“: 2,5 x 10²

7.2 Fluoreszenzmikroskopische Nachweise des Biofilms

Der optische Nachweis des Biofilms wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie von exemplarischen Proben erbracht. Als Nukleinsäurefarbstoff wurde DAPI, BIOZOL[®], verwendet. Vor Versuchsbeginn wurde eine Kontamination der Proben mit Sterilitätskontrollen ausgeschlossen. Die zugehörigen Wachstumsreihen auf den Nährböden zeigten lediglich *E. faecalis*-Stämme (Abb.16-19).

Die Übersichtsaufnahme in Abb. 16 zeigt ein Viertel des Kanalquerschnitts. Die angefärbten Zellen von *E. faecalis* sind deutlich als blau fluoreszierender Biofilm auf der Wurzeldentinoberfläche erkennbar und belegen eine weitreichende Besiedelung des Bakteriums auf dieser.

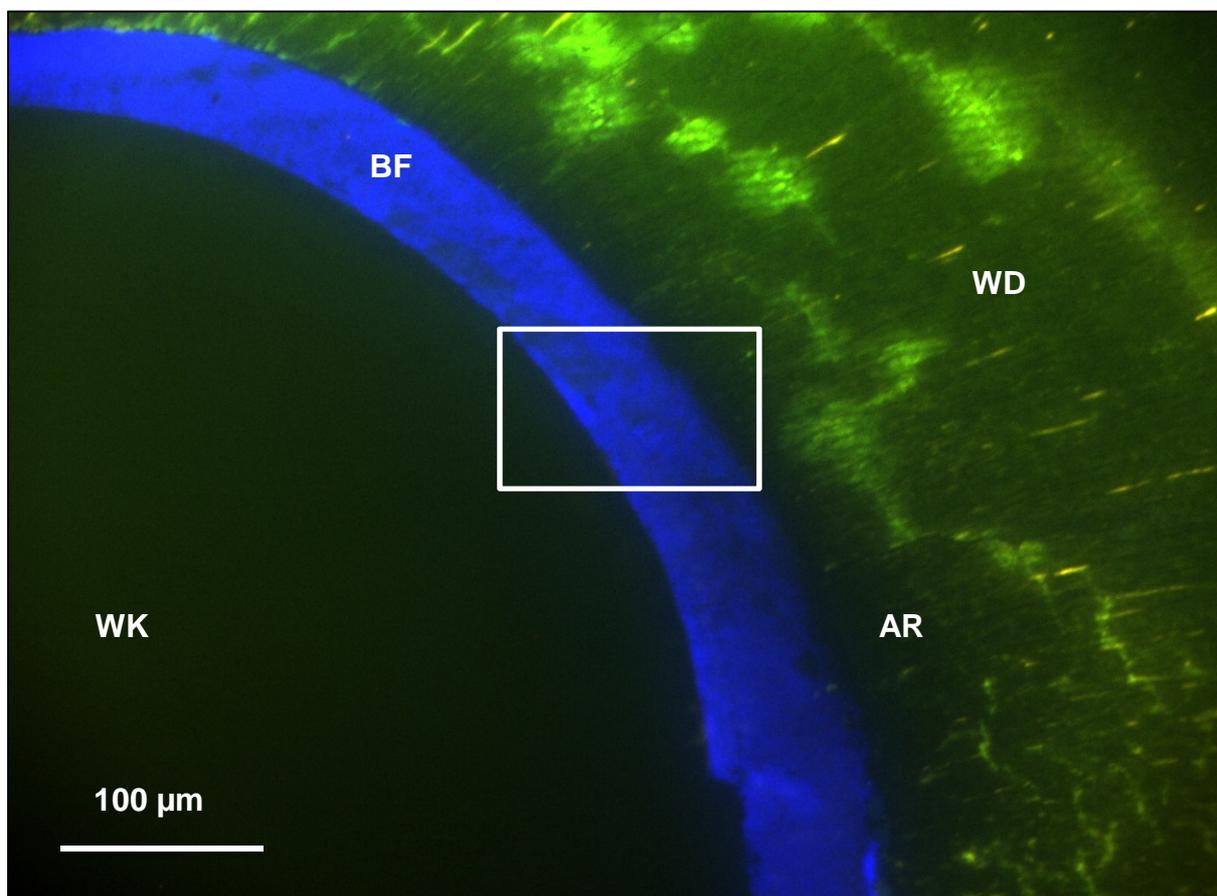


Abb. 16: Übersichtsdarstellung des Wurzelkanallumens, der von *E. faecalis* besiedelten Wurzelkanaloberfläche und des Wurzeldentins. Der blau fluoreszierende Biofilm ist deutlich erkennbar. WK: Wurzelkanallumen. BF: Biofilm. AR: Artefakt. WD: Wurzeldentin.

Die Abb. 17 stellt die Vergrößerung des Biofilmausschnittes dar. Hier sind mehrlagige Zellschichten erkennbar. Die Abb. 18 dokumentiert den mit *E. faecalis* infiltrierten und vergrößerten Ausschnitt eines akzessorischen Kanals.

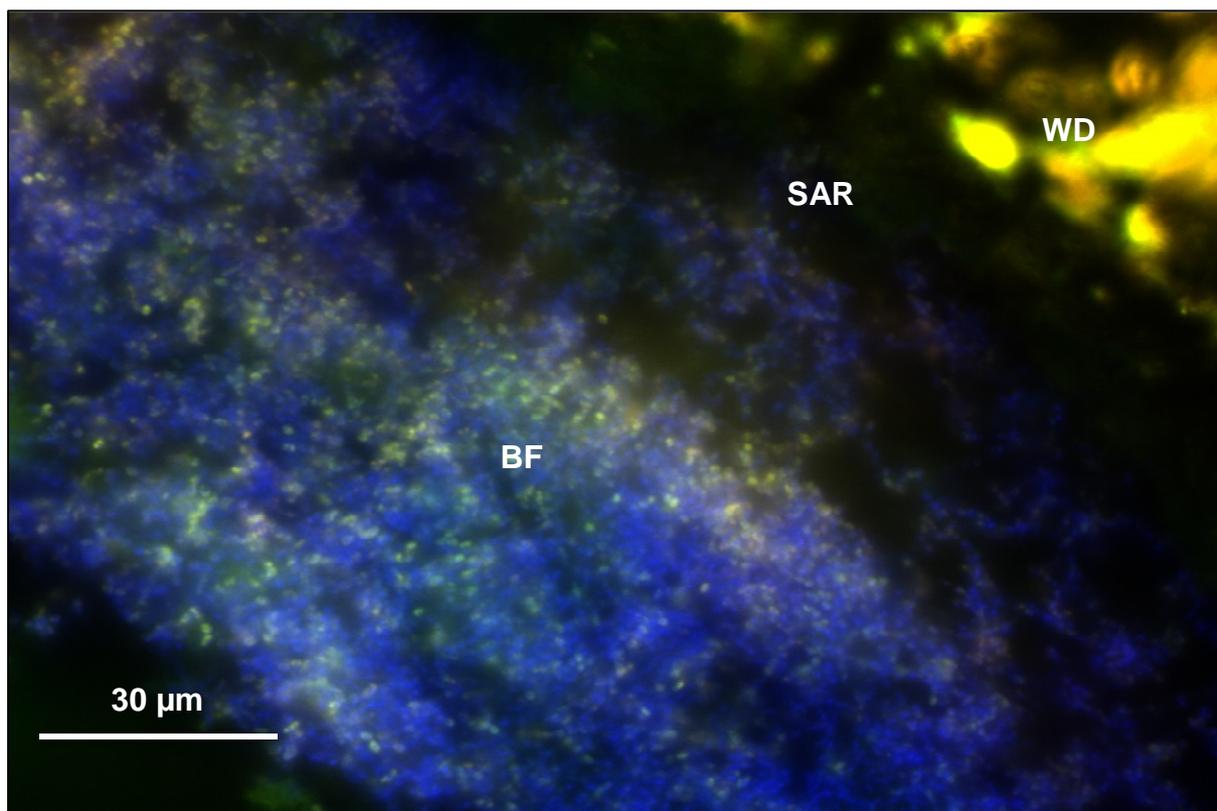


Abb. 17: Vergrößerung des Biofilmausschnittes von Abb. 16. Erkennbar sind die mehrlagigen angefärbten Zellschichten von *E. faecalis* auf der Wurzelentinoberfläche. BF: Biofilm. SAR: Schrumpfungsartefakt. WD: Wurzelentin.

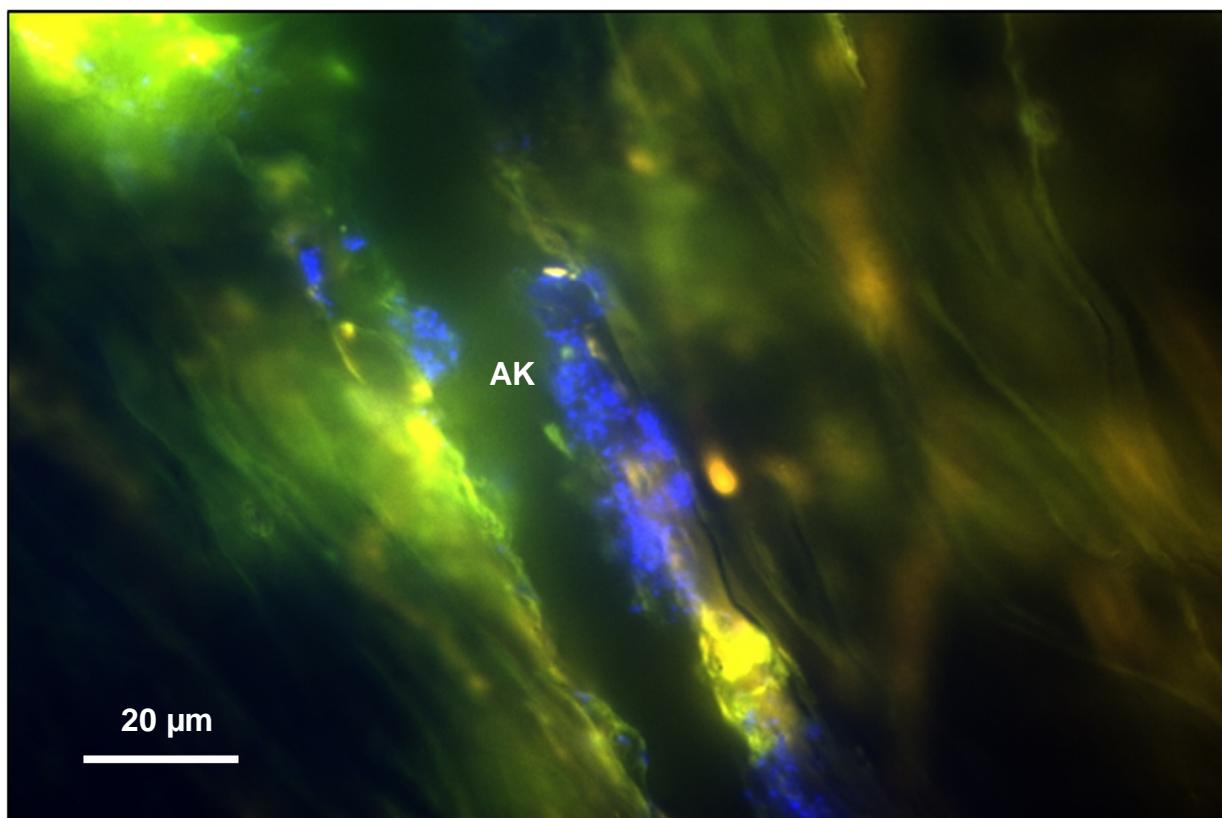


Abb. 18: Anschnitt eines von *E. faecalis* infiltrierten akzessorischen Kanals. *E. faecalis* ist hier blau eingefärbt. AK: Akzessorischer Kanal.

Die Abb. 19 zeigt einen Längsschnitt durch das Wurzelzement mit Anlagerung von *E. faecalis* in den Dentintubuli.

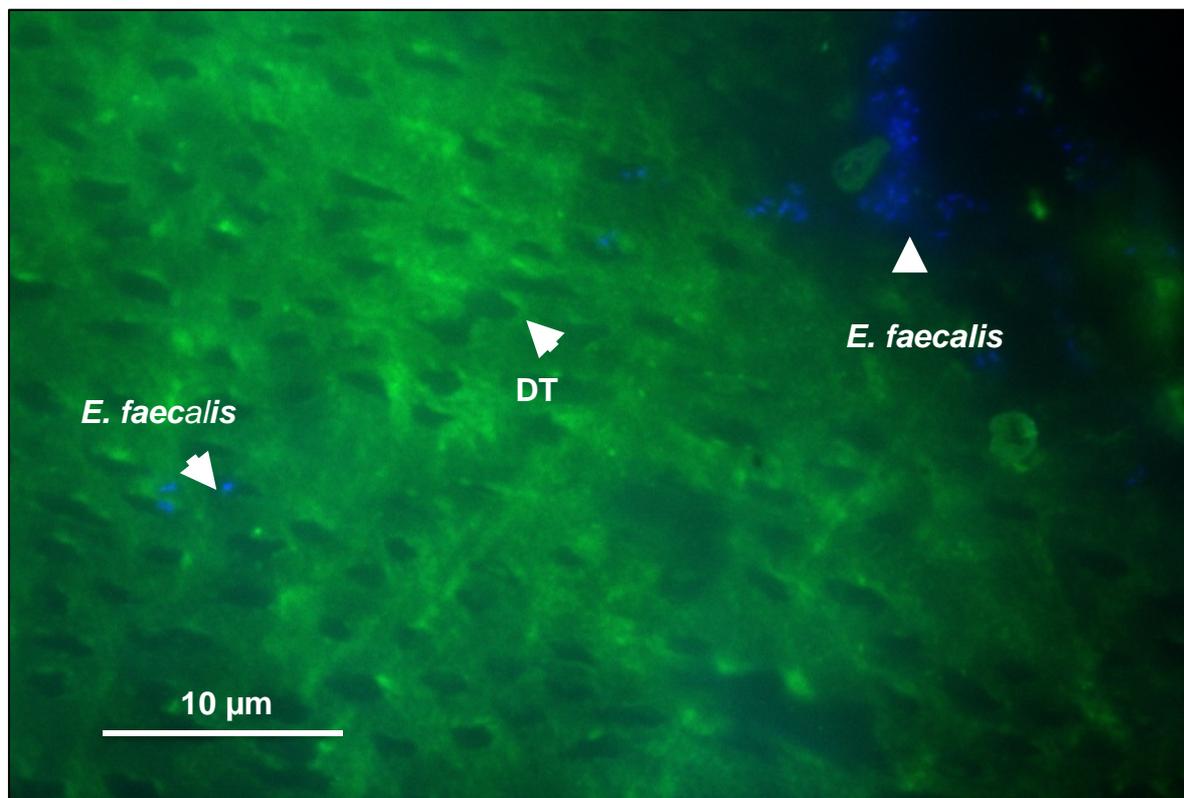


Abb. 19: Anschnitt der Dentintubuli. DT: Dentintubuli.

7.3 Die Abschlussbakterienzahl im Wurzelkanal

Die Abschlussbakterienzahl im Wurzelkanal wurde in *colony-forming units* pro Milliliter (CFU/ml) bestimmt. Diese wurde anhand der gezählten Kolonien unter Berücksichtigung der verwendeten Verdünnungsreihe für alle Proben ermittelt. Um die Ergebnisse besser vergleichbar zu machen, wurde die Restbakterienzahlbelastung in drei Klassen eingeteilt (Tabelle 4). Die Abschlussbakterienzahlen im Wurzelkanal wurden erfasst und in die jeweilige Bakterienzahlklasse eingeteilt. Außerdem wurde der Mittelwert der Ausgangsbakterienzahlen zusammenfassend dargestellt (Tabelle 3). Um die Ergebnisse der Abschlussbakterienzahl in den verschiedenen Bakterienzahlklassen der jeweiligen Untergruppen besser darstellen zu können, wurden diese Ergebnisse als Balkendiagramme eingefügt (Abb. 20-23). Hierbei entspricht jeder Balken mit 100 % einer Untergruppe mit 15 Proben.

Tabelle 4: Klassifikation der Bakterienbelastung zum Versuchsende im Wurzelkanal.

| Bakterienzahlklasse | Bakterienbelastung der Probe |
|---------------------|---|
| 1 | Unterhalb der Nachweisgrenze Hauptgruppe 1 und 2 < 2000 CFU/ml Hauptgruppe 3 und 4 < 500 CFU/ml |
| 2 | ≤ 47500 CFU/ml |
| 3 | > 47500 CFU/ml |

7.3.1 Versuchsreihe 1 – ohne chemo-mechanische Aufbereitung

In Versuchsreihe 1 (Abb. 20) ohne weitere Aufbereitung der Probenzähne und ohne Verwendung einer desinfizierenden Spüllösung konnte Kalziumhydroxid eine hohe Bakterienreduktion erreichen; 93,3 % der Proben waren bakterienfrei. Sowohl in den Ozon-Proben (28,6 %) als auch in den Laser-Proben (6,7 %) verblieben deutlich weniger Proben unterhalb der Nachweisgrenze. Es lag bei beiden Behandlungen ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu Kalziumhydroxid vor (je $p = 0,005$). Im Vergleich beider Behandlungen zum CHX-Gel lag jedoch kein signifikanter Unterschied vor (Laser $p = 0,022$; Ozon $p = 0,027$). Die Kalziumhydroxid- und die CHX-Behandlung unterschieden sich hinsichtlich der Abschlussbakterienzahl nicht signifikant voneinander ($p = 0,044$; Chi-Quadrat-Test). Aufgrund der Mehrfachtestung wurde das Signifikanzniveau für den Chi-Quadrat-Test auf $p = 0,0083$ abgesenkt. Um nicht nur isoliert paarweise zwei Gruppen hinsichtlich der kategoriellen Endbakterienzahlen zu vergleichen, wurde zusätzlich die Bakterienreduktion in jeder Hauptgruppe mit einer Varianzanalyse und anschließenden Post-hoc-Tests analysiert. Ohne Aufbereitung zeigte sich ein signifikanter Effekt der Desinfektionsmaßnahmen ($p < 0,0005$; ANOVA). Ozon und Laser zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Bakterienreduktion ($p = 0,718$; Tukey), beide zeigten jedoch signifikant geringere Bakterienreduktionen im Vergleich zu $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und CHX (beide p Werte $< 0,0005$). $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und CHX hatten in der Bakterienreduktion keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,159$; Tukey) zu verzeichnen.

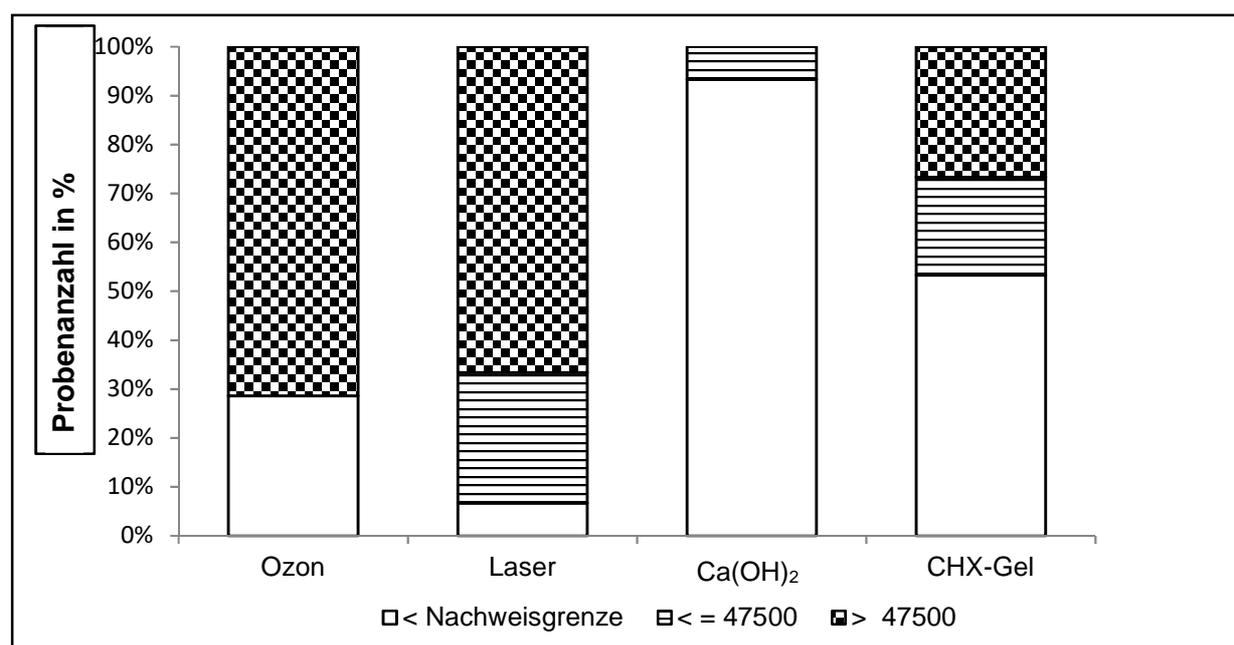


Abb. 20: Abschlussbakterienzahl im Wurzelkanal (in CFU/ml); Versuchsreihe 1 - ohne Spülung.

