

Aus der Abteilung für Zahnerhaltung und Präventivzahnmedizin des
Charité Centrums 3 für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

In-vitro-Untersuchung zur Wirksamkeit verschiedener
Spülprotokolle, der photodynamischen Therapie (PDT) sowie
der kombinierten Anwendung von chemomechanischer
Aufbereitung und adjuvanter PDT auf einen endodontischen
Multispeziesbiofilm

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Claudia Enseleit

aus Berlin

Datum der Promotion: 13.12.2019

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in folgender Publikation:

Hoedke D, Enseleit C, Gruner D, Dommisch H, Schlafer S, Dige I, Bitter K.

Effect of photodynamic therapy in combination with various irrigation protocols on an endodontic multispecies biofilm ex vivo.

Int Endod J. 2018 Jan; 51 Suppl 1:e23-e34. PubMed PMID: 28276583.

Meiner Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

I. Abbildungsverzeichnis.....	8
II. Tabellenverzeichnis.....	9
III. Abstrakt.....	10
IV. Abstract.....	12
1 Einleitung.....	14
2 Literaturübersicht.....	15
2.1 Erkrankungen des Endodonts und des Periapex.....	15
2.2 Mikrobiologische Aspekte der Wurzelkanalinfektion.....	16
<u>2.2.1 Biofilme in der Endodontie.....</u>	<u>18</u>
2.2.1.1 <i>Enterococcus faecalis</i>	20
2.2.1.2 <i>Streptococcus oralis</i>	21
2.2.1.3 <i>Prevotella intermedia</i>	21
2.3 Chemomechanische Aufbereitung.....	22
<u>2.3.1 Natriumhypochlorit.....</u>	<u>24</u>
<u>2.3.2 Chlorhexidindi gluconat.....</u>	<u>24</u>
2.4 Die photodynamische Therapie.....	26
<u>2.4.1 Die photodynamische Therapie in der Zahnmedizin.....</u>	<u>27</u>
3 Fragestellung und Arbeitshypothese.....	30
4 Material und Methode.....	31
4.1 Studiendesign.....	31
4.2 Vorbereitende Maßnahmen zur Versuchsdurchführung.....	33
<u>4.2.1 Auswahlkriterien für die Zahnproben.....</u>	<u>33</u>
<u>4.2.2 Vorbereitung der Zahnproben.....</u>	<u>34</u>
<u>4.2.3 Sterilisationskontrollen.....</u>	<u>36</u>
<u>4.2.4 Erzeugung eines Biofilmes im Wurzelkanal.....</u>	<u>36</u>
4.2.4.1 Bakteriengewinnung und -aufbereitung.....	36
4.2.4.2 Inokulation der Bakteriensuspension in die Zahnproben.....	38
<u>4.2.5 Wachstumsreihe.....</u>	<u>40</u>
<u>4.2.6 Verdünnungsreihe.....</u>	<u>40</u>
<u>4.2.7 Qualitative Untersuchung.....</u>	<u>43</u>
4.3 Versuchsdurchführung.....	44

4.4	Bestimmung der Bakterienkonzentration vor der Therapie	44
4.4.1	<u>Bestimmung der planktonischen Bakterienkonzentration vor der Therapie (T0)</u>	44
4.4.2	<u>Bestimmung der dentinadhärenten Bakterienkonzentration vor der Therapie</u>	45
4.5	Anwendung der Therapieprotokolle	45
4.6	Bestimmung der Bakterienkonzentration nach erfolgter Therapie	48
4.6.1	<u>Bestimmung der planktonischen Bakterienkonzentration im Wurzelkanallumen direkt im Anschluss an die Therapie (T1)</u>	49
4.6.2	<u>Bestimmung der planktonischen Bakterienkonzentration im Wurzelkanallumen nach Inkubation für weitere fünf Tage (T2)</u>	49
4.6.3	<u>Bestimmung der dentinadhärenten Bakterienkonzentration nach erfolgter Therapie</u>	51
4.7	Statistische Auswertungen	51
4.7.1	<u>Statistische Analyse der planktonischen Bakterien im Wurzelkanallumen</u>	51
4.7.2	<u>Statistische Analyse der dentinadhärenten Bakterien</u>	53
4.7.3	<u>Vergleich der planktonischen und dentinadhärenten Bakterienkonzentrationen</u>	54
5	Ergebnisse	55
5.1	Wachstumsreihe	55
5.2	Ergebnisse der <i>Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung</i>	56
5.3	Planktonische Bakterien im Wurzelkanallumen	58
5.3.1	<u>Deskription der planktonischen Bakterienkonzentrationen vor und nach der Therapie</u>	58
5.3.2	<u>Univariate einfaktorielle ANOVA der planktonischen Bakterienkonzentration vor der Therapie (T0)</u>	60
5.3.3	<u>Univariate mehrfaktorielle ANOVA der chemomechanischen Aufbereitung und der adjuvanten PDT bei sofortiger Probenentnahme (T1)</u>	60
5.3.4	<u>Univariate mehrfaktorielle ANOVA der chemomechanischen Aufbereitung und der adjuvanten PDT bei Probenentnahme fünf Tage nach erfolgter Therapie (T2)</u>	61
5.3.5	<u>Relative Verteilung der planktonischen Bakterienspezies zu den Zeitpunkten T0, T1, T2</u>	63
5.4	Dentinadhärente Bakterien	66
5.4.1	<u>Deskription der dentinadhärenten Bakterienkonzentrationen vor und nach der Therapie</u>	66
5.4.1.1	Deskription der dentinadhärenten Bakterienkonzentration vor der Therapie T0	66
5.4.1.2	Deskription der dentinadhärenten Bakterienkonzentration nach der Therapie bei sofortiger Probenentnahme (T1) nach erfolgter Therapie	66

5.4.1.3	Deskription der dentinadhärenten Bakterienkonzentration nach der Therapie bei Probenentnahme fünf Tage nach erfolgter Therapie (T2) .	67
5.4.2	<u>Nicht-parametrische Tests der Verteilung der dentinadhärenten Bakterienkonzentrationen nach der Therapie bei sofortiger Probenentnahme (T1) nach erfolgter Therapie</u>	68
5.4.3	<u>Nicht-parametrische Tests der Verteilung der Bakterienkonzentrationen nach der Therapie bei Probenentnahme fünf Tage nach erfolgter Therapie (T2)</u>	69
5.5	Vergleich planktonischer und dentinadhärenter Bakterienkonzentrationen	69
5.5.1	<u>Kreuztabelle der planktonischen und dentinadhärenten Bakterienkonzentrationen nach der Therapie bei sofortiger Probenentnahme (T1) nach erfolgter Therapie</u>	69
5.5.2	<u>Kreuztabelle der planktonischen und dentinadhärenten Bakterienkonzentrationen nach der Therapie bei Probenentnahme fünf Tage nach erfolgter Therapie (T2)</u>	71
6	Diskussion	73
6.1	Diskussion von Material und Methode	73
6.1.1	<u>Biofilmmodell</u>	73
6.1.2	<u>Vorbereitende Präparation der Versuchsproben</u>	74
6.1.3	<u>Etablierung des Multispeziesbiofilmes im Wurzelkanal</u>	76
6.1.4	<u>Therapieprotokolle</u>	79
6.1.5	<u>Nachweismethoden für planktonische und dentinadhärente Bakterienkonzentrationen</u>	80
6.1.6	<u>Zeitpunkte der Probenentnahme</u>	81
6.2	Diskussion der Ergebnisse	82
6.2.1	<u>Bakterielle Besiedelung des Wurzelkanals vor der Therapie</u>	82
6.2.2	<u>Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung</u>	85
6.2.3	<u>Korrelation der planktonischen und dentinadhärenten Bakterienkonzentrationen</u>	85
6.2.4	<u>Therapieergebnisse</u>	86
6.2.5	<u>Die PDT in der Endodontie - die aktuellen Ergebnisse im klinischen Kontext</u>	91
7	Schlussfolgerung	93
8	Literaturverzeichnis	95
9	Eidesstattliche Versicherung	105
10	Anteilsklärung an erfolgten Publikationen	106

11 Lebenslauf.....	107
12 Publikationsliste	108
13 Danksagung.....	109

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vorbereitung der Versuchsproben	36
Abbildung 2: Anordnung der Proben im Anaerobiertopf	39
Abbildung 3: Verdünnungsreihe	42
Abbildung 4: Flüssigkeitsprobe aus dem Wurzelkanallumen.....	42
Abbildung 5: Versuchsdurchführung.....	47
Abbildung 6: Wachstumsreihe des Multispeziesbiofilmes.....	56
Abbildung 7: Ergebnisse des Hybridisierungsexperiments	57
Abbildung 8: Biofilmnachweis im Wurzelkanal durch die <i>Fluoreszenz-in-situ-</i> <i>Hybridisierung</i>	58
Abbildung 9: Logarithmischer Reduktionsfaktor der planktonischen Bakterien zum Zeitpunkt T1 (LRF 1)	61
Abbildung 10: Logarithmischer Reduktionsfaktor der planktonischen Bakterien zum Zeitpunkt T2 (LRF 2)	63
Abbildung 11: Relativer Anteil (Median) der Spezies <i>P. intermedia</i> , <i>E. faecalis</i> und <i>S. oralis</i> an der planktonischen Phase im Kanallumen vor der Therapie (T0)	64
Abbildung 12: Relativer Anteil (Median) der Spezies <i>P. intermedia</i> , <i>E. faecalis</i> und <i>S. oralis</i> an der planktonischen Phase im Kanallumen nach der Therapie (T1, T2)	65
Abbildung 13: Bakterienkonzentration im Dentin zum Zeitpunkt T1	67
Abbildung 14: Bakterienkonzentration im Dentin zum Zeitpunkt T2	68
Abbildung 15: kategoriale Verteilung der Bakterienkonzentrationen im Wurzelkanallumen und im Dentin zum Zeitpunkt T1	71
Abbildung 16: kategoriale Verteilung der Bakterienkonzentrationen im Wurzelkanallumen und im Dentin zum Zeitpunkt T2	72

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle I: Einteilung der Untersuchungsgruppen	32
Tabelle II: Vorbereitung und Ablauf der Versuchsdurchführung	33
Tabelle III: Aufbereitungsprotokoll während der initialen Aufbereitung	35
Tabelle IV: Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Bakterienkonzentration (KBE/ml) zum Zeitpunkt T0.....	41
Tabelle V: Spülprotokolle während der Versuchsdurchführung	46
Tabelle VI: Untersuchungsparameter	48
Tabelle VII: Verdünnungsreihe zum Erfassen der Bakterienkonzentration (KBE/ml) im Kanallumen zum Zeitpunkt T1	49
Tabelle VIII: Verdünnungsreihe zum Erfassen der Bakterienkonzentration (KBE/ml) im Kanallumen zum Zeitpunkt T2 in den Hauptgruppen 1 und 2.....	50
Tabelle IX: Verdünnungsreihe zum Erfassen der Bakterienkonzentration (KBE/ml) im Kanallumen zum Zeitpunkt T2 in den Hauptgruppen 3 und 4.....	50
Tabelle X: Kategorien der Bakterienkonzentration im Dentin nach erfolgter Therapie..	53
Tabelle XI: Deskription der Bakterienkonzentration (KBE/ml) aus dem Wurzelkanallumen zu den Zeitpunkten T0, T1 und T2	59

III. Abstrakt

Einleitung: Für den langfristigen Erfolg einer endodontischen Behandlung ist die mechanische Erweiterung und die suffiziente Desinfektion des Kanalsystems von entscheidender Bedeutung. Eine größtmögliche Entfernung der Mikroorganismen ist das Ziel. Konventionelle Therapieprotokolle können diese Anforderung aufgrund der Komplexität des Wurzelkanalsystems nicht immer erfüllen. Gegenwärtig wird nach Behandlungsstrategien gesucht, die eine zuverlässige Desinfektion des Wurzelkanals sicherstellen.

Zielsetzung: Ziel dieser In-vitro-Studie war die bakterienreduzierende Wirksamkeit verschiedener Spülprotokolle, der photodynamischen Therapie (PDT) sowie der kombinierten Anwendung von chemomechanischer Aufbereitung und adjuvanter PDT auf einen Multispeziesbiofilm zu untersuchen.

Material und Methode: 160 extrahierte, humane Zähne wurden standardisiert aufbereitet und sterilisiert. Es folgte eine Inokulation der Proben mit den Spezies *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), *Streptococcus oralis* (*S. oralis*) und *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*). Der Nachweis für die Ausbildung eines Multispeziesbiofilmes entlang der Kanalwand wurde durch eine *Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung* (FISH) erbracht. Zu Beginn der Versuchsdurchführung wurde in jedem Wurzelkanal die planktonische Bakterienkonzentration bestimmt. Anschließend erfolgte die endodontische Therapie mit der Aufbereitung des Wurzelkanals um drei weitere ISO-Größen. Die Proben wurden auf vier Hauptgruppen (HG) aufgeteilt. Die HG 1 erfuhr keine chemomechanische Aufbereitung, sie diente als Kontrollgruppe. In der HG 2 wurde intermittierend mit Natriumchloridlösung (NaCl) 0,9 % gespült. HG 3 und HG 4 erfuhren eine Aufbereitung mit Natriumhypochloritspülung (NaOCl) 1 %. In der HG 4 erfolgte eine Abschlusspülung mit Chlorhexidindigluconatlösung (CHX) 2 %. Die Hälfte der Proben in jeder HG erhielt eine adjuvante PDT. Nach der Behandlung wurden in jedem Wurzelkanal die planktonische sowie die dentinadhärente Bakterienkonzentration bestimmt. Die Probenentnahmen erfolgten zu zwei Zeitpunkten: direkt nach der Therapie (T1) oder nach fünf Tagen erneuter Inkubation (T2).

Ergebnisse: Für die planktonischen Bakterien wurde ein signifikant höherer Reduktionsfaktor (LRF) der koloniebildenden Einheiten pro Milliliter (KBE/ml) zu beiden

Zeitpunkten T1 (HG 3: $6,3 \pm 1,3$; HG 4: $6,3 \pm 0,7$) und T2 (HG 4: $2,4 \pm 2,4$) durch die Spülung mit desinfizierenden Lösungen nachgewiesen ($p < 0,0001$; ANOVA).

Ein signifikanter Einfluss der PDT zeigte sich nur zum Zeitpunkt T2. Die Kombination aus chemomechanischer Aufbereitung mit NaOCl und CHX und anschließender PDT erzielte sowohl gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,0001$; Tukey-HSD) als auch gegenüber der alleinigen chemomechanischen Aufbereitung ($p = 0,001$; T-Test) eine signifikant höhere Bakterienreduktion. In 85,6 % aller Wurzelkanäle stimmten die kategorialen Ergebnisse der Bakterienkonzentration im Dentin mit denen der planktonischen Bakterien überein.

Schlussfolgerung: Eine zuverlässige Bakterienreduktion wurde durch die Spülung mit desinfizierenden Lösungen erzielt. Die PDT konnte nur unter bestimmten Voraussetzungen als therapieergänzende Maßnahme die Bakterienreduktion steigern.

IV. Abstract

Introduction: For the long-term success of endodontic treatment chemomechanical debridement is of great importance. Conventional root canal therapy does not always achieve complete disinfection of the root canal system. Today's research focuses on additional treatment strategies for eradication of microorganisms in the root canal system.

Aim: The objective of this study was to compare the antibacterial effect of conventional endodontic treatment with various irrigation protocols and photodynamic therapy (PDT) and the combination of both strategies on the removal of a multispecies biofilm in human root canals *in vitro*.

Methodology: A total of 160 extracted human single-rooted teeth were divided into four groups (n = 40). In group G1 (control group) preparation was performed up to size 60. In group G2 to G4 root canals were enlarged up to size 40. All root canals were inoculated with the bacterial species *Streptococcus oralis* (*S. oralis*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) and *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) for four days. The presence of a multispecies biofilm covering the dentinal wall was verified by *Fluorescence-in-situ-Hybridization* (FISH). In all specimen samples of planktonic bacteria were taken at baseline. In G2 to G4 root canals were enlarged up to size 60 using the following irrigation solutions: 0.9% sodium chloride (NaCl) (G2), 1% sodium hypochlorite (NaOCl) (G3), 1% sodium hypochlorite (NaOCl) and a final rinse with 2% chlorhexidine (CHX) (G4). Half of the root canals of each group received an adjunctive PDT. After treatment planktonic and dentine-adherent bacterial concentration were evaluated by counts of colony-forming units (CFUs) immediately after treatment (T1) or after five days of further incubation (T2).

Results: Irrigation protocol using antibacterial solutions reduced the concentration of planktonic bacteria at T1 and T2 significantly ($p < 0.0001$; ANOVA). Adjunctive PDT significantly reduced bacterial levels only at T2 ($p < 0.0001$; ANOVA). PDT after irrigation using NaOCl and CHX was significantly more effective in reducing CFU compared to both, control group ($p < 0.0001$; Tukey-HSD) and chemomechanical debridement alone ($p = 0.001$, T-Test). For both planktonic and dentine-adherent

bacteria the same categories of CFU counts were registered in 85.6 % of all samples at T1 and T2.

Conclusion: An irrigation protocol including disinfectant solutions reduced bacterial counts reliable. After five days of further incubation in combination with an irrigation protocol including NaOCl and CHX adjunctive PDT achieved a higher bacterial reduction in root canals than irrigation alone.

1 Einleitung

Für das Gelingen einer Wurzelkanalbehandlung ist die Desinfektion des Kanalsystems vor dessen suffizienter Füllung eine der wichtigsten Voraussetzungen. Eine weitestgehende Reduktion der Mikroorganismen wird durch die mechanische Bearbeitung des Dentins unter gleichzeitigem Einsatz von antibakteriellen Spüllösungen erreicht und gegebenenfalls durch eine temporäre medikamentöse Einlage ergänzt. Es gibt jedoch regelmäßig Wurzelkanalabschnitte, die von der chemomechanischen Reinigung unerreicht bleiben und somit ein Reservoir für Bakterien darstellen [1, 2]. Verbleiben Mikroorganismen im Kanal erhöht sich das Risiko eines Misserfolges.

Primäre Infektionen des endodontischen Systems bestehen überwiegend aus Mischkulturen gramnegativer Anaerobier. Die mit einer fehlgeschlagenen endodontischen Behandlung assoziierte persistierende Infektion ist häufig von einer deutlich kleineren Speziesvielfalt geprägt. Die beteiligten Spezies gehören mehrheitlich zur Gruppe der grampositiven Anaerobier [3, 4]. Eine große Anzahl an Studien verweist auf den *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) als ausgesprochen resistente Spezies. Sie ist besonders häufig mit endodontischen Misserfolgen assoziiert [5]. Biofilme, in denen unter anderen auch *E. faecalis*, *Streptococcus oralis* (*S. oralis*) und *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) vorkommen, konnten sowohl in primären als auch in sekundären Infektionen nachgewiesen werden [3, 4, 6, 7].

Gegenwärtig wird nach Methoden gesucht, die es ermöglichen, bisher unerreichte Wurzelkanalabschnitte zu desinfizieren und resistente Spezies, die sich der chemomechanischen Aufbereitung entziehen, zu eliminieren. Die photodynamische Therapie (PDT) wird seit einigen Jahren in der Parodontitistherapie angewandt. Der Einsatz photoaktiver Substanzen zur Desinfektion des endodontischen Systems wird zurzeit erprobt. Die überwiegende Mehrzahl der Studien untersuchte die desinfizierende Wirkung der PDT auf einzelne Spezies meist in planktonischer Phase [8]. Das antibakterielle Potential gegenüber polymikrobiellen Biofilmen wurde bisher nur unzureichend geklärt.

In der vorliegenden In-vitro-Studie wurde die Effektivität verschiedener Spülprotokolle während der Aufbereitung sowie der Effekt der adjuvanten PDT auf Multispeziesbiofilme, bestehend aus *E. faecalis*, *S. oralis* und *P. intermedia*, in humanen Wurzelkanälen überprüft.

2 Literaturübersicht

2.1 Erkrankungen des Endodonts und des Periapex

Als Endodont wird die anatomisch-funktionelle Einheit aus Pulpa und umgebendem Dentin bezeichnet. Über das *Foramen apicale* der Wurzelspitze und akzessorische Wurzelkanäle steht das Endodont mit dem Parodont in Verbindung. Die Ausbreitung endodontischer Erkrankungen in das Parodont, vor allem im Bereich des Periapex, wird somit möglich [9].

Die häufigste Ursache der Pulpitis ist die bakterielle Infektion des Pulpa-Dentin-Komplexes [10]. In der Mehrzahl der Fälle ist diese auf eine *Caries profunda* zurückzuführen. Seltener sind marginale Parodontopathien Ausgangspunkt bakterieller Migration in das Zahnmark. Traumatische Ereignisse oder iatrogen verschuldete Reize, zum Beispiel im Rahmen umfangreicher Präparationsmaßnahmen, können auch ohne Beteiligung von Mikroorganismen zur Schädigung der Pulpa führen. Die Pulpitis folgt grundsätzlich den typischen Gesetzmäßigkeiten einer Entzündungsreaktion. Jedoch bedingt die hartgewebige Ummantelung der Pulpa die für dieses Krankheitsbild charakteristischen Verlaufsformen [11]. Die Terminologie der Pulpitis ist uneinheitlich. Zur Beurteilung des Entzündungszustandes können sowohl histologische als auch klinische Aspekte herangezogen werden. Oftmals besteht aber nur eine geringe Kongruenz zwischen dem histologischen Bild und der klinisch erstellten Diagnose [12]. Die Pulpanekrose ist als finales Stadium der Pulpitis zu sehen und beschreibt den irreversiblen lokalen Zelltod. Dieser kann herdförmig in umschriebenen Bereichen oder in der gesamten Pulpa auftreten.

Für den Zahnarzt, der auf Grundlage der Symptomatik und der klinischen Erscheinungsform der Pulpitis seine Therapiemaßnahmen auswählt, ist die Beurteilung der Pulpapathologie anhand klinischer Untersuchungsergebnisse zielführend. Klinisch erfolgt bei vitaler, entzündeter Pulpa die Abgrenzung der reversiblen von der irreversiblen Pulpitis. Im Fall einer reversiblen Pulpitis ist nach Beseitigung des ursächlichen Reizes eine Ausheilung der Entzündung möglich. Eine irreversible Pulpitis indiziert eine Wurzelkanalbehandlung [13].