7.3.2 Versuchsreihe 2 – Aufbereitung mit physiologischer Kochsalzlösung

Zwischen der Behandlung von Kalziumhydroxid und CHX-Gel konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der kategoriellen Endbakterienzahlen ($p = 0,215$) erkannt werden. Bei der Kalziumhydroxid-Anwendung konnten in 80 % der Proben keine Bakterien mehr nachgewiesen werden; es lagen für diese Gruppe signifikante Unterschiede gegenüber Ozon ($p < 0,0083$) und Laser ($p < 0,0083$) vor; CHX-Gel wies keine signifikanten Unterschiede gegenüber Laser ($p = 0,015$) und Ozon ($p = 0,401$; Chi-Quadrat-Test) auf (Abb. 21). Die Bakterienreduktion wurde in dieser Hauptgruppe (Aufbereitung mit Kochsalz) signifikant von der Desinfektionsmethode beeinflusst ($p < 0,0005$; ANOVA). Der Post-hoc-Test nach Tukey zeigt hinsichtlich der bakteriellen Reduktion im Wurzelkanal, dass Laser eine signifikant geringere Reduktion als Ozon ($p = 0,011$), $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ($p < 0,005$) und CHX-Gel ($p < 0,005$) aufwies, die sich wiederum nicht signifikant voneinander unterschieden ($p > 0,05$; Post-hoc-Test, Tukey).

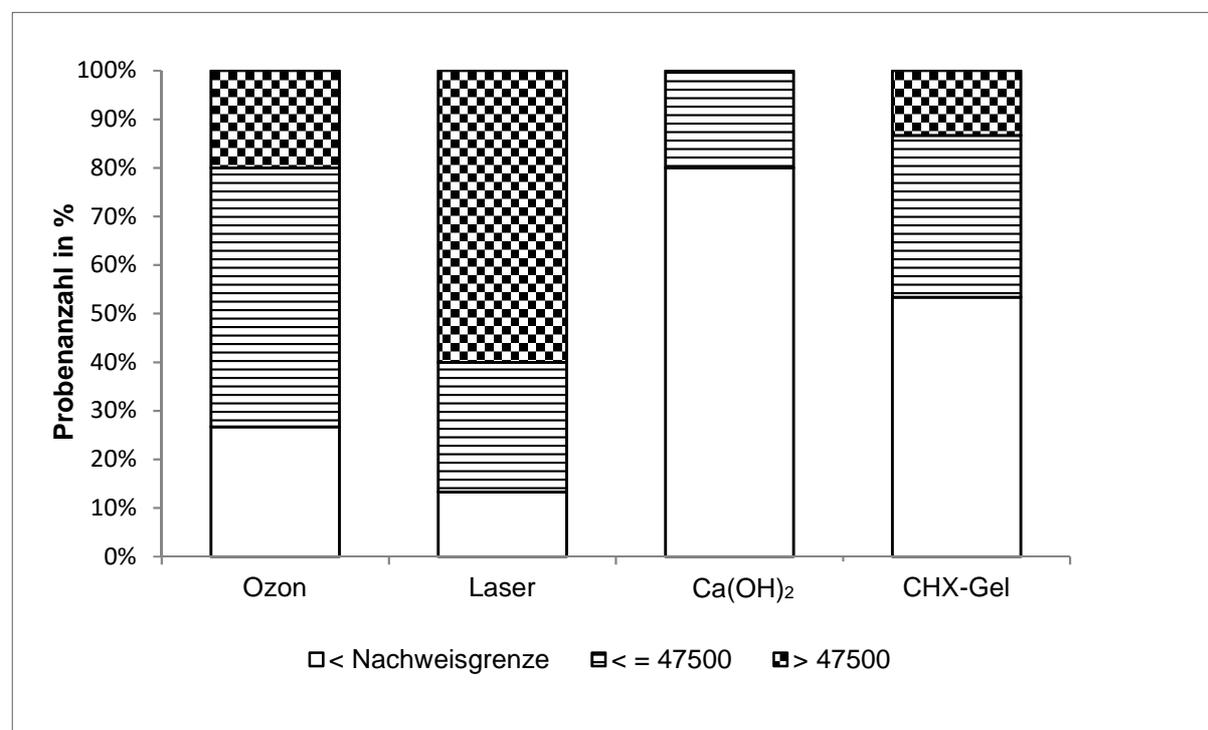


Abb. 21: Abschlussbakterienzahl im Wurzelkanal (in CFU/ml); Versuchsreihe 2 - physiologische Kochsalzlösung.

7.3.3 Versuchsreihe 3 – Aufbereitung mit Natriumhypochlorit

Bei der finalen Aufbereitung unter Verwendung der desinfizierenden Spüllösung NaOCl wurden lediglich in der CHX-Gruppe noch Werte im oberen Bakterienzahlspektrum festgestellt (Abb. 22). Nach dem Einsatz der Spüllösung NaOCl und der chemo-mechanischen Aufbereitung konnten in der Ozon-Gruppe keine Zellen von *E. faecalis* mehr nachgewiesen werden. Bei dieser Aufbereitung unterschied sich die Ozon-Behandlung signifikant ($p < 0,0083$) von der CHX-Gel-Anwendung. Die Proben der Ca(OH)_2 - und der CHX-Einlage zeigten keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,092$). Zwischen Kalziumhydroxid und Ozon ($p = 0,483$) und auch zwischen Kalziumhydroxid und Laser ($p = 1,000$) lag ebenfalls kein signifikanter Unterschied vor. Die Laser- und die CHX-Gel-Anwendungen zeigten keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,092$; Chi-Quadrat-Test). Die univariate Varianzanalyse zeigte in dieser Hauptgruppe hinsichtlich der bakteriellen Reduktion keinen Einfluss der Desinfektionsmethoden ($p = 0,062$; ANOVA).

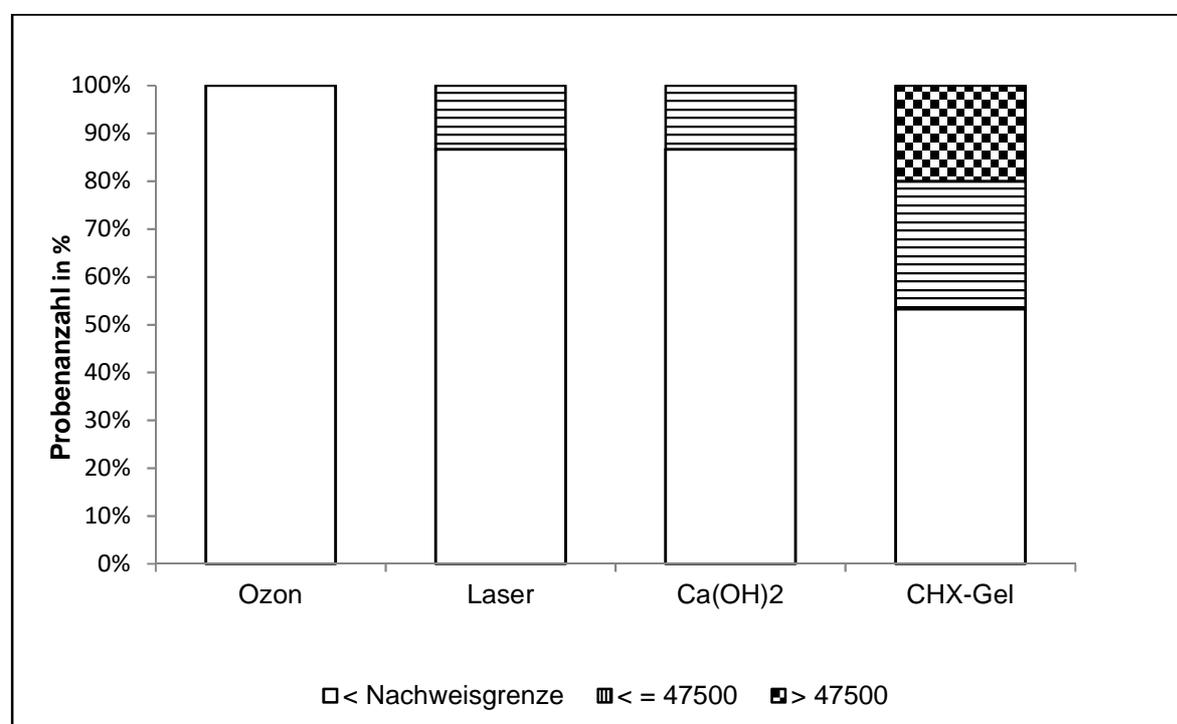


Abb. 22: Abschlussbakterienzahl im Wurzelkanal (in CFU/ml); Versuchsreihe 3 - Natriumhypochlorit.

7.3.4 Versuchsreihe 4 – Aufbereitung mit Chlorhexidin

Durch die Ozon- und Laserbehandlung konnten in 93 % der Proben keine Bakterien nachgewiesen werden (Abb. 23): Sie unterschieden sich in ihrem Ergebnis nicht signifikant von Kalziumhydroxid und auch nicht von der CHX-Gel-Einlage ($p > 0,05$). Ein Vergleich der CHX-Gel- und der $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Anwendung zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,018$; Chi-Quadrat-Test).

Hinsichtlich der bakteriellen Reduktion offenbarte sich bei Spülung mit CHX ein signifikanter Einfluss der Desinfektionsmethoden auf die bakterielle Reduktion ($p = 0,001$; ANOVA). Die Anwendung von Ozon ($p = 0,013$), Laser ($p = 0,014$) und $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ($p = 0,002$) resultierte in einer signifikant höheren bakteriellen Reduktion als die Einlage mit CHX-Gel (Post-hoc-Test nach Tukey).

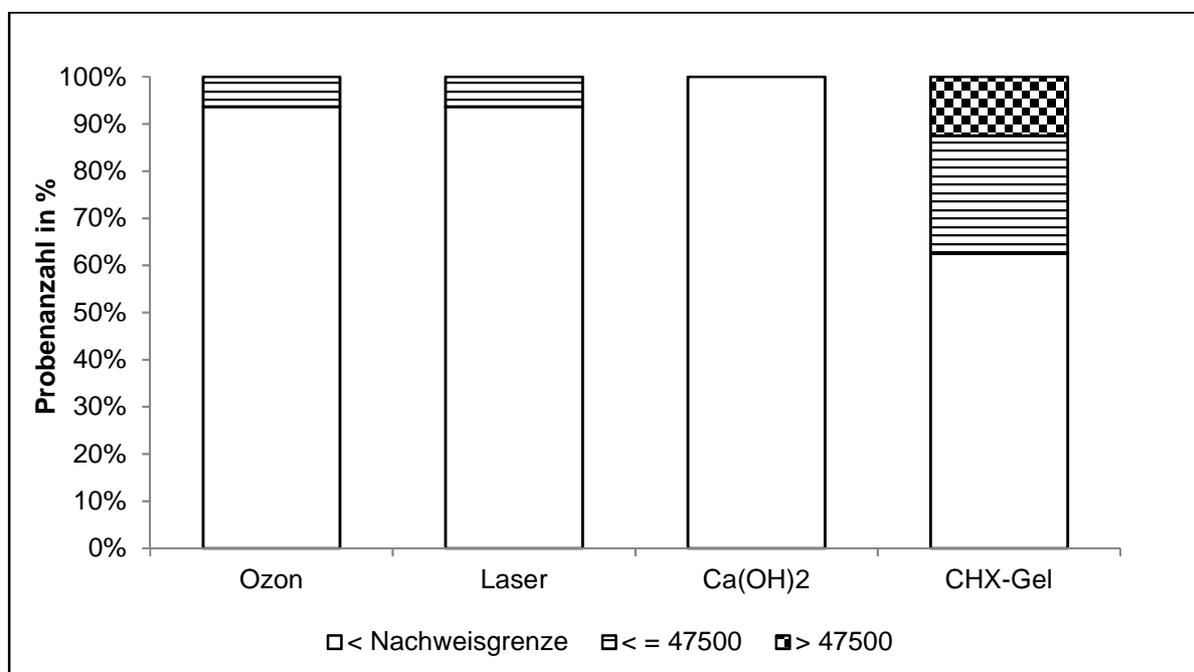


Abb. 23: Abschlussbakterienzahl im Wurzelkanal (in CFU/ml); Versuchsreihe 4 - Chlorhexidin.

7.3.5 Effektivitätsvergleich der Desinfektionsmaßnahmen

Unabhängig von der verwendeten Spüllösung zeigte $\text{Ca}(\text{OH})_2$ eine hohe Bakterienreduktion; 90 % aller Proben waren ohne *E. faecalis*-Nachweis (Abb. 24). Eine univariate Varianzanalyse über alle Gruppen hinweg ergab einen signifikanten Einfluss sowohl der getesteten Spüllösungen ($p < 0,0005$) als auch der Desinfektionsmaßnahmen ($p < 0,0005$; ANOVA) auf die bakterielle Reduktion im Wurzelkanal.

Die Post-hoc-Tests hinsichtlich der Desinfektionsmaßnahmen ergaben, dass die Anwendung von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ gegenüber allen Vergleichsgruppen (CHX-Gel, Laser, Ozon) in einer signifikant höheren bakteriellen Reduktion (je $p < 0,001$; Tukey) resultierte. Ozon ($p = 0,029$) und die Einlage mit CHX-Gel führte zu einer höheren Bakterienreduktion als die Laserapplikation ($p = 0,01$; Tukey).

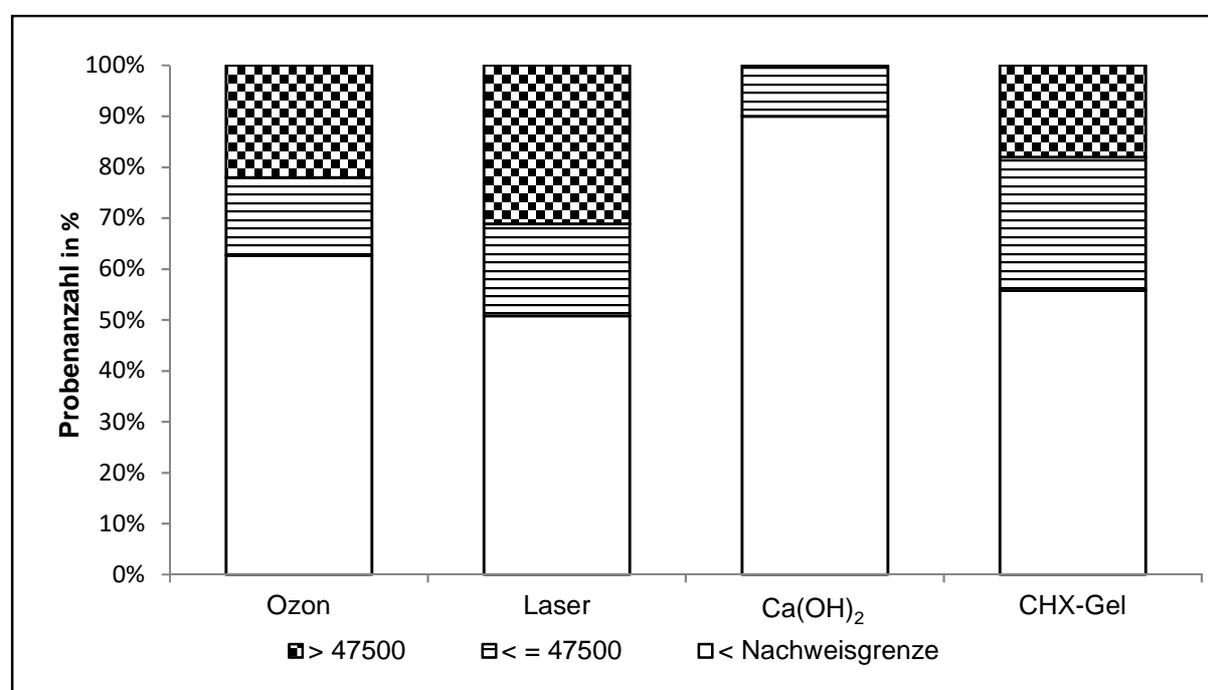


Abb. 24: Abschlussbakterienzahlen (in CFU/ml) nach Desinfektionsmaßnahmen sortiert, ohne Berücksichtigung der Spülprotokolle.

7.3.6 Effektivitätsvergleich der Spülprotokolle

87,1 % der mit CHX-Spüllösung behandelten Proben waren bakterienfrei, bei der NaOCl-Gruppe waren es 81,7 % (Abb. 25). Der Post-hoc-Test nach Tukey hinsichtlich der bakteriellen Reduktion zeigt zwischen den Spüllösungen CHX und NaOCl keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,914$, Tukey). Einen signifikanten Unterschied gab es zwischen CHX und NaCl ($p < 0,001$) und auch zwischen NaOCl und NaCl ($p < 0,001$). Die Gruppe ohne Aufbereitung unterschied sich nicht signifikant von der Aufbereitung mit NaCl ($p = 0,496$, Tukey).

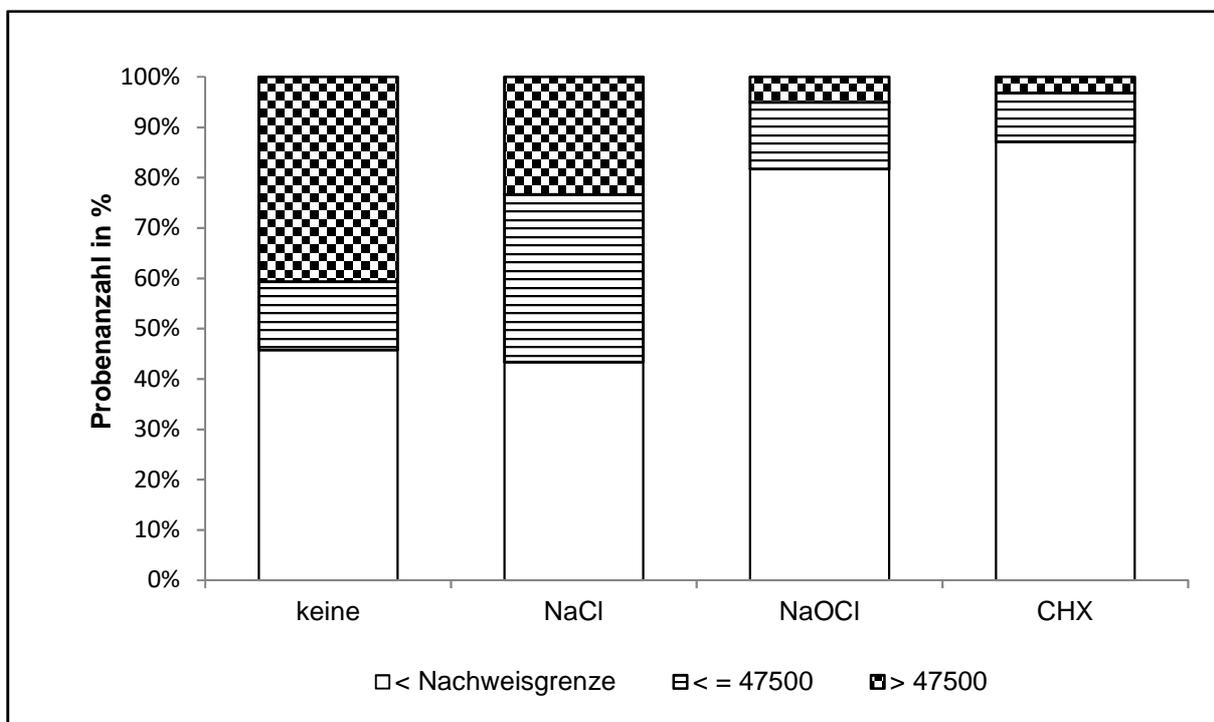


Abb. 25: Abschlussbakterienzahlen (in CFU/ml) nach Spüllösungen sortiert.

7.4. Der Biofilm im Dentin

Die Abschlussbakterienzahl adhärenter Mikroorganismen im Dentin wurde in *colony-forming units* pro Milligramm (CFU/mg) bestimmt. Diese wurde anhand der gezählten Kolonien unter Berücksichtigung der verwendeten Verdünnungsreihe für alle Proben ermittelt. Um die Ergebnisse besser vergleichbar zu machen, wurde die Restbakterienbelastung in drei Klassen eingeteilt (Tabelle 5).

Die Abschlussbakterienzahlen im Dentin wurden erfasst und in die jeweilige Bakterienzahlklasse eingeteilt. Um die Ergebnisse der Abschlussbakterienzahl in den verschiedenen Bakterienzahlklassen der jeweiligen Untergruppen besser erklären zu können, sind diese Ergebnisse als Balkendiagramme dargestellt (Abb. 26-29). Hierbei entspricht jeder Balken mit 100 % einer Untergruppe mit 15 Proben

Tabelle 5: Klassifikation der Bakterienbelastung zum Versuchsende (Dentin).

| Bakterienzahlklasse | Bakterienbelastung der Probe |
|---------------------|------------------------------|
| 1 | Unterhalb der Nachweisgrenze |
| 2 | ≤ 20.000 CFU/mg |
| 3 | > 20.000 CFU/mg |

7.4.1 Versuchsreihe 1 – ohne chemo-mechanische Aufbereitung

In der Versuchsreihe 1 (Abb. 26) ohne eine weitere Aufbereitung der Probenzähne und ohne die Verwendung einer desinfizierenden Spüllösung konnte bei 100 % der Kalziumhydroxid-Proben kein Nachweis mehr von *E. faecalis* erbracht werden.

Ozon und Laser wiesen häufiger eine verbleibende Bakterienbelastung auf und waren von Kalziumhydroxid (je $p < 0,0083$) und auch von der CHX-Gel-Einlage (Laser $p < 0,0083$, Ozon $p = 0,004$) signifikant zu unterscheiden. 40 % der Laser- und der Ozon-Proben lagen im oberen Bakterienzahlbereich. Kalziumhydroxid und CHX wiesen keinen signifikanten Unterschied auf ($p = 0,224$; Chi-Quadrat-Test). Im Vergleich zu den Ergebnissen im Wurzelkanal konnte eine geringere Bakterienreduktion dargestellt werden.

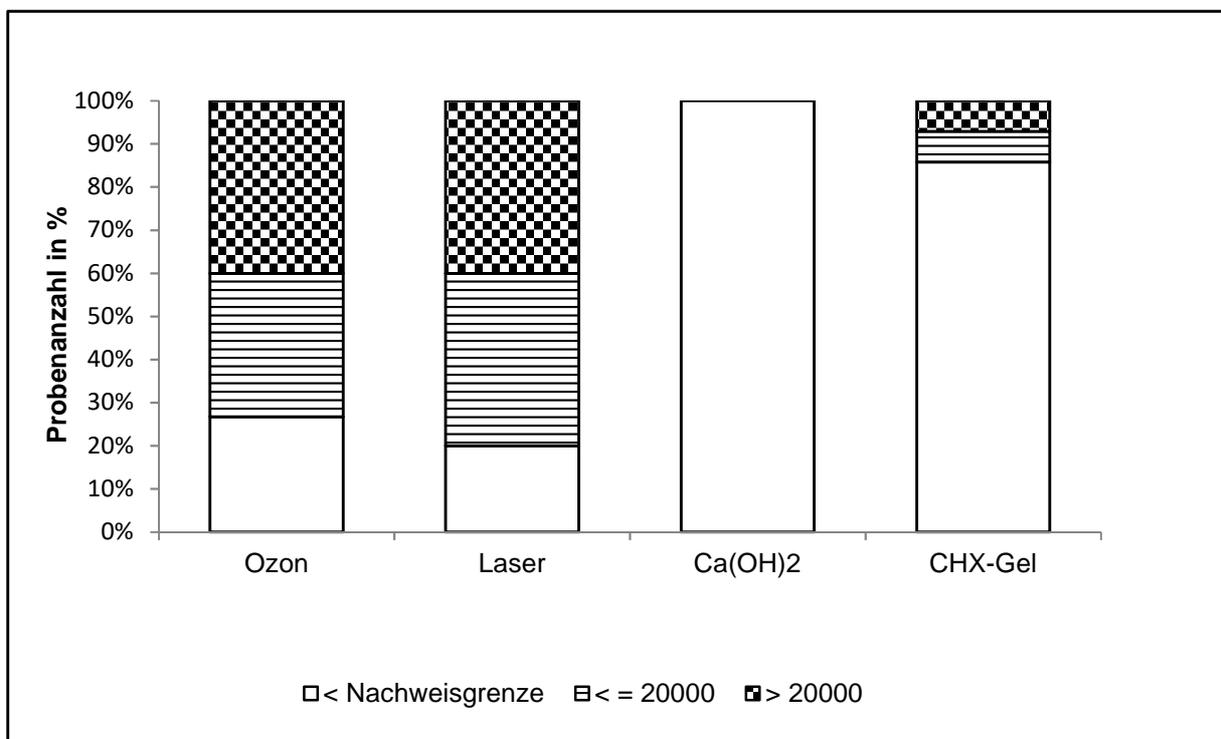


Abb. 26: Abschlussbakterienzahl im Dentin (in CFU/mg), Versuchsreihe 1 – ohne Aufbereitung

7.4.2 Versuchsreihe 2 – Aufbereitung mit physiologischer Kochsalzlösung

Unter Verwendung von NaCl in Kombination mit der chemo-mechanischen Aufbereitung wiesen 92,9 % der Kalziumhydroxid- und CHX-Proben keine Bakterien mehr auf; es lag kein signifikanter Unterschied zwischen den medizinischen Einlagen vor ($p = 1,000$).

Bei der Ozon- und Laserapplikation waren jeweils 46,7 % der Proben bakterienfrei (Abb. 27). Beide Behandlungen zeigten keinen signifikanten Unterschied gegenüber Kalziumhydroxid aufgrund des adjustierten p-Wertes von 0,0083 (Laser $p = 0,014$, Ozon $p = 0,019$) und CHX-Gel (Laser $p = 0,014$, Ozon $p = 0,019$; Chi-Quadrat-Test).

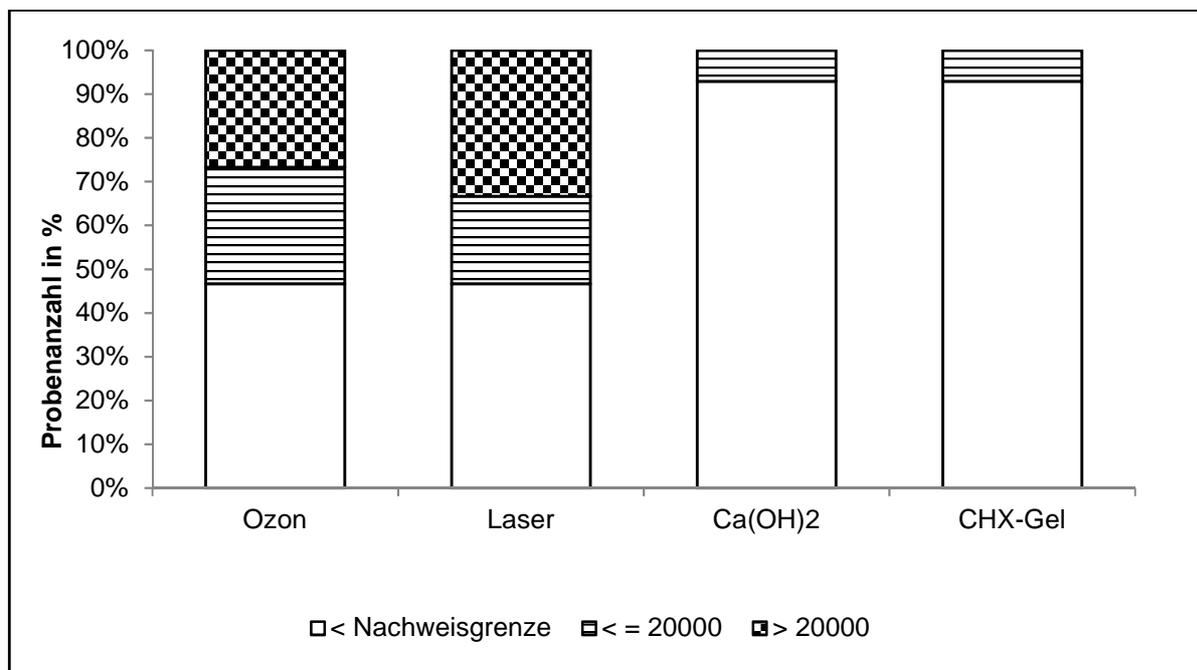


Abb. 27: Abschlussbakterienzahl im Dentin (in CFU/mg), Versuchsreihe 2 – physiologische Kochsalzlösung.

7.4.3 Versuchsreihe 3 – Aufbereitung mit Natriumhypochlorit

93,3 % der CHX-Proben und 86,7 % der $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Proben waren nach der Aufbereitung mit Natriumhypochlorit bakterienfrei, es konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 1,000$) erkannt werden.

Sowohl nach der Behandlung mit Laser als auch mit Ozon konnten keine Bakterien mehr nachgewiesen werden (Abb. 28). Hier lag kein signifikanter Unterschied von beiden Medizingeräten zu Kalziumhydroxid (je $p = 0,483$) CHX-Gel (je $p = 1,000$; Chi-Quadrat-Test) vor.

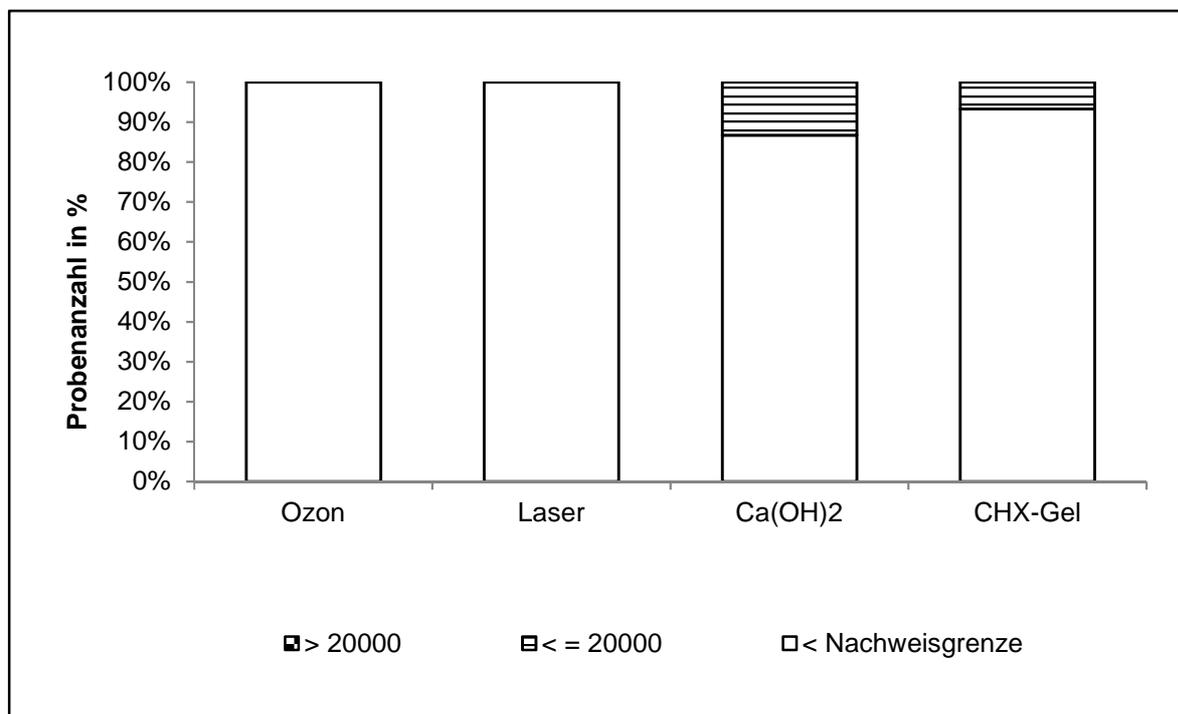


Abb. 28: Abschlussbakterienzahl im Dentin (in CFU/mg, Versuchsreihe 3 – NaOCl).

7.4.4 Versuchsreihe 4 – Aufbereitung mit Chlorhexidin

Durch die Verwendung der CHX-Spüllösung als Komponente der chemo-mechanischen Aufbereitung konnte in dieser Untergruppe in allen Behandlungen kein Nachweis von *E. faecalis* mehr erbracht werden (Abb. 29), da alle Proben unterhalb der Nachweisgrenze lagen.

Dementsprechend lag kein signifikanter Unterschied (je $p = 1,000$) zwischen den Behandlungen von CHX und Kalziumhydroxid, CHX-Gel und Ozon/Laser, Kalziumhydroxid und Laser/Ozon vor.

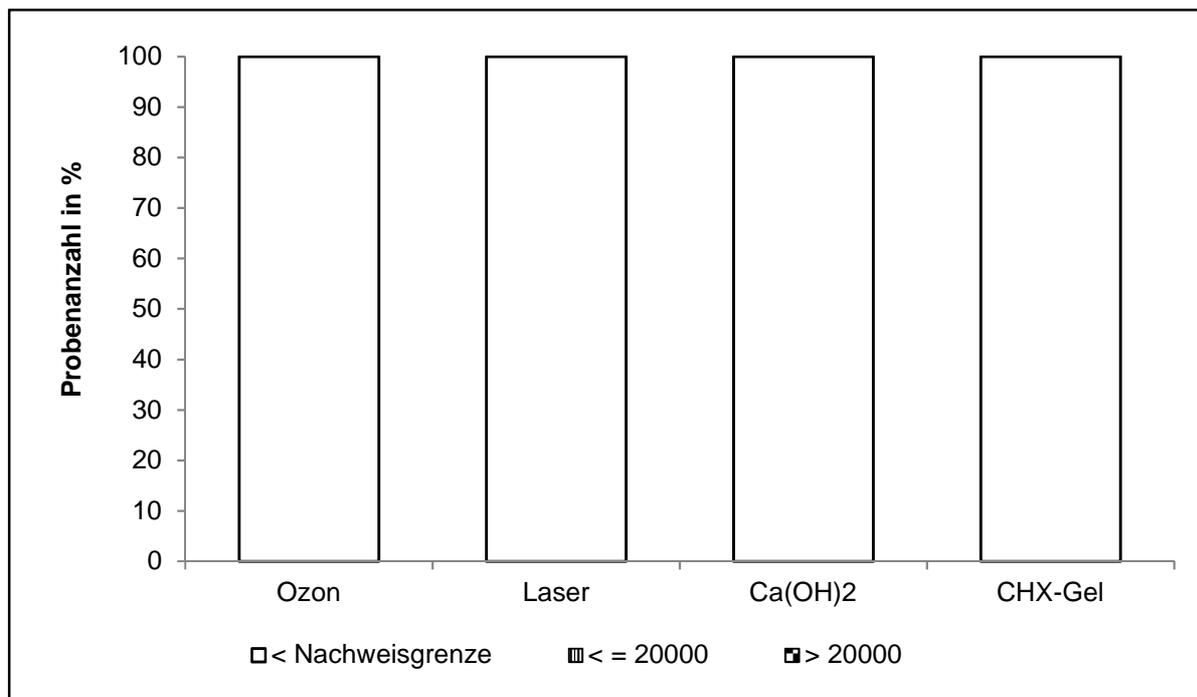


Abb. 29: Abschlussbakterienzahl im Dentin (in CFU/mg); Versuchsreihe 4 – Chlorhexidin.

7.4.5 Effektivität der Desinfektionsmaßnahmen – adhärenente Bakterien

Die verschiedenen Desinfektionsmaßnahmen aller Untergruppen im Dentin wurden miteinander verglichen (Abb. 30). Bei 94,9 % der gesamten $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Proben und 93,2 % der CHX-Proben konnte keine Belastung mit *E. faecalis* nachgewiesen werden. 68,3 % der Ozon-Proben und 67,2 % der Laser-Proben waren ohne Bakteriennachweis. Die Restbakterienbelastungen lagen in der Laser-Gruppe bei 18,0 %, in der Ozon-Gruppe bei 16,7 % und in der CHX-Gruppe bei 1,7 %.

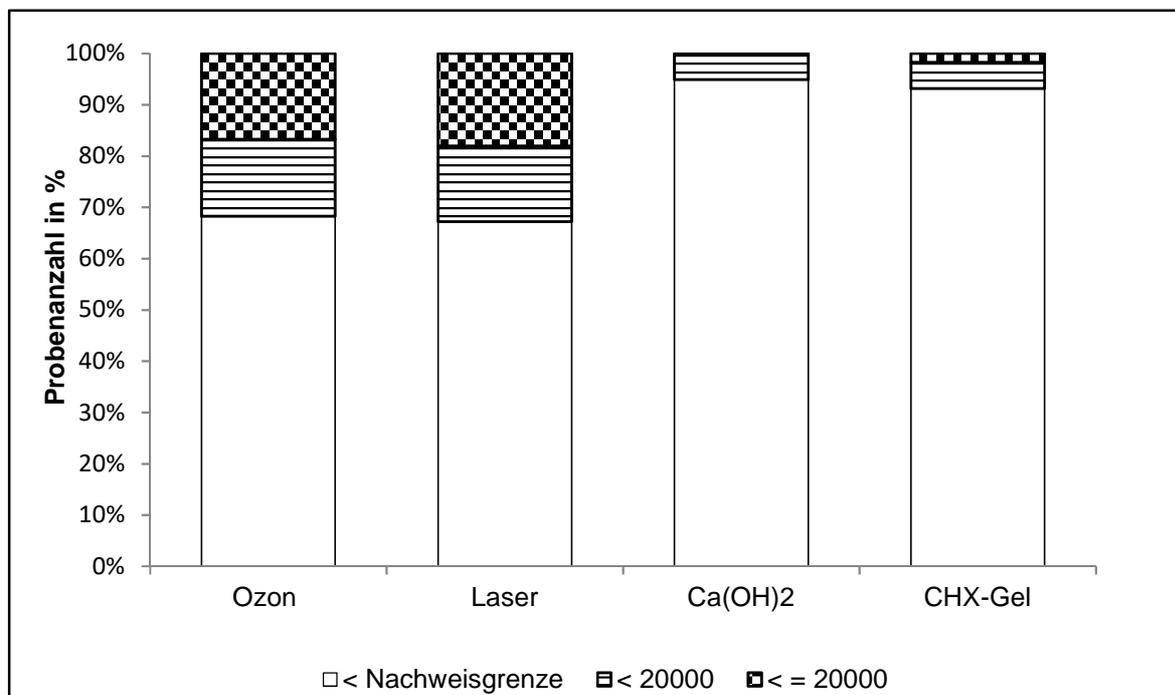


Abb. 30: Abschlussbakterienzahlen (in CFU/mg) nach Desinfektionsmaßnahmen sortiert.

7.4.6 Effektivität der Spülprotokolle – adhärente Bakterien

Die Ergebnisse der Spüllösungen aller Proben zeigen, dass 100 % der CHX-Spüllösungen-Proben bakterienfrei getestet wurden, bei der NaOCl-Gruppe waren es 95 % (Abb. 31).

Eine hohe Bakterienbelastungen (> 20.000 CFU/mg) wurden bei 22,0 % der Proben ohne eine weitere Aufbereitung und 15,5 % der NaCl-Proben gefunden. Bei den mit desinfizierenden Lösungen behandelten Proben zeigten sich keine hohen Restbakterienbelastungen mehr (CHX und NaOCl jeweils 0,0 %).