In der Folge der Pulpitis kann die Entzündung auf das periapikale Gewebe übergehen. Man spricht dann von einer *Parodontitis apicalis*. Voraussetzung dafür ist die mikrobielle Besiedelung des Wurzelkanals [14]. Verbleiben nach der chemomechanischen

Aufbereitung Mikroorganismen im Kanalsystem, besteht auch bei einer suffizienten Wurzelfüllung das Risiko, dass sich im weiteren Verlauf eine periapikale Entzündungsreaktion mit fortschreitender Knochendestruktion etabliert.

Gelangen bakterielle Toxine oder Antigene über das apikale Foramen oder über Seitenkanäle in das Desmodont, führt dies entweder direkt zur Lyse oder indirekt über die Immunantwort des Wirtsorganismus zur Destruktion der umgebenden Strukturen [15]. Vor allem Endotoxine, Lipopolysaccharide (LPS) in der Zellwand gramnegativer Bakterien, scheinen an der Aktivierung verschiedener Immunzellen beteiligt zu sein [16]. Darüber hinaus können Zerfallsprodukte der Pulpa und des Dentins als Antigene fungieren und so zur Destruktion der apikalen Gewebe beitragen [17]. Die häufigste Form der chronischen periapikalen Läsion ist das apikale Granulom. Durch anhaltende Reize kommt es zur fortschreitenden Knochendemineralisation und Ausbildung von Granulationsgewebe. Wesentlich seltener entwickeln sich im chronischen Verlauf radikuläre Zysten [18].

2.2 Mikrobiologische Aspekte der Wurzelkanalinfektion

Es ist heute allgemein anerkannt, dass sich die endodontische Infektion aus einer Vielzahl von Bakterien zusammensetzt. Jedoch schafft es nur ein Bruchteil der aktuell mehr als 700 nachgewiesenen Spezies [19], die Bestandteil der natürlichen Mundhöhlenflora sein können, sich im Wurzelkanalsystem zu etablieren und sich gegen den dort herrschenden Selektionsdruck durchzusetzen.

Die frühe Wurzelkanalinfektion wird von Aerobiern und fakultativen Anaerobiern dominiert. Durch einen stetigen Sauerstoffverbrauch stellt sich intraradikulär schnell ein anaerobes Milieu ein. Die Zusammensetzung der Mikroflora im Wurzelkanal unterscheidet sich in der Artenvielfalt und in der Anzahl der beteiligten Spezies in Abhängigkeit davon, ob es sich um einen Zahn mit nekrotischer Pulpa oder einen bereits endodontisch behandelten Zahn handelt. Es wird allgemein die sogenannte Primärinfektion von der persistierenden Infektion unterschieden. Für letztere wird häufig, insbesondere im englischen Sprachgebrauch, auch synonym der Begriff der Sekundärinfektion verwandt. Siqueira, J. F., Jr. beschreibt in seinem Artikel „Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives“ [20] die initiale Besiedlung der nekrotischen Pulpa durch Mikroorganismen als Primärinfektion. Dem gegenüber stellt er die Sekundärinfektion, die sich im Laufe oder nach Abschluss der endodontischen

Behandlung etabliert und durch Spezies, die nicht an der primären Infektion beteiligt waren, unterhalten wird. Eine anhaltende mikrobielle Besiedlung während der Aufbereitung kann durch nicht einhalten der hygienischen Richtlinien bedingt sein oder zwischen zwei Behandlungssitzungen durch einen undichten provisorischen Verschluss der Zugangskavität erfolgen. Weiterhin ermöglichen eine undichte postendodontische Restauration sowie eine insuffiziente Wurzelfüllung den Zutritt von Mikroorganismen in das Kanalsystem auch nach Beendigung der Therapie. Unter einer persistierenden Infektion versteht Siqueira das Verbleiben von Mikroorganismen der Primär- und/ oder der Sekundärinfektion im Kanal. Ursächlich hierfür sieht er die unvollständige chemomechanische Desinfektion des Kanalsystems sowie die Fähigkeit einzelner Spezies auch während andauernder Phasen ohne Substratzufuhr im gefüllten Wurzelkanal überleben zu können.

Der Einsatz molekularbiologischer Nachweistechiken zur Erforschung der mikrobiologischen Zusammensetzung endodontischer Infektionen brachte in den 1990er Jahren neue Erkenntnisse über die Vielzahl der beteiligten Taxa und die Artenvielfalt der Mischinfektion. Kulturelle Nachweismethoden weisen in Primärinfektionen durchschnittlich 3-6 Spezies pro Kanal nach. Molekularbiologisch lässt sich eine wesentlich höhere Komplexität dieser Infektionen belegen [7, 21]. Entsprechende Verfahren zeigten 10 - 30 Spezies in Einzelfällen sogar bis zu 50 Spezies pro Kanal auf. Die Mischinfektion wird von gramnegativen, anaerob wachsenden Bakterien dominiert. Zu den am häufigsten nachgewiesenen Gattungen zählen Fusobakterien, Porphyromonas, Prevotella und Campylobacter. Grampositive Anaerobier wie Peptostreptokokken, Eubacteria, Pseudoramibacter und fakultativ anaerobe oder mikrophile Streptokokken sind ebenfalls regelmäßig an Primärinfektionen beteiligt [7].

Durch die chemomechanische Aufbereitung des infizierten Kanalsystems wird die Mehrheit der gramnegativen Bakterien abgetötet. Eine Ausnahme bilden immer wieder anaerobe Stäbchen wie *Fusobacterium nucleatum*, *P. intermedia* und *Campylobacter rectus*. Grampositive Spezies, vorrangig Streptokokken, Actinomyceten, Laktobazillen, Propionibakterien sowie *E. faecalis* erscheinen gegenüber den desinfizierenden Maßnahmen deutlich resistenter und verbleiben oftmals nach erfolgter endodontischer Therapie im Wurzelkanal [4]. Pilze, insbesondere *Candida albicans*, besiedeln seltener das endodontische System. Vorrangig sind sie im Rahmen persistierender Infektionen nachgewiesen worden [4, 22]. Die Speziesvielfalt in Zähnen mit revisionsbedürftigen

Wurzelkanalfüllungen kann deutlich geringer ausfallen. Bei einer *lege artis* ausgeführten endodontischen Behandlung finden sich pro Kanal etwa eine bis fünf Spezies. Unzureichend aufbereitete Wurzelkanäle weisen eine ähnlich hohe Speziesvielfalt wie Primärfektionen auf (bis zu 30 Spezies) [4, 7]. Die Infektion wird in der Regel von grampositiven, fakultativ anaerob lebenden Bakterien dominiert. *E. faecalis* scheint sowohl durch Anzuchtverfahren als auch durch molekularbiologische Methoden die am häufigsten nachgewiesene Spezies zu sein [4, 6].

Alle drei in dieser Studie zur Erzeugung eines Multispeziesbiofilmes verwandten Bakterienspezies wurden wiederholt sowohl in Primär- als auch in Sekundärfektionen nachgewiesen [4, 7]. *S. oralis* ist überwiegend an Primärfektionen beteiligt. Vielfach wurde diese Spezies jedoch auch im Anschluss an die desinfizierenden Maßnahmen zum Zeitpunkt der Wurzelkanalfüllung nachgewiesen [23]. *P. intermedia* ist regelmäßig an Primärfektionen beteiligt, insbesondere an solchen, die mit apikalen Läsionen einhergehen [24, 25]. *E. faecalis* verbleibt häufig nach erfolgter Therapie im Wurzelkanal und unterhält als persistierender Besiedler eine chronische Infektion des Endodonts [5, 6].

2.2.1 Biofilme in der Endodontie

Als Biofilm wird die Lebensgemeinschaft von Mikroorganismen an einer Grenzfläche bezeichnet. Mikroorganismen besiedeln die Mundhöhle als frei im Speichel schwimmende planktonische Zellen. Lagern sich diese freibeweglichen Zellen an eine Oberfläche an, entsteht ein Biofilm. Ein typisches Beispiel für einen oralen Biofilm ist die dentale Plaque.

Der Biofilm ist eine dynamische Lebensform, in der es fortwährend zur Anlagerung und zum Abspalten von Bakterien kommt. Der ausgereifte Biofilm besteht aus Zellen eingebettet in eine extrazelluläre Matrix aus Polysacchariden, Proteinen und Wasser. Auf das Gesamtvolumen bezogen machen die Bakterienzellen nur etwa 5 bis 25 % aus [26, 27].

Das Zusammenleben im Biofilm bietet gegenüber der planktonischen Phase verschiedene Vorteile für die Zellen. Es entstehen Nahrungsketten, durch die auch in substratarmen Perioden der mikrobielle Stoffwechsel aufrecht erhalten werden kann [28]. Innerhalb des Biofilmes ist eine interzelluläre Kommunikation möglich [29]. Diese kann eine modifizierte Proteinbiosynthese in der Zelle bewirken [30]. Im Biofilm

entstehen biochemische Gradienten [27, 31, 32]. Die daraus resultierende Modifikation der Genexpression führt wiederum zu physiologischen und morphologischen Anpassungserscheinungen der Zellen. Häufig ergibt sich daraus eine höhere Widerstandsfähigkeit gegenüber externen Noxen [33]. Verschiedene Antibiotika sind in ihrer Wirksamkeit eingeschränkt und chemische Desinfektiva zeigen eine deutlich verminderte Wirksamkeit auf Bakterien im Biofilm als auf solche in planktonischer Phase [34, 35]. Einzelne Spezies steigern durch die veränderten Stoffwechselprozesse ihre Pathogenität, indem sie vermehrt gewebeschädigende Stoffe produzieren. Andererseits kann durch den im Biofilm herrschenden Selektionsdruck das Wachstum pathogener Spezies gefördert werden [26].

Ein weiterer Aspekt, der dem Schutz der einzelnen Zellen zugutekommt, ist der strukturelle Aufbau des Biofilmes. Eindringende Moleküle können in der extrazellulären Matrix abgefangen und inaktiviert werden. Je dicker der Zellverband ist, umso schwieriger ist es für von außen einwirkende antibakterielle Substanzen die tiefer angesiedelten Mikroorganismen zu erreichen [36].

Naturgemäß sind an oralen Biofilmen immer mehrere Spezies beteiligt (so genannter Multispeziesbiofilm) [4, 37].

Im Wurzelkanal wurden erstmals 1987 durch Nair biofilmähnliche Zellverbände nachgewiesen [38]. Bislang gibt es nur wenige Studien zu endodontischen Biofilmen und die Kenntnisse diesbezüglich sind begrenzt. Sehr wahrscheinlich sind auch an den im Wurzelkanal entstehenden Biofilmen in der Regel mehrere Spezies beteiligt [37]. Die mikrobiologische Zusammensetzung endodontischer Infektionen unterscheidet sich von denen der Karies und der Parodontitis [37, 39].

Kommt es in der Folge von Karies zur Pulpanekrose, entstehen im Wurzelkanal mehrere ökologische Nischen mit lokal sehr unterschiedlichen Umweltfaktoren, die das Zusammenleben von Zellgemeinschaften limitieren. Der Sauerstoffgehalt nimmt von koronal nach apikal ab. Nährstoffe sind vor allem koronal über den Speichel und apikal über den Anschluss an die periapikale Region zugänglich. Im mittleren Kanaldrittel gibt es weniger direkte Energielieferanten. Ein weiterer Aspekt ist die Erreichbarkeit durch chemomechanische Desinfektionsmaßnahmen. Diese nimmt ebenfalls zum Apex hin ab und ist in akzessorischen Seitenkanälen sehr oft unzureichend [37]. Daraus folgt, dass vor allem die Seitenkanäle nach erfolgter endodontischer Therapie Lebensräume mit guten Voraussetzungen zum Überleben anpassungsfähiger Spezies darstellen [39, 40].

2.2.1.1 *Enterococcus faecalis*

Bei der Gattung der Enterokokken handelt es sich um fakultativ anaerobe, grampositive Kettenkokken. Die am häufigsten auftretenden Spezies sind *E. faecalis* und *Enterococcus faecium*. Als physiologischer Bestandteil der menschlichen Darmflora zeichnet sich *E. faecalis* durch eine hohe Resistenz gegenüber extremen Umweltbedingungen aus. In der Mundhöhle gesunder Patienten wurde diese Spezies selten nachgewiesen. Vereinzelt fanden sich kleine Mengen auf der Zunge, den Tonsillen, im Speichel und im Sulkus getesteter Probanden [41]. Außerhalb des Verdauungstraktes ist *E. faecalis* potenziell pathogen. Die Spezies ist vorrangig an Harnwegsinfektionen, nosokomialen Infektionen, an intraabdominalen Infektionen und an Entzündungen des Endokards beteiligt [42].

E. faecalis verfügt über eine Vielzahl an Schutzmechanismen gegen die wirtsspezifische Immunabwehr und gegen antiseptische Maßnahmen. Zusätzlich besitzt diese Spezies ein hohes pathogenes Potential. Zu den Virulenzfaktoren des *E. faecalis* gehören verschiedene zellmembrangebundene Moleküle. Darüber hinaus wird die Pathogenität durch die Produktion lytischer Enzyme und Toxine gesteigert [43, 44].

Aufgrund der guten Adhärenzeigenschaften ist *E. faecalis* an der Bildung von Biofilmen maßgeblich beteiligt [45]. *E. faecalis* ist zudem in der Lage, tief in die Dentintubuli einzudringen und sich so der Wirkung endodontischer Spüllösungen zu entziehen [46]. In den Tubuli kann diese Spezies lange Zeit überleben. In Perioden ohne Substratzufuhr ist die Proteinsynthese reduziert. Dieser Zustand wird auch als stationäre Phase oder Nicht-Wachstumsphase bezeichnet. Bei Fehlen beziehungsweise starker Reduktion der äußeren Glukosezufuhr synthetisiert *E. faecalis* spezielle Stressproteine, die dieser Spezies zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Hitze, Wasserstoffperoxid, Säuren (pH 3,7), Ethanol und Natriumhypochlorit verhelfen. In der stationären Phase ist *E. faecalis* bis zu 900-fach resistenter gegenüber Natriumhypochlorit. Starke pH-Wertschwankungen werden auch von Zellen in der Wachstumsphase toleriert [42, 47]. Unter alkalischen Bedingungen, wie sie durch Spülungen mit Natriumhypochlorit oder Kalziumhydroxideinlagen erzeugt werden, pumpt eine membranständige H⁺-K⁺-ATPase Kationen und Protonen in das Zellinnere. Der pH-Wert im Zytoplasma wird so innerhalb eines engen Schwankungsbereichs gehalten und die Funktion der Enzyme sichergestellt. Studien zeigen, dass erst ein pH-Wert höher als 11,5 sicher letal auf *E. faecalis*-Zellen wirkt [48]. Der im Wurzelkanal

erreichte pH-Wert durch Kalziumhydroxideinlagen und Hypochloridspülungen liegt meist darunter, was auf die Pufferkapazität des Dentins zurückgeführt wird [49].

In der Zahnmedizin gilt *E. faecalis* insbesondere beim Krankheitsbild der persistierenden, therapieresistenten *Parodontitis apicalis* als ausgesprochen resistente Spezies [42].

2.2.1.2 *Streptococcus oralis*

Streptokokken sind grampositive Kokken, die sich kettenförmig oder in Paaren aneinanderlagern. Sie gehören zur normalen Standortflora der Mundhöhle, des Rachenraumes, des Darms sowie der Vagina [50, 51]. Bakterienzellen der Spezies *S. oralis* zeigen eine große phenotypische sowie genetische Variabilität [52, 53]. *S. oralis* ist, wie der Großteil der Streptokokken, fakultativ pathogen. Insbesondere bei immunsupprimierten Patienten wurde dieses Bakterium häufig in Fällen einer subakuten Endokarditis [54] oder einer Sepsis isoliert [55].

Mit Hilfe des Enzyms Sialidase (Neuraminidase) spaltet *S. oralis* Sialinsäure aus Glykoproteinen. Sialinsäure dient als gärungsfähiges Kohlenhydrat einerseits der bakteriellen Vermehrung und ermöglicht andererseits durch das Freilegen von Bindungsstellen die Anheftung des Bakteriums an Zellen des Wirtsorganismus. Darüber hinaus ist die Sialinsäure ein wichtiges Signalmolekül in der interzellulären Kommunikation [56]. *S. oralis* verfügt über spezielle Bindungsproteine in seiner Zelloberfläche und ist als einer der Erstbesiedler des Dentin maßgeblich an der Biofilmformation beteiligt [57, 58]. Die Fähigkeit dieser Spezies auch niedrige pH-Werte zu tolerieren sowie das Vermögen die Dentintubuli zu infiltrieren machen das Bakterium für endodontische Desinfektionsmaßnahmen schwer erreichbar [59, 60]. Darüber hinaus scheint *S. oralis* durch die Produktion extrazellulärer Proteine an der Schädigung periapikaler Gewebe beteiligt zu sein [23, 61].

2.2.1.3 *Prevotella intermedia*

P. intermedia ist ein gramnegatives, obligat anaerob wachsendes, kokkoides Stäbchen, welches auf Blutagarplatten schwarz pigmentierte Kolonien bildet.

Zu den physiologischen Standorten der *P. intermedia* zählen die Mundhöhle, der obere Respirationstrakt und der Urogenitaltrakt [62]. Zu den stärksten Virulenzfaktoren dieser Spezies gehören die in der äußeren Zellmembran verankerten Lipopolysaccharide. Sie

induzieren die Freisetzung osteolytisch wirksamer Entzündungsmediatoren und stimulieren so indirekt die Knochenresorption [63]. Darüber hinaus produziert *P. intermedia* zelltoxische Stoffwechselprodukte und trägt damit zur weiteren Gewebeschädigung bei [64]. Zum Schutz gegen die Immunantwort des Wirtsorganismus verfügt *P. intermedia* über verschiedene Proteasen, die die Opsonierung der Mikroorganismen verhindern und so die Phagozytose durch Leukozyten deutlich erschweren [65].

P. intermedia ist zur Invasion der Dentintubuli fähig [66, 67]. Durch die Produktion und Speicherung intrazellulärer Polysaccharide überlebt *P. intermedia* auch substratarmer Perioden [68]. Zudem ist *P. intermedia* in der Lage Serumproteine in Peptide und Aminosäuren aufzuspalten. Dies dient einerseits der eigenen Energiegewinnung und ermöglicht andererseits das Wachstum anderer Spezies. Bakterien, die auf Peptide angewiesen sind, selbst jedoch nicht die Enzyme zur Hydrolyse von intakten Proteinen besitzen, profitieren vom Zusammenleben mit *P. intermedia* [69]. Das Wachstum von *P. intermedia* selbst ist abhängig von Vitamin K und Hämin. Die Hämolyseaktivität sichert der Spezies die Bereitstellung des essentiellen Wachstumsfaktors Hämin. Für die Versorgung mit Vitamin K ist sie auf andere Spezies angewiesen, da dieses von ihr nicht selbst erzeugt werden kann [70-72].

Von zahnmedizinischer Relevanz ist, dass *P. intermedia* häufig mit oralen Abszessen und Parodontitiden assoziiert ist [73, 74]. Das Risiko der Ausbildung einer periapikalen Läsion scheint deutlich erhöht bei Wurzelkanalinfektionen, an denen *P. intermedia* beteiligt ist [67, 74]. Die Spezies ist überwiegend in Primärinfektionen des Endodonts zu finden, wurde aber auch aus revisionsbedürftigen Wurzelkanälen isoliert [24, 74].

2.3 Chemomechanische Aufbereitung

Das Ziel der Wurzelkanalbehandlung ist die Beseitigung der bakteriellen Infektion des Endodonts. Zu diesem Zweck wird das Wurzelkanalsystem sowohl mechanisch als auch chemisch aufbereitet. Die mechanische Präparation mittels Feilen und anderer geeigneter Instrumente verfolgt nach Grossman *et al.* [75] im Wesentlichen die Ziele:

- Erweiterung und Formgebung des Kanalsystems,
- Ausräumen des vitalen beziehungsweise nekrotischen Pulpagewebes,
- Entfernen des infizierten Dentins.

Darüber hinaus zerstört die Instrumentierung des Wurzelkanals die Integrität vorhandener Biofilme. Dieser Effekt und das durch die Aufbereitung zunehmende Kanalvolumen erhöhen die reinigende und desinfizierende Wirkung der eingesetzten Spüllösungen [76]. Allein durch die mechanische Bearbeitung der Dentinwände wird ein Großteil der endodontischen Mikroflora ausgeräumt. Jedoch bleiben abhängig von der angewandten Technik ein Drittel bis die Hälfte der Wurzelkanaloberfläche unbearbeitet [1, 2]. Diese Areale können als potenzieller Ausgangspunkt für eine Rekolonialisierung verbliebener Mikroorganismen dienen. Das Spülen mit desinfizierenden Lösungen während der Aufbereitung ist heute obligat, da es eine deutlich verstärkte Reduktion der mikrobiellen Belastung im Wurzelkanal bewirkt [77]. Die Anforderungen an endodontische Spüllösungen sind vielfältig. Sie sollten:

- eine antimikrobielle Wirkung mit einem breiten Wirkspektrum und einer hohen Effektivität gegenüber anaeroben und fakultativ anaeroben Mikroorganismen aufweisen.
- in den mikrobiellen Biofilm eindringen.
- organischen und anorganischen Kanalinhalt auflösen.
- bakterielle Lipopolysaccharide inaktivieren.
- die Bildung einer Schmierschicht (smear layer) während der Kanalaufbereitung verhindern beziehungsweise eine entstandene Schmierschicht entfernen.
- als Gleitmittel für die Wurzelkanalinstrumente dienen.
- eine geringe toxische Wirkung auf das periapikale Gewebe haben.
- keine Veränderungen der Zahnhartsubstanzen bewirken. [78]

Eine intermittierende Spültechnik sorgt zusätzlich für den stetigen Abtransport der während der Aufbereitung entstehenden Zerfallsprodukte und der anfallenden Dentinspäne [78, 79]. Die Auswahl an endodontischen Spüllösungen ist groß. Unter anderem sind dies Natriumhypochlorit (NaOCl), Chlorhexidindigluconat (CHX), Wasserstoffperoxid (H₂O₂), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Zitronensäure und Alkohol [78]. Die am häufigsten verwendete Spüllösung ist NaOCl [79]. In der Mehrzahl der endodontischen Behandlungen scheinen die reinigenden und desinfizierenden Eigenschaften des NaOCl ausreichend, um die Ausheilung eines apikalen Prozesses zu ermöglichen beziehungsweise dessen Entstehung vorzubeugen [80]. Die Kombination verschiedener Spülflüssigkeiten kann unter bestimmten Voraussetzungen sinnvoll sein.