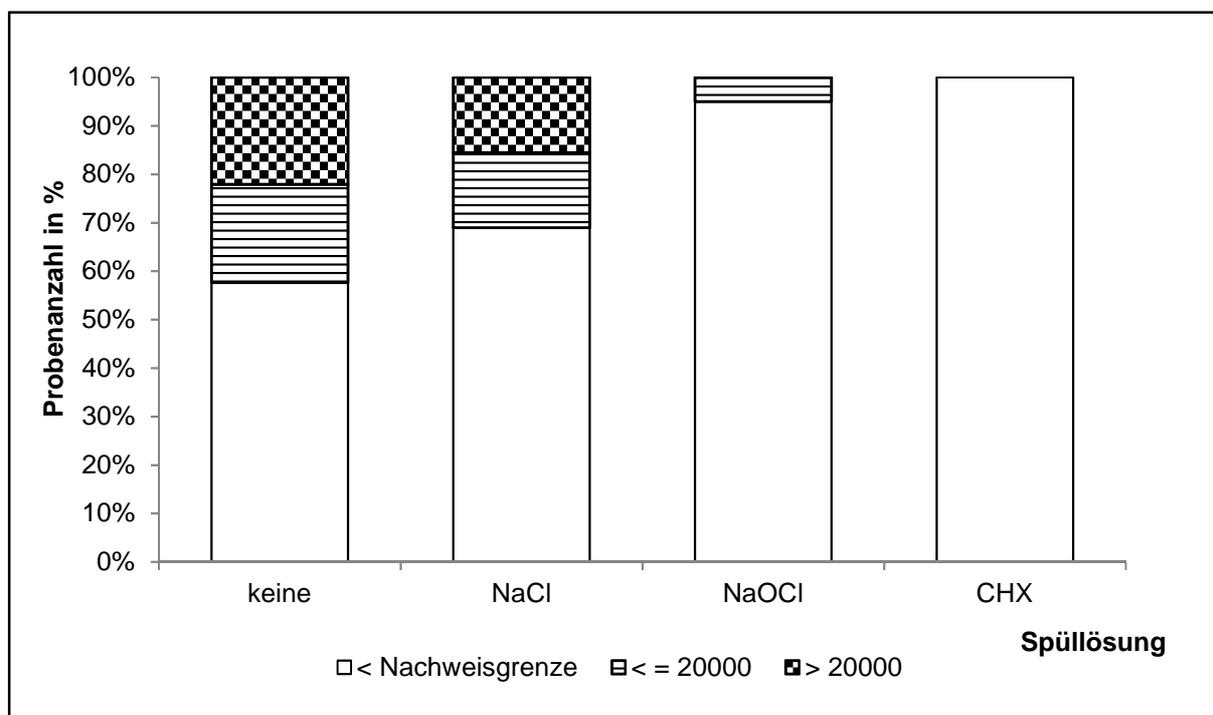


Abb. 31: Abschlussbakterienzahlen (in CFU/mg) nach Spüllösungen sortiert.

7.5 Feilenabrieb der behandelten Proben

Der Feilenabrieb der Dentineoberfläche wurde in allen Proben standardisiert in Milligramm (mg) ermittelt. Die gemessenen Gewichte wurden gemittelt. Die Quantität des Dentinabtrages in den einzelnen Untergruppen variierte: die medikamentösen Einlagen (Ca(OH)₂, CHX) verzeichneten im Vergleich zu Ozon und Laser mehr Abtrag. Im Durchschnitt wurden bei den Ca(OH)₂-Proben 2,005 mg, bei den CHX-Proben 1,1641 mg, bei den Laser-Proben 0,5567 mg und bei den Ozon-Proben 0,5553 mg Dentinspan abgetragen. Der folgende Boxplot zeigt den Abtrag in den verschiedenen Versuchsreihen mit den entsprechenden Untergruppen (Abb. 32). Mittels Kruskal-Wallis-Test wurden die Unterschiede in den Abtragsmengen analysiert.

Hierbei zeigte sich, dass die Art der verwendeten Spülung keinen Einfluss auf die Menge des Feilenabriebs hat ($p = 0,124$). Dahingegen weist die Desinfektionsmaßnahme einen Einfluss auf den Feilenabrieb auf: Die Gruppen mit den medikamentösen Einlagen (Ca(OH)₂, CHX) weisen einen höheren Feilenabrieb auf als die Vergleichsgruppen Ozon und Laser ($p < 0,001$; Kruskal-Wallis-Test).

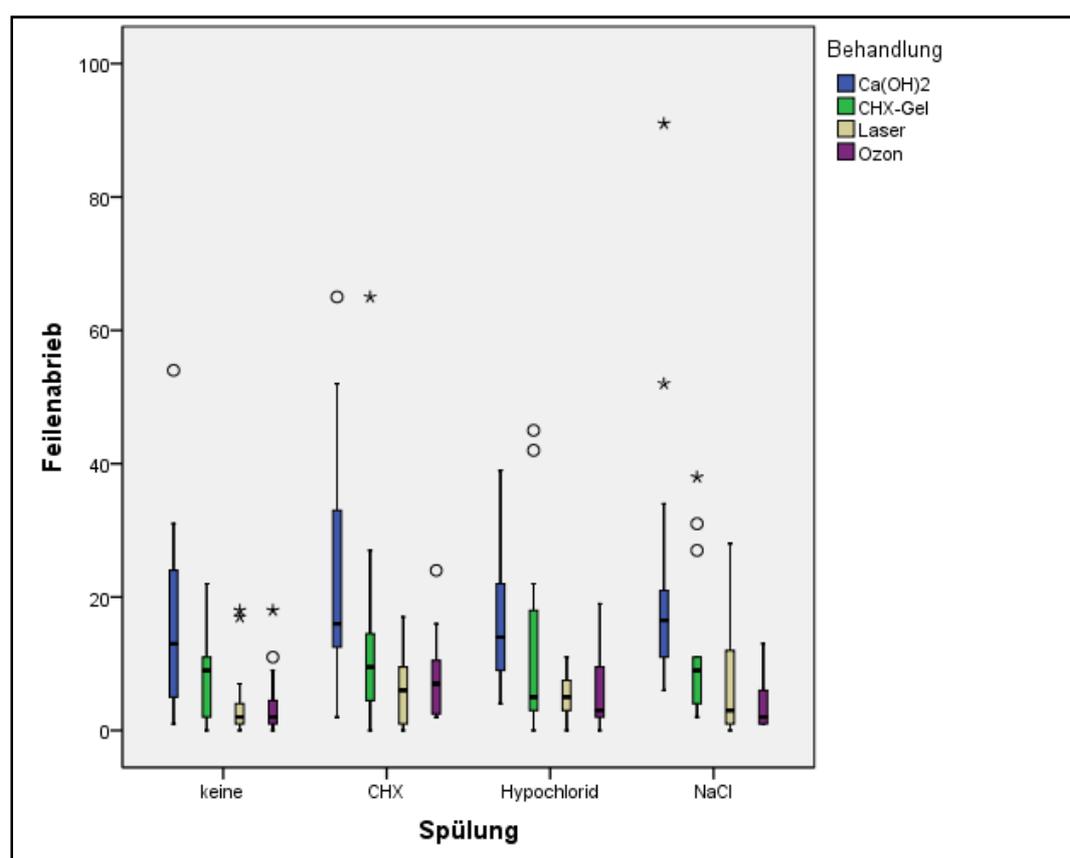


Abb. 32: Feilenabrieb (in mg) der verschiedenen Versuchsreihen und Untergruppen.

7.6 Bakterienwachstum in den bakterienfrei getesteten Kanälen

Die Proben, die nach den Behandlungen im Dentin eine Bakterienfreiheit aufwiesen, wurden einmal mit Nährmedium beimpft, bebrütet und in einer dichotomen Entscheidung (ja/nein) auf Bakterienwachstum kontrolliert.

Die Abb. 33 stellt die Ergebnisse der Proben dar, die nach den Behandlungen weiterverwendet werden konnten. Es ist zu erkennen, dass die CHX-Proben das geringste Neuwachstum nach erneuter Bebrütung hatten: 78,6 % der Proben blieben bakterienfrei, bei der $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Gruppe waren es 61,5 %. 75 % der zuvor mit Ozon behandelten Zähne zeigten erneutes Wachstum von *E. faecalis*, bei den Laserproben waren es 66,6 %.

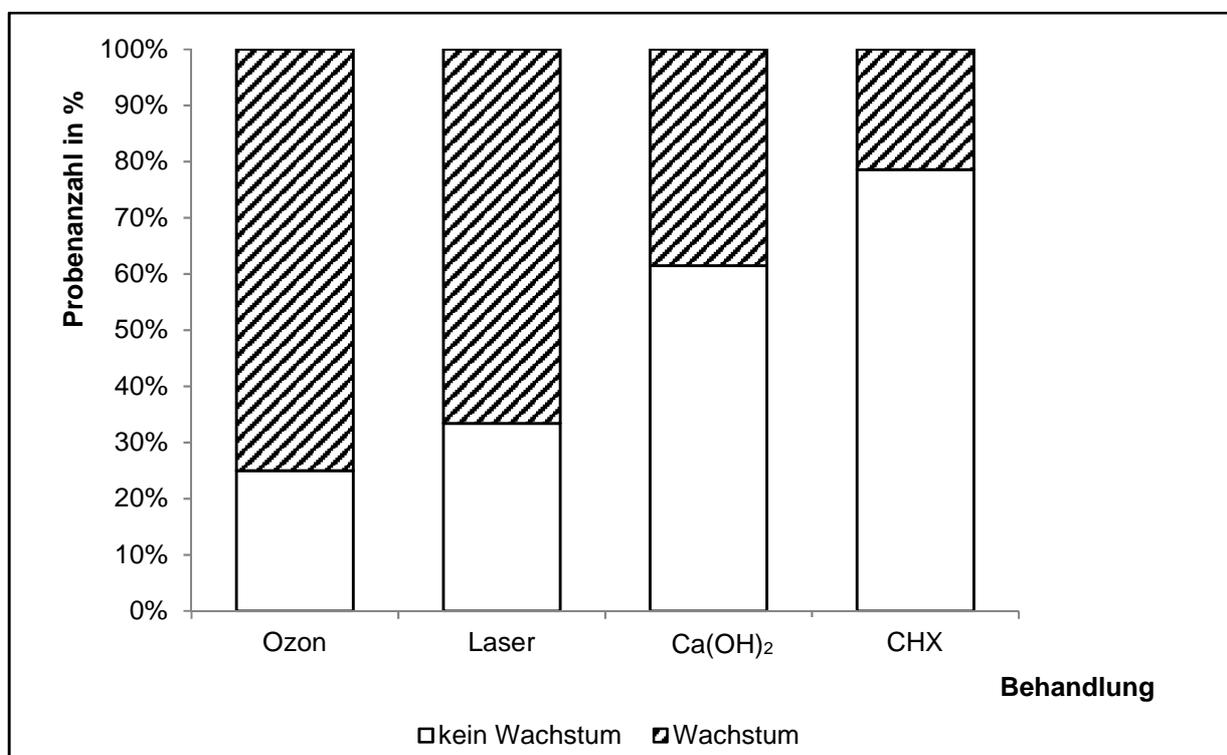


Abb. 33: Häufigkeit des Bakterienwachstums der vorher als bakterienfrei klassifizierten Wurzelkanäle (in %).

8. Diskussion

8.1 Diskussion des Materials

8.1.1 Probenzähne

Zur Untersuchung der Wirksamkeit verschiedener medizinischer Einlagen und Medizingeräte existieren bereits zahlreiche In-vitro-Biofilmmodelle auf verschiedenen Oberflächen (Titan, Glas, Kunststoff) [Chandra *et al.* 2001, Nikawa *et al.* 2003, Suci *et al.* 2003]. Für diese Untersuchung wurden Wurzelkanäle ganzer humaner Zähne verwendet. Diese haben den Vorteil, dass sie der klinischen Situation am ehesten entsprechen, im Gegensatz zu Untersuchungen auf künstlichen Oberflächen, wie beispielsweise auf Dentinchips, in bovinem Material, auf Agarplatten oder in Flüssigkeiten [Mehl *et al.* 1999, Noetzel *et al.* 2009a].

Da die Permeabilitätseigenschaften hinsichtlich der Bakterieninvasion durch die Art der Lagerung sowie die Sterilisation der Probenzähne beeinflusst werden können [Schmalz *et al.* 2001], wurden die Zähne nach der initialen Reinigung in isotonischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %) gelagert und mittels Ethylenoxid sterilisiert, was dem Erhalt der Dentinmorphologie zugutekommt.

Die Zähne wurden so gekürzt, dass jeder Wurzelkanal in der Untersuchung die gleiche Länge hatte und somit reproduzierbaren Untersuchungsbedingungen nahegekommen werden konnte.

8.1.2 *Enterococcus faecalis*

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Einfluss verschiedener Desinfektionsprotokolle auf die Reduktion bzw. Elimination des Bakteriums *E. faecalis* untersucht. Dieses gilt als Schlüsselpathogen bei persistierenden endodontischen Infektionen, ist wenig empfindlich für Desinfektionsmaßnahmen und nur schwer aus dem Wurzelkanalsystem zu entfernen [Haapasalo *et al.* 2000, Komorowski *et al.* 2000, Kaufman *et al.* 2005].

Mithilfe einer auf dem bakterienspezifischen 16s-rRNA-Gen basierenden PCR wurde nachgewiesen, dass die Bakterien-DNA von *E. faecalis* mit den für die Endodontie üblichen Desinfektionsmitteln nicht vollständig entfernt werden kann [Kaufman *et al.* 2005, Zoletti *et al.* 2006]. Für Studienbedingungen ist es von Vorteil, dass der fakultativ anaerobe *E. faecalis* sowohl unter anaeroben als auch unter aeroben

Wachstumsbedingungen *in vitro* leicht anzüchtbar ist, schnell wächst und effizient einen Biofilm an der Wurzeloberfläche bilden kann.

E. faecalis ist überaus widerstandsfähig und in der Lage, sich an veränderte Umgebungsbedingungen zu adaptieren. Da er in großer Zahl bei persistierenden Wurzelkanalinfektionen zu finden ist, wird diskutiert, ob *E. faecalis* für Misserfolge bei der Wurzelkanalbehandlung verantwortlich ist, da eine Bakterienpersistenz im Wurzelkanal die Ausheilung periapikaler Läsionen verhindert [Fabricius *et al.* 2006]. Trotzdem gilt er nicht als unmittelbarer Verursacher von periapikalen Entzündungen [Kaufman *et al.* 2005, Zoletti *et al.* 2006].

8.1.3 Desinfektionsmittel

Die Wirkung von Desinfektionsmitteln sollte im Idealfall ohne direkten Kontakt zu den Mikroorganismen funktionieren. Dies ist sowohl bei der Ozon- als auch bei der Laserapplikation möglich. Bei beiden Applikationsformen verbleiben keine Rückstände in den Wurzelkanälen. Ein falsch negatives Ergebnis in Bezug auf die Bakterienreduktion ist somit durch Rückstände von Ozon und Laser nicht möglich.

In direktem Kontakt werden medizinische Einlagen in hohen Verdünnungen (z. B. Agardiffusionstest) erfolgreich gegen Bakterien eingesetzt [Spångberg 1981, Gomes *et al.* 2003]. Die desinfizierende Wirkung wird durch die Schädigung der äußeren Bakterienmembran erzeugt. Nach durchschnittlich zwei Tagen werden durch die Anwendung von Ca(OH)_2 diese Bakterien abgetötet; grampositive Bakterien hingegen erst nach bis zu vier Tagen [Podbielski *et al.* 2003, Zerella *et al.* 2005]. Komorowski und Kollegen untersuchten die Substantivität von Chlorhexidin gegenüber *E. faecalis* und wiesen nach, dass eine optimale Wirkung bei einer Mindestliegedauer von sieben Tagen erreicht wird [Komorowski *et al.* 2000]. In der vorliegenden Untersuchung wurden die medizinischen Einlagen sieben Tage im Wurzelkanal belassen, um eine ausreichende Wirkung zu erzielen. Eine weitere Aufbereitung im Anschluss an die medikamentöse Einlage erscheint sinnvoll, um mögliche Rückstände von den medikamentösen Einlagen in den Dentintubuli zu entfernen. Dadurch kann die Möglichkeit eines falsch negativen Ergebnisses reduziert werden.

8.2 Diskussion der Methodik

8.2.1 Probenherstellung

Die Wurzeln wurden versiegelt und in verschließbare Kunststoffhülsen mit Epoxidharzkunststoff eingebettet, was ein exaktes, hygienisches Arbeiten und eine bessere Handhabung ermöglichte. Die verwendeten Flüssigkeiten, medizinischen Einlagen und Gase konnten durch diesen periradikulären Schutz nicht entweichen und auch keine Fremdstoffe von außen in die Wurzeln eindringen. Durch die äußere Dentinoberfläche konnte keine mikrobielle Belastung eintreten.

Aufgrund seiner Virulenzfaktoren und Größe kann *E. faecalis* in Dentintubuli migrieren und dort überleben [Stuart *et al.* 2006]. Physikalische Barrieren wie z. B. die Schmierschicht oder sklerosierte apikale Dentinbereiche können ein schlechtes Infektions- und Desinfektionsergebnis bewirken [Love *et al.* 1996]. Um dem Bakterium die Penetration in die Dentintubuli zu ermöglichen und somit offene, nicht durch die Schmierschicht verlegte, durchgängige Dentinkanälchen zu erhalten, die eine gewisse Eindringtiefe erreichen, wurde während der Probenvorbereitung EDTA zur Entfernung der Schmierschicht verwendet. Hierdurch wurde das Eindringen der Bakterien in das Wurzelentin und damit auch die Kolonisation des Dentins und der Dentinkanälchen begünstigt [Perez *et al.* 1996]. Da Nährstoffmangel den Biofilm in einen inaktiven Zustand mit ruhendem Wachstum bringen kann, wurden die Proben täglich mit Nährmedium versorgt; in dieser Phase war der Biofilm optimal geschützt vor äußeren Angriffen [Haapasalo *et al.* 1987]. Ørstavik und Haapasalo untersuchten den Vitalitätszustand von *E. faecalis* in Rinderzähnen nach Substratzug. Nach sieben Tagen ohne Substrat zeigte sich *E. faecalis* noch anzüchtbar [Ørstavik und Haapasalo 1990]. Ein nachteiliger Aspekt der Studie von Ørstavik und Haapasalo ist die Tatsache, dass nicht humane Proben, sondern artifiziell infizierte Rinderdentinproben untersucht wurden. Dentinkanälchen von Rinderzähnen sind im Durchmesser größer [Perez *et al.* 1993] und die Anzahl der querangeschnittenen Dentinkanälchen pro mm² im Wurzelentin ist vergleichsweise höher als bei humanem Dentin [Schilke *et al.* 2000]. In der vorliegenden Studie konnte die Penetration durch *E. faecalis* mithilfe fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen optisch dargestellt werden. Diese zeigen, dass die Wachstumsbedingungen ausreichend dafür waren, nach sieben Tagen Inkubationszeit einen Biofilm von *E. faecalis* zu bilden (Abb. 16, 17).

Aufgrund der individuellen Morphologie und Anatomie der Wurzelkanäle war es jedoch nicht möglich, eine identische Ausgangsbakterienzahl zu erreichen. Trotz standardisierter Aufbereitung und Beimpfung konnte eine hohe Varianz in der Bakterienzahl nicht verhindert werden, jedoch unterschieden sich die Ausgangsbakterienzahlen zwischen den Gruppen nicht signifikant (Abb. 15). Durchschnittlich lag eine Bakterienzahl von $6,24 \times 10^6$ CFU/ml (Kapitel 7.1.) vor, was eine klinisch realistische Bakterienbelastung innerhalb des Wurzelkanals darstellt. In infizierten Wurzelkanälen kommen zwischen 4×10^5 bis $2,6 \times 10^6$ Bakterien vor [Giardino *et al.* 2009]. Durch die sterile Nährlösung, die sterile Inkubation und auch das sterile Arbeiten wurde das gezielte Wachstum der Versuchsbakterien in den Kanälen ermöglicht. Unter Berücksichtigung der Limitationen des vorliegenden experimentellen Designs ermöglichten die standardisierte Aufbereitung und Beimpfung sowie die identischen Umgebungsbedingungen einen reproduzierbaren Versuchsaufbau mit ausreichender Vergleichbarkeit.

8.2.2 Probenentnahme

Die Flüssigkeiten wurden aus dem Kanallumen mit längenmarkierten sterilen Papierspitzen entnommen. Dadurch konnte die Flüssigkeit aus dem apikalen Bereich extrahiert werden. Durch alleiniges Pipettieren wäre dies aufgrund der engen Kanallumina nicht möglich gewesen.

Die Entnahme der Dentinspäne mithilfe von Hedström-Feilen aus den verschiedenen infizierten Proben erfolgte mit gleichmäßigem Druck zirkumferent entlang der gesamten Wurzelkanalwand. Der Abtrag des Dentins ist nicht einheitlich und als variant für alle Zähne anzusehen, da er manuell erfolgte und die Wurzelkanäle trotz standardisierter Aufbereitung Varianzen aufwiesen.

Infolgedessen sind diese quantitativen Bestimmungen der Probenentnahme mit einem Interpretationsspielraum behaftet.

8.2.3 Auswertung

In diesem Studienmodell konnten verschiedene Behandlungen miteinander verglichen und *E. faecalis*-Bakterien unter ähnlichen Bedingungen wie in der klinischen Situation bei endodontischen Therapien untersucht werden. Der Nachweis von Mikroorganismen in den Proben wurde mittels der koloniebildenden Einheiten (KbE = CFU, *colony-forming units*) erzielt. Die Bestimmung der Infektionsrate durch die CFU

ist in der Mikrobiologie ein gängiges, etabliertes und auch kostengünstiges Verfahren, welches quantitative Aussagen zum Bakterienwachstum ermöglicht [Suerbaum *et al.* 2012]. Weiger und Kollegen (2002) zeigten, dass in primär infiziertem Wurzelkaries nach vierwöchiger Kalziumhydroxideinlage keine koloniebildenden Einheiten mehr nachweisbar waren, wohingegen nach selektiver Fluoreszenzmarkierung mit Vitalfarbstoffen noch vitale Mikroorganismen dargestellt werden konnten. Nachteilig ist, dass vitale, aber nicht kultivierbare Zellen kaum nachgewiesen werden können und es somit zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann, wenn die Bakterienzahl unterhalb der Nachweisgrenze liegt [Wu *et al.* 2006]. Um falsch negative Ergebnisse zu unterbinden, wurde in der vorliegenden Studie eine niedrige Nachweisgrenze gewählt. Peters und Kollegen zeigten, dass es keinen negativen Einfluss auf die Erfolgsrate der Behandlung hat, wenn eine niedrige Nachweisgrenze gewählt wird [Peters *et al.* 2002]. Eine weitere Untersuchung zum Nichtvorhandensein vitaler Zellen und auch zur klinischen Bedeutung wurde in dieser Studie nicht gemacht. Diese möglicherweise vorhandenen Zellen haben klinisch zudem nicht die optimalen Wachstumsbedingungen, da es im Idealfall nach der ordnungsgemäßen Durchführung der Wurzelkanalbehandlung zur Wurzelfüllung kommt. Möglicherweise kann in weiterführenden Studie zusätzlich ein ATP-Nachweisverfahren verwendet werden, um das Vorhandensein von lebensfähigen Bakterien während der Wurzelkanaltherapie zu bestimmen [Tan *et al.* 2015].

Exakte Quantifizierungen von Infektionen sind durch Strukturunregelmäßigkeiten in der Wurzelkanalwand schwierig [Siqueira *et al.* 2001, Sedgley *et al.* 2005, Siqueira und Rocas 2005, Rocas *et al.* 2006, Zoletti *et al.* 2006]. Bei dem in der vorliegenden Studie verwendeten Nachweisverfahren steht im Vordergrund, dass durch die Kulturbedingungen (Kulturmedium, Nährlösung, Umgebung) meist nur eine Auswahl aller vorkommenden Mikroorganismen erfasst wird.

Die Abschlussbakterienzahl in Wurzelkanal und Dentin wurde unmittelbar nach der Behandlung der Proben ermittelt, um die Auswirkungen der Desinfektionsmaßnahmen direkt nach der Anwendung auf die Bakterienzahl bestimmen zu können.

Sowohl die Ausgangs- als auch die Abschlussbakterienzahlermittlung im Wurzelkanal wurden identisch durchgeführt. Die ermittelten Werte der Abschlussbakterienzahl im Wurzelkanal wurden in drei Bakterienklassenbereiche eingeteilt (Tabelle 2, 4 und 5).

Die Abschlussbakterienzahl im Dentin stellte eine quantitative Messung dar, bei der die Wirksamkeit der verschiedenen Verfahren nachgewiesen werden konnte. Es

konnten durch die Bestimmung der planktonischen und adhärenen Bakterien Aussagen über den Wirkort der Maßnahmen getroffen werden. Die Entnahme einer Probe zur Messung des Ausgangswertes hätte den vorhandenen Biofilm zerstören können und damit die Ergebnisse sowie den Abtrag in Milligramm verfälschen können. Als kritisch ist die Überführung der Dentinspäne in das Flüssigmedium zur Bestimmung der Abschlussbakterienzahl im Dentin zu bewerten. Gleichmaßen problematisch kann die vorausgegangene Gewichtsmessung für den quantitativen Feilenabrieb betrachtet werden. Da dieser Vorgang ausschließlich mechanisch und manuell durchgeführt wurde, bestand die Gefahr, dass Probenmaterial von den endodontischen Nadeln und aus dem Probenlumen abfiel oder nicht komplett aufgenommen wurde. Um die Hygienekette nicht zu unterbrechen und mögliche Fehler zu vermeiden, wurde sehr sorgfältig gearbeitet. Für jede Probe und Messung wurden sterile Feilen und Handschuhe verwendet.

8.3 Diskussion der Ergebnisse

8.3.1 Wirksamkeit der Desinfektionsmaßnahmen

In der vorliegenden Untersuchung zeigte Kalziumhydroxid unabhängig von der chemo-mechanischen Aufbereitung und den verschiedenen Spüllösungen die größte Wirksamkeit in Bezug auf die Reduktion von *E. faecalis* und erreichte in jeder Untersuchungsgruppe den höchsten logarithmischen Reduktionsfaktor (siehe Tabelle 3.). Diese lagen (\pm Standardabweichung) zwischen $2,8 \pm 0,5$ (bei NaOCl) und $3,9 \pm 0,4$ (bei CHX-Spülung). Nach Bebrütung der planktonisch Endkeimzahl zeigten sich 90% der Proben unterhalb der Nachweisgrenze (Abbildung 24), bei den adhärenen Bakterien im Dentinabrieb waren es sogar 95% (Abbildung 30). Auch hier zeigte Calciumhydroxid die besten Ergebnisse im Vergleich zu den anderen Desinfektionsoptionen.

Die medizinische Einlage mit Kalziumhydroxid zeigte sich hier als effektiver Wirkstoff zur Bakterienelimination des *E. faecalis*, obwohl es Untersuchungen gibt, die belegen, dass *E. faecalis*-Resistenzen gegenüber $\text{Ca}(\text{OH})_2$ vorliegen können [Sirén *et al.* 2004]. Bei direktem Kontakt weist es die größte Wirksamkeit gegenüber den verschiedenen Mikroorganismen auf [Byström 1985]. Die Neutralisierung bakterieller Endotoxine durch $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Suspensionen [Buck *et al.* 2001] und die Hemmung ortsständiger Mikroorganismen [Grawehr *et al.* 2003] sind entscheidend für die Wirksamkeit.

In dieser Studie wurde eine pastöse Ca(OH)_2 -Suspension ohne weitere Zusätze verwendet. Glycerin und Propylenglycol, die bei Diffusionsuntersuchung mit Ca(OH)_2 diesem beigemischt wurden, beeinträchtigen die Dissoziation von Kalzium- und Hydroxylionen und somit die Erhöhung des pH-Wertes [Safavi und Nakayama 2000]. Bei einem Vergleich Ca(OH)_2 -haltiger Guttaperchastifte mit Ca(OH)_2 -Suspensionen zeigte sich, dass die Suspensionsapplikation die höchsten pH-Werte und somit die größere antibakterielle Wirkung im Kanal erreichen konnte [Schäfer und Al Behaissi 2000].

Um eine ausreichende Desinfektion in den Kanälen zu ermöglichen, wurde die Ca(OH)_2 -Paste für eine Woche im Wurzelkanal belassen. Lana und Kollegen untersuchten die Wirkung von Kalziumhydroxid mit und ohne Chlorophenol als medikamentöse Einlage [Lana *et al.* 2009]. Dafür wurden 70 Unterkiefer-Frontzähne nach standardisierter chemo-mechanischer Aufbereitung mit *E. faecalis*-Kulturen beimpft. Die Anwendung von Ca(OH)_2 als medikamentöse Einlage für sieben Tage erzielte eine Bakterienfreiheit, ebenso die 14-tägige Einlage von Kalziumhydroxid kombiniert mit Chlorophenol. Die chemo-mechanische Aufbereitung alleine war immer mit einer Restbakterienbelastung verbunden. So konnte nachgewiesen werden, dass erst die Applikation von Kalziumhydroxid als medikamentöse Einlage mit einer ausreichenden Liegedauer (abhängig vom Präparat) nach der chemo-mechanischen Aufbereitung die Bakterienzahl minimiert [Lana *et al.* 2009]. Haapasalo und Kollegen zeigten ebenfalls, dass eine siebentägige Liegezeit der Kalziumhydroxid-Einlage nötig war, damit in allen Wurzelbereichen ein Anstieg des pH-Wertes erzielt werden konnte [Haapasalo *et al.* 2000]. Nerwich und Kollegen untersuchten den Einfluss der Liegedauer von Kalziumhydroxid im Wurzelkanal auf den pH-Wert-Anstieg. Innerhalb von Stunden wurden die maximalen pH-Werte erreicht (9,7-10,8), jedoch erst nach Diffusion ins Wurzelentin hielt dieser Wert bis zu sieben Tage an. Auch hier wurde der positive Einfluss der langen Liegedauer nachgewiesen [Nerwich *et al.* 1993], was von Tronstad und Kollegen bestätigt wurde [Tronstad *et al.* 1981]. Dementsprechend kann die Applikationsdauer positiven Einfluss auf das Ergebnis der Ca(OH)_2 -Einlage genommen haben. Beachtet werden muss, dass durch einen Langzeiteffekt des Kalziumhydroxids zurückgebliebene Kalziumhydroxidreste die Probenentnahme und dadurch Ergebnisse verfälscht haben könnten. Die vollständige Entfernung der medikamentösen Einlage ist bedeutsam, um den Langzeiterfolg der Therapie zu ermöglichen, jedoch ist die komplette Entfernung von Kalziumhydroxid aus dem

Wurzelkanalsystem durch die Komplexität der Anatomie des Kanals schwer erreichbar [Ethem Yaylali *et al.* 2015, Ma *et al.* 2015a, Ma *et al.* 2015b]. Dadurch kann der Langzeiterfolg einer Wurzelkanalbehandlung beeinflusst sein; $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Reste können die Dichtigkeit der Wurzelkanalfüllung sowie die Adhäsion des Sealers beeinträchtigen [Kim & Kim 2002, Bottcher *et al.* 2010]. Daher sollte für eine vollständige Entfernung der medikamentösen Einlage eine Instrumentierung des Wurzelkanals auf eine oder mehrere ISO-Größen größer als das zuletzt verwendete Instrument in Kombination mit verschiedenen Spüllösungen vorgesehen werden [Rödig *et al.* 2010, Lambrianidis *et al.* 2006]. Entscheidend ist dann das Spülprotokoll: Für die Entfernung von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Resten wird die Natriumhypochlorit-Spüllösung als unzureichend bewertet [Salgado *et al.* 2009]. Empfohlen werden die Chelatoren EDTA und Zitronensäure, sie erzielen signifikant bessere Ergebnisse [Rödig *et al.* 2010]. Dies wird auf eine Chelatbildung von EDTA mit den $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Resten zurückgeführt. Im Anschluss können die gebundenen Komplexe durch die NaOCl-Spülung entfernt werden.

In dieser Untersuchung zeigte sich Chlorhexidin als Desinfektionsmaßnahme im Vergleich mit Kalziumhydroxid als unterlegen, auch wenn es bei allen Spülprotokollen gute Ergebnisse erzielte: Die logarithmischen Reduktionsfaktoren (siehe Tabelle 3) lagen in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Untersuchungsgruppen zwischen $2,6 \pm 0,9$ (Kontrollgruppe) und $3,1 \pm 1,2$ (NaOCl). Nach Bebrütung der planktonisch Endkeimzahl zeigten sich 56% der Proben unterhalb der Nachweisgrenze (Abbildung 24), bei den adhärennten Bakterien im Dentinabrieb waren es sogar 93% (Abbildung 30). Im Widerspruch zu der vorliegenden Arbeit gibt es Untersuchungen, die belegen, dass CHX-Gel dem Kalziumhydroxid als medikamentöse Einlage hinsichtlich der Bakterienelimination überlegen ist. Schäfer und Kollegen untersuchten die Wirksamkeit von Chlorhexidin (2 %) und Kalziumhydroxid als medikamentöse Einlage auf *E. faecalis* in humanen Wurzelkanälen nach dreitägiger Inkubation [Schäfer *et al.* 2005]. Chlorhexidin war signifikant effektiver als Kalziumhydroxid und die Kombination von Kalziumhydroxid mit Chlorhexidin als medikamentöse Einlage [Schäfer *et al.* 2005]. In einem anderen Studienmodell wurden präparierte Guttaperchastifte miteinander verglichen; $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -haltige Guttaperchastifte zeigten eine bessere Hemmung des Bakterienwachstums als CHX-haltige Guttaperchastifte [Podbielski *et al.* 2000, Delgado *et al.* 2010]. Bei diesen Versuchen muss jedoch bedacht werden, dass es verschiedene Faktoren gibt, die einen Vergleich erschweren. Möglicherweise war die Medikamentenabgabe effektiver, die Verarbeitung des jeweiligen

Medikaments besser oder schlechter oder Guttapercha hat möglicherweise die Wirkung des jeweiligen Medikaments unterbunden.

Chlorhexidin verfügt über ein breites Wirkspektrum gegen grampositive und gramnegative Mikroorganismen sowie gegen Pilze, Viren und Hefen [Henessey 1973, Fardal und Turnbuhl 1986]. Daher wird es auch in der Endodontie als antimikrobielle Spüllösung oder medikamentöse Zwischeneinlage bei Wurzelkanalbehandlungen verwendet [Vahdaty *et al.* 1993, Buck *et al.* 1999]. Delgado und Kollegen verglichen die Effektivität von pastenförmigem Kalziumhydroxid und Chlorhexidin-Gel bei der Reduktion von *E. faecalis* [Delgado *et al.* 2010]. Dazu wurden einwurzelige Zähne standardisiert aufbereitet und mit *E. faecalis* beimpft. Chlorhexidin wies einen höheren antimikrobiellen Effekt auf ($p < 0,05$) als Kalziumhydroxid bzw. die Kombination aus beiden Präparaten.

Im Gegensatz zu diesen Studien war Chlorhexidin (55,7 % Bakterienfreiheit im Wurzelkanal) in der vorliegenden Studie als medikamentöse Einlage dem Kalziumhydroxid (90,0 % Bakterienfreiheit) unterlegen ($p < 0,05$) (Abb. 24). Kalziumhydroxid weist so lange einen antimikrobiellen Effekt auf, wie ein basischer pH-Wert im Wurzelkanalsystem vorherrscht [Siqueira und Lopes 1999]. CHX ist ein kationisches Molekül, welches durch Substantivität seine antimikrobielle Wirksamkeit entfaltet [Mohammadi und Abott 2009]. Dementsprechend hängt die Substantivität von der Konzentration des CHX-Präparates ab. Das Ergebnis könnte in diesem Fall also dadurch beeinflusst sein, dass die Konzentration des CHX-Gel-Präparates (1 %) in diesem Versuch nicht ausreichend hoch war; Wang und Kollegen empfehlen 2%iges CHX-Gel [Wang *et al.* 2007].

Die Anwendung von Ozongas konnte erst in der Kombination mit desinfizierenden Spüllösungen überzeugende Ergebnisse liefern. Der logarithmische Reduktionsfaktor (\pm Standardabweichung) erhöhte sich von $1,4 \pm 1,0$ (Kontrollgruppe) und $2,3 \pm 0,9$ (NaOCl) auf $3,7 \pm 0,3$ (NaOCl) und $3,8 \pm 0,4$ (CHX, siehe Tabelle 3). Mit den desinfizierenden Spüllösungen kombiniert wurden sowohl bei den planktonischen, als auch bei den adhärenen Bakterien im Dentinabrieb in 100% der Proben eine Bakterienreduktion unter der Nachweisgrenze erreicht (Abbildungen 22, 23, 28 und 29). Das gasförmige Ozon kann aufgrund seiner Molekülgröße besser in die Dentinkanälchen diffundieren, als es flüssige, gelförmige und pastöse Substanzen mit einer höheren Viskosität können. Die Durchmesser der Dentinkanälchen im Wurzelkanal variieren: Im Pulpenkammerbereich beträgt der Durchmesser 1,7 bis

2,8 µm. An der Dentin-Schmelz-Grenze liegt er nur noch bei 1,0 bis 1,3 µm [Forsell-Ahlberg *et al.* 1975]. Somit kann Ozon tiefer in die Dentintubuli eindringen, als es Bakterien können, da innerhalb des Ozonmoleküls der Molekülabstand 128 pm beträgt [Mortimer 1996] und im Durchschnitt das kleinste Bakterium 0,1 µm groß ist [Dworkin *et al.* 2006]. Dadurch ist es möglich, dass das Ozon in tiefere Gewebsschichten als die Mikroorganismen selbst vordringt und dort seine antimikrobielle Wirkung entfalten kann; es ist in der Lage, dort Biomoleküle und Bakterienzellwände zu zerstören [Boch *et al.* 2015]. Darüber hinaus könnte die Wirksamkeit der Ozonapplikation durch die Vorbehandlung des Wurzelentins beeinflusst sein. Bei der mechanischen Aufbereitung wurde EDTA verwendet, welches die Schmierschicht im Kanal entfernt. Dies könnte die Penetration und die Tiefenwirkung des Ozongases verbessert haben. Um eine optimale Bakterienreduktion zu erzielen, sollte das Ozongas zweimalig appliziert werden [Huth *et al.* 2009]. Aus diesem Grund wurde Ozon in der vorliegenden Studie zwei Mal für je 60 Sekunden (Gesamtapplikationszeit 120 Sekunden) angewendet. Durch den komplexen Aufbau mit Ab- und Zulauf im geschlossenen System des Ozongerätes konnte ständig unverbrauchtes Ozon in die Kavität geleitet werden und verbrauchtes Ozon abtransportiert werden. Trotzdem ist die Wertigkeit als Desinfektionsmaßnahme in der Endodontie eingeschränkt, da eine vollständige Bakterienreduktion durch die alleinige Ozonbehandlung ausgeschlossen wird [Hems *et al.* 2005, Estrela *et al.* 2007, Kustarci *et al.* 2009]. Während Ozongas gegenüber planktonischem *E. faecalis* einen antimikrobiellen Effekt hat, kann es in vorhandenen, organisierten Biofilmen die Anzahl der Bakterien nicht verringern [Hems *et al.* 2005]. Auch in der vorliegenden Studie zeigte sich, dass Ozon ohne die Unterstützung von NaOCl eine geringere antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber *E. faecalis* hatte als Ca(OH)₂ und CHX (Abb. 20-21, 24-27, 30-31)

Innerhalb der Untergruppen zeigte die Kombination von NaOCl als Spüllösung und Ozon als Desinfektionsmaßnahme die größte Effektivität (100 % Bakterienfreiheit) (Abb. 22). Diese Aussage wird auch durch die In-vitro-Studie von Boch und Kollegen bestätigt [Boch *et al.* 2015]: Durch die Verwendung von NaOCl und den dadurch bedingten Zerfall des Biofilms gelingt es den Ozonmolekülen besser, in den Biofilm und in die Dentintubuli zu penetrieren.