2.3.1 Natriumhypochlorit

NaOCl ist bis heute bei Zahnärzten weltweit das Desinfektionsmittel der ersten Wahl im Rahmen einer Wurzelkanalbehandlung [79, 81]. Es zeichnet sich durch seine starke antimikrobielle Wirkung und sein breites Wirkspektrum aus. Die desinfizierenden Eigenschaften sind nicht nur auf Bakterien beschränkt, sondern wurden auch für Pilze, Sporen, Protozoen und Viren nachgewiesen [82].

Der antimikrobielle Charakter des NaOCl ist zurückzuführen auf die Desintegration der Zellmembran, die Störungen des Zellstoffwechsels durch veränderte beziehungsweise gehemmte Enzymaktivität und die Bildung von Chloraminen als hoch toxische Zellgifte [83].

NaOCl ist als einzige Spüllösung in der Lage in den endodontischen Biofilm einzudringen und diesen zu zerstören [84, 85]. Bereits bei niedrigen Konzentrationen zeigt es im Vergleich zu anderen endodontischen Spülmedien das größte Vermögen sowohl vitales als auch nekrotisches Pulpagewebe aufzulösen [82, 86, 87]. In einigen Übersichtsarbeiten wird NaOCl die Fähigkeit zur Inaktivierung von Endotoxinen zugesprochen [79]. Diese ist jedoch unvollständig. Durch die Spülung des Wurzelkanals mit NaOCl können die bakteriellen LPS reduziert werden. Geringe Mengen bleiben jedoch regelmäßig im Kanalsystem zurück [88, 89].

In der Endodontie wird NaOCl in Konzentrationen zwischen 0,5 % und 5,25 % verwendet [79]. Die antimikrobielle Wirkung dieser Spüllösung ist abhängig von der Menge freien Chlorids. Im Wurzelkanal wird das Chlorid vom Dentin gebunden und damit die Wirksamkeit des NaOCl herabgesetzt [49, 90]. Mit steigender Konzentration nehmen die zytotoxischen Eigenschaften und somit die Irritation des periapikalen Gewebes beim Überpressen der Spüllösung zu [91]. Da in mehreren Studien keine nennenswerten Unterschiede der antimikrobiellen Wirkung von verschiedenen Konzentrationen beschrieben werden [92, 93], werden in der Literatur überwiegend Empfehlungen für 1- bis 3%ige Lösungen ausgesprochen [78, 79]. Darüber hinaus sorgt ein häufiger Austausch der Spüllösung für eine andauernd hohe Verfügbarkeit von freiem Chlorid [78].

2.3.2 Chlorhexidindigluconat

Chlorhexidin ist ein synthetisch hergestelltes kationisches Biguanid. Da Chlorhexidin nur sehr gering in Wasser löslich ist, werden hauptsächlich die Salze dieser Verbindung

als Antiseptika genutzt. Chlorhexidindigluconat (CHX) findet heute seine Anwendung in der Ophthalmologie, Gynäkologie, Urologie und Zahnheilkunde. Es wird zur Desinfektion der Haut und von Operationssitus genutzt. In der Zahnmedizin kommt es standardmäßig zur Desinfektion der Mundhöhle vor operativen Eingriffen und in der Parodontologie zum Einsatz. Von einigen Autoren wird es zur Desinfektion des Wurzelkanalsystems als adjuvantes Spülmedium insbesondere in Revisionsfällen empfohlen [79, 94]. Im Gegensatz dazu kamen Ng *et al.* in einer prospektiven Studie zu dem Ergebnis, dass der zusätzliche Gebrauch von CHX während der Aufbereitung des Kanalsystems die Wahrscheinlichkeit der Ausheilung einer apikalen Parodontitis herabsetzt. Der Einsatz von CHX als medikamentöse Einlage zwischen zwei Behandlungssitzungen in Kombination mit oder als Ersatz für Kalziumhydroxid ist trotz guter Ergebnisse in In-vitro-Studien als kritisch zu betrachten [94, 95].

CHX hat keine gewebeauflösenden Eigenschaften [86, 96] und ist nicht in der Lage bakterielle Endotoxine zu neutralisieren [88, 97]. Auch die während der Aufbereitung erzeugte Schmierschicht an der Kanalwand wird durch CHX nicht adäquat entfernt [98]. Dennoch zeichnet sich dieses Desinfektivum durch Eigenschaften aus, die deutliche Vorteile gegenüber anderen Spülmedien aufweisen. Hierzu zählen die Substantivität, also die prolongierte antiseptische Wirkung [99, 100] des CHX, als auch seine breite mikrobiologische Effektivität gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien sowie seine antimykotische Wirkung [101]. Ein weiterer positiver Aspekt ist die im Vergleich zu NaOCl geringe Toxizität [102]. In verschiedenen Studien wurde durchaus ein letaler Effekt des CHX auf verschiedene Wirtszellen nachgewiesen [103]. Jedoch scheint die Wahrscheinlichkeit einer Irritation des periapikalen Gewebes beim Überpressen der Spüllösung sehr gering, da die Toxizität durch Serumproteine, Dentinmatrix und Bakterienzellen herabgesetzt wird [104, 105]. CHX wird in der Endodontie in Konzentrationen von 0,2 bis 2,0 % genutzt [106, 107].

Der genaue Wirkmechanismus des CHX ist bisher noch unklar. Es wird vermutet, dass sich das stark basische Molekül, welches seine höchste biologische Wirksamkeit bei einem pH-Wert zwischen 5 und 8 aufweist, an die sauren Phospholipide der Bakterienoberfläche anlagert und so die Permeabilität der Zellmembran erhöht. In der Folge kommt es zu einem erhöhten Austritt von Kalium und Phosphor aus der Zelle. Dies bedingt eine Bakteriostase [94, 108]. In höheren Konzentrationen wirkt CHX bakteriolytisch, da das Molekül selbst in das Zellinnere eindringt und dort zur Präzipitation und Koagulation des Zytoplasmas führt [109, 110]. Aufgrund seiner

kationischen Struktur bindet Chlorhexidin locker an Hydroxylapatit und an die die orale Schleimhaut überziehenden Muzine. So ist es in der Lage seine antimikrobielle Aktivität über den Zeitraum der direkten Applikation hinaus fortzusetzen, indem ständig Chlorhexidinmoleküle freigesetzt werden [111]. Des Weiteren verhindert die Anlagerung an das Hydroxylapatit eine bakterielle Besiedlung der benetzten Dentinwände [112, 113]. Eine 2%ige CHX-Lösung scheint eine ausgedehntere Substantivität aufzuweisen als niedriger konzentrierte Lösungen [99].

Im Gegensatz zu NaOCl hat CHX ein geringeres Potenzial in Biofilme einzudringen und diese zu zerstören [114, 115]. Es werden 2%ige CHX-Lösungen zur Desinfektion des Wurzelkanals empfohlen, um eine ausreichende bakterizide Wirkung und eine entsprechend hohe Substantivität zu erreichen. In therapieresistenten Fällen und zur Behandlung von Zähnen mit nekrotischer Pulpa war in einzelnen Studien die kombinierte Spülung des Kanalsystems mit NaOCl und CHX effektiver im Infektionsmanagement als die alleinige Anwendung eines der beiden Spülmedien [116, 117].

2.4 Die photodynamische Therapie

Die PDT lässt sich allgemein als eine nichtinvasive lichtinduzierte Inaktivierung von Zellen, Mikroorganismen und Molekülen beschreiben, die auf drei Komponenten angewiesen ist: Lichtenergie, einen Farbstoff (Photosensibilisator) und Sauerstoff. Der Farbstoff bindet an die Zielzelle und wird durch Licht einer bestimmten Wellenlänge aktiviert. In diesem angeregten Zustand ist der Photosensibilisator hochreaktiv und kann über zwei potentielle Mechanismen seine toxische Wirkung entfalten. Zum einen ist die direkte Schädigung der DNA möglich, zum anderen wird die zytoplasmatische Membran der Zielorganismen in ihrem Aufbau gestört. In die Membran eingelagerte Transportsysteme und Enzyme können ihre Funktion verlieren, was letztlich den Zelltod zur Folge hat. Die Schädigung der Zellmembran scheint der hauptverantwortliche Faktor des bakteriziden Effekts der PDT zu sein [118].

Auf molekularer Ebene ist die PDT auf zwei Reaktionsarten zurückzuführen (Typ I und Typ II). Bei der Typ-I-Reaktion kommt es im Sinne einer Redoxreaktion zum Elektronentransfer vom aktivierten Photosensibilisator auf umgebende Moleküle. Durch die Lichtenergie können Wasserstoffionen vom Farbstoffmolekül unter Bildung freier Radikale abgespalten werden. Die hoch reaktiven Elektronen reagieren dann mit

endogenem Sauerstoff zu instabilen Sauerstoffspezies wie Hydroxyl- und Superoxidradikalen, welche dann die Zellmembran schädigen. Eine direkte Energieübertragung vom Farbstoffmolekül auf molekularen Triplett-Sauerstoff unter der Bildung von hoch reaktivem Singulett-Sauerstoff entspricht der Typ-II-Reaktion. Die Interaktion des Singulett-Sauerstoffs mit Molekülen der Zellmembran oder der Zellwand führt schließlich zum Zelltod. Da der Singulett-Sauerstoff mit weniger als 0,04 μ s nur eine sehr geringe Lebensdauer und lediglich einen Aktionsradius von unter 0,02 μ m aufweist [119], bleibt der Effekt der PDT lokal sehr begrenzt. Die Wirkung phototoxischer Effekte auf die ebenfalls angefärbten gesunden Wirtszellen im umgebenden Gewebe ist im Fall vieler Farbstoffe noch unklar. Die letalen Effekte der PDT auf die Zielzellen werden überwiegend durch die Typ-II-Reaktion vermittelt [120].

2.4.1 Die photodynamische Therapie in der Zahnmedizin

Der bedeutendste Anwendungsbereich der PDT in der Zahnmedizin ist aktuell die Parodontitis- und Periimplantitisbehandlung [121-123]. Die PDT als adjuvante Maßnahme im Rahmen der endodontischen Behandlung zeigt sich gegenwärtig als ein vielversprechender Therapieansatz [121, 124].

Es gibt eine Reihe verschiedener Systeme zur Photodesinfektion des Wurzelkanals, die sich untereinander bezüglich der Farbstoff-Laser-Kombination unterscheiden.

Um einen phototoxischen Effekt auf die Zielzelle ausüben zu können, muss der Photosensibilisator an die Zielzelle binden oder in diese eindringen. Bei gramnegativen Bakterien ist dieser Prozess deutlich erschwert, da diese im Vergleich zu Grampositiven über eine zusätzliche äußere Zellmembran verfügen. Diese Membran dient als effektive Diffusionsbarriere gegenüber externen Noxen. Für die PDT bedeutet das, dass zur Abtötung Grampositiver sowohl kationische aber auch neutrale und anionische Farbstoffe eingesetzt werden können. Um gramnegative Bakterien mit der PDT zu erreichen, sind kationische Photosensibilisatoren notwendig oder bei Verwendung nicht-kationischer Farbstoffe zusätzliche Strategien zur Erhöhung der Membranpermeabilität [125]. Die Vorbehandlung der Zielzellen mit EDTA [126] sowie die Kopplung des kationischen Photosensibilisators an ein basisches Trägermolekül [127] erwiesen sich diesbezüglich als wirksam.

In der Endodontie werden heute überwiegend die Phenothiazinfarbstoffe Toluidinblau O (TBO) und Methylenblau (MB) als Photosensibilisator eingesetzt. Bei diesen Farbstoffen

handelt es sich um mehrfachpositivgeladene Moleküle, die in der Lage sind, neben grampositiven auch gramnegative Bakterienspezies abzutöten. Der Photosensibilisator wird durch Lichtenergie aktiviert. Wichtig für eine optimale Nutzung des desinfizierenden Potentials ist die Abstimmung des Laserlichtes auf das Absorptionsmaximum des Photosensibilisators. Das Absorptionsmaximum für TBO liegt bei 632 nm, das für MB bei 664 nm. Als Energiequelle dienen Diodenlaser. Diodenlaser sind sogenannte Low-Level-Laser oder Softlaser, die monochromatisches Licht im Milliwattbereich emittieren. Aufgrund der geringen Energieleistung werden keine nennenswerten thermischen Effekte auf die bestrahlten Gewebe ausgeübt.

Eine eingehende Literaturrecherche ergab, dass gegenwärtig nur wenige In-vivo-Studien zur Anwendung der PDT während der Wurzelkanalbehandlung vorliegen. Eine dieser Studien stammt von Garcez *et al.* aus dem Jahr 2008 [128]. Sie führten an zwanzig Zähnen mit nekrotischer Pulpa und apikaler Aufhellung eine konventionelle Wurzelkanalbehandlung durch, bevor eine photodynamische Desinfektion mit dem Farbstoff PEI-ce6 erfolgte. In einer zweiten Sitzung wurde die Wurzelkanalbehandlung inklusive PDT nach dem gleichen Protokoll wiederholt. Die Ergebnisse zeigen, dass während der ersten Sitzung 91 % der Mikroorganismen durch die chemomechanische Aufbereitung abgetötet werden konnten. Die PDT führte zu einer weiteren Steigerung auf 98,5 %. Nach sieben Tagen, in denen der Wurzelkanal mit Kalziumhydroxid gefüllt und speicheldicht verschlossen war, waren in den Wurzelkanälen 40 % der ursprünglichen mikrobiellen Besiedelung erreicht. Die erneute Behandlung erzielte eine Gesamtreduktion der Mikroorganismen um 99,9 %. In einer In-vivo-Studie von Bonsor *et al.* [129] führte bereits die Aufbereitung unter alternierender Spülung mit Zitronensäure 20 % und NaOCl 2,25 % in sechzehn von zwanzig Fällen zu einer restlosen Elimination der Mikroorganismen im Wurzelkanal. Eine sich anschließende PDT mit Toloniumchlorid (Toluidinblau) bewirkte in drei weiteren Proben ein ausbleibendes bakterielles Wachstum. Die Autoren merkten an, dass im verbleibenden Wurzelkanal, in dem keine vollständige Desinfektion erreicht wurde, die optische Faser des Diodenlasers gebrochen war. Der mikrobielle Nachweis erfolgte in der oben genannten Studie durch Anzucht von Dentinproben, die zuvor aus dem Wurzelkanal entnommen worden waren, auf Blutagarplatten. Diese Arbeiten zeigen, dass die chemomechanische Aufbereitung bereits einen hohen Anteil der Wurzelkanalflora zerstört und dass die Desinfektion durch die zusätzliche PDT noch gesteigert werden

kann. Garcez *et al.* [130] bestätigten einen ausgeprägten bakteriziden Effekt der adjuvanten PDT auch auf antibiotikaresistente Mikroorganismen. In 30 klinischen Fällen, in denen zuvor aufgrund persistierender Infektionen eine Antibiose eingeleitet worden war, konnten durch die endodontische Revisionsbehandlung mit anschließender PDT alle Wurzelkanäle vollständig desinfiziert werden. War zu Beginn der Therapie in jedem Zahn mindestens eine resistente Spezies nachweisbar, so konnte bereits nach der konventionellen Revisionstherapie in zehn Proben kein bakterielles Wachstum mehr nachgewiesen werden. Durch die zusätzliche PDT wurden auch die verbleibenden zwanzig Kanäle vollständig desinfiziert. Für den mikrobiologischen Nachweis wurden Flüssigkeitsproben zu verschiedenen Therapiezeitpunkten aus dem Wurzelkanal entnommen. Die Bestimmung der Spezies erfolgte anhand diverser labordiagnostischer Methoden, die sowohl morphologische als auch physiologische Merkmale testeten. Darüber hinaus wurde ein Antibiotogramm erstellt.

3 Fragestellung und Arbeitshypothese

Durch die chemomechanische Aufbereitung während einer endodontischen Behandlung sollte nekrotisches, infiziertes Gewebe ausgeräumt und eine bestmögliche Keimreduktion erzielt werden. Die vollständige Entfernung teilungsfähiger Bakterien aus dem Wurzelkanal ist mit den konventionellen Therapiestrategien bisher nicht möglich [1, 131, 132].

Eine bewährte Spüllösung in der Endodontie ist das NaOCl. Es weist sowohl bei alleiniger Anwendung als auch in der Kombination mit anderen Spülmitteln eine hohe desinfizierende Wirkung auf [92]. Eine ergänzende Spülung mit CHX erscheint vor allem dann sinnvoll, wenn der Verdacht naheliegt, dass die Spezies *E. faecalis* an der Infektion beteiligt ist [116, 133].

Inwiefern die PDT die desinfizierende Wirkung der konventionellen Aufbereitung ergänzen kann und welchen Einfluss dabei unterschiedliche Spülprotokolle auf das Ergebnis haben, sollte in dieser Arbeit geprüft werden. Des Weiteren wurde untersucht, in welchem Ausmaß die PDT, sowohl als alleinige Behandlungsmaßnahme als auch in der Kombination mit konventionellen Spülprotokollen, in der Lage ist, einen Multispezies-Biofilm anzugreifen.

Die Arbeitshypothese dieser In-vitro-Studie ging davon aus, dass eine zusätzlich zur klassischen chemomechanischen Aufbereitung durchgeführte PDT zu einer höheren Reduktion, sowohl der planktonischen als auch der dentinadhärenten Bakterien im Wurzelkanal führt als jede der beiden Therapien für sich allein genommen.

Weiterhin wurde vermutet, dass eine ergänzende Abschlussspülung mit CHX 2 % eine gesteigerte Bakterienreduktion zur Folge hat.

Als Nullhypothese wurde angenommen, dass weder die mechanische Aufbereitung, noch ein antibakterielles Spülprotokoll, noch die PDT einen Effekt auf die Bakterienreduktion ausüben.

4 Material und Methode

4.1 Studiendesign

Zur experimentellen Untersuchung der Effektivität verschiedener antibakterieller Spüllösungen, der PDT sowie der kombinierten Anwendung verschiedener Spülprotokolle und der photodynamischen Desinfektion auf einen bakteriellen Multispezies-Biofilm wurden 160 extrahierte humane Zähne randomisiert auf vier Hauptuntersuchungsgruppen (n = 40) entsprechend der chemomechanischen Aufbereitung aufgeteilt.

Im Rahmen der Vorbereitungsphase wurden die Zähne der Hauptgruppe 1 (HG 1) bereits vollständig bis zu einer apikalen Masterfeile (MAF) ISO 02/60 und die Zähne der Hauptgruppen 2 bis 4 (HG 2 bis HG 4) zunächst nur bis zu einer MAF ISO 02/40 erweitert. Als Spüllösung während der Aufbereitung diente physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %; Apotheke der Charité). Nach der Sterilisation der Zahnproben erfolgte die Etablierung eines Multispezies-Biofilmes, bestehend aus *E. faecalis*, *P. intermedia* und *S. oralis*, im Wurzelkanal. Zum Nachweis des Biofilmes wurde eine *Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)* exemplarisch an drei zusätzlichen Proben vorgenommen.

Vor der Versuchsdurchführung (T0) wurde in jedem Wurzelkanal die Bakterienkonzentration bestimmt. Die Zähne der HG 1 erfuhren im Rahmen der Versuchsdurchführung keine weitere Aufbereitung. In den HG 2 bis 4 wurden die Zähne unter Anwendung verschiedener Spülprotokolle bis MAF ISO 02/60 aufbereitet. Bei jeweils der Hälfte der Proben einer Hauptgruppe (n = 20) erfolgte eine zusätzliche photodynamische Desinfektion. Die verbleibenden 20 Zähne einer Hauptgruppe erfuhren keine weitere Behandlung. Dieses Vorgehen hatte eine entsprechende Aufteilung der Hauptgruppen in je zwei Nebengruppen (NG 1, ohne PDT; NG 2, mit PDT) zur Folge (siehe Tabelle (Tab.) I).

Der gewählte Versuchsaufbau ermöglichte in der HG 1 die Wirkung der PDT als alleinige Behandlungsmaßnahme auf einen Multispezies-Biofilm zu untersuchen. Weiterhin stellt die NG 1, welche keine photodynamische Desinfektion beinhaltet, die jeweilige Kontrollgruppe für den Effekt der PDT dar. In der HG 2 erfolgte während der Aufbereitung eine Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung, sodass diese

Hauptgruppe als Kontrollgruppe für die desinfizierende Wirkung der Spüllösungen angesehen werden kann sowie im Vergleich zur HG 1 für den Effekt der mechanischen Aufbereitung. In der HG 3 diente Natriumhypochlorit 1 % (NaOCl 1 %; Apotheke der Charité) als Spüllösung. In der HG 4 wurde während der Aufbereitung mit NaOCl 1 % gespült. Im Anschluss an die Aufbereitung erfolgten eine Zwischenspülung mit Alkohol (2-Propanol 70 %, Emprove® exp; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und weiterhin eine Abschlusspülung mit einer 2%igen Chlorhexidindigluconatlösung (CHX 2 %; Apotheke der Charité).

Tabelle I: Einteilung der Untersuchungsgruppen

		Hauptgruppen (N=40)			
		HG 1	HG 2	HG 3	HG 4
Nebengruppen (N= 20)		keine Aufbereitung	Aufbereitung mit NaCl 0,9 %	Aufbereitung mit NaOCl 1 %	Aufbereitung mit NaOCl 1 % und CHX 2 %
NG 1	ohne PDT	G 1.1	G 2.1	G 3.1	G 4.1
NG 2	mit PDT	G 1.2	G 2.2	G 3.2	G 4.2

HG, Hauptgruppe; **NG**, Nebengruppe; **G**, Gruppe; **PDT**, photodynamische Therapie; **NaCl**, Natriumchlorid; **NaOCl**, Natriumhypochlorit; **CHX**, Chlorhexidindigluconat

Nach Durchführung des Therapieprotokolls wurden die Proben jeder Nebengruppe in zwei weitere Untergruppen (n = 10) eingeteilt, um eine qualitative sowie quantitative Auswertung der nach der Behandlung im Wurzelkanal verbliebenen Bakterien zu zwei verschiedenen Zeitpunkten durchzuführen. Bei der Hälfte aller Proben erfolgte die Bestimmung der Bakterienkonzentration direkt nach der Therapie (T1) durch Anzucht der Bakterien aus dem Wurzelkanal auf Universalnährböden (Col.BAP mit Vit.K und Haemin; heipha, Eppelheim, Deutschland) und Auszählen der koloniebildenden Einheiten (KBE). Im Vergleich dazu wurden die Zähne der anderen Untergruppe (T2) für weitere fünf Tage bebrütet und erst danach qualitativ und quantitativ nach der gleichen Methode ausgewertet. Eine tabellarische Übersicht über Vorbereitung und Ablauf der Versuchsdurchführung gibt Tab. II.

Tabelle II: Vorbereitung und Ablauf der Versuchsdurchführung

1.	Reinigung der Zähne ↓			
2.	Sterilisation ↓			
3.	Aufbereitung unter Kochsalzspülung (NaCl 0,9 %), HG 1 bis MAF ISO 02/60 und HG 2 - 4 bis MAF ISO 02/40 ↓			
4.	Einbetten in Kunststoffubes ↓			
5.	Sterilisation ↓			
6.	Sterilisationskontrolle ↓			
7.	Etablierung des Multispezies-Biofilmes bestehend aus <i>E. faecalis</i>, <i>S. oralis</i>, <i>P. intermedia</i> ↓			
8.	Bestimmung der Bakterienkonzentration vor der Therapie (T0) ↓			
9.	Versuchsdurchführung			
	HG 1 keine weitere Aufbereitung		HG 2 - 4 Aufbereitung bis MAF ISO 02/60	
9.1	↓ NG 1, ohne PDT	↓ NG 2, mit PDT	↓ NG 1, ohne PDT	↓ NG 2, mit PDT
10.	Bestimmung der Bakterienkonzentration			
	↓ direkt im Anschluss an die Versuchsdurchführung (T1)		↓ nach fünftägiger Inkubation (T2)	

HG, Hauptgruppe; **NG**, Nebengruppe; **PDT**, photodynamische Therapie; **MAF**, apikale Masterfeile; *E. faecalis*, *Enterococcus faecalis*; *S. oralis*, *Streptococcus oralis*; *P. intermedia*, *Prevotella intermedia*

4.2 Vorbereitende Maßnahmen zur Versuchsdurchführung

4.2.1 Auswahlkriterien für die Zahnproben

Alle in der Studie verwendeten Zähne waren humanen Ursprungs. Die Zähne waren vor unbestimmter Zeit extrahiert worden und sind in 0,5%iger Chloramin-T-Lösung (Chloramin T Trihydrat; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gelagert worden. Es wurden nur einwurzelige Zähne mit genau einem Wurzelkanal verwendet. Eine übermäßige Krümmung der Wurzel, eine vorhandene Wurzelkanalfüllung,

Wurzelkaries sowie eine plastische Füllung im Bereich der Wurzel führten zum Ausschluss aus der Untersuchung.

4.2.2 Vorbereitung der Zahnproben

Zunächst wurden alle 160 Zähne mittels Ultraschall (SONICFlex; KaVo, Biberach, Deutschland) gereinigt und nachfolgend plasmasterilisiert (Campus Benjamin Franklin, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland). Anschließend wurden die Zähne unter Verwendung einer diamantierten Trennscheibe (HORICO Diamantscheibe; Hopf, Ringleb & Co. GmbH & Cie., Berlin, Deutschland) auf eine einheitliche Länge von 19 mm eingekürzt (siehe Abbildung (Abb.) 1).

Vor der Aufbereitung der Proben wurde zur Schaffung eines koronalen Flüssigkeitsreservoirs ein kugelförmiger Diamant mit 2,9 mm Durchmesser (Diamantkugel Größe 029 Komet; Gebr. Brasseler, Lemgo, Deutschland) bis zu dessen Äquator am Kanaleingang abgesenkt. Die koronale Erweiterung des Wurzelkanals mittels Gates Bohrern schloss sich an. In der HG 1 erfolgte dies mit Gates Bohrern der ISO-Größen 150 und 130 (Gates Glidden Bohrer Größen 6 und 5; VDW, München, Deutschland) und in den übrigen Hauptgruppen mit Gates Bohrern der ISO-Größen 130 und 110 (Gates Glidden Bohrer Größen 5 und 4; VDW). Zuerst wurde der jeweils größere der entsprechend der Hauptgruppe verwendeten Gates-Bohrer bis zu einer Tiefe von 4,5 mm in den Kanal eingeführt und dann der zweite, kleinere Gates-Bohrer bis zu einer Tiefe von 7,5 mm versenkt. Daraufhin erfolgte eine maschinelle Aufbereitung des Wurzelkanals mit Hilfe des Flexmastersystems (FlexMaster® System; VDW) entsprechend der Crown-down-Technik.

Die Proben der HG 1 erfuhren bereits vor der Versuchsdurchführung eine vollständige Aufbereitung des Wurzelkanals bis MAF ISO 02/60. Die Zähne der HG 2 bis 4 wurden initial nur bis MAF ISO 02/40 aufbereitet. Die Arbeitslänge in allen vier Hauptgruppen entsprach 18 mm. Abschließend wurde in allen 160 Proben zur Schaffung einer einheitlich konischen Kanalform und zur Vermeidung einer Stufenbildung eine Feile der ISO-Größe 06/30 (Headström ISO 30, VDW) an den Kanalwänden entlang geführt. Als Spüllösung während der Aufbereitung diente physiologische Kochsalzlösung. Zur Entfernung der Schmierschicht erfolgte eine Behandlung mit flüssiger Ethylendiamintetraessigsäure 18 % (Ultradent® EDTA 18 %, Ultradent Products USA,

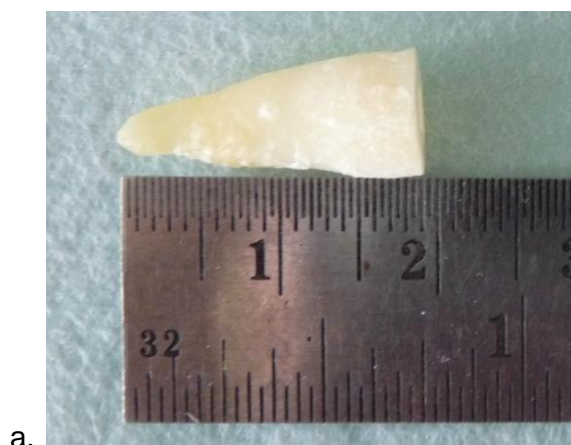
Köln Deutschland). Die Ethylendiamintetraessigsäure wurde wiederum durch Spülen des Kanals mit 10 ml physiologischer Kochsalzlösung entfernt (Tab. III).

Tabelle III: Aufbereitungsprotokoll während der initialen Aufbereitung

Hauptgruppe	Feile (Konizität/ISO- Größe)	Arbeitslänge	Spülvolumen	Spüllösung
1 - 4	—	—	3 ml	NaCl 0,9 %
	Introfeile (blau)		2 ml	NaCl 0,9 %
	06/30	max. 16 mm	2 ml	NaCl 0,9 %
	06/25	max. 16 mm	2 ml	NaCl 0,9 %
	06/20	max. 16 mm	2 ml	NaCl 0,9 %
	04/30	max. 16 mm	2 ml	NaCl 0,9 %
	02/30	18 mm	2 ml	NaCl 0,9 %
	02/35	18 mm	2 ml	NaCl 0,9 %
	02/40	18 mm	2 ml	NaCl 0,9 %
1	02/45	18 mm	2 ml	NaCl 0,9 %
	02/50	18 mm	2 ml	NaCl 0,9 %
	02/60	18 mm	2 ml	NaCl 0,9 %
1 - 4	06/30	18 mm	3 ml	NaCl 0,9 %

NaCl, Natriumchlorid; **mm**, Millimeter; **ml**, Milliliter

Um eine spätere Bakterienmigration zwischen Wurzeloberfläche und Wurzelkanal zu vermeiden erfolgte eine äußere Versiegelung der Wurzeln mit Nagellack (Long Lasting Nail Colour; Rival de Loop, Berlin, Deutschland). Anschließend wurden die Proben mit Kunststoff (Technovit 4071; Heraeus Kulzer, Deutschland) in Kunststoffröhrchen (Safeseal Microtube 2 ml PP; Sarstedt, Deutschland) eingebettet. Für die erneute Plasmasterilisation (Campus Benjamin Franklin, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland) wurde die Probe aus dem Kunststoffröhrchen entfernt (siehe Abbildung (Abb.) 1).



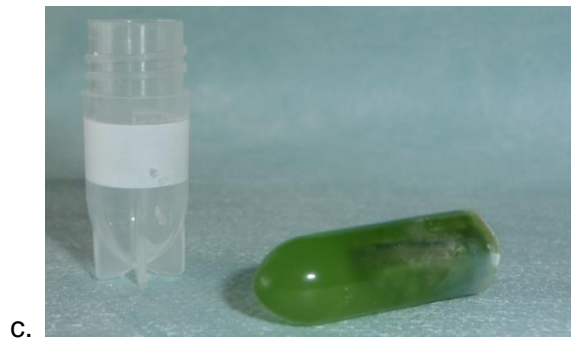


Abbildung 1: Vorbereitung der Versuchsproben

a) gereinigter und auf 19 mm eingekürzter Zahn, **b)** eingebettete Probe im Kunststoffröhrchen, **c)** eingebettete Probe und Kunststoffröhrchen vor Sterilisation

4.2.3 Sterilisationskontrollen

Vor der Inokulation von Bakterien zur Etablierung eines Biofilmes wurde an jedem Zahn eine Sterilisationskontrolle durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Zähne in 50 Milliliter fassende Kunststoffröhrchen (50 ml Falcon Röhrchen; Sarstedt, Numbrecht, Deutschland) mit steriler Hirn-Herz-Bouillon (BHI, Hirn-Herz-Bouillon; SIFRIN, Berlin, Deutschland) angereichert mit 0,1 % Cystein (L-Cysteine hydrochloride monohydrate; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland), 0,5 % Hefe (Yeast extract SERVABACTER®; SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland), 0,01 % Vitamin K (Konakion MM; Apotheke der Charité) und 0,025 % Hemin (Hemin bovine; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) für den Zeitraum von fünf Tagen im Brutschrank gelagert. Für jeden Zahn wurde ein separates Kunststoffröhrchen verwendet. Sofern keine Trübung der Lösung eintrat, war die Zahnprobe steril.

4.2.4 Erzeugung eines Biofilmes im Wurzelkanal

4.2.4.1 Bakteriengewinnung und -aufbereitung

Zur Etablierung eines Multispezies-Biofilmes wurden die Spezies *E. faecalis*, *P. intermedia* und *S. oralis* herangezogen. Die verwendeten Bakterienstämme entstammten dem unbehandelten Wurzelkanal eines Probanden. Zur Identifizierung der Mikroorganismen wurden diese nach der Probengewinnung auf Universalnährböden angezüchtet und makroskopisch untersucht. Eine Gramfärbung mit anschließender lichtmikroskopischer Auswertung diente der mikroskopischen Analyse der

Mikroorganismen. Abschließend verhalf mit dem Analytischen-Profil-Index (Rapid ID 32 STREP, Rapid ID 32; bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) ein biochemisches Nachweisverfahren zur endgültigen Bestimmung der Bakterienspezies. Nach entsprechender Aufbereitung wurden die Zellen mit Hilfe eines Einfriermediums (DMSO freezing broth; Labor - Abt. Parodontologie und synoptische Zahnmedizin der Charité) als Monospezies konserviert. Hierfür wurde jeweils ein Milliliter beimpftes Einfriermedium in ein Cryotube (Cryo-Tubes; Carl Roth GmbH + Co. KG) überführt und die Suspension 24 Monate bei -80 °C gelagert. Im Rahmen der Rekultivierung wurde jeweils ein Milliliter der Suspension innerhalb von zehn Minuten aufgetaut und gleichmäßig auf sechs sterile Nährböden ausplattiert. Die Bebrütung der Nährböden erfolgte für drei Tage bei 37 °C in einem Anaerobiertopf (Anaerobiertopf; OXOID GmbH, Wesel, Deutschland, Anaerobiertopf; Merck KGaA). Für die mit der Spezies *P. intermedia* beimpften Nährböden wurde in einem separaten Topf unter Verwendung des AnaeroGen-Gasentwicklers (AnaeroGen™; OXOID) ein sauerstoffarmes Milieu (< 0,1 % Sauerstoff (O₂), 7 - 15 % Kohlenstoffdioxid (CO₂); entsprechend der Herstellerangaben) erzeugt. Die Inkubation der Stämme *E. faecalis* und *S. oralis* fand in einer mit CO₂ (CO₂ Gen™; OXOID) angereicherten Atmosphäre mit 6 % CO₂ in 15 % O₂ (entsprechend der Herstellerangaben) statt. Während der Bebrütung wurden die Anaerobiertöpfe in einem Brutschrank (Typ T50 28; Heraeus, Hanau, Deutschland) gelagert. Nach drei Tagen wurden die Nährböden per Sichtkontrolle auf Kolonien untersucht. Mit Hilfe eines sterilen Watteträgers (Euroturbo® collection swab; Dental AB, Rubi, Spanien) wurden die Monospezieskulturen erneut auf sterile Nährböden überimpft. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle drei Spezies unter Erzeugung eines sauerstoffarmen Milieus bebrütet.

Vor dem Herstellen einer Mischbouillon erfolgte der mikroskopische Nachweis der einzelnen Bakterienstämme durch die Gram-Färbung. Gleichzeitig wurde bei dieser Untersuchung die Reinheit der verwendeten Kulturen geprüft. Für die Gram-Färbung wurde zunächst ein Tropfen sterile Kochsalzlösung auf einen Objektträger (Objektträger; Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) gegeben. Anschließend wurden die Mikroorganismen per sterilen Watteträger vom Nährboden auf den Objektträger übertragen und in der Natriumchloridlösung ausgestrichen. Nach dem Lufttrocknen der Suspension erfolgte die Fixierung der Bakterien, indem der Objektträger dreimal durch die Flamme des Bunsenbrenners gezogen wurde. Zum Anfärben der

grampositiven Bakterien wurde zunächst der Farbstoff Kristallviolett (Grams Kristallviolettlösung; Merck KGaA) für 90 Sekunden auf den Objektträger gegeben. Daran schloss sich das Beizen mit Lugol'scher Lösung (Lugols Lösung; Merck KGaA) für ebenfalls 90 Sekunden an. Durch Zugabe von Entfärbelösung (Grams Entfärbelösung; Carl Roth GmbH + Co. KG) wurde nicht gebundener Farbstoff ausgewaschen. Zur Markierung der gramnegativen Bakterien wurde anschließend der Farbstoff Safranin (Safraninlösung; Carl Roth GmbH + Co. KG) für 90 Sekunden auf das Präparat aufgetragen. Zwischen dem Auftragen der verschiedenen Lösungen wurde der jeweils nicht gebundene Anteil der verwendeten Flüssigkeit durch Abspülen des Präparates unter fließendem Wasser ausgewaschen. Abschließend wurde auf den Objektträger ein Tropfen Öl (Immersionsöl; Merck KGaA) gegeben und das Präparat unter dem Mikroskop (Lichtmikroskop; Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) bei 1000-facher Vergrößerung untersucht.

Zusätzlich erfolgte der biochemische Nachweis der Bakterien unter Verwendung des Analytischen-Profil-Indexes. Bei diesem Schnellbestimmungssystem wurden die Bakterien in physiologischer Natriumchloridlösung bis zu einem Trübungsgrad 4 entsprechend der Herstellerangaben gelöst. Zur Übertragung der Mikroorganismen vom Nährmedium in die Flüssigkeit diente eine Kunststofföse (Einwegschleifen; Thermo Scientific™ Nunc™ Waltham, MA USA). Nachfolgend wurden je 55 µl dieser Suspension in die zehn Reaktionswannen eines Teststreifens gegeben, nach Herstellerangaben aufbereitet und bei 37 °C für vier Stunden inkubiert. Der Farbumschlag der einzelnen Substrate im Teststreifen, ermöglichte die Identifikation der Mikroorganismen. Für jeden der drei Bakterienstämme wurde ein separater Teststreifen beimpft.

4.2.4.2 Inokulation der Bakteriensuspension in die Zahnproben

Alle nachfolgend genannten Arbeitsschritte wurden in einer sterilen Werkbank (Mikrobiologische Sicherheitskabine; Bleyemehl Reinraumtechnik GmbH, Inden, Deutschland) durchgeführt. Nach der Identifikation der einzelnen Bakterienstämme sowie der Überprüfung ihrer Reinheit wurde von jedem Stamm eine Bouillon hergestellt. Dazu wurden 10 ml BHI mit der jeweiligen Spezies beimpft. Die Übertragung der Mikroorganismen vom Nährboden auf die Bouillon erfolgte mit Hilfe eines sterilen Watteträgers. Um eine Mischbouillon herstellen zu können, die zu drei gleichen Teilen

die Spezies *E. faecalis*, *P. intermedia* und *S. oralis* enthielt, wurde die Konzentration der Bakterien in der Monospezies-Bouillon durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm im Photometer (Novaspec II Visible Spectrophotometer; Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) ermittelt. Im Rahmen von Voruntersuchungen wurde die optische Dichte verschiedener Konzentrationen jeder Spezies bestimmt. Eine Konzentration von näherungsweise $2,5 \times 10^8$ koloniebildenden Einheiten pro Milliliter (KBE/ml) ergab folgende optische Dichten (OD): *E. faecalis* OD ~ 0,25, *S. oralis* OD ~ 1,0, *P. intermedia* OD ~ 1,0.

Zur Erzeugung der Mischbouillon wurden 5 ml aus jeder Monospezies-Bouillon unter Verwendung einer sterilen Einmalspritze in ein steriles Kunststoffröhrchen gegeben und das so erzeugte Volumen von 15 ml zur gleichmäßigen Verteilung der Zellen 30 Sekunden mit Hilfe eines Reagenzglasschüttlers vermischt.

Vor dem Beimpfen des Wurzelkanals wurden die sterilen Zahnproben im Anaerobiertopf standsicher platziert. In einem Topf fanden jeweils vier Zahnproben Platz (Abb. 2). Die Mischbouillon wurde mit sterilen Einmalspritzen (BD Plastipak™ Insulinspritze 1 ml, BD, Madrid, Spanien) in die Wurzelkanäle appliziert.

Die Zähne wurden unter anaeroben Bedingungen für vier Tage bei 37 °C inkubiert. Während der Bebrütung wurde dem Wurzelkanal täglich Nährlösung zugeführt.

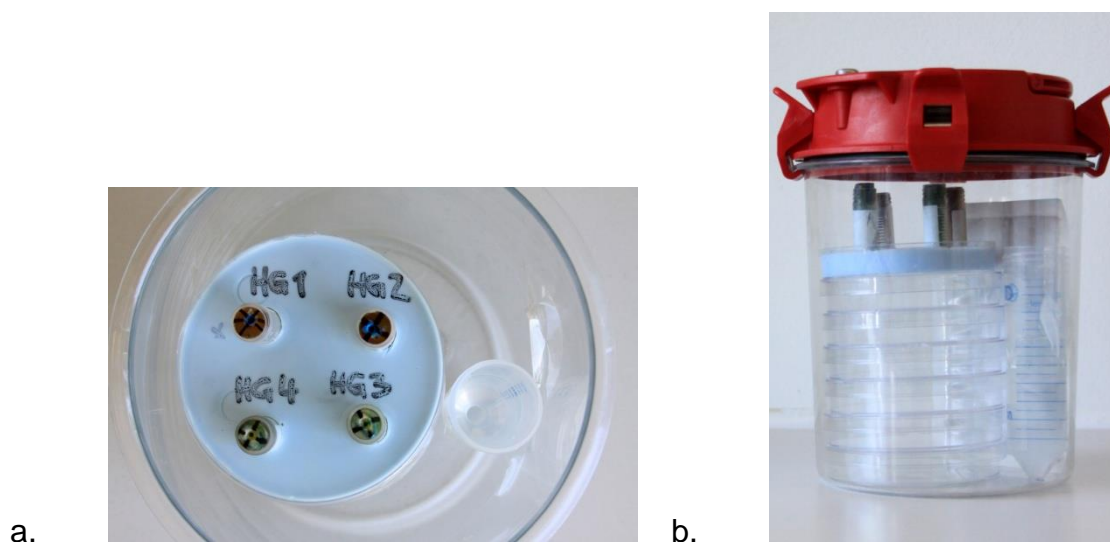


Abbildung 2: Anordnung der Proben im Anaerobiertopf

a) standsichere Platzierung und Kennzeichnung der Proben, **b)** für die Inkubation vorbereiteter verschlossener Anaerobiertopf

4.2.5 Wachstumsreihe

Um den Zeitpunkt einzugrenzen, an dem eine ausreichend hohe Bakterienkolonisation bei gleichzeitiger Teilungsfähigkeit der Mikroorganismen im Wurzelkanal vorlag, wurde vor dem Beimpfen der Versuchsproben eine Wachstumsreihe bestehend aus 12 x 3 Zähnen angesetzt. Die Proben wurden nach dem oben geschildertem Prinzip beimpft und für vierzehn Tage inkubiert. Ab dem dritten Tag erfolgte täglich eine Bestimmung der Bakterienkonzentration im Wurzelkanal an jeweils drei Zähnen. Dafür wurden Flüssigkeitsproben aus dem Wurzelkanal entnommen und auf einem sterilen Nährboden ausplattiert. Zusätzlich wurde eine Gram-Färbung angefertigt und das Präparat im Mikroskop untersucht. Das Zuführen der Mischbouillon sowie die Flüssigkeitsentnahme erfolgten in einer sterilen Werkbank um eine Kontamination der Zahnproben zu vermeiden. Erst nach einem Inkubationszeitraum von vier Tagen konnte ein Wachstum aller drei Spezies zuverlässig nachgewiesen werden. (*E. faecalis* 788 x 10⁶ KBE/ml, *S. oralis* 628 x 10⁶ KBE/ml, *P. intermedia* 1724 x 10⁶ KBE/ml; Σ = 3.140 KBE/ml). An den darauffolgenden Tagen sank die Bakterienkonzentration im Wurzelkanal zunächst wieder bis sie nach insgesamt sieben Tagen Inkubation erneut anstieg und erst nach neun Tagen einen vergleichbaren Wert (Σ = 3.160 x 10⁶ KBE/ml) erreichte.