Auch die Anwendung des Lasers konnte erst in der Kombination mit desinfizierenden Spüllösungen überzeugende Ergebnisse liefern. Der logarithmische Reduktionsfaktor (\pm Standardabweichung) erhöhte sich von $1,1 \pm 1,0$ (Kontrollgruppe) und $1,4 \pm 0,5$

(NaOCl) auf $3,4 \pm 0,6$ (NaOCl) und $3,8 \pm 0,4$ (CHX, siehe Tabelle 3). Mit den desinfizierenden Spüllösungen kombiniert wurden sowohl bei den adhärennten Bakterien im Dentinabrieb in 100% der Proben eine Bakterienreduktion unter der Nachweisgrenze erreicht (Abbildungen 28 und 29), bei den planktonischen Bakterien waren es 87% (NaOCl) und 93% (CHX, Abbildungen 22 und 23). Die bakterizide Wirkung von Laserstrahlen im Wurzelkanal wurde in mehreren Studien nachgewiesen [Gutknecht *et al.* 1996, Gutknecht *et al.* 2000, Moritz *et al.* 2000, Gutknecht *et al.* 2004, Kallis 2005] und empfohlen [Mathew *et al.* 2014]. Bergmanns und Kollegen zeigten, dass 99,7 % der *E. faecalis*-Kulturen durch die Verwendung eines Nd:YAG-Lasers eliminiert wurden [Bergmans *et al.* 2006]. Schoop und Kollegen erzielten eine Bakterienzahlreduktion um 10^3 für den Diodenlaser (810 nm) gegenüber *E. faecalis* [Schoop *et al.* 2006]. De Souza und Kollegen erreichten sogar eine 100%ige Elimination von *E. faecalis* mit dem Diodenlaser (830 nm) [de Souza *et al.* 2008]. Letzteres steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung, in der nur in 50,8 % der Proben eine Bakterienfreiheit erreicht wurde. Differenziert man die Ergebnisse allerdings nach verwendeter Spüllösung, zeigen sich bessere Ergebnisse, da hier eine Bakterienfreiheit der Proben dargestellt wurde: Bei der Kombination Laser mit Natriumhypochlorit konnten 86,7 % und bei der Kombination Laser mit Chlorhexidin 93,3 % der Proben bakterienfrei getestet werden (Abb. 23). Somit ist eine alleinige Kanaldesinfektion mit Laser nicht effizient, in Kombination mit antiseptischen Spüllösungen können jedoch gute Ergebnisse hinsichtlich der Bakterienreduktion erreicht werden. Bei der vorliegenden Studie wurden verschiedene Spüllösungen mit Medizinprodukten kombiniert, da diese Versuchsanordnung dem klinischen Ablauf am nächsten erscheint.

Bei der Laseranwendung können Nebenwirkungen wie z. B. eine Emphysementstehung und auch Zytotoxizität nicht auftreten, was im klinischen Alltag von großer Bedeutung ist [Yesilsoy *et al.* 1995, Gutknecht *et al.* 1996]. Weitere Vorteile sind der stimulierende Effekt auf das umliegende Gewebe des Wurzelkanals und auch die kurze Applikationsdauer [Gutknecht *et al.* 1996, Gutknecht *et al.* 2004]. Die Penetrationstiefe des Lasers im Vergleich zu Spüllösungen und medizinischen Einlagen bleibt diskussionswürdig, auch wenn Gutknecht und Kollegen mithilfe von exakten Temperaturregistrierungen die Effektivität der Laserbehandlung in therapeutisch unzugängliche Bereiche des Wurzelkanals zeigen konnten [Gutknecht 1999]. Zudem muss die von Kleemann beschriebene „Biostimulation“ bedacht werden

[Kleemann 2007]: Bakterien können nach der Applikation des Lasers mit subtherapeutischer Dosis eine photobiologische Wirkung erfahren, die mit einer Bakterienerhöhung und Wachstumsförderung einhergeht. Diese wird zwar erst ab der Verwendung von Dosen unter 100 J/cm^2 berichtet, welche im Wurzelkanal jedoch trotz optimaler Laserapplikation in biologischen Nischen vorkommen können [Kleemann 2007].

Zusammenfassend gesagt unterstützen die vorliegenden Ergebnisse Kalziumhydroxid als Goldstandard unter den Desinfektionsmaßnahmen bei der Multiple-visit-Behandlung, da es eine hohe Wirksamkeit auf *E. faecalis* zeigt, selbst wenn es mit einer Spüllösung kombiniert wird, die keine ausreichende antiseptische Wirkung aufweist.

Wird jedoch die One-visit-Methode angewandt, dann zeigen diese Ergebnisse, dass die Ozonbehandlung in Kombination mit der chemo-mechanischen Aufbereitung mit NaOCl eine vergleichbar hohe Bakterienzahlreduktion zeigt wie die medizinische Einlage mit Ca(OH)_2 und damit eine klinische Alternative darstellen könnte.

8.3.2 Wirksamkeit der Spüllösungen

Die antiseptischen Spüllösungen (CHX und NaOCl) wiesen erwartungsgemäß eine höhere Wirksamkeit ($p < 0,0001$) als die Vergleichsgruppen (keine Spülung und NaCl) auf. Chlorhexidin erreichte in 87,1 % der Proben eine Bakterienfreiheit im Wurzelkanal, NaOCl in 81,7 % (Abb. 25).

Generell waren Chlorhexidin-Spülungen effektiver als die medikamentöse Einlage von CHX-Gel (Abb. 20, 22, 23, 25). Dies scheint aufgrund der Konzentrationen zunächst nicht nachvollziehbar. Es muss allerdings beachtet werden, dass die Gesamtmenge des applizierten Chlorhexidins bei dem Spülvolumen deutlich höher lag als bei der medikamentösen Einlage. Zudem kann eine Flüssigkeit tiefer in die Dentinkanälchen eindringen, was zusätzlich die Wirksamkeit erhöht. Außerdem wird bei der Spülung ständig unverbrauchtes CHX nachgelegt, wohingegen es sich im Gel während der Liegezeit (sieben Tage) verbraucht und unwirksam wird. Gomes und Kollegen konnten zeigen, dass die 0,2%ige Chlorhexidin-Spülung nach 30 Sekunden Kontaktzeit auf *E. faecalis*-Kolonien wirkt, während Chlorhexidin-Gel (1 %) dafür 15 Minuten benötigte [Gomes *et al.* 2001]. Im Vergleich von 0,2%iger Lösung und 2%igem Gel konnte in den ersten 100 μm der Dentinkanälchen kein Unterschied in der Wirksamkeit festgestellt werden [Vahdaty *et al.* 1993]. CHX hat zwar eine hervorragende

antiseptische Wirkung, ist aber nicht in der Lage, pulpales Restgewebe aufzulösen wie NaOCl.

Natriumhypochlorit (NaOCl) zeigte mit 81,7 % Bakterienfreiheit eine vergleichbar gute Wirksamkeit hinsichtlich der Bakterienreduktion wie Chlorhexidin ($p > 0,05$) (Abb. 25). Es wird als potentes antimikrobielles Mittel und zur Gewebsresteentfernung bei der chemo-mechanischen Reinigung empfohlen [Baumgartner und Cuenin 1992, Oguntebi 1994, Ayhan *et al.* 1999, Siqueira *et al.* 2000]. Seine Wirksamkeit wurde in vielen Studien belegt [Hand *et al.* 1978, Andersen *et al.* 1992, Yang *et al.* 1995, Türkün *et al.* 1997]. Verbliebenes NaOCl in den Dentintubuli erwies sich als entscheidend für eine effektive Desinfektion [Hecker *et al.* 2013]. Kustarci zeigte in seiner Studie, dass NaOCl eine bessere antimikrobielle Wirkung erzielen konnte, als es durch Ozon möglich war [Kustarci *et al.* 2009]. Gomes konnte durch die Kombination von NaOCl und Chlorhexidin-Spüllösung die stärkste antibakterielle Wirkung gegenüber *E. faecalis* erreichen [Gomes *et al.* 2001]. Als Erklärung für diesen synergistischen Effekt wird die Bildung von Chlorhexidindichlorid diskutiert, welches die ionisierende Wirkung der CHX-Moleküle verstärken kann [Kuruvilla und Kamath 1998]. Andererseits muss beachtet werden, dass es aufgrund antagonistischer Wechselwirkungen bei direktem Kontakt zwischen NaOCl und CHX zur Ausfällung eines NaOCl-/CHX-Präzipitats, Parachloranillin (PCA), kommen kann. Diese orange-braune Verunreinigung des Kanalsystems erschwert die endodontische Therapie, z. B. durch den Verschluss der Dentinkanälchen, und hat in einigen Studien toxisches und kanzerogenes Potenzial gezeigt [Basrani *et al.* 2007; Prado *et al.* 2013]. Durch Anwendung einer Zwischenspülung z. B. mit steriler Kochsalzlösung oder Zitronensäure kann eine Präzipitation verhindert werden [Basrani *et al.* 2007; Prado *et al.* 2013].

Als alleinige Maßnahme ohne zusätzliche Aufbereitung des Kanals sind die antiseptischen Spüllösungen nicht in der Lage, *E. faecalis* zu eliminieren. Estrela und Kollegen verglichen die Wirkung von NaOCl (2,5 %) und CHX (2 %) auf *E. faecalis* bei einem konstanten Flow von 20 Minuten im Wurzelkanal. Beide Lösungen konnten *E. faecalis* nicht eliminieren [Estrela *et al.* 2003].

Da in der vorliegenden Studie das Natriumhypochlorit nach der Anwendung nicht mit Natriumthiosulfat inaktiviert wurde, kann eine Übertragung auf die Agarplatte und damit eine Unterbindung des Wachstums auf der Agarplatte mit der möglichen Gefahr falsch negativer Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden [Hecker *et al.* 2013]. Dennoch wird dieser mögliche Effekt von NaOCl kontrovers diskutiert und scheint bis

zu einer Konzentration von 3 % geringen Einfluss zu haben [Muhammad *et al.* 2014, Rossi-Fedele *et al.* 2010].

Abschließend lässt sich festhalten: Antiseptische Spüllösungen (CHX, NaOCl) sind ein obligater Teil der chemo-mechanischen Aufbereitung.

8.3.3 Abschlussbakterienzahl im Dentin

Die Abschlussbakterienzahl im Dentin ermöglicht Aussagen über die Wirksamkeit der Desinfektionsmethoden auf den adhärenen Biofilm und eine mögliche Penetration in die Dentintubuli.

Die medikamentösen Einlagen (Ca(OH)₂ mit 94,9 % Bakterienfreiheit, CHX 93,2 %) waren den Vergleichsgruppen (Ozon 68,3 %, Laser 67,2 %) überlegen ($p < 0,05$) (Abb. 30). Die relative Wirksamkeitssteigerung von CHX im Dentin (93,2 % bakterienfrei) im Vergleich zu der Abschlussbakterienzahl von CHX im Wurzelkanal (55,7 % bakterienfrei) kann in der Penetration von CHX in die Dentintubuli begründet liegen. Aufgrund seiner polaren Eigenschaften hat CHX eine hohe Affinität, sich an geladene Oberflächen anzulagern. Die Zahnoberfläche und auch die Dentintubuli weisen eine negative Oberflächenladung auf. So ist es dem CHX möglich, bis zu 100 µm tief in die Dentinkanälchen einzudringen und seine Wirkung zu entfalten [Barbosa *et al.* 1997]. Die Gesamtheit der penetrierten Dentintubuli weist eine größere Oberfläche auf als die Wurzelkanalwand alleine. Somit ist vergleichsweise mehr Chlorhexidin in den Dentintubuli verfügbar als auf der Wurzelkanaloberfläche und damit auch über einen längeren Zeitraum hinweg wirksam [Portenier *et al.* 2001, Portenier *et al.* 2005].

Ein negativer Einfluss der Pufferwirkung des Dentins auf Kalziumhydroxid konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht nachgewiesen werden (Abb. 30).

Vor allem bei niedrigen Konzentrationen des Ca(OH)₂ verhindert die Pufferkapazität des Dentins einen pH-Wert-Anstieg auf mehr als 11,5. Evans und Kollegen beobachteten bei der Kalziumhydroxid-Einlage lediglich einen Wert von 10,3 [Evans *et al.* 2002], welcher nicht ausreicht, um *E. faecalis* zu eliminieren [Siqueira 2002].

Auch bei den Spüllösungen konnte die Wirksamkeit des Einsatzes von Antiseptiva bestätigt werden. Chlorhexidin konnte in 100 % der Fälle eine Bakterienfreiheit erzielen, bei NaOCl waren es 95,0 % (Abb. 31). Diese Ergebnisse sind mit denen im Wurzelkanal vergleichbar. Berücksichtigt werden muss dabei, dass es möglicherweise zu einem falsch negativen Ergebnis kommt, wenn die Spüllösungen die

Mikroorganismen nicht eliminieren, sondern diese sich in einem Biofilm verschanzen oder sich in einer ruhenden inaktiven Phase befinden [Dahlén 2009]. Um falsch negative Ergebnisse während mikrobiologischer Kultivierung zu vermeiden, können spezifische und unspezifische Inhibitoren eingesetzt werden, welche eine Ausschaltung der antimikrobiellen Restwirkung erleichtern [Zamany und Spångberg, 2002]. Zamany und Spångberg verwendeten für das Blocking von CHX L-alpha lecithin in Tween 80 [Zamany und Spångberg, 2002]. Tween 80 ist eine polyoxyethylierte Verbindung, auch Polysorbat 80 genannt. Sie wird als Emulgator und Netzmittel bei Arzneimitteln verwendet.

8.3.4 Feilenabrieb der Dentinspäne

Der Feilenabrieb der Dentinspäne in mg wies eine hohe Varianz auf (Abb. 32). Die Proben mit medikamentösen Einlagen ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, CHX) wiesen einen höheren Abtrag als die Vergleichsgruppen (Ozon, Laser) auf ($p < 0,05$). Da die Probengewinnung weder druckkalibriert noch unter genormten Bedingungen erfolgte, sollten diese Unterschiede mit Vorsicht interpretiert werden.

Es kann die Möglichkeit bestehen, dass es zu Ansammlung von Kalziumhydroxid bzw. CHX in den Dentintubuli gekommen ist, die bei der Abschlusspülung nicht vollständig entfernt wurden. Die so „verstopften“ Kanälchen weisen beim Abrieb folglich mehr Masse auf, da das reine Dentingewicht durch Medikamentenreste verfälscht wurde. Yoldas zeigte in einer statistischen Analyse, dass die Verwendung von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ die Dentin-Mikrohärte verringert [Yoldas 2004]. Möglicherweise kann es auch in dieser Studie durch die medizinischen Einlagen zu einer chemischen Aufweichung der Wurzelkanalwand gekommen sein, die mit einem höheren Abtrag einhergeht. Um diese Interpretation zu festigen, müssten weitere Versuche durchgeführt werden.

Die mit Ozon und Laser behandelten Proben weisen einen relativ konstanten Abrieb auf ($p < 0,05$) (Abb. 32). Hier scheint es zu keinen Oberflächenveränderungen gekommen zu sein.

Die Spüllösungen hatten keinen signifikanten ($p = 0,124$) Einfluss auf die Quantität des Feilenabriebs (Abb. 32).

8.3.5 Bakteriellles Wachstum nach Desinfektion

Proben, die zur Abschlussbakterienzahlbestimmung bakterienfrei waren, wurden (unabhängig von verwendeter Desinfektionsmaßnahme und Spüllösung) erneut mit

Nährmedium befüllt und sieben Tage inkubiert. Dabei konnten trotz vorherigem Negativ-Nachweis aktive, teilungsfähige Bakterien nachgewiesen werden (Abb. 33). Im Wurzelkanal zurückbleibende, vitale Bakterien können in bis zu 80 % der Fälle das Wurzelkanalsystem nach zwei bis sieben Tagen reinfizieren [Spratt et al. 2001, Torabinejad et al. 2002]. Zamaný und Kollegen zeigten, dass mit konventioneller Aufbereitung und Spüllösung nach einer Inkubationszeit von vier Wochen ein erneutes Bakterienwachstum zu verzeichnen war [Zamaný *et al.* 2003]. Eine Reinfektion scheint laut den genannten Studien quasi unvermeidbar. Auch in der vorliegenden Untersuchung kam es – abhängig vom zuvor verwendeten Desinfektionsverfahren – in vielen Fällen zu einem erneuten Bakterienwachstum: Bei 75,0 % der Ozon-Proben und 66,6 % der Laser-Proben kam es zu einem erneuten Wachstum von *E. faecalis* (Abb. 33). Bei den Proben mit medikamentösen Einlagen waren diese Werte geringer (CHX 21,4 %, Ca(OH)_2 38,5 %) (Abb. 33). Dies ist durch die höhere Substantivität der medikamentösen Einlagen zu erklären. Aufgrund der chemischen Eigenschaften der medizinischen Einlagen kommt es zu einer Penetration in die Dentinkanälchen und somit zu einer möglicherweise optimierteren Wirkung (siehe Kapitel 6.3.3). Die Anwendung von Laser und Ozon bewirkt weder eine Langzeitwirkung noch eine posttherapeutische Penetration in die Dentintubuli, was eine mögliche Erklärung für die vorliegenden Ergebnisse ist.

Eine Langzeitaussage über zurückbleibende, überlebende Mikroorganismen nach einer längeren Latenzphase ist mit den vorliegenden Daten nicht möglich. In-vitro-Versuche an abgefüllten Wurzelkanälen zeigten jedoch nach einem Jahr ohne Substratzufuhr vitale *E. faecalis*-Stämme [Sedgley et al. 2005]. Offensichtlich verwertet das Bakterium Serum als Nahrungsquelle, dabei sind geringste Mengen an Serum für den bakteriellen Metabolismus der Bakterien ausreichend [Figdor 2004, Sedgley et al. 2005]. Dies ist auch eine Erklärung für die hohe Prävalenz von *E. faecalis* bei endodontischen Misserfolgen.

8.3.6 Konsequenzen für den klinischen Alltag

Klinisch ist die Umsetzung des sterilen Konzepts, wie es in dieser Untersuchung durchgeführt wurde, in der bakterienbesiedelten Mundhöhle erschwert. Bei jedem Zugang zum Kanalsystem kann es zu einer bakteriellen Transmission kommen. Dies wurde im Versuchsaufbau ausgeschlossen. Um die Voraussetzungen für eine erfolgreiche endodontische Therapie am Patienten zu erhöhen, ist die Verwendung

von Kofferdam obligat. Nur so kann der Zahn von der Mundhöhle isoliert werden, um eine Kontamination des Wurzelkanalsystems über mikrobiell belastete Atemluft und Speichel mit großer Sicherheit zu verhindern [Georgi und Hülsmann 2006].

Die vorliegenden Ergebnisse beziehen sich auf die Wirksamkeit gegenüber *E. faecalis*. Der infizierte Wurzelkanal weist aber immer eine Mischflora und somit auch einen komplexen Biofilm auf. Sind Mikroorganismen im Biofilm organisiert, verändert sich ihre Sensitivität auf antimikrobielle Substanzen und Maßnahmen [Saini et al. 2001]. Shen und Kollegen untersuchten die antibakterielle Wirksamkeit von Chlorhexidin auf den dentalen Biofilm [Shen et al. 2011]. Sie zeigten, dass „reifer“ Biofilm (drei Wochen alt) und „inaktiver“ Biofilm (6-12 Wochen Karenz der Substratzufuhr) widerstandsfähiger gegen Chlorhexidin waren als ein sich etablierender Biofilm, der zwischen zwei Tagen und zwei Wochen alt war [Shen et al. 2011]. Dementsprechend können die vorliegenden Ergebnisse möglicherweise nicht auf Mischinfektionen übertragen werden. Es gilt zu beachten, dass Monoinfektionen, die von einer antiseptischen Methode erfolgreich bekämpft werden, nicht unbedingt auch Erfolge bei der Bakterienelimination von Mischinfektionen erzielen [Vahdaty et al. 1993, Ohara et al. 1993, Portenier et al. 2006, Zehnder 2006].