4.2.6 Verdünnungsreihe

Die Verdünnungsreihe wurde während der Vorversuche durchgeführt, um einen geeigneten Verdünnungsfaktor, mit dem die Proben später ausplattiert werden sollten, zu bestimmen. Hierfür wurden die Flüssigkeitsproben, die im Rahmen der Wachstumsreihe aus dem Wurzelkanal entnommen worden waren, in unterschiedlichen Konzentrationen auf mehreren Nährböden ausplattiert (siehe Tab. IV).

Mit Hilfe einer Papierspitze der ISO-Größe 40 (Paperpoint ISO 40; VDW) wurde Flüssigkeit bis zu einer Markierung von 18 mm aus dem Wurzelkanal entnommen. Das Volumen des auf diese Weise gewonnenen Probenmaterials betrug 5 μ l.

Die Flüssigkeitsproben der Wachstumsreihe wurden in folgenden Verdünnungen ausplattiert: 1: 4.000, 1: 40.000, 1: 400.000, 1: 4.000.000. Die jeweilige Verdünnung wurde folgendermaßen erreicht: Mit Hilfe einer Papierspitze der ISO-Größe 40 wurden aus dem Wurzelkanal 5 μ l Flüssigkeit entnommen. Die Papierspitze wurde zusammen

mit 1995 μl BHI in ein Kunststofftube (Eppendorf Save-Lock Tube; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) eingebracht und dieses für 30 Sekunden auf dem Reagenzglasschüttler platziert. Anschließend wurden mittels Eppendorf-Pipette (Eppendorf Reference[®] 2; Eppendorf AG) 100 μl aus dem Tube entnommen und auf einem sterilen Nährboden ausplattiert (Verdünnung 1: 8000). Weitere 100 μl der Lösung wurden erneut mit 900 μl BHI verdünnt. Aus der entstandenen Lösung wurden wiederum zwei Proben der Volumina 100 μl entnommen. Die eine Probe wurde ausplattiert und damit die Verdünnung 1: 40.000 erreicht. Die zweite Probe diente der Erzeugung der Verdünnung 1: 400.000, indem der eben beschriebene Vorgang wiederholt wurde. Die nochmalige Wiederholung des Vorgehens führte zu einer Verdünnung von 1: 4.000.000. Die beimpften Nährböden wurden für drei Tage bei einer Temperatur von 37 °C im Brutschrank gelagert, bevor die Bestimmung der KBE/ml erfolgte (siehe Abb. 3 und 4).

Tabelle IV: Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Bakterienkonzentration (KBE/ml) zum Zeitpunkt T₀

pipettierte Volumina	ausplattierte Volumina	Verdünnungsfaktor
5 μl (Papierspitze) in 1995 μl BHI →	100 μl	$2 \times 4 \times 10^3$
↓		
100 μl in 900 μl BHI →	100 μl	4×10^4
↓		
100 μl in 900 μl BHI →	100 μl	4×10^5
↓		
100 μl in 900 μl BHI →	100 μl	4×10^6

KBE/ml, koloniebildende Einheiten pro Milliliter; **T₀**, vor der Therapie; **BHI**, Hirn-Herz-Bouillon; **μl** , Mikroliter

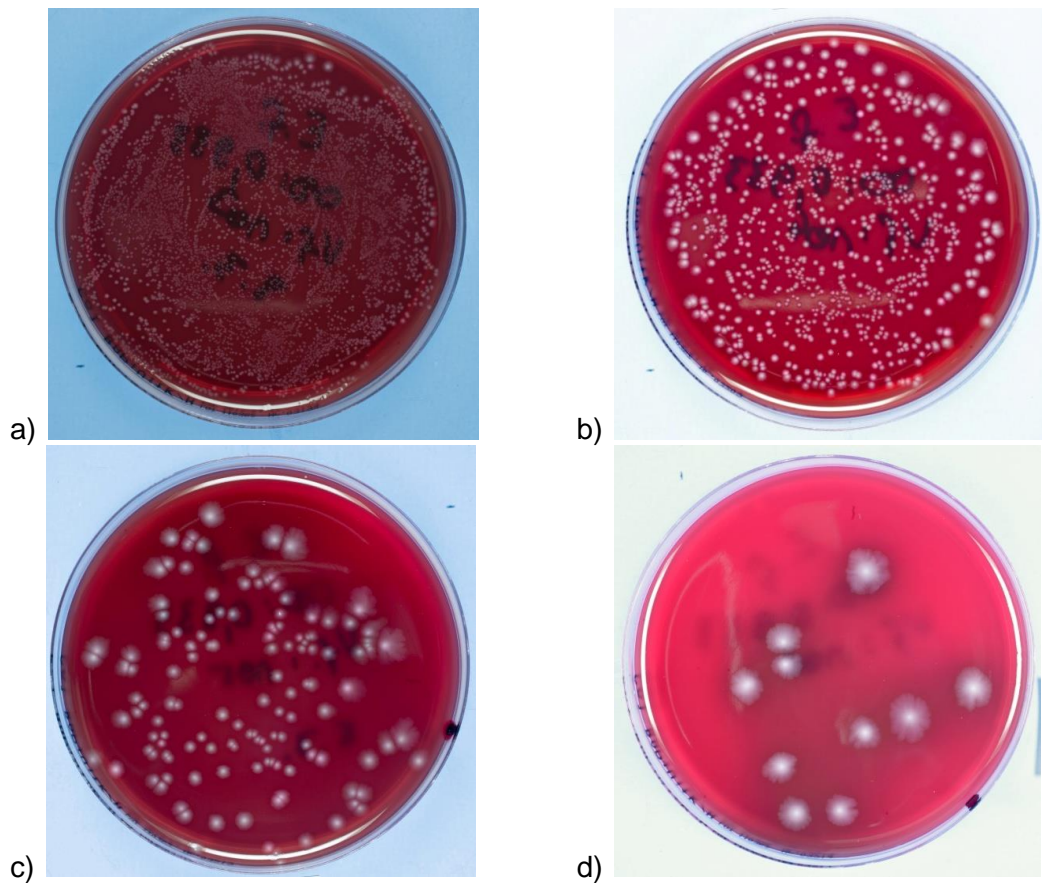


Abbildung 3: Verdünnungsreihe

Enterococcus faecalis, optische Dichte = 0,933

a) Verdünnungsfaktor (Vf) = $2 \times 4 \times 10^3$, **b)** Vf = 4×10^4 , **c)** Vf = 4×10^5 , **d)** Vf = 4×10^6

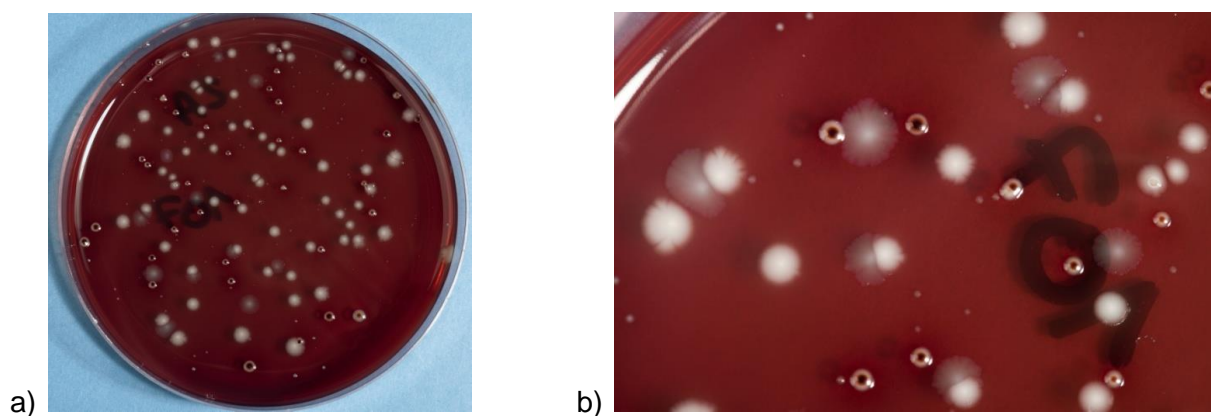


Abbildung 4: Flüssigkeitsprobe aus dem Wurzelkanallumen

koloniebildende Einheiten (KBE) der Spezies *Streptococcus oralis* (homogen milchig weiße, opake KBE), *Prevotella intermedia* (scharf begrenzte, zentral braun bis schwarz gefärbte KBE) und *Enterococcus faecalis* (transluzente, weiße KBE mit zentraler Opazität)

a) Verdünnungsfaktor 4×10^7 , **b)** vergrößerter Bildausschnitt derselben Agarplatte

4.2.7 Qualitative Untersuchung

Zum Nachweis eines Biofilmes in drei exemplarisch beimpften Zahnproben wurde im Rahmen der Kooperation mit dem zahnmedizinischen Institut der Universität Aarhus in Dänemark an diesen eine *Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)* durchgeführt und die Proben anschließend unter einem konfokalen Laser Mikroskop (Zeiss LSM 700 Confocal Laser Scanning Microscope (CSLM); Carl Zeiss, Jena, Deutschland) ausgewertet.

Zunächst wurden die Wurzelkanäle analog zu den Versuchsproben aufbereitet, beimpft und inkubiert. Anschließend wurden die Proben in Vorbereitung auf die *FISH* fixiert. Die *FISH* selbst sowie die mikroskopische Auswertung fanden im zahnmedizinischen Institut der Universität Aarhus in Dänemark statt.

Nachfolgend werden die einzelnen Arbeitsschritte, obwohl von der Doktorandin nicht selbst durchgeführt, zusammengefasst dargestellt.

Die Zähne wurden nach dem Trocknen des Wurzelkanals mit Papierspitzen der ISO-Größe 40 mit 4%igem Paraformaldehyd in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) für sechzehn Stunden bei 4 °C fixiert. Die Überschüsse wurden mit steriler PBS ausgewaschen. Bis zum Einbetten der Proben in Kunststoff (Technovit 8100; Heraeus Kulzer, Deutschland) wurden diese in einer Lösung aus 100%igem Ethanol und steriler PBS im Volumenverhältnis 1: 1 bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde mit einem Mikrotom (Ernst Leitz GmbH, Wetzlar, Deutschland) entlang des Wurzelkanals ein 1 mm dicker Streifen präpariert und dieser dann in EDTA 17 % über einen Zeitraum von 16 - 27 Tagen dekalzifiziert. Die vollständige Demineralisation der Proben wurde mit digitalen Röntgenanalysen überprüft. Aus jedem Streifen wurden fünf Blöcke von koronal nach apikal präpariert. Es wurde darauf geachtet, dass jeder Block einen Teil des Wurzelkanals mit Biofilm und angrenzendem Dentin enthielt. Die Blöcke wurden erneut in Kunststoff eingebettet. Anschließend wurden mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Ultracut E; Reichert Jung Optische Werke AG, Wien, Österreich) 1 - 2 µm dünne Teilstücke präpariert und diese auf einem Adhäsionsobjektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht.

Im Rahmen der *FISH* wurden die Proben für neun Minuten mit 25 µl Lysozym (Sigma, Brøndby, Dänemark) (70 U/µl in 100 mmol/l Tris/HCl, pH 7.5, 5 mmol/l EDTA) bei einer Temperatur von 37 °C in einer Feuchtkammer behandelt, um die Permeabilität der Zellmembranen zu erhöhen. Die Hybridisierung der Proben mit markierten Sonden erfolgte in einer 30%igen Formamidlösung. Die Sonde STR405 (5'-TAG CCG TCC CTT

TCT GGT-3') diene zum Nachweis von *S. oralis* und war mit dem Farbstoff Alexa488 (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) markiert. Zum spezifischen Nachweis von *P. intermedia* wurde die Sonde PRIN (5'-CTT TAC TCC CCA ACA AAA GCA GTT TAC AA-3'), an welche der Farbstoff Atto550 (IBA, Göttingen, Deutschland) gebunden war, verwendet. Die Sonde EUB338 (5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'), zum unspezifischen Nachweis von Eubakterien, war an den Farbstoff Atto633 (IBA) gekoppelt. Vor der mikroskopischen Auswertung wurde ein Deckgläschen mit Citifluor AF1 (Citifluor Ltd, Leicester, UK) auf das Präparat gesetzt. Es schloss sich die Betrachtung der Präparate unter einem konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskop an. Die Farbstoffe wurden mit Laserstrahlen verschiedener Wellenlängen zur Fluoreszenz angeregt (Alexa488, $\lambda = 488$ nm, Atto550, $\lambda = 543$ nm, Atto 633, $\lambda = 639$ nm). Für die optische Auswertung wurde ein 100x/1,46 NA Oil Immersion Objektiv (alpha Plan-Apochromat, Zeiss) genutzt. Es wurden folgende Scanparameter gewählt: eine Bildgröße von 584 x 584 Pixel ($64 \times 64 \mu\text{m}^2$) mit einer Pixel-Verweilzeit von 5,53 μs .

4.3 Versuchsdurchführung

4.4 Bestimmung der Bakterienkonzentration vor der Therapie

4.4.1 Bestimmung der planktonischen Bakterienkonzentration vor der Therapie (T0)

Nach dem Beimpfen und darauf folgender Inkubation der Zähne für vier Tage bei 37 °C wurden vor der Versuchsdurchführung zunächst in allen Proben die Bakterienkonzentrationen bestimmt.

Mit einer sterilen Papierspitze der ISO-Größe 40 wurden 5 μl Flüssigkeit aus dem Wurzelkanal entnommen. Die Papierspitze wurde mit 1995 μl BHI in ein verschließbares Kunststofftube gegeben und dieses auf dem Reagenzglasschüttler platziert. Die gewonnene Probe wurde daraufhin zunehmend mit BHI, wie weiter oben beschrieben, versetzt, bis der jeweilige Verdünnungsfaktor erreicht war (Tab. IV). Es wurden jeweils 100 μl der Flüssigkeit mittels Eppendorf-Pipette auf einen sterilen Nährboden überführt und mit einem Glasspatel ausplattiert. Nach einer fünftägigen Inkubation der Agarplatte unter anaeroben Bedingungen bei einer Temperatur von 37° C erfolgten die Auszählung der entstandenen Kolonien und die Berechnung der KBE/ml.

Um die KBE der drei Bakterienstämme sicher makroskopisch gegeneinander abgrenzen zu können, wurde im Rahmen der Vorversuche ein geeigneter Verdünnungsfaktor ermittelt. Eine schwache Verdünnung der gewonnenen Probe erlaubt das Erfassen niedriger Zellzahlen. Eine hohe Zellkonzentration verhindert in diesem Falle jedoch das Abgrenzen einzelner Bakterienkolonien gegeneinander und schränkt deren Wachstumsverhalten auf dem Nährboden ein. Je höher der Verdünnungsfaktor angesetzt wird, umso eindeutiger sind makroskopische Eigenschaften der drei Spezies ausgebildet, da auch hohe Zellkonzentrationen nur wenige KBE auf dem Nährboden erzeugen. Auf Grundlage der Ergebnisse der Vorversuche wurden zur Bestimmung der Bakterienkonzentration vor der Therapie jeweils die Verdünnungsstufen $1: 4 \times 10^5$, $1: 4 \times 10^6$, sowie $1: 4 \times 10^7$ ausplattiert. Abhängig von der Gesamtkonzentration und vom Bakterienstamm ließen sich insgesamt bis zu 5×10^2 KBE auf einem Nährboden sicher bestimmen.

4.4.2 Bestimmung der dentinadhärenten Bakterienkonzentration vor der Therapie

Die Bestimmung der dentinadhärenten Bakterienkonzentration vor der Therapie erfolgte exemplarisch an drei Zähnen. Die Wurzelkanäle wurden analog zu den Versuchsproben vorbereitet, beimpft und inkubiert. Sie waren jedoch nicht Bestandteil der späteren Versuchsdurchführung.

Für die Probenentnahme wurde eine Headströmfeile der ISO-Größe 40 dreimal an der Kanalwand entlang geführt. Das Arbeitsende der Feile wurde anschließend an der Sollbruchstelle mit Hilfe eines sterilen Seitenschneiders vom Instrumentengriff getrennt und in ein Kunststofftube mit 50 µl steriler BHI überführt. Durch Platzieren des Tubes auf dem Reagenzglasschüttler für 30 Sekunden wurden die Dentinspäne von der Feile gelöst und in der BHI suspendiert. Anschließend wurde die Suspension in den Verdünnungen $1: 1 \times 10^6$, $1: 1 \times 10^7$ und $1: 1 \times 10^8$ auf sterilen Nährböden ausplattiert und bei 37 °C für fünf Tage inkubiert. Durch das Auszählen der KBE ließ sich die dentinadhärente Bakterienkonzentration nachfolgend berechnen.

4.5 **Anwendung der Therapieprotokolle**

Die vier Zähne in einem Anaerobiertopf wurden randomisiert den verschiedenen Therapien zugeführt (Tab. V). In den HG 2 bis 4 begann die terminale Aufbereitung der Kanäle mit der koronalen Erweiterung analog zum Vorgehen während der initialen

Aufbereitung in der HG 1 durch Gates Bohrer der ISO-Größen 150 und 130. Anschließend wurden die Zähne mit dem FlexMaster® System vollständig bis MAF ISO 02/60 aufbereitet (siehe Abb. 5), wobei in jeder der drei Hauptgruppen ein anderes Spülprotokoll befolgt wurde. Sofern nicht anders erwähnt, erfolgte eine alternierende Spülung (10 ml Syringe; BD Plastipak™, Franklin Lakes, NJ USA) nach folgendem Muster: 3 ml vor der ersten Feile, dann je 2 ml und nochmals 3 ml nach der letzten Feile. In HG 2 diente NaCl 0,9 % als Spülmittel. Die Proben der HG 3 und 4 erfuhren während der Aufbereitung eine Behandlung mit NaOCl 1 %. In der HG 4 erfolgte im Anschluss an die Aufbereitung eine Zwischenspülung mit 3 ml Isopropanol 70 % und abschließend wurde der Kanal mit 3 ml CHX 2 % gereinigt. Das im Wurzelkanal verbliebene CHX wurde vor Bestimmung der Bakterienkonzentration nach erfolgter Therapie mit 3 ml NaCl 0,9 %, welche 3 % Tween 80 (Tween® 80; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) und 0,3 % L- α -Lecithin (L- α -Lecithin, Egg Yolk; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX USA) enthielt, neutralisiert. Die Proben der HG 1 erfuhren während der Versuchsdurchführung keine weitere Aufbereitung. Die im Kanal befindliche Bakteriensuspension wurde mit 2 ml NaCl 0,9 % entfernt.

Tabelle V: Spülprotokolle während der Versuchsdurchführung

Hauptgruppe	Feile (Konizität/ISO- Größe)	Arbeitslänge	Spülvolumen	Spüllösung
1	—	—	2 ml	NaCl 0,9 %
2	—	—	3 ml	NaCl 0,9 %
	02/45	18 mm	2 ml	NaCl 0,9 %
	02/50	18 mm	2 ml	NaCl 0,9 %
	02/60	18 mm	3 ml	NaCl 0,9 %
3	—	—	3 ml	NaOCl 1 %
	02/45	18 mm	2 ml	NaOCl 1 %
	02/50	18 mm	2 ml	NaOCl 1 %
	02/60	18 mm	3 ml	NaOCl 1 %
4	—	—	3 ml	NaOCl 1 %
	02/45	18 mm	2 ml	NaOCl 1 %
	02/50	18 mm	2 ml	NaOCl 1 %
	02/60	18 mm	3 ml	NaOCl 1 %
	—	—	3 ml	Isopropanol 70 %
	—	—	3 ml	CHX 2 %
	—	—	3 ml	Neutralisator

NaCl, Natriumchlorid; **NaOCl**, Natriumhypochlorit; **CHX**, Chlorhexidindigluconat; **mm**, Millimeter; **ml**, Milliliter

Die Wurzelkanäle aller 160 Zähne wurden nach der jeweiligen Abschlusspülung mit sterilen Papierspitzen der ISO-Größe 60 (Paperpoint ISO 60; VDW) vollständig getrocknet.

An die Aufbereitung schloss sich bei jeweils 20 Proben (entspricht der NG 2) jeder Hauptgruppe die PDT an.

Im Rahmen der PDT wurde mit Hilfe eines Kunststoffapplikators (HELBO® Endo Blue steriler Einmalapplikator; HELBO, Walldorf, Deutschland) der Photosensitizer (HELBO® Endo Blue Photosensitizer; HELBO) in den getrockneten Kanal eingebracht. Nach einer Einwirkzeit von 60 Sekunden erfolgte eine Spülung mit 5 ml steriler Natriumchloridlösung, um nicht gebundene Farbstoffmoleküle zu entfernen. Daraufhin wurde der Kanal erneut vollständig mit Papierspitzen der ISO-Größe 60 getrocknet. Der Wurzelkanal galt als trocken, wenn keine Blaufärbung der Papierspitze mehr eintrat. Die folgende einminütige Laserbehandlung bei einer Wellenlänge von 660 nm aktivierte den verbliebenen Photosensitizer im Wurzelkanal. Hierfür wurde der Lichtleiter (HELBO®3D Endo Probe, HELBO) mit einem Durchmesser von 0,45 mm und einer Länge der aktiven Oberfläche von 17 mm vollständig in den Wurzelkanal eingeführt und aktiviert (Abb. 5). Es kam ein Diodenlaser (HELBO®TheraLite Laser; HELBO) mit einer Leistung von 110 mW zur Anwendung. Die so über die optische Faser abgegebene Energieleistung betrug gemäß Herstellerangaben > 40 mW und erzeugte eine Energiedosis von 2,4 J im Wurzelkanal.

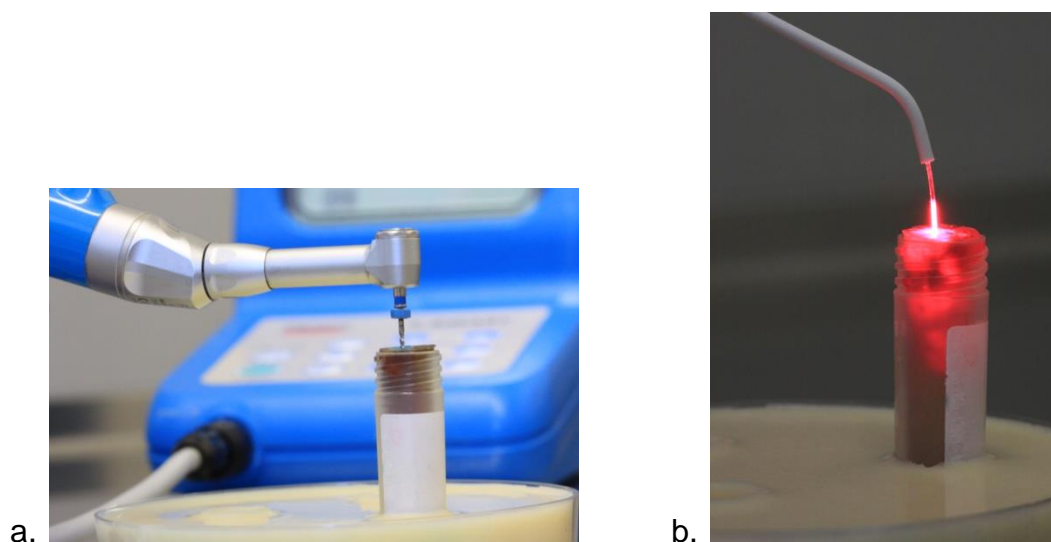


Abbildung 5: Versuchsdurchführung

a) maschinelle Aufbereitung des Wurzelkanals, **b)** Laserapplikation im Rahmen der photodynamischen Therapie

4.6 Bestimmung der Bakterienkonzentration nach erfolgter Therapie

Vor der Bestimmung der posttherapeutischen Bakterienkonzentration im Wurzelkanal wurden die Nebengruppen randomisiert in je zwei Untergruppen aufgeteilt (n = 10). In der ersten Untergruppe (T1) erfolgte die quantitative Auswertung unmittelbar im Anschluss an die Versuchsdurchführung. Die Zahnproben der zweiten Untergruppe (T2) wurden nach erfolgter Therapie zunächst mit steriler Nährlösung befüllt und erneut anaerob bebrütet. Es wurde täglich sterile BHI in den Wurzelkanal eingebracht. Nach fünf Tagen wurden die Proben zur Konzentrationsbestimmung entnommen.

Die Flüssigkeitsentnahme erfolgte in beiden Untergruppen (T1, T2) mit einer Papierspitze der ISO-Größe 40. Zusätzlich wurde aus jedem Wurzelkanal mit einer Headströmfeile der ISO-Größe 40 (Headström ISO 40, VDW) eine Dentinprobe gewonnen (Tab. VI).

Tabelle VI: Untersuchungsparameter

Untersuchungsparameter	Methode der Probenentnahme	Untersuchungszeitpunkt	Anzahl der Proben
planktonische Bakterien (KBE/ml)	per Papierspitze	unmittelbar vor Versuchsdurchführung (T0)	160
	per Papierspitze	direkt im Anschluss an die Versuchsdurchführung (T1)	80
	per Papierspitze	nach fünftägiger Inkubation (T2)	80
dentinadhärente Bakterien (KBE/ml)	per Headströmfeile	direkt im Anschluss an die Versuchsdurchführung (T1)	80
	per Headströmfeile	nach fünftägiger Inkubation (T2)	80

KBE/ml, koloniebildende Einheiten pro Milliliter

Da für die Bakterienkonzentration im Anschluss an die jeweils erfolgte Therapie kein zu erwartender Wert bekannt war, konnte ein günstiger Verdünnungsfaktor nicht im Vorfeld bestimmt werden. Aus diesem Grund wurde die jeweils gewonnene Probe in verschiedenen Verdünnungsstufen ausplattiert und daraufhin für fünf Tage bei 37° C unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Anschließend konnte über Auszählen der entstandenen Kolonien die Bakterienkonzentration berechnet werden.

4.6.1 Bestimmung der planktonischen Bakterienkonzentration im Wurzelkanallumen direkt im Anschluss an die Therapie (T1)

Nach der vollständigen Trocknung des Wurzelkanals wurde dieser mit steriler Kochsalzlösung befüllt. Es folgte die Entnahme der Flüssigkeitsprobe mit einer Papierspitze. Diese wurde in ein Kunststofftube mit 45 µl steriler Nährlösung eingebracht. Zur Erzeugung einer homogenen Bakteriensuspension wurde die Lösung mit Hilfe des Reagenzglasschüttlers für 30 Sekunden vermengt. Um eine möglichst niedrige Nachweisgrenze von 5×10^2 KBE/ml zu erreichen, wurden 20 µl der erzeugten Suspension auf einem Nährboden ausgestrichen. Weitere 20 µl wurden in 1980 µl sterile Nährlösung überführt und zur Herstellung der Verdünnungsstufen 1: 10^4 und 1: 10^5 gebraucht. Die hergestellte Verdünnungsreihe zum Erfassen der Bakterienkonzentration im Kanallumen zum Zeitpunkt T1 zeigt die Tab. VII.

Tabelle VII: Verdünnungsreihe zum Erfassen der Bakterienkonzentration (KBE/ml) im Kanallumen zum Zeitpunkt T1

pipettierte Volumina	ausplattierte Volumina	Verdünnungsfaktor
5 µl (Papierspitze) in 45 µl BHI → ↓	20 µl	500
20 µl in 1980 µl BHI → ↓	100 µl	10^4
100 µl in 900 µl BHI →	100 µl	10^5

KBE/ml, koloniebildende Einheiten pro Milliliter; **T1**, Probenentnahme direkt nach der Therapie; **BHI**, Hirn-Herz-Bouillon; **µl**, Mikroliter

4.6.2 Bestimmung der planktonischen Bakterienkonzentration im Wurzelkanallumen nach Inkubation für weitere fünf Tage (T2)

Nach fünftägiger Inkubation und täglicher Zugabe steriler Nährlösung wurde die Flüssigkeitsprobe aus dem Kanal entnommen.

Da die zu erwartenden Bakterienkonzentrationen in den verschiedenen Hauptgruppen stark variierten, wurden die Proben abhängig von ihrer Hauptgruppenzugehörigkeit in unterschiedlichen Verdünnungen ausplattiert (siehe Tab. VIII und Tab. IX). Nach einem vorangegangenen Versuchsdurchlauf wurde in den HG 1 und 2 eine vergleichsweise hohe Bakterienkonzentration vermutet. In den HG 3 und 4 wurde hingegen von relativ

geringen Bakterienkonzentrationen ausgegangen. Infolgedessen wurden die gewonnenen Flüssigkeitsproben aus den HG 1 und 2 in den Verdünnungen 1: 10⁵, 1: 10⁶ sowie 1: 10⁷ ausplattiert. In den HG 3 und 4 erfolgte die Herstellung der Verdünnungsreihen ähnlich dem Vorgehen zur Bestimmung der Bakterienkonzentration direkt im Anschluss an die durchgeführte Therapie. Jedoch wurde in der HG 4 zusätzlich die Verdünnung: 1: 10⁶ ausplattiert.

Tabelle VIII: Verdünnungsreihe zum Erfassen der Bakterienkonzentration (KBE/ml) im Kanallumen zum Zeitpunkt T2 in den Hauptgruppen 1 und 2

Hauptgruppe	pipettierte Volumina	ausplattierte Volumina	Verdünnungsfaktor
1, 2	5 µl (Papierspitze) in 1995 µl BHI ↓	-	400
	100 µl in 900 µl BHI ↓	-	4 x 10 ³
	100 µl in 900 µl BHI → ↓	100 µl	4 x 10 ⁵
	100 µl in 900 µl BHI → ↓	100 µl	4 x 10 ⁶
	100 µl in 900 µl BHI →	100 µl	4 x 10 ⁷

KBE/ml, koloniebildende Einheiten pro Milliliter; **T2**, Probenentnahme fünf Tage nach Therapie; **BHI**, Hirn-Herz-Bouillon; **µl**, Mikroliter

Tabelle IX: Verdünnungsreihe zum Erfassen der Bakterienkonzentration (KBE/ml) im Kanallumen zum Zeitpunkt T2 in den Hauptgruppen 3 und 4

Hauptgruppe	pipettierte Volumina	ausplattierte Volumina	Verdünnungsfaktor
3, 4	5 µl (Papierspitze) in 45 µl BHI → ↓	20 µl	500
	20 µl in 1980 µl BHI → ↓	100 µl	10 ⁴
	100 µl in 900 µl BHI → ↓	100 µl	10 ⁵
4	100 µl in 900 µl BHI →	100 µl	10 ⁶

KBE/ml, koloniebildende Einheiten pro Milliliter; **T2**, Probenentnahme fünf Tage nach Therapie; **BHI**, Hirn-Herz-Bouillon; **µl**, Mikroliter

4.6.3 Bestimmung der dentinadhärenten Bakterienkonzentration nach erfolgter Therapie

Zur Detektion von Bakterien im Dentin wurde eine sterile Headströmfeile der ISO-Größe 40 dreimal an der Kanalwand entlang geführt und die so gewonnene Dentinprobe anschließend mit 50 µl BHI in ein 500 µl-fassendes Kunststofftube überführt. Durch das Rütteln des Tubes auf einem Reagenzglasschüttler für 30 Sekunden wurde das Probenmaterial in der Flüssigkeit suspendiert. Von der Flüssigkeit wurden 20 µl mit einer Eppendorf-Pipette auf einen Nährboden gegeben und mit einem Glasspatel ausplattiert. Die Nährböden wurden vor dem Auszählen der KBE wiederum fünf Tage bei 37 °C in einer anaeroben Atmosphäre inkubiert.

4.7 **Statistische Auswertungen**

In der statistischen Auswertung wurden nur Fälle berücksichtigt, in denen nachweislich alle drei Spezies vor der Versuchsdurchführung im Wurzelkanal vorhanden waren. Dies trifft für alle 160 ausgewerteten Proben zu.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm IBM SPSS Statistics, Version 21 (IBM SPSS Statistics, Version 21; IBM Corporation, Armonk, NY USA).

Die Auswertung wurde stratifiziert nach dem Entnahmezeitpunkt (T1 = Probenentnahme sofort nach erfolgter Therapie, T2 = Probenentnahme nach erneutem fünftägigen Bebrüten) sowie nach dem Ort der Gewinnung der Bakterien (planktonische Bakterien im Wurzelkanallumen, dentinadhärente Bakterien) durchgeführt. Das Signifikanzniveau α wurde mit $\alpha = 0,05$ gewählt. Als Nullhypothesen wurden angenommen, dass die mechanische Aufbereitung des Wurzelkanals, die mechanische Aufbereitung in Kombination mit desinfizierenden Spüllösungen und die adjuvante PDT keinen Einfluss auf die Bakterienreduktion zu den Zeitpunkten T1 und T2 besaßen.

4.7.1 Statistische Analyse der planktonischen Bakterien im Wurzelkanallumen

In jedem Wurzelkanal wurde jeweils in mehreren Verdünnungsstufen für jede Spezies die Bakterienkonzentration vor und nach der Therapie erfasst. Aus den vorhandenen Verdünnungsstufen wurde im Rahmen der Auswertung für jede Spezies der Mittelwert berechnet. Waren im Anschluss an die Therapie keine KBE einer Spezies nachweisbar,

wurde der Mittelwert für diese Spezies mit der halben Nachweisgrenze gleichgesetzt. Die Nachweisgrenze der planktonischen Bakterien lag bei 500 KBE/ml pro Spezies. Die Mittelwerte der drei Spezies wurden addiert und so die Gesamtkonzentration an Bakterien im Biofilm vor und nach der Therapie berechnet. In Fällen, in denen im Anschluss an die Therapie aufgrund einer zu hohen Bakteriendichte in allen ausplattierten Verdünnungsstufen kein Auszählen der KBE möglich war, musste ein fiktiver Wert für die Spezieskonzentration festgelegt werden. Folgende Überlegungen wurden zur Herleitung eines entsprechenden Wertes für die unzählbaren Bakterienkonzentrationen angestellt: Der Wert musste größer sein als die maximal auf einem Nährboden ermittelte Anzahl an KBE für eine Spezies und durfte gleichzeitig keinen übermäßig hohen Betrag annehmen, um die Ergebnisse nicht zu verzerren. Dementsprechend musste zunächst die größtmögliche, noch zählbare Anzahl an KBE auf einem Nährboden ermittelt werden. Dafür wurde die Summe aller KBE auf einer Agarplatte für jede ausplattierte Verdünnung berechnet und anschließend der Maximalwert bestimmt. Dieser betrug 869 KBE. Dieser Wert wurde durch die Anzahl der Spezies dividiert ($869 \text{ KBE} : 3 = 290 \text{ KBE}$). Da eine Anzahl von 869 KBE der tatsächlich größten Summe auf eine Platte entsprach, musste für die unzählbaren Fälle ein Faktor definiert werden, der ausdrückte, dass die Bakterienkonzentration auf dem entsprechenden Nährboden diesen Maximalwert überschritt. Zunächst wurde der Faktor 10 gewählt. Es zeigte sich, dass sich bei einem dementsprechend hohen Wert für die unzählbaren Bakterienkonzentrationen im Rahmen der Auswertung Werte mit negativem Vorzeichen für die Differenz aus der Bakterienkonzentration im Biofilm vor der Therapie und der Bakterienkonzentration im Biofilm nach der Therapie ergaben. Die Schlussfolgerung aus diesen Daten wäre gewesen, dass im Anschluss an die Therapie mehr Bakterienzellen im Wurzelkanal vorhanden waren als vor der Therapie. Diese Annahme erschien im Rahmen des Versuchsaufbaus zumindest für die Probenentnahme zum Zeitpunkt T1 unwahrscheinlich. Die gleichen Beobachtungen trafen für den Faktor 5 zu, so dass letztlich der Wert von 290 verdoppelt wurde. Zusammenfassend bedeutete dies, dass in Fällen, in denen im Anschluss an die Therapie in keiner der ausplattierten Verdünnungen die Anzahl der KBE für eine Spezies bestimmt werden konnte, für diese Spezies in der höchsten Verdünnungsstufe der Wert 290×2 eingesetzt und zur Berechnung des Biofilmes herangezogen wurde. Da keine Normalverteilung der Werte vorlag, wurde die Bakterienkonzentration im Wurzelkanallumen zur Basis 10 logarithmiert. Anschließend wurde der logarithmische

Reduktionsfaktor (LRF) bestimmt. Hierfür wurde der logarithmierte Wert der Bakterienkonzentration nach der Therapie vom logarithmierten Wert der Bakterienkonzentration vor der Therapie subtrahiert. Für die Deskription der Daten wurden Medianwerte (M) und Interquartilsabstände (IQR) sowie Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) ermittelt. Zum Vergleich der Bakterienkonzentration in den Proben vor der Therapie wurde die univariate einfaktorische Varianzanalyse angewandt. Die Effekte der verschiedenen Aufbereitungsprotokolle (Einflussfaktor 1, 4 Faktorstufen) und der adjuvanten PDT (Einflussfaktor 2, 2 Faktorstufen) auf die Bakterienreduktion wurden anhand des logarithmischen Reduktionsfaktors mit Hilfe der univariaten mehrfaktoriellen ANOVA geprüft. Als Referenzgruppen wurden die Kontrollgruppen ohne Therapie festgelegt. Um Unterschiede in der antibakteriellen Wirkung der einzelnen Spüllösungen gegenüber der Kontrollgruppe ohne Aufbereitung zu ermitteln, erfolgte die Berechnung von T-Tests.

4.7.2 Statistische Analyse der dentinadhärenten Bakterien

Für die Ausgangskonzentration der Bakterien im Dentin wurden der Medianwert sowie der Interquartilsabstand dargestellt. Für die statistische Auswertung der Bakterienkonzentration im Dentin nach erfolgter Therapie wurden drei Kategorien gebildet (Tab. X).

Tabelle X: Kategorien der Bakterienkonzentration im Dentin nach erfolgter Therapie

Kategorie	absolute Bakterienkonzentration
1	< 50 KBE/ml
2	50 - 100000 KBE/ml
3	> 100000 KBE/ml

KBE/ml, koloniebildende Einheiten pro Milliliter

Der Kategorie 1 wurden alle Proben zugeordnet, in denen nach der Therapie keine Bakterien mehr nachgewiesen werden konnten. Die Nachweisgrenze für die dentinadhärenten Bakterien betrug 50 KBE/ml.

Mit dem Kruskal-Wallis-Test wurde die Verteilung der Messwerte in den Hauptgruppen auf die drei Kategorien geprüft. Paarweise Vergleiche mit der HG 1 (ohne Aufbereitung) als Referenzgruppe wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test stratifiziert nach der Nebengruppe (ohne PDT, mit PDT) durchgeführt. Unter Berücksichtigung der

Mehrfachvergleiche des Mann-Whitney-U-Tests wurde $\alpha < 0,0167$ als statistisch signifikant bewertet (Bonferroni Korrektur).

4.7.3 Vergleich der planktonischen und dentinadhärenten Bakterienkonzentrationen

Um die Ergebnisse der beiden Messverfahren (planktonisch: Probenentnahme mittels Papierspitze, dentinadhärent: Probenentnahme mittels Feile) vergleichen zu können, wurden die ermittelten Bakterienkonzentrationen im Wurzelkanallumen analog zu denen im Dentin in Kategorien eingeteilt. Die Kategorie 1 entsprach wiederum Bakterienkonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze. Die vergleichende Auswertung der kategorialen Daten für die planktonischen und die dentinadhärenten Bakterienkonzentrationen erfolgte stratifiziert nach dem Entnahmezeitpunkt (T1, T2) anhand von Kreuztabellen. Der Kappa-Koeffizient wurde berechnet.

5 Ergebnisse

5.1 Wachstumsreihe

Die Abbildung 6 zeigt das Wachstum der drei Bakterienspezies über den Zeitraum von dreizehn Tagen. An Tag 2 konnten zunächst nur für die Spezies *E. faecalis* (132×10^6 KBE/ml) und *S. oralis* (64×10^6 KBE/ml) KBE nachgewiesen werden. Nach vier Tagen gelang der erste Nachweis von *P. intermedia* (1.724×10^6 KBE/ml) im Wurzelkanallumen. An Tag 4 waren erstmals alle drei Spezies im Wurzelkanallumen nachweisbar. Die Spezies *E. faecalis* (788×10^6 KBE/ml) und *S. oralis* (628×10^6 KBE/ml) wiesen zu diesem Zeitpunkt höhere Bakterienkonzentrationen im Vergleich zum Vortag auf. An Tag 5 war die Konzentration von *P. intermedia* (776×10^6 KBE/ml) bereits wieder rückläufig, ebenso die des *S. oralis* (256×10^6 KBE/ml). Eine Konzentrationsabnahme in der Wachstumskurve zeigte auch *E. faecalis* (632×10^6 KBE/ml) nach 6 Tagen. Nach sieben und nach zwölf Tagen waren die Konzentrationen der Spezies *S. oralis* und *P. intermedia* sehr niedrig. Die Konzentration der Spezies *P. intermedia* sank unter die Nachweisgrenze, so dass Rückschlüsse auf einen Multispezies-Biofilm zu diesen Zeitpunkten nicht sicher möglich waren. Im Verlauf der Wachstumsreihe kam es immer wieder zu Zu- und Abnahmen in den einzelnen Spezieskonzentrationen. An den Tagen 4 ($\Sigma = 3.140 \times 10^6$ KBE/ml) und 5 ($\Sigma = 2.780 \times 10^6$ KBE/ml) sowie 8 ($\Sigma = 2.588 \times 10^6$ KBE/ml) und 9 ($\Sigma = 3.160 \times 10^6$ KBE/ml) waren insgesamt die höchsten Bakterienkonzentrationen zu verzeichnen.