Die konventionelle chemo-mechanische Aufbereitung mit der Spüllösung NaOCl oder CHX kombiniert mit der medikamentösen Einlage $\text{Ca}(\text{OH})_2$ konnte hinsichtlich der Elimination von *E. faecalis* den besten Wirkungsgrad erzielen. Dies ist besonders vor dem Hintergrund zu betrachten, dass vitale *E. faecalis*-Stämme auch bei fehlender Substratzufuhr noch ein Jahr lang im Wurzelkanal nachgewiesen werden können [Sedgley et al. 2005].

Chlorhexidin-Gel als medizinische Einlage erreichte in dieser Studie nicht die Effizienz von $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Warum das Chlorhexidin in Gelform nicht den Wirkungsgrad der Spüllösung erreicht hat, sollte durch weitere Studien analysiert werden.

Weder die Applikation von Ozongas noch die Laser-Anwendung konnte die desinfizierende Potenz von Kalziumhydroxid erreichen. Werden die einzelnen Anwendungen betrachtet, so scheint kein anderes Verfahren an den Wirkungsgrad von Kalziumhydroxid heranzureichen. Dies ändert sich für den Fall der One-visit-Behandlung durch den Einsatz der desinfizierenden Spüllösungen. Die zusätzliche Anwendung von NaOCl konnte die Ergebnisse deutlich verbessern. Ozon in Kombination mit NaOCl erreichte eine hohe Bakterienreduktion (Abb. 22 und 28). Dies legt den Schluss nahe, dass Kalziumhydroxid bei Schmerzbehandlungen oder

Zeitmangel eine ideale Wahl ist, da man durch dessen Einsatz ein gutes Ergebnis erzielt. Jedoch müssen die Gefahr einer Rekontamination durch die provisorische Füllung während der Liegedauer und die spätere erschwerte Entfernbarkeit des Kalziumhydroxids berücksichtigt werden. Diese Problematik besteht bei der One-visit-Behandlung nicht, da der Zahn in einer Sitzung abschließend behandelt wird. Hier können Ozon und NaOCl in Kombination mit antibakteriellen Spüllösungen eine hohe Bakterienzahlreduzierung erzielen. Es zeigte sich in dieser Studie, dass die physiologische Kochsalzlösung als unterstützende Spüllösung kein suffizientes Spülmedium für die endodontische Anwendung ist.

Unter den vorliegenden Studienbedingungen zeigten Natriumhypochlorit und Chlorhexidin vergleichbar gute Werte. Dieses Ergebnis und der Einsatz dieser Spüllösungen sind im klinischen Alltag differenziert zu betrachten, ebenso deren Wirkungsgrad. Da CHX nicht die gewebeauflösenden Eigenschaften des NaOCl besitzt, kann es als alleiniges Spülmedium nicht eingesetzt werden. In klinischer Hinsicht wäre eine Spülkombination aus NaOCl und CHX angebracht, um die verschiedenen Eigenschaften abzudecken. Dies wird auch in einer Studie von Cachovan und Kollegen (2013) dargestellt; NaOCl war als alleinige Spüllösung nicht so effektiv wie in Kombination mit CHX. In diesem Zusammenhang muss weiterhin darauf geachtet werden, dass eine falsche Anwendung und Handhabung der Spüllösungen zu einem Misserfolg der Wurzelkanalbehandlung führen kann. Um diese, die Wurzelkanalbehandlung erschwerenden Präzipitate auszuschließen und damit die Erfolgchancen der endodontischen Behandlung zu erhöhen, sollten Zwischenspülungen erfolgen.

9. Schlussfolgerung

Das Prinzip der One-visit-Wurzelkanalbehandlung wird für die Therapie von infizierten Wurzelkanälen kontrovers diskutiert. Ihre Vorteile gegenüber der Multiple-visit-Behandlung liegen im kürzeren Zeitaufwand und dadurch bedingt einer Reduzierung des Risikos der Rekontamination durch weiteres Öffnen des Wurzelkanals. Um bei diesem einzeitigen Vorgehen eine optimale Bakterienreduktion zu erzielen, werden Desinfektionsmaßnahmen wie die Applikation von Laser oder Ozon vorgeschlagen. Die alleinige Anwendung von Laser und Ozon ohne Spülprotokoll zeigte in dieser In-vitro-Studie keine signifikant ausreichende Effektivität gegenüber dem *E. faecalis*-Biofilm. Gleichwohl reduzierte während der chemo-mechanischen Aufbereitung mit NaOCl als Spüllösung die Ozonapplikation *E. faecalis* signifikant zu 100 %. Sowohl die Ozon- als auch die Laserapplikation sind optionale Desinfektionsmaßnahmen zusätzlich zur chemo-mechanischen Aufbereitung im Rahmen der One-visit-Wurzelkanalbehandlung bei mit *E. faecalis* infizierten Wurzelkanälen. Im Zusammenhang mit der One-visit-Wurzelkanalbehandlung könnte daher der Einsatz dieser Medizingeräte empfehlenswert sein, um die Desinfektionswirkung der chemo-mechanischen Aufbereitung zu erhöhen und so das Rekontaminationsrisiko zu reduzieren.

Eine zentrale Rolle kommt bei der chemo-mechanischen Aufbereitung den verwendeten Spüllösungen zu: Bei allen mit NaOCl aufbereiteten Zähnen konnten durchschnittlich weniger Bakterien nachgewiesen werden. Alle Proben nach Einsatz der CHX-Spülung und 95 % der mit NaOCl-Spülung behandelten Proben wiesen (unabhängig von der Desinfektionsmaßnahme) eine Bakterienfreiheit des Dentinabriebs auf. Beide Spüllösungen zeigten somit eine hohe Effektivität gegenüber *E. faecalis*.

Kalziumhydroxid wies auch ohne chemo-mechanische Aufbereitung die signifikant höchste Wirksamkeit sowohl im Wurzelkanal als auch im Dentin auf. Dieses Ergebnis unterstreicht den Stellenwert von Kalziumhydroxid als medizinische Einlage bei der Multiple-visit-Wurzelkanalbehandlung, auch wenn eine chemo-mechanische Aufbereitung des Wurzelkanals unverzichtbar bleibt.

Ob die Desinfektion mit Ozon oder Diodenlaser zusätzlich zur chemo-mechanischen Aufbereitung mit NaOCl oder CHX als Spüllösung klinisch einen Einfluss auf das Behandlungsergebnis nach One-visit-Wurzelkanalbehandlungen hat, müssen entsprechende Langzeit-in-vivo-Untersuchungen zeigen. Daher erscheinen auf Basis

der Daten dieser In-vitro-Studie weitere Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* zur Anwendung von Ozon und Laser in Kombination mit der chemo-mechanischen Aufbereitung von Interesse.

10. Literaturverzeichnis

Abu-Naba`a L, Al Shorman H, Stevenson M, Lynch E. Ozone treatment of pit and fissure caries: 6-months results. *J Dent Res* 2003, 82.

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.

Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-Garcia M, Baca P. Enterococcus faecalis biofilms eradication by root canal irrigants. *J Endod*. 2009 May, 35(5): 711-4

Ayhan H, Sultan N, Çirak M, Ruhi MZ, Bodur H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *Int Endod J* 1999, 32:99-102.

Azarpazhooh A, Limeback H: The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. *J Dent* 2008, 36:104-16.

Barbosa CA, Goncalves RB, Siqueira JF, Jr., de Uzeda M. Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. A clinical and laboratory study. *J Endodon* 1997, 23(5):297-300.

Barnhart BD, Chuang A, Lucca JJ, Roberts S, Liewehr F, Joyce AP. An in vitro evaluation of the cytotoxicity of various endodontic irrigants on human gingival fibroblasts. *J Endod* 2005, 31(8):613-5.

Barthel C, Georgi M, Schäfer E, Petschelt A, Flachsenberg S, Neuber T, Kockapan C, Weiger R, Hülsmann. Die Wurzelkanalspülung, Stellungnahme der AG Endodontologie und Traumatologie der DGZ. Version 1.0, DZZ 10/2006

Basrani BR, Manek S, Sodhi RN, Fillery E, Manzur A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *J Endod* 2007, 33:966-9.

Baumgartner JC, Cuenin PR. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. *J Endod* 1992, 18(12):605-12.

Baumgartner JC, Ibay AC. The chemical reactions of irrigants used for root canal debridement. *J Endod* 1987, 13(2):47-51.

Baysan A. Management of primary root caries using ozone therapies. PhD thesis. Belfast: Queens University 2002.

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.

Boch T, Tennert C, Vach K, Al-Ahmad A, Hellwig E, Polydorou O. Effect of gaseous ozone on Enterococcus faecalis biofilm-an in vitro study. *Clin Oral Investig* 2015.

- Borssen, JA, Sundquist, G. Actinomyces of infected dental root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981, 51:643.
- Bottcher DE, Hirai VH, Da Silva Neto UX, Grecca FS. Effect of calcium hydroxide dressing on the long-term sealing ability of two different endodontic sealers: an in vitro study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010, 110(3), 386-389.
- Bradford CE, Eleazer PD, Downs KE, Scheetz JP. Apical pressures developed by needles for canal irrigation. *J Endod* 2002, 28(4):333-5.
- Bringmann G. Die Wirkung von Ozon auf Organismen des Trinkwassers. *Z Hyg Infektionskr* 1954, 139:333-7.
- Brown DC, Moore BK, Brown CE Jr, Newton CW. An in vitro study of apical extrusion of sodium hypochlorite during endodontic canal preparation. *J Endod* 1995, 21(12):587-91.
- Buck, RA, Cai J, Eleazer PD, Staat RH, Hurst HE. Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide. *J Endod* 2001, 27:325-7.
- Bui TB, Baumgartner JC, Mitchell JC. Evaluation of the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate and its effect on root dentin. *J Endod* 2008, 34:181-5.
- Buttler TK, Crawford JJ. The detoxifying effect of varying concentrations of sodium hypochlorite on endotoxins. *J Endod* 1982, 8(2):59-66.
- Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983, 5:307-12.
- Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1985, 1(5):170-5.
- Cachovan G, Schiffner U, Altenhof S, Guentsch A, Pfister W, Eick S. Comparative antibacterial efficacies of hydrodynamic and ultrasonic irrigation systems in vitro. *J Endod*. 2013 Sep;39(9):1171-5. doi: 10.1016/j.joen.2013.06.008.
- Calışkan MK, Türkün M, Alper S. Allergy to sodium hypochlorite during root canal therapy: a case report. *Int Endod J* 1994, 27(3):163-7.
- Case PD, Bird PS, Kahler WA, George R, Walsh LJ. Treatment of root canal biofilms of *Enterococcus faecalis* with ozone gas and passive ultrasound activation. *J Endod* 2012, 38(4):523-6.
- 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.
- Cymbler DM, Ardakani P. Sodium hypochlorite injection into periapical tissues. *Whitecross Dental Care*, London, England. 1994, 21(8):345-6.

Dahlén, Gunnar. Culture-Based Analysis of Endodontic Infections, Chapter 4, Endodontic Microbiology (Englisch) Gebundene Ausgabe, Verlag: John Wiley & Sons; Auflage: 1 (27. März 2009), ISBN-10: 0813826462 27.

Dakin HD. The antiseptic action of hypochlorites: the ancient history of the "new antiseptic". *Brit Med J* 1915, 2:809-10.

Dalton BC, Ørstavik D, Phillips C, Pettiette M, Trope M. Bacterial reduction with nickel-titanium rotary instrumentation. *J Endod* 1998, 24:763-7.

Dammaschke T, Schneider U, Stratmann U, Yoo JM, Schäfer E, Effect of root canal dressings on the regeneration of inflamed periapical tissue. *Acta Odontol Scand* 2005, 63(3):143-52.

Delgado RJ, Gasparoto TH, Sipert CR, et al. Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2010, 36(8),1389-93.

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.

Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, KH, Stackebrandt, E.; *The Prokaryotes, A Handbook of the Biology of Bacteria*. 7 Bände, 3. Auflage, Springer-Verlag, New York 2006

Estrela C, Rodrigues de Araújo Estrela C, Bammann LL, Pecora JD. Two methods to evaluate the antimicrobial action of calcium hydroxide paste. *J Endod* 2001, 27 (12):720-3.

Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CR, Pecora JD, Sousa-Neto MD. Antimicrobial effect of 2 % sodium hypochlorite and 2 % chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J* 2003, 14(1):58-62.

Estrela C, Estrela CRA, Decurio DA, Hollanda ACB, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexine in infected human root canals. *Int Endo J* 2007, 40:85-93.

Ethem Yaylali I, Kececi AD, Ureyen Kaya B. Ultrasonically Activated Irrigation to Remove Calcium Hydroxide from Apical Third of Human Root Canal System: A Systematic Review of In Vitro Studies. *J Endod* 2015, 41(10), 1589-1599.

Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002, 35(3):221-8.

Fabricius L, Dahlen G, Sundqvist G, Happonen RP, Moller AJ. Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. *Eur J Oral Sci* 2006, 114(4):278-85.

Fardal O., Turnbuhl RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J Am Dent Assoc* 1986, 112(6):863-9.

Figdor D. Microbial aetiology of endodontic treatment failure and pathogenic properties of selected species. *Aust Endod J* 2004, 30(1):11-4.

Filippi A, Tilkes F, Beck EG, Kirschner H. Wasserdesinfektion zahnärztlicher Behandlungseinheiten durch Ozon. *Dtsch Zahnärztl Z* 1991, 46:485-7.

Filippi A. Klinisch-experimentelle Untersuchungen zur Wundheilung von Oralgeweben unter Einfluß von Ozonwasser. Gießen: Justus-Liebig-Universität. 1999.

Fischer P, Thofern E, Botzenhardt K. Vergleichende Untersuchungen zur Wirksamkeit von Chlor und Ozon auf Bakterien und Sporen. *Zentralbl Bakteriol (Orig B)* 1978, 166:399.

Forsell-Ahlberg K, Brannström M, Edwall I. The diameter and number of dentinal tubules in rat, cat, dog and monkey: A comparative scanning electron microscopic study. *Acta odont Scand* 1975, 33:243-50.

Frentzen M. Laser in der Endodontie - eine Übersicht. *ZWR* 2002, 111:375-90.

Frentzen M, Koort HJ. Lasertechnik in der Zahnheilkunde. *Dtsch Zahnärztl Z* 1991, 46:443-54.

Gambal A, Hülsmann M. Die maschinelle Wurzelkanalaufbereitung mit dem Tri-Auto-ZX-Winkelstück. *Endodontie* 2003, 12(4):353-64.

Gängler P, Hoffmann T, Willershausen B, Schwenzer N, Ehrenfeld M. Zahn-Mund-Kieferheilkunde. Lehrbuchreihe zur Aus- und Weiterbildung, Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie. 2010, Kapitel 6 Zahnkaries – Therapie und Nachsorge, Wurzelkanalbehandlung S228-233.

Georgi M, Hülsmann M. Keine Wurzelkanalbehandlung ohne Kofferdam. *ZM* 2006, 96(7):12-13.

Giardino L, Savoldi E, Ambu E, Rimondini R, Palezona A, Debbia EA. Antimicrobial effect of MTAD, Tetraclean, Cloreximid, and sodium hypochlorite on three common endodontic pathogens. *Indian J Dent Res* 2009, 20(3):391.

Gomes BPFA, Ferraz CCR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antibacterial activity of endodontic irrigants in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2000, 26:555.

Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001, 34(6):424-8.

Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, et al. Effectiveness of 2 % chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J* 2003, 36(4):267-75.

Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa EL, et al. Enterococcus faecalis in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006, 102(2):247-53.

Grawehr M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M. Interactions of ethylenediamine tetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. Int Endod J. 2003 Jun, 36(6) 411-7

Greenstein G, Berman C, Jaffin R: Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. J Periodontol 1986, 57: 370-7.

Guerisoli DM, Marchesan MA, Walmsley AD, Lumley PJ, Pecora JD. Evaluation of smear layer removal by EDTAC and sodium hypochlorite with ultrasonic agitation. Int Endod J 2002, 35(5):418-21.

Guldener PHA, Langeland K. Endodontologie. Stuttgart: Thieme, 1993.

Gutknecht, N. Lasertherapie in der zahnärztlichen Praxis. Die Anwendung unterschiedlicher Lasertypen in ihren jeweiligen Spezialgebieten. Quintessenz Verlags-GmbH, 1999.

Gutknecht N, Moritz A, Conrads G, Sievert T, Lampert F. Bactericidal effect of the Nd:YAG laser in in vitro root canals. J Clin Laser Med Surg 1996, 14(2):77-80.

Gutknecht N, van Gogswaardt D, Conrads G, Apel C, Schubert C, Lampert F. Diode laser irradiation and its bactericidal effect in root canal wall dentin. J Clin Laser Med Surg 2000, 18:57-60.

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.

Haapasalo M, Ørstavik D. In Vitro infection and disinfection of dentinal tubules. J Dent Res 1987, 31:1-7.

Haapasalo HK, Sirén EK, Waltimo TM, Ørstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. Int Endod J 2000, 33(2):126-31.

Haight Ponce E, Endo H, Horiuchi H. Endotoxin activity measured by limulus assay. Endod Dent Traumatol 1999, 15:109-12.

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

Hata G, Hayami S, Weine FS, Toda T, Effectiveness of oxidative potential water as a root canal irrigant. Int Endod J 2001, 34(4):308-17.

Hecker S, Hiller KA, Galler KM, Erb S, Mader T, Schmalz G. Establishment of an optimized ex vivo system for artificial root canal infection evaluated by use of sodium hypochlorite and the photodynamic therapy. Int Endod J. 2013 May, 46(5):449-57.

- Hems RS, Gulabivala K, Ready YL, Spratt DA. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *Int Endo J* 2005, 38:22-9.
- Henessey TD. Some antibacterial properties of chlorhexidine. *J Periodontol Res* 1973, 8:61-7.
- Henriques FC, Moritz AR. Studies of thermal injury II. *Am J Pathol* 1947, 23:695-720.
- Hof H, Dörries R. Medizinische Mikrobiologie. 3. Komplett überarbeitete und erweiterte Auflage, MLP Duale Reihe, Thieme, 2005.
- Hope CK, Garton SG, Wang Q, Burnside G, Farrelly PJ. A direct comparison between extracted tooth and filter-membrane biofilm models of endodontic irrigation using *Enterococcus faecalis*. *Arch Microbiol* 2010, 192:775-81.
- Hülsmann M. Die Aufbereitung des Wurzelkanals. In: Endodontie, Studienausgabe Praxis der Zahnheilkunde. München-Jena: Urban & Fischer, 2001.
- Hülsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation - literature review and case reports. *Int Endod J* 2000, 33(3):186-93.
- Huth KC, Hickel R. The role of ozone in "minimal intervention dentistry". In: Lynch E, ed. Ozone: the revolution in dentistry. London: Quintessence Verlag 2004, 117-24.
- Huth KC; Quirling M, Maier S, et al. Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a canal biofilm model. *Int Endod J* 2009, 42:3-13.
- Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0 % chlorhexidine gluconate and 5.25 % sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod* 1994, 20:276-8.
- Joffe E. Complication during root canal therapy following accidental extrusion of sodium hypochlorite through the apical foramen. *Gen Dent* 1991, 39(6):460-1.
- Johansson E, Claesson R, van Dijken JW. Antibacterial effect of ozone on cariogenic bacterial species. *J Dent* 2009, 37(6):449-53.
- Johnson BT. Uses of chlorhexidine in dentistry. *Gen Dent* 1995, 43:126-32.
- Joret JC, Block JC, Hartemann P, Richard Y. Wastewater disinfection: elimination of fecal bacteria and enteric viruses by ozone. *Ozone Sci Eng* 1982, 4:91.
- Kallis A. Bactericidal effect of different pulse duration on the endodontic marker germ *Enterococcus faecalis* using Nd:YAG (1064nm) laser radiation in dentine depths of 500 µm and 1000 µm. Master thesis at RWTH Aachen University. AALZ, 2005:5.
- Kaufman B, Spångberg L, Barry J, Fouad AF. *Enterococcus* spp. in endodontically treated teeth with and without periradicular lesions. *J Endod* 2005, 31(12):851-6.
- 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.