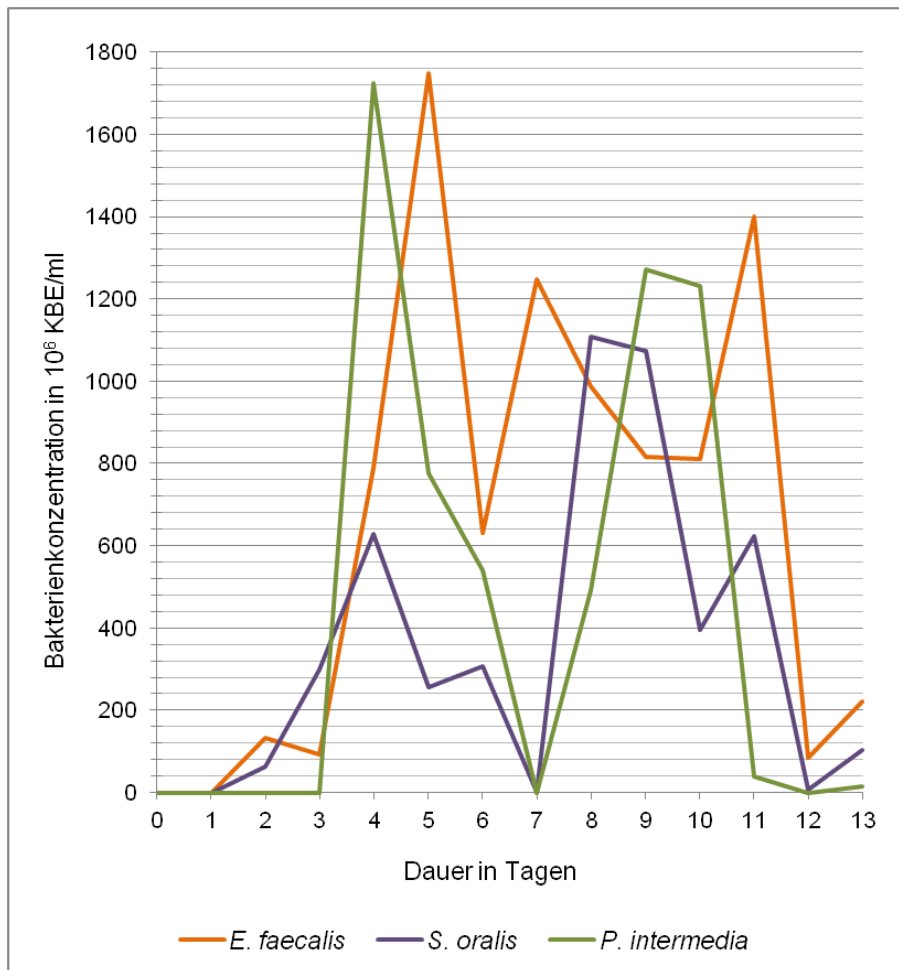


Abbildung 6: Wachstumsreihe des Multispeziesbiofilmes

Startkonzentration von je $2,5 \times 10^8$ KBE/ml pro Spezies

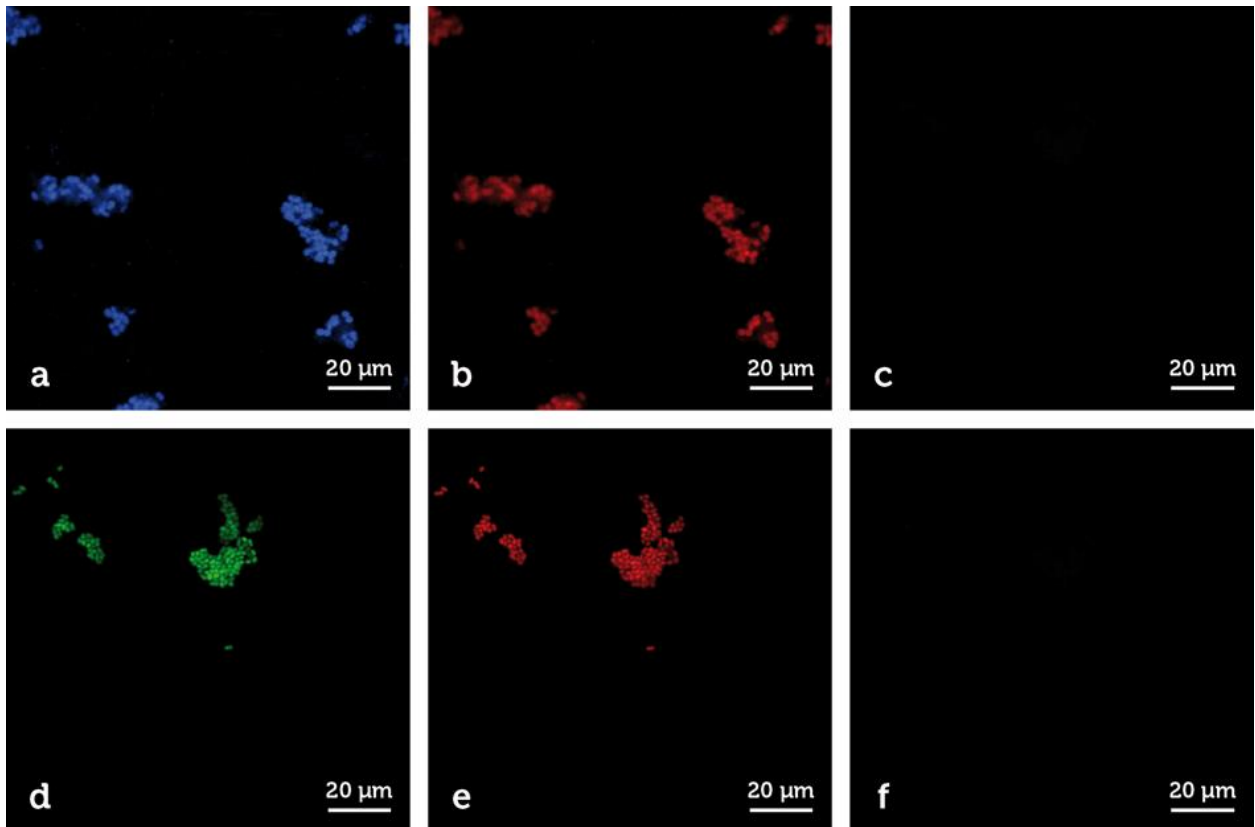
KBE/ml, koloniebildende Einheiten pro Milliliter; ***E. faecalis***, *Enterococcus faecalis*; ***S. oralis***, *Streptococcus oralis*; ***P. intermedia***, *Prevotella intermedia*

5.2 Ergebnisse der *Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung*

Die Durchführung und Auswertung der *FISH* erfolgte durch das zahnmedizinische Institut der Universität Aarhus, Dänemark. Durch die freundliche Genehmigung von Dr. S. Schlafer und I. Dige, mit denen gemeinsam die Daten der vorliegenden Arbeit publiziert wurden, kann nachfolgend die Auswertung der gewonnenen Ergebnisse im Rahmen der vorliegenden Arbeit dargestellt werden.

Alle drei Spezies wurden durch die Sonde EUB 338 erfolgreich markiert und zeigten sich im konfokalen Mikroskop durch die Emission roten Lichtes. Die Spezies *S. oralis* band zusätzlich die Sonde STR 405, jedoch nicht die Sonde PRIN (Abb. 7). Im Mikroskop entsprach dies der Emission grünen Lichtes. Die Sonde PRIN identifizierte

sicher die Spezies *P. intermedia* in den vorliegenden Dentinproben und fluoreszierte in blauem Licht (Abb. 7). Die *FISH* zeigte die drei Spezies in enger räumlicher Beziehung zueinander, so dass auf das Vorhandensein eines Biofilmes geschlossen wurde. Dieser konnte sowohl an den koronalen als auch an den apikalen Kanalwänden der untersuchten Dentinproben durch die *FISH* verifiziert werden. In einigen Abschnitten konnten Zellen der Spezies *S. oralis* und *E. faecalis* auch innerhalb der Dentintubuli nachgewiesen werden (Abb. 8).

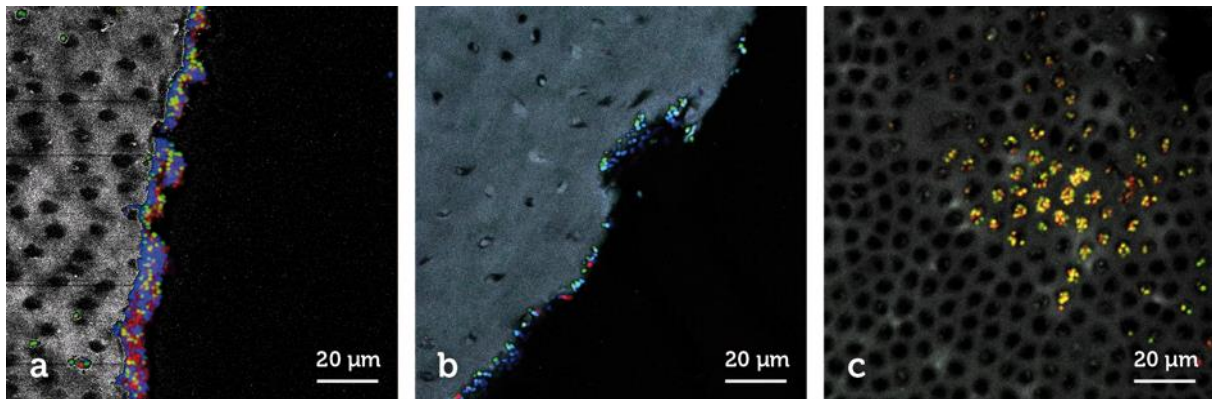


Bilder mit freundlicher Genehmigung von Dr. S. Schlafer und I. Dige, zahnmedizinisches Institut der Universität Aarhus, Dänemark.

Abbildung 7: Ergebnisse des Hybridisierungsexperiments

obere Reihe: *Streptococcus oralis* markiert durch die Sonden **a)** STR 405 und **b)** EUB 338, jedoch nicht durch **c)** PRIN.

untere Reihe: *Prevotella intermedia* markiert durch die Sonden **d)** PRIN und **e)** EUB 338, jedoch nicht durch **f)** STR 405.



Bilder mit freundlicher Genehmigung von Dr. S. Schlafer und I. Dige, zahnmedizinisches Institut der Universität Aarhus.

Abbildung 8: Biofilmnachweis im Wurzelkanal durch die *Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung*

Die Sonden STR 405 (dargestellt in grün), spezifisch für Streptokokken, PRIN (blau), spezifisch für *Prevotella intermedia* und EUB 338 (rot), unspezifisch an alle drei Spezies gebunden, gleichzeitig eingesetzt. Die Autofluoreszenz des Dentin erscheint in grau.

a) zeigt einen dünnen Biofilm bestehend aus *Streptococcus oralis*, *Prevotella intermedia* und *Enterococcus faecalis* (ausschließlich durch die Sonde EUB 338 markiert) entlang der Kanalwand im koronalen Abschnitt und **b)** in den apikalen Regionen. **c)** In einigen Abschnitten zeigten sich Zellen der Spezies *Streptococcus oralis* und *Enterococcus faecalis* innerhalb der Dentintubuli.

5.3 Planktonische Bakterien im Wurzelkanallumen

5.3.1 Deskription der planktonischen Bakterienkonzentrationen vor und nach der Therapie

In allen Gruppen trat eine Reduktion der Bakterienkonzentration zwischen den Zeitpunkten T0 und T1 auf. Den kleinsten LRF ($1,0 \pm 1,2$) zeigte die Gruppe ohne Aufbereitung und ohne PDT (G 1.1). Die größte Bakterienreduktion wurde in G 3.1 (LRF = $6,7 \pm 0,7$) erzielt.

Zwischen den Zeitpunkten T0 und T2 trat außer in G 3.1 in allen Gruppen eine Reduktion der Bakterienkonzentration ein. In drei der vier Hauptgruppen war der LRF kleiner gleich 1,0. Die geringste Reduktion zeigte G 3.1 (LRF = $-0,2 \pm 0,5$). Nur in der HG 4 nahm der LRF Werte größer als 1,0 an. In dieser Hauptgruppe wurde ohne adjuvante PDT (G 4.1) ein LRF von $2,4 \pm 2,4$ erreicht, bei Anwendung der PDT (G 4.2) betrug der LRF $5,5 \pm 1,9$ (siehe Tab. XI).

Tabelle XI: Deskription der Bakterienkonzentration (KBE/ml) aus dem Wurzelkanallumen zu den Zeitpunkten T0, T1 und T2

Hauptgruppe	HG 1: keine Aufbereitung		HG 2: Aufbereitung mit NaCl 0,9 %		HG 3: Aufbereitung mit NaOCl 1 %		HG 4: Aufbereitung mit NaOCl 1 % + CHX 2 %	
Nebengruppe	NG 1: ohne PDT	NG 2: mit PDT	NG 1: ohne PDT	NG 2: mit PDT	NG 1: ohne PDT	NG 2: mit PDT	NG 1: ohne PDT	NG 2: mit PDT
Gruppe	G 1.1	G 1.2	G 2.1	G 2.2	G 3.1	G 3.2	G 4.1	G 4.2
KBE/ml T0 in den Gruppen mit PE zum Zeitpunkt T1	9,0 x 10 ⁹ (3,0-16,9 x 10 ⁹)	2,2 x 10 ⁹ (0,8-5,1 x 10 ⁹)	4,3 x 10 ⁹ (1,8-14,1 x 10 ⁹)	3,8 x 10 ⁹ (3,0-7,4 x 10 ⁹)	6,3 x 10 ⁹ (0,9-14,0 x 10 ⁹)	7,0 x 10 ⁹ (3,2-14,8 x 10 ⁹)	4,7 x 10 ⁹ (2,8-16,3 x 10 ⁹)	5,2 x 10 ⁹ (2,0-8,8 x 10 ⁹)
KBE/ml T1	1,0 x 10 ⁸ (0,6-1,7 x 10 ⁸)	3,1 x 10 ⁶ (0,9-52,7 x 10 ⁶)	2,7 x 10 ⁷ (0,4-5,2 x 10 ⁷)	1,4 x 10 ⁶ (0,7-15,3 x 10 ⁶)	7,5 x 10 ² (7,5-7,5 x 10 ²)	1,4 x 10 ³ (0,8-140,0 x 10 ³)	1,1 x 10 ³ (0,8-5,7 x 10 ³)	1,9 x 10 ³ (0,8-15,7 x 10 ³)
Reduktion KBE/ml T0 - T1	8,8 x 10 ⁹ (2,9-16,8 x 10 ⁹)	2,1 x 10 ⁹ (0,8-5,0 x 10 ⁹)	4,2 x 10 ⁹ (1,8-14,1 x 10 ⁹)	3,8 x 10 ⁹ (3,0-7,4 x 10 ⁹)	6,3 x 10 ⁹ (0,9-14,0 x 10 ⁹)	7,0 x 10 ⁹ (3,2-14,7 x 10 ⁹)	4,7 x 10 ⁹ (2,8-16,3 x 10 ⁹)	5,2 x 10 ⁹ (2,0-8,8 x 10 ⁹)
LRF 1	1,0 ± 1,2	2,2 ± 1,4	2,3 ± 1,0	3,2 ± 1,4	6,7 ± 0,7	5,8 ± 2,1	6,4 ± 0,6	6,1 ± 0,9
KBE/ml T0 in den Gruppen mit PE zum Zeitpunkt T2	5,2 x 10 ⁹ (1,8-10,7 x 10 ⁹)	4,8 x 10 ⁹ (2,9-11,5 x 10 ⁹)	5,7 x 10 ⁹ (3,2-11,1 x 10 ⁹)	3,8 x 10 ⁹ (2,1-9,9 x 10 ⁹)	5,0 x 10 ⁹ (1,9-9,7 x 10 ⁹)	6,2 x 10 ⁹ (1,6-11,0 x 10 ⁹)	5,7 x 10 ⁹ (2,4-10,0 x 10 ⁹)	2,9 x 10 ⁹ (1,8-8,6 x 10 ⁹)
KBE/ml T2	0,8 x 10 ⁹ (0,3-2,9 x 10 ⁹)	2,4 x 10 ⁹ (1,2-5,8 x 10 ⁹)	0,9 x 10 ⁹ (0,4-2,9 x 10 ⁹)	1,4 x 10 ⁹ (0,6-5,2 x 10 ⁹)	6,2 x 10 ⁹ (5,9-13,1 x 10 ⁹)	5,9 x 10 ⁹ (0,4-17,4 x 10 ⁹)	1,7 x 10 ⁷ (0,4-8,7 x 10 ⁷)	2,3 x 10 ³ (0,8-24,9 x 10 ³)
Reduktion KBE/ml T0 - T2	4,4 x 10 ⁹ (1,5-9,2 x 10 ⁹)	2,5 x 10 ⁹ (-2,8-9,7 x 10 ⁹)	4,7 x 10 ⁹ (1,3-7,2 x 10 ⁹)	1,6 x 10 ⁹ (-0,4-6,0 x 10 ⁹)	-2,3 x 10 ⁹ (-8,5-2,1 x 10 ⁹)	2,3 x 10 ⁸ (-1,2 x 10 ¹⁴ - 69 x 10 ⁸)	5,6 x 10 ⁹ (2,4-10,0 x 10 ⁹)	2,9 x 10 ⁹ (1,8-8,6 x 10 ⁹)
LRF 2	0,8 ± 0,5	0,3 ± 0,6	0,7 ± 0,4	0,4 ± 0,5	-0,2 ± 0,5	0,4 ± 1,0	2,4 ± 2,4	5,5 ± 1,9

Dargestellt sind Median (Interquartilsabstand) oder Mittelwert ± Standardabweichung.

HG, Hauptgruppe; **NaCl**, Natriumchlorid; **NaOCl**, Natriumhypochlorit; **CHX**, Chlorhexidin; **NG**, Nebengruppe; **PDT**, photodynamische Therapie; **KBE/ml**, koloniebildende Einheiten pro Milliliter; **T0**, vor der Therapie; **T1**, sofort nach Therapie; **T2**, fünf Tage nach Therapie; **LRF**, Logarithmischer Reduktionsfaktor

5.3.2 Univariate einfaktorielle ANOVA der planktonischen Bakterienkonzentration vor der Therapie (T0)

Die Wurzelkanäle in den einzelnen Therapiegruppen wurden zur Bestimmung der Bakterienkonzentration nach erfolgter Behandlung auf zwei Gruppen verteilt (T1, sofort nach Therapie; T2, fünf Tage nach Therapie). Die univariate einfaktorielle ANOVA der planktonischen Bakterienkonzentration vor der Therapie wurde für beide Gruppen separat durchgeführt. Sowohl in den Proben, bei denen die Probenentnahme direkt im Anschluss an die Behandlung erfolgte (T1, $p = 0,71$), als auch in den Wurzelkanälen, deren Proben fünf Tage nach der Therapie ausgewertet wurden (T2, $p = 0,88$) zeigte die Analyse keine Unterschiede zwischen den logarithmierten Werten der KBE vor der Behandlung.

5.3.3 Univariate mehrfaktorielle ANOVA der chemomechanischen Aufbereitung und der adjuvanten PDT bei sofortiger Probenentnahme (T1)

Die univariate mehrfaktorielle ANOVA zeigte einen signifikanten Einfluss der chemomechanischen Aufbereitung (HG; $p < 0,0001$). Die Anwendung der PDT (NG; $p = 0,5$) hatte hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die Bakterienreduktion. Der Interaktionsterm wies einen p-Wert von $p = 0,01$ auf und war somit ebenfalls signifikant. Die Reduktion der Bakterienzahlen durch die Anwendung desinfizierender Spüllösungen war signifikant. Als Referenzgruppe ohne Aufbereitung diente HG 1 mit einem LRF von $2,2 \pm 0,7$. Demgegenüber konnte in der HG 3 ein LRF von $6,3 \pm 1,3$ ($p < 0,0001$; Tukey-HSD) und in der HG 4 ein LRF von $6,3 \pm 0,7$ ($p < 0,0001$; Tukey-HSD) erreicht werden. Die HG 2 (LRF = $2,9 \pm 0,8$) zeigte im Vergleich zur HG 1 ebenfalls eine geringfügig höhere Bakterienreduktion; dieses Ergebnis war jedoch nicht signifikant ($p = 0,09$; Tukey-HSD).

Mit Hilfe des T-Testes wurde der Einfluss der adjuvanten PDT auf die Bakterienreduktion innerhalb der Hauptgruppen untersucht. In den Gruppen, in denen während der Aufbereitung des Wurzelkanals eine desinfizierende Spüllösung zum Einsatz kam, konnte für die PDT kein signifikanter Effekt auf eine zusätzliche Bakterienreduktion nachgewiesen werden (HG 3 $p = 0,2$, HG 4 $p = 0,4$; T-Test). In den HG 1 ($p = 0,03$) und HG 2 ($p = 0,01$) führte die adjuvante PDT zu einer signifikanten Steigerung der Bakterienreduktion (Abb. 9).

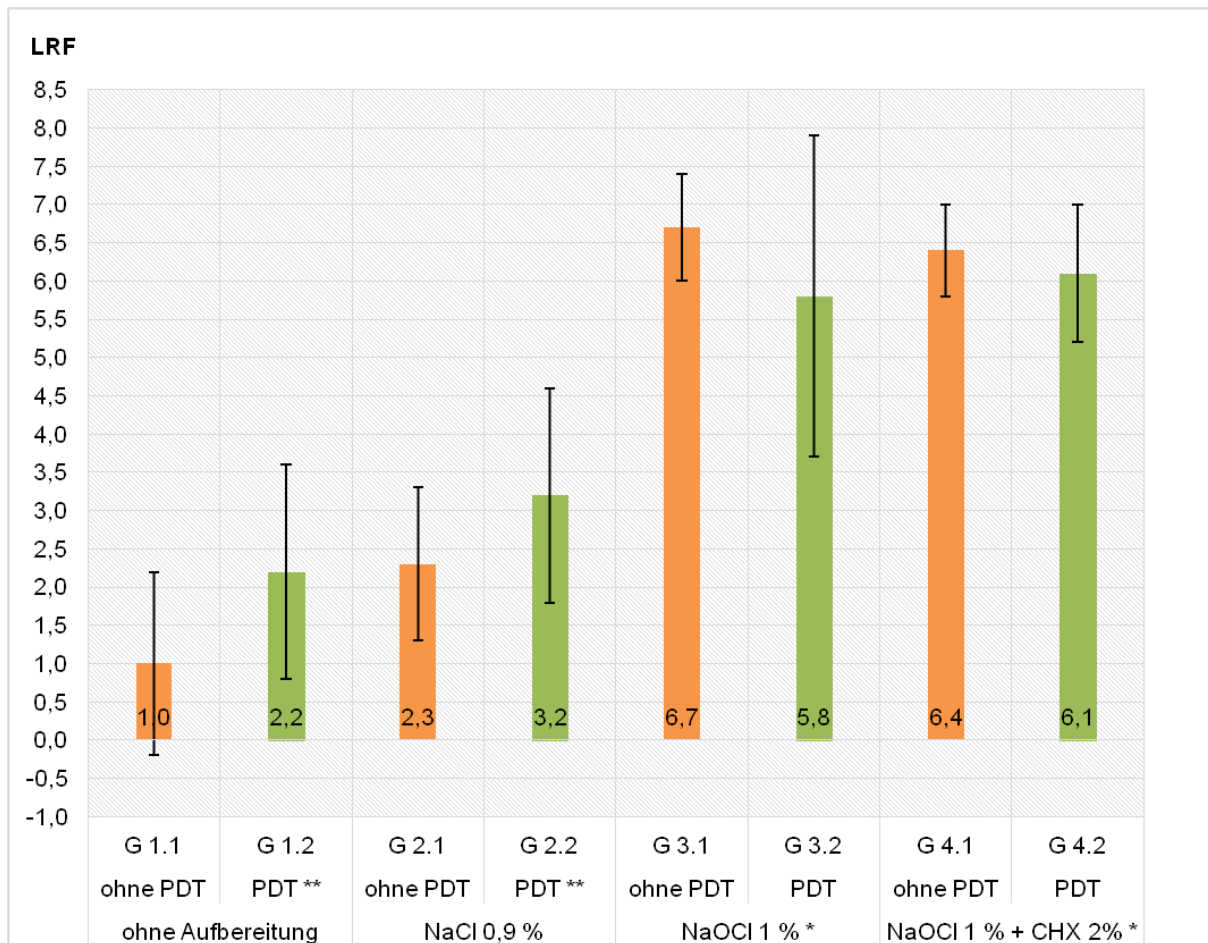


Abbildung 9: Logarithmischer Reduktionsfaktor der planktonischen Bakterien zum Zeitpunkt T1 (LRF 1)

Dargestellt sind der Mittelwert \square und die Standardabweichung **I**.