- Kim SK, Kim YO. Influence of calcium hydroxide intracanal medication on apical seal. *Int Endod J* 2002, 35(7), 623-628.
- Kimura Y, Wilder-Smith P, Matsumoto K. Lasers in endodontics: a review. *Int Endod J* 2000, 33:173-85.
- Kishen A, Advanced therapeutic options for endodontic biofilms. *Endodontic Topic* 2012, 22, 99-123.
- Kleemann, P. Bakterizide Wirkung des gepulsten Nd:YAG-Lasers auf *Prevotella intermedia* und *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Eine dosimetrische *In-vitro*-Studie. Master thesis at RWTH Aachen University, 2007.
- Klimm W, Krause L, Krause P, Wenzel J. Tierexperimentelle Untersuchungen zur Toxizität verschiedener Wurzelkanalantiseptika. *Stomatol DDR* 1989, 39:153-5.
- Koçkapan C. Curriculum Endodontie. Berlin: Quintessenz, 2003: 125–145
- Komorowski R, Grad H, Wu XY, Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin. *J Endod* 2000, 26(6):315-7.
- Kuruvilla JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5 % sodium hypochlorite and 0.2 % chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *J Endod* 1998, 24:472-6.
- Kuştarci A, Sümer Z, Altunbaş D, Koşum S. Bactericidal effect of KTP Laser irradiation against *Enterococcus faecalis* compared with gaseous ozone: an *ex vivo* study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009, 107(5): e73-9.
- Lambrianidis T, Kosti E, Boutsoukis C, Mazinis M: Removal efficacy of various calcium hydroxide/chlorhexidine medicaments from the root canal. *Int Endod* 2006 J 39, 55–61.
- Lambrianidis T, Margelos J, Beltes P. Removal efficiency of calcium hydroxide dressing from the root canal. *J Endod.* 1999 Feb, 25(2):85-8.
- Lana PE, Scelza MF, Silva LE, Mattos-Guaraldi AL, Hirata Júnior R. Antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes on *Enterococcus faecalis* cultivated in root canal systems. *Braz Dent J* 2009, 20(1):32-6.
- Löe H, Schiott CR. The effect of suppression of the microflora upon the development of dental plaque and gingivitis. In: McHugh WD, ed. *Dental Plaque*. Edinburgh: Livingstone, 1970, 247-55.
- Love RM, Chandler NP, Jenkinson HF. Penetration of smeared or no smeared dentine by *Streptococcus gordonii*. *Int Endod J* 1996, 29(1):2-12.
- Ma J, Shen Y, Yang Y, In vitro study of calcium hydroxide removal from mandibular molar root canals. *J Endod* 2015a, 41(4), 553-558.

- Ma JZ, Shen Y, Al-Ashaw AJ. Micro-computed tomography evaluation of the removal of calcium hydroxide medicament from C-shaped root canals of mandibular second molars. *Int Endod J* 2015b, 48(4), 333-341.
- Margelos J, Eliades G, Verdelis C, Palaghias G. Interaction of calcium hydroxide with zinc oxide-eugenol type sealers: a potential clinical problem. *J Endod.* 1997 Jan, 23(1):43-8.
- Mathew J, Emil J, Paulaian B, John B, Raja J, Mathew J. Viability and antibacterial efficacy of four root canal disinfection techniques evaluated using confocal laser scanning microscopy. *J Conserv Dent* 2014, 17(5), 444-448
- Masschelein W. Trinkwasser. In: Beck EG, Viehbahn-Hänsler R, eds. *Ozon-Handbuch: Grundlagen-Prävention-Therapie*. Landsberg: EcoMed 1995.
- 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.
- Millar BJ, Hodson N. Assessment of the safety of two ozone delivery devices. *J Dent* 2007, 35(3):195-200.
- Mohammadi Z. Laser applications in endodontics: an update review. *Int Dent J* 2009, 59(1):35-46.
- Moritz A, Jakolitsch S, Goharkhay K, et al. Morphologic changes correlating to different sensitivities of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* to Nd:YAG laser irradiation through dentin. *Lasers Surg Med* 2000, 26(3):250-61.
- Mortimer, Charles E., *Chemie, Das Basiswissen der Chemie*. 6. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 1996
- Mozo S, Llana C, Chieffi N, Forner L, Ferrari M. Effectiveness of passive ultrasonic irrigation in improving elimination of smear layer and opening dentinal tubules. *J Clin Exp Dent* 2014, 6(1): e47-52.
- Müller G, Ertl TH. *Angewandte Laser-Zahnheilkunde II-2.1*. Ecomed 1995, II-5.1.6; 1,3.
- Muhammad OH, Chevalier M, Rocca JP, Brulat-Bouchard N, Medioni E. Photodynamic therapy versus ultrasonic irrigation: interaction with endodontic microbial biofilm, an ex vivo study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2014 Jun, 11(2):171-81.
- Muschol A, Speer U. *Medizinische Mikrobiologie*. München: Mediscript 1981.
- 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.
- 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 Jun; 19(6): 302-6

- Nikawa H, Jin C, Mikihiro S, Egusa H, Hamada T, Kumagai H. Biofilm formation of *Candida albicans* on the surface of deteriorated soft denture lining materials caused by denture cleansers *in vitro*. J Oral Rehabil 2003, 30:243-50.
- Noetzel J a, Moter A, Walkenbach S, Schulze S, Neumann, Kielbassa AM. Wirksamkeit von Ozon und einem Diodenlaser gegenüber Biofilmen von *Candida albicans* in Wurzelkanälen. Autoreferate-Band der Deutschen Gesellschaft für Zahnerhaltung, 2009:96.
- Noetzel J b, 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, 22:14-18.
- Oguntebi BR. Dentine tubule infection and endodontic therapy implications. Int Endod J 1994, 27:218-22.
- Ohara P, Torabinejad M, Kettering JD. Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected anaerobic bacteria. Endod Dent Traumatol 1993, 9(3):95-100.
- Ørstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. Endod Dent Traumatol 1990, 6(4):142-9.
- Overdiek HF, Honrath L. Ozone in the treatment of root canal gangrene. Zahnärztl Welt 1951, 6:373-6.
- Paetz A. Wörterbuch Umweltuntersuchung: Begriffe, Definitionen und Erläuterungen aus den Bereichen Abfall, Boden, Wasser. Beuth Verlag 2011.
- Perez F, Calas P, de Falguerolles A, Maurette A. Migration of a *Streptococcus sanguis* strain through the root dentinal tubules. J Endod 1993, 19(6):297-301.
- Perez F, Calas P, Rochd T. Effect of dentin treatment on *in vitro* root tubule bacterial invasion. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1996, 82:446-51.
- Peters LB. Zur Frage der Infektion von Dentinkanälchen. Endodontie 2, 239 (1993) photodynamic therapy. Lasers Med Sci 2003, 18:51-5.
- 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(8):660-7.
- Podbielski A, Boeckh C, Haller B. Growth inhibitory activity of gutta-percha points containing root canal medications on common endodontic bacterial pathogens as determined by an optimized quantitative *in vitro* assay. J Endod 2000, 26:398-403.
- Podbielski A, Spahr A, Haller B. Additive antimicrobial activity of calcium hydroxide and chlorhexidine on common endodontic bacterial pathogens. J Endod 2003, 29(5):340-5.

- Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. *Int Endod J* 2001, 34(3):184-8.
- Portenier I, Waltimo T, Ørstavik k D, Haapasalo M. The susceptibility of starved, stationary phase, and growing cells of *Enterococcus faecalis* to endodontic medicaments. *J Endod* 2005, 31(5):380-6.
- Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *J Endod* 2006, 32(2):138-41.
- Prado M, Santos Junior HM, Rezende CM, Pinto AC, Faria RB, Simao RA, Gomes BP. Interactions between irrigants commonly used in endodontic practice: a chemical analysis. *J Endod* 2013, 39(4):505-10.
- Prucha J. Trinkwasser. In: Beck EG, Schmidt P, eds. *Hygiene in Krankenhaus und Praxis*. 1986. Berlin: Springer-Verlag, 430.
- Reeh ES, Messer HH. Long-term paresthesia following inadvertent forcing of sodium hypochlorite through perforation in maxillary incisor. *Endod Dent Traumatol* 1989, 5(4):200-3.
- Rice RG, Robson CM, Miller GW, Hill AG. Uses of ozone in drinking water treatment. *J Am Water Works Assoc* 1981, 73:44-57.
- Rocas IN, Siqueira Jr. JF, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic. *Oral Microbiol Immunol* 2006, 21:112-22.
- Rocas IN, Siqueira Jr. JF. Root Canal Microbiota of teeth with Chronic Apical Periodontitis. *Journal of Clinical Microbiology* 2008, 46(11):3599-606.
- Rödig T, Vogel S, Zapf A, Hülsmann M. Efficacy of different irrigants in the removal of calcium hydroxide from root canals. *Int Endod J* 2010, 43, 519–527.
- Rossi-Fedele G, Figueiredo JA, Steier L, Canullo L, Steier G, Roberts AP. Evaluation of the antimicrobial effect of super-oxidized water (Sterilox®) and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* in a bovine root canal model. *J Appl Oral Sci*. 2010 Sep-Oct, 18(5):498-502.
- Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod* 1993, 19(2):76-8.
- Safavi K, Nakayama TA. Influence of mixing vehicle on dissociation of calcium hydroxide in solution. *J Endod* 2000, 26:649-51.
- Saini R, Saini S, Sharma S. Biofilm: A dental microbial infection. *J Nat Sci Biol Med* 2001, 2(1):71-5.

Salgado RJC, Moura-Netto C, Yamazaki AK, Cardoso LN, Moura AA, Prokopowitsch I: Comparison of different irrigants on calcium hydroxide medication removal: microscopic cleanliness evaluation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009, 107, 580–584.

Santoro F, Biase M, Ruffoni D, Batia S, Ni Ceglie N, Spadari F. Die Ozontherapie in der Stomatologie. *Dent Cadmos* 2005, 9.

Sarbinoff JA, O'Leary TJ, Miller CH. The comparative effectiveness of various agents in detoxifying diseased root surfaces. *J Periodontol* 1983, 54(2):77-80.

Sassone L, Fidel R, Figueiredo L, Fidel S, Faveri M, Feres M. Evaluation of the microbiota of primary endodontic infections using checkerboard DNA-DNA hybridization. *Oral Microbiol Immunol* 2007, 22(6):390-7.

Schäfer E. Struktur der Pulpa und ihre Erkrankungsformen. Aus Endodontie Studienausgabe Praxis der Zahnheilkunde, Urban & Fischer 2001.

Schäfer E, Bössmann K. Antimicrobial effect of camphorated chloroxylenol (ED 84) in the treatment of infected root canals. *J Endod* 1999, 25(8):547-51.

Schäfer E, Al Behaissi A. pH changes in root dentin after root canal dressing with gutta-percha points containing calcium hydroxide. *J Endod* 2000, 26:665-7.

Schäfer E. Bössmann K. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2005, 31(1):53-6.

Schilke R, Lisson JA, Bauss O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol* 2000, 45(5):355-61.

Schmalz G, Hiller KA, Nunez LJ, Stoll J, Weis K. Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. *J Endod* 2001, 27(1):23-30.

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.

Schroeder HE. Orale Strukturbiologie. 3 ed. Stuttgart-New York: Thieme, 1987.

Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals *ex vivo*. *Int Endod J* 2005, 38(10):735-42.

Segura JJ, Jiménez-Rubio A, Guerrero JM, Calvo JR. Comparative effects of two endodontic irrigants, chlorhexidine digluconate and sodium hypochlorite, on macrophage adhesion to plastic surfaces. *J Endod* 1999, 25(4):243-6.

Seichter U, van der Schelling D. Bakteriologische Untersuchungen zur desinfizierenden Wirkung von Chlorhexidin als Spülmittel bei der Wurzelkanalbehandlung. *Dtsch Zahnärztl Z* 1987, 42: 763-6.

- Sen BH, Wesselink PR, Türkün M. The smear layer: a phenomenon in root canal therapy. *Int Endod J* 1995, 28(3):141-8.
- Serper A, Ozbek M, Calt S. Accidental sodium hypochlorite-induced skin injury during endodontic treatment. *J Endod* 2004, 30(3):180-1.
- Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod* 2011, 37(5):657-61.
- Shovelton D. The presence and distribution of micro-organisms within non-vital teeth. *BR Dent J* 1964, 117:101.
- Shuping G, Ørstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using Nickel-Titanium rotary instrumentation and various medicaments. *J Endod* 1999, 26:751-5.
- Siqueira JF Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002, 94(3):281-93.
- Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calciumhydroxide: a critical review. *Int Endod J* 1999, 32:361-9.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1 %, 2.5 %, and 5.25 % sodium hypochlorite. *J Endod* 2000, 26(6):331-4.
- Siqueira JF Jr, Rocas IN, Oliveira JC, Santos KR. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod* 2001, 27(9):563-6.
- Siqueira JF Jr, Rocas IN. Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections. *J Clin Microbiol* 2005, 43(7):3314-9.
- Sirén EK, Haapasalo MPP, Waltimo TMT, 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(4):326-31.
- Sjögren U, Figdor D, Spångberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J* 1991, 24(3):119-25.
- Spångberg L, Engström B, Langeland K. Biologic effect of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effects of endodontic antiseptics *in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1973, 36:856-71.
- Spångberg L, Rutberg M, Rydinge E. Biologic effects of endodontic antimicrobial agents. *J Endod* 1979, 5(6):166-75.
- Spångberg L. *In vitro* assessment of the toxicity of endodontic materials. *Int Endod J* 1981, 14(1):27-33.

- Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An *in vitro* evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J* 2001, 34(4):300-7.
- Stoll R, Venne L, Jablonski-Momeni A, Mutters R, Stachniss V. The disinfecting effect of ozonized oxygen in an infected root canal: an *in vitro* study. *Quintessence Int.* 2008, 39(3):231-6.
- Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006, 32(2):93-8
- 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.
- Suerbaum S, Hahn H, Burchard GD, Kaufmann SHE, Schulz TF. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Kapitel 18.2 Kulturverfahren.* Hamburg: Springer-Verlag, 2012, 131-2.
- Tan KS, Yu VS, Quah SY, Bergenholtz GJ. Rapid method for the detection of root canal bacteria in endodontic therapy. *J Endod.* 2015 Apr;41(4):447-50. doi: 10.1016/j.joen.2014.11.025. Epub 2015 Jan 6.
- Thé SD. The solvent action of sodium hypochlorite on fixed and unfixed necrotic tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1979, 47:558-61.
- Torabinejad M, Handysides R, Khademi AA, Bakland LK. Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002, 94(6):658-66.
- Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod* 1981;7(1):17-21.
- Türkün M, Cengiz T. The effects of sodium hypochlorite and calcium hydroxide on tissue dissolution and root canal cleanliness. *Int Endod J* 1997, 30: 335-42.
- Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules *in vitro*. *Endod Dent Traumatol.* 1993, 9(6):243-8.
- Vera J, Siqueira JF Jr, Ricucci D, Loghin S, Fernández N, Flores B, Cruz AG. One-versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *J Endod.* 2012 Aug; 38(8):1040-52. doi: 10.1016/j.joen.2012.04.010. Epub 2012 Jun 12.
- Vianna ME, Gomes BP. Efficacy of sodium hypochlorite combined with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009, 107(4):585-9.
- Wadachi R, Araki K, Suda H. Effect of calcium hydroxide on the dissolution of soft tissue on the root canal wall. *J Endod* 1998, 24:326-30.

- Wallhäußer KH. Praxis der Sterilisation–Desinfektion–Konservierung. Stuttgart: Thieme-Verlag, 1995.
- Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Ørstavik DF. Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. J Endod 2005, 31(12):863-6.
- Wang CS, Arnold RR, Trope M, Teixeira FB. Clinical efficiency of 2% chlorhexidine gel in reducing intracanal bacteria. J Endod. 2007 Nov, 33(11):1283-9.
- Weichmann 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, Löst C. Vitality status of microorganisms in infected human root dentine. Int Endod J. 2002 Feb, 35(2):166-71
- Wennberg A. Biological evaluation of root canal antiseptics using *in vitro* and *in vivo* methods. Scand J Dent Res 1980, 88:46-52.
- White RE, Janer LR, Hays GL. Residual antimicrobial activity associated with a chlorhexidine endodontic irrigant used with sodium hypochlorite. Am J Dent 1999, 12:148-50.
- Wolff A. Ozon in der Wundbehandlung. Berliner klinische Wochenschrift 1920, 57:785-6.
- 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.
- Yang SF, Rivera EM, Baumgardner KR, Walton RE, Stanford C. Anaerobic tissue-dissolving abilities of calcium hydroxide and sodium hypochlorite. J Endod 1995, 21: 613-6.
- Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. J Endod 1995, 21(10):513-5.
- Yoldas O, The effect of two different calcium hydroxide combinations on root dentine microhardness. International Endodontic Journal 2004; 37 (12): 828 – 831.
- Zamany A, Spångberg LS. An effective method of inactivating chlorhexidine. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002 May;93(5):617-20.
- Zamany A, Safavi K, Spångberg LS. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 2003, 96:578-81.
- Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod 2006, 32(5):389-98.
- Zehnder M, Guggenheim B. The mysterious appearance of enterococci in filled root canals. Int Endod J 2009, 42(4):277-87.

Zerella JA, Fouad AF, Spångberg LS. Effectiveness of a calcium hydroxide and chlorhexidine digluconate mixture as disinfectant during retreatment of failed endodontic cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005, 100(6):756-61.

Zoletti GO, Siqueira JF Jr, Santos KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches. *J Endod* 2006, 32(8):722-6.

11. Anhang

11.1 Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung

„Ich, Mediha Niepel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „In-vitro-Studie zur Effektivität von Diodenlaser, gasförmigem Ozon, Kalziumhydroxid und Chlohexidindiglukonat-Gel gegenüber *Enterococcus faecalis* im Wurzelkanal“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Ein Promotionsverfahren wurde weder zu einem früheren Zeitpunkt an einer anderen Hochschule noch bei einem anderen Fachbereich beantragt.

Berlin, den 02.05.2018

Mediha Niepel

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Mediha Niepel hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Bitter, K., Vlassakidis, A., Niepel, M., Hoedke, D., Schulze, J., Neumann, K., Moter, A. & Noetzel, J. (2017). Effects of Diode Laser, Gaseous Ozone, and Medical Dressings on Enterococcus faecalis Biofilms in the Root Canal Ex Vivo. BioMed research international, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6321850>

Experimenteller Teil: vollständige eigene Durchführung des experimentellen Teils der Arbeit

Auswertung: Einpflegen der Rohdaten in Excel.

Statistik: Aufarbeitung der Daten für die statistische Auswertung, Durchführung der deskriptiven Statistik

Konkrete Arbeiten bei der Manuskriptentstehung: Vorlage von Einleitung, Material und Methode, Ergebnissen sowie Diskussion, Endfassung durch Betreuer und Mentor.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

11.2 Tabellarischer Lebenslauf

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

11.3 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zur Entstehung und zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben:

Zuallererst möchte ich mich bei Oberärztin PD Dr. Kerstin Bitter für die Übernahme der Betreuung für diese Doktorarbeit bedanken. Ihre außergewöhnlich engagierte und freundschaftliche Betreuung hat mich diese Arbeit zu Ende bringen lassen. Sie gab wertvolle und gute Hilfestellungen, war immer für mich da und, ganz wichtig für mich, sie ist immer freundlich geblieben.

Herrn Dr. Jörn Noetzel danke ich für die wissenschaftliche Betreuung. Sein wertvolles Wissen und die unterstützende Anleitung zu allen Fragen bauten mich immer wieder auf. Ich konnte jederzeit auf seine Zielführung bauen.

Frau Dr. Annette Moter danke ich für die wissenschaftliche Betreuung während der Untersuchung. Ganz selbstverständlich ermöglichte sie die Durchführung der Versuche am Institut für Mikrobiologie und Hygiene.

Einen großen Dank für die engagierte und zuverlässige Mitarbeiterin der Abteilung für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie sowie Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité - Universitätsmedizin Berlin Julia Schulze. Sie stand mir immer zur Seite und war geduldig, egal welche Probleme auftraten.

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. Außerdem gilt mein ganz besonderer Dank meiner Familie. Zuletzt möchte ich mich bei allen weiteren Personen, die mich bei meiner Doktorarbeit in jeglicher Weise unterstützt haben, bedanken.