T1, sofort nach Therapie; **LRF**, Logarithmischer Reduktionsfaktor; **NaCl**, Natriumchlorid; **NaOCl**, Natriumhypochlorit; **CHX**, Chlorhexidin; **PDT**, photodynamische Therapie

* signifikanter Einfluss der Hauptgruppe (Tukey-HSD $p < 0,05$); ** signifikanter Einfluss der Nebengruppe (T-Test $p < 0,05$)

5.3.4 Univariate mehrfaktorielle ANOVA der chemomechanischen Aufbereitung und der adjuvanten PDT bei Probenentnahme fünf Tage nach erfolgter Therapie (T2)

Die univariate mehrfaktorielle ANOVA bestätigte einen signifikanten Einfluss auf die Bakterienreduktion sowohl für die chemomechanische Aufbereitung (HG, $p < 0,0001$) als auch für die Anwendung der PDT (NG, $p = 0,01$). Der Interaktionsterm war ebenfalls signifikant ($p < 0,0001$).

In den Untersuchungsgruppen, in denen keine adjuvante PDT durchgeführt wurde (NG 1), zeigte nur G 4.1 mit einem LRF = 2,4 eine signifikant höhere Reduktion der

Bakterien im Wurzelkanallumen als die Kontrollgruppe G 1.1 (LRF = 0,8; mittlere Differenz G 1.1 - G 4.1 = -2,2, $p < 0,0001$; Tukey-HSD). Darüber hinaus war in G 4.1 die stärkste bakterienreduzierende Wirkung im Vergleich zu den übrigen drei Aufbereitungsprotokollen ohne adjuvante PDT eingetreten (G 1.1, G 2.1; G 3.1 $p < 0,0001$; Tukey-HSD).

Für die Proben, die im Anschluss an die chemomechanische Aufbereitung zusätzlich eine PDT erhielten (NG 2), zeigte nur G 4.2 (LRF = 5,5) eine signifikant höhere Reduktion der planktonischen Bakterien gegenüber der Kontrollgruppe G 1.2 (LRF = 0,3; mittlere Differenz G 1.2 - G 4.2 = -5,4, $p < 0,0001$; Tukey-HSD). Weiterhin konnte in der G 4.2 auch nach fünf Tagen eine signifikant höhere Bakterienreduktion als in allen anderen Hauptgruppen (HG 1 - 3, NG 2 $p < 0,0001$; Tukey-HSD) nachgewiesen werden.

Die Analyse des Effektes der adjuvanten PDT auf die Bakterienreduktion innerhalb der Hauptgruppen ergab nur für die HG 4 eine signifikant höhere Reduktion der Bakterienzahlen durch Anwendung der PDT ($p = 0,001$; T-Test) (Abb. 10).

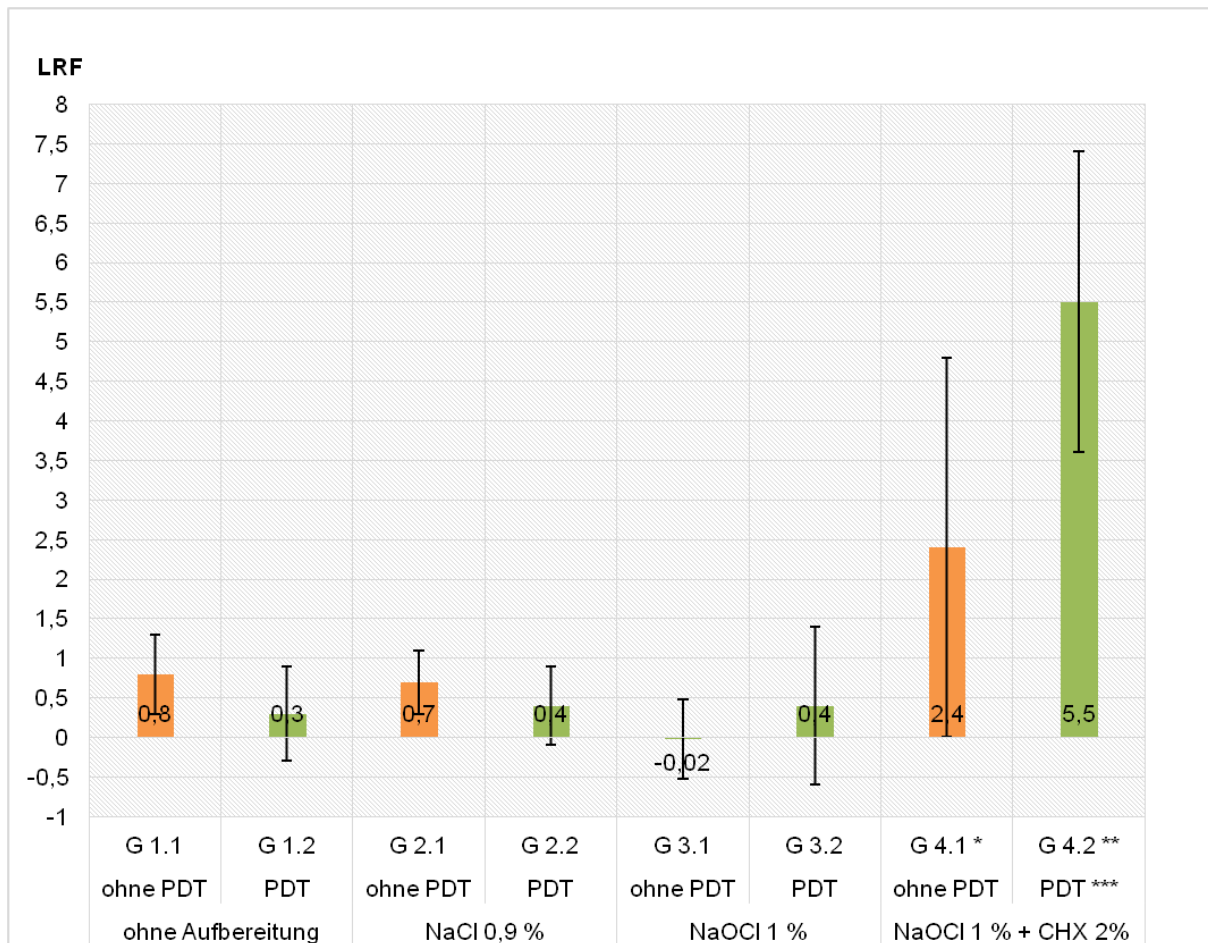


Abbildung 10: Logarithmischer Reduktionsfaktor der planktonischen Bakterien zum Zeitpunkt T2 (LRF 2)

Dargestellt sind der Mittelwert \square und die Standardabweichung **I**.

T2, fünf Tage nach Therapie; **LRF**, Logarithmischer Reduktionsfaktor; **NaCl**, Natriumchlorid; **NaOCl**, Natriumhypochlorit; **CHX**, Chlorhexidin; **PDT**, photodynamische Therapie

* signifikante Reduktion gegenüber G 1.1 (Tukey-HSD $p < 0,05$); ** signifikante Reduktion gegenüber G 1.2 (Tukey-HSD $p < 0,05$); *** signifikanter Einfluss der Nebengruppe (T-Test $p < 0,05$)

5.3.5 Relative Verteilung der planktonischen Bakterienspezies zu den Zeitpunkten T0, T1, T2

Den relativen Anteil der untersuchten Spezies *P. intermedia*, *E. faecalis* und *S. oralis* an der Gesamtbakterienkonzentration im Wurzelkanallumen zum Zeitpunkt T0 zeigt die Abbildung 11. Die Spezies *P. intermedia* und *E. faecalis* waren zu etwa gleichen Teilen in der planktonischen Phase vertreten (*P. intermedia*, Median 41 %, IQR 21 - 54 %; *E. faecalis*, Median 36 %, IQR 19 - 54 %). Der Anteil der Spezies *S. oralis*

(Median 18 %, IQR 9 - 33 %) entsprach vor der Therapie annähernd einem Fünftel der Gesamtpopulation im Wurzelkanal.

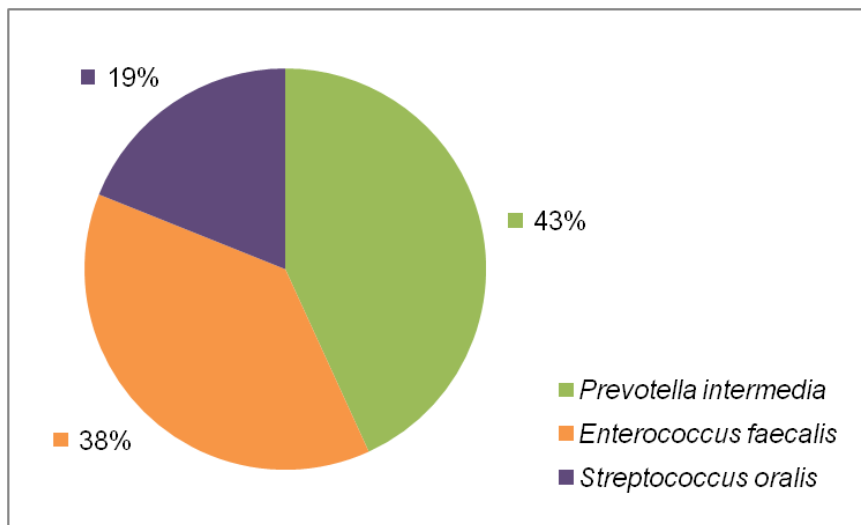


Abbildung 11: Relativer Anteil (Median) der Spezies *P. intermedia*, *E. faecalis* und *S. oralis* an der planktonischen Phase im Kanallumen vor der Therapie (T0)

Die Beteiligung der drei Spezies an der planktonischen Phase im Kanallumen zu den Zeitpunkten T1 und T2 in Abhängigkeit von der Aufbereitung des Kanals (Hauptgruppe) und Anwendung der PDT (Nebengruppe) zeigt die Abbildung 12.

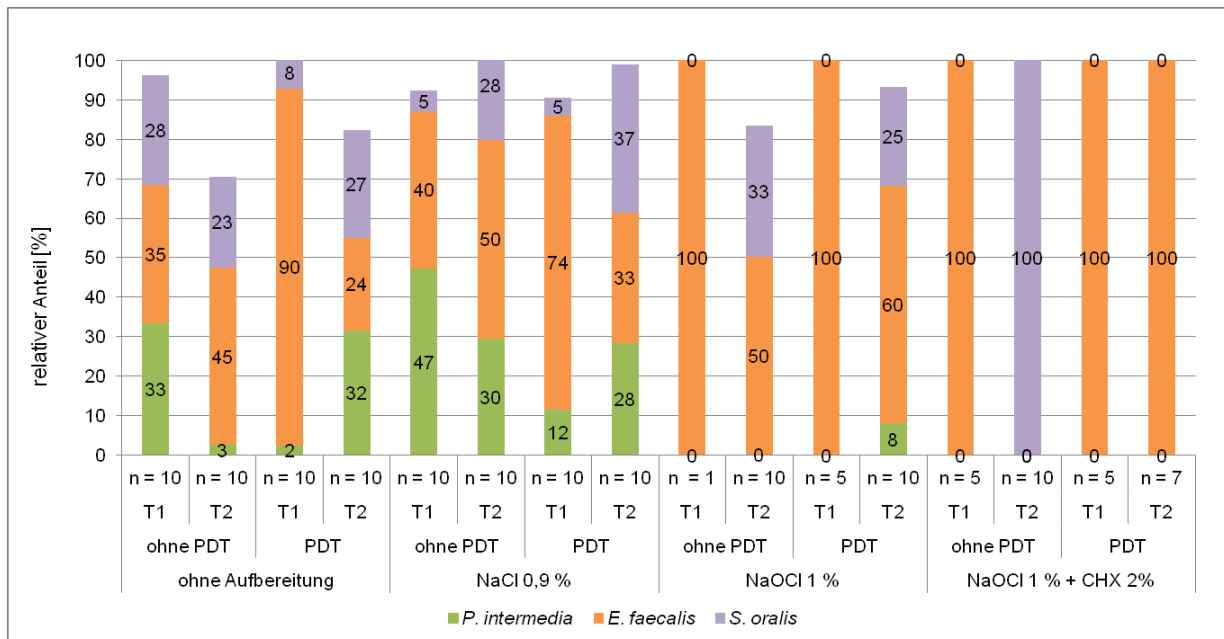


Abbildung 12: Relativer Anteil (Median) der Spezies *P. intermedia*, *E. faecalis* und *S. oralis* an der planktonischen Phase im Kanallumen nach der Therapie (T1, T2)

Dargestellt ist der relative Anteil (Median) in Prozent der drei Spezies am Biofilm nach der Therapie. Es wurden nur Proben für diese Auswertung berücksichtigt, in denen im Anschluss an die Therapie ein Bakterienwachstum nachweisbar war.

n, Anzahl der berücksichtigten Proben; **T1**, sofort nach Therapie; **T2**, fünf Tage nach Therapie; **NaCl**, Natriumchlorid; **NaOCl**, Natriumhypochlorit; **CHX**, Chlorhexidin; **PDT**, photodynamische Therapie; ***P. intermedia***, *Prevotella intermedia*; ***E. faecalis***, *Enterococcus faecalis*; ***S. oralis***, *Streptococcus oralis*

E. faecalis war im Anschluss an die Therapie zu beiden Entnahmezeitpunkten (T1, T2) die dominanteste Spezies im Wurzelkanallumen. In zwölf der insgesamt sechzehn Gruppen war diese Spezies am stärksten in der Zellsuspension vertreten. Darüber hinaus überlebte diese Spezies die Therapie in fünfzehn Gruppen. Wurde während der Versuchsdurchführung der Wurzelkanal mit einer desinfizierenden Lösung gespült, war *E. faecalis* in fünf von acht Gruppen die einzige Spezies, die die Behandlung überlebte. Der mediane Anteil am Biofilm betrug 50 % (IQR 33 - 100 %). *P. intermedia* war in sieben und *S. oralis* in fünf der besagten acht Gruppen im Anschluss an die Therapie nicht mehr nachweisbar. Die beiden Spezies wiesen in diesen Gruppen einen medianen Anteil am Biofilm von 0 % (*P. intermedia*, IQR 0 - 7 %) beziehungsweise 33 % (*S. oralis*, 0 - 33 %) auf.

In den Gruppen, in denen keine Aufbereitung stattfand oder in denen während der mechanischen Erweiterung des Kanals mit NaCl 0,9 % gespült wurde, waren im

Anschluss an die Therapie stets alle drei Spezies im Kanallumen vorhanden. Die Spezies *E. faecalis* zeigte auch hier den größten Anteil in der planktonischen Phase. Der Median in den Gruppen ohne den Einsatz desinfizierender Spüllösungen entsprach 40 % (IQR 28 - 67 %). *P. intermedia* war mit einem medianen Anteil von 30 % (IQR 0 - 49 %) und *S. oralis* mit 17 % (5 - 34 %) vertreten.

5.4 Dentinadhärente Bakterien

5.4.1 Deskription der dentinadhärenten Bakterienkonzentrationen vor und nach der Therapie

5.4.1.1 Deskription der dentinadhärenten Bakterienkonzentration vor der Therapie T0

Der Medianwert der Bakterienkonzentration vor der Therapie für die dentinadhärenten Zellen im Biofilm betrug $58,5 \times 10^6$ KBE/ml (IQR $57 - 94 \times 10^6$ KBE/ml). Alle Dentinproben wiesen mehr als 100.000 KBE/ml auf.

5.4.1.2 Deskription der dentinadhärenten Bakterienkonzentration nach der Therapie bei sofortiger Probenentnahme (T1) nach erfolgter Therapie

Die kategoriale Konzentration dentinadhärenter Bakterien direkt im Anschluss an die Therapie ist der Abbildung 13 zu entnehmen. Zum Zeitpunkt T1 wiesen in den G 1.1 und G 1.2 jeweils neun von zehn Proben eine Bakterienkonzentration größer als 100.000 KBE/ml auf, in jeweils einem Wurzelkanal lag die Bakterienkonzentration zwischen 50 – 100.000 KBE/ml.

In allen Wurzelkanälen der HG 2 (G 2.1, G 2.2) wurden im Dentin mehr als 100.000 KBE/ml unabhängig von der Nebengruppenzugehörigkeit nachgewiesen. Die Spülung mit NaOCl 1 % (HG 3) führte in jedem Fall zu einer Bakterienkonzentration kleiner als 100.000 KBE/ml. In der G 3.1 waren in acht, in G 3.2 in sieben Proben im Anschluss an die Therapie keine Bakterien mehr nachweisbar. Nach Spülung mit NaOCl 1 % und CHX 2 % (HG 4) ohne Anwendung der PDT konnte in allen zehn Proben jeweils eine bakterielle Besiedlung des Dentins mit weniger als 100.000 KBE/ml erreicht werden. In sechs Wurzelkanälen lag die Bakterienkonzentration im Dentin unter der Nachweisgrenze von 50 KBE/ml. Die adjuvante Anwendung der PDT in HG 4 führte in sieben Fällen zu einer Bakterienkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze. In

einer der insgesamt zehn Proben trat eine Zellkonzentration größer als 100.000 KBE/ml auf.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit desinfizierender Spüllösung (HG 3, HG 4) unabhängig von der Nebengruppe in 70 % der Wurzelkanäle an den Dentinwänden eine Bakterienkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze erreicht werden konnte. Die Aufbereitung ohne desinfizierende Spüllösungen (HG 1, HG 2) hatte in 95 % der Proben eine verbleibende Bakterienkonzentrationen größer als 100.000 KBE/ml zur Folge.

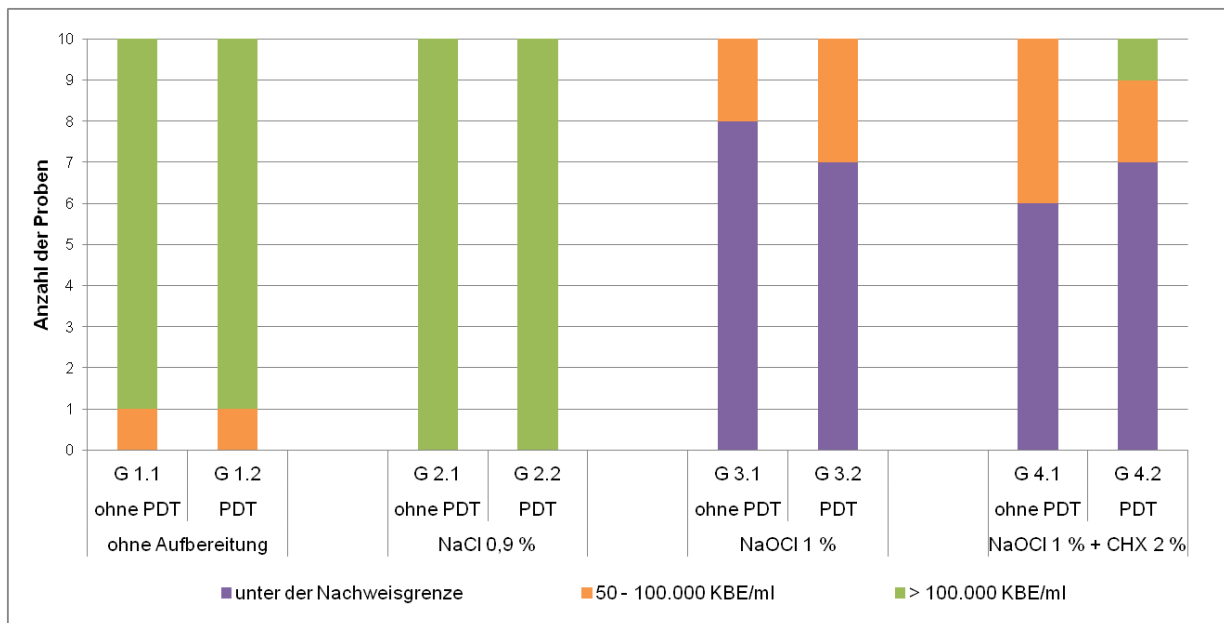


Abbildung 13: Bakterienkonzentration im Dentin zum Zeitpunkt T1

T1, sofort nach Therapie; **NaCl**, Natriumchlorid; **NaOCl**, Natriumhypochlorit; **CHX**, Chlorhexidin; **PDT**, photodynamische Therapie; **KBE/ml**, koloniebildende Einheiten pro Milliliter

5.4.1.3 Deskription der dentinadhärenten Bakterienkonzentration nach der Therapie bei Probenentnahme fünf Tage nach erfolgter Therapie (T2)

In drei der vier Hauptgruppen (HG 1 - HG 3) waren die Bakterienkonzentrationen unabhängig von der Nebengruppe in allen Proben größer als 100.000 KBE/ml. Nur nach desinfizierender Spülung mit NaOCl 1 % und CHX 2 % (HG 4) wurden nach der Therapie Bakterienkonzentrationen kleiner als 100.000 KBE/ml erreicht. Im Anschluss an die Therapie lagen in 20 % der Proben ohne Anwendung der PDT die Bakterienkonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze, in weiteren 20 % konnten Zellkonzentrationen zwischen 50 - 100.000 KBE/ml nachgewiesen werden. Mit

adjuvanter PDT-Anwendung (G 4.2) zeigten 90 % der Proben Bakterienkonzentrationen kleiner als 100.000 KBE/ml. In der Hälfte der insgesamt zehn Wurzelkanäle konnten zum Zeitpunkt T2 an den Dentinwänden keine Bakterien mehr nachgewiesen werden (Abb. 14).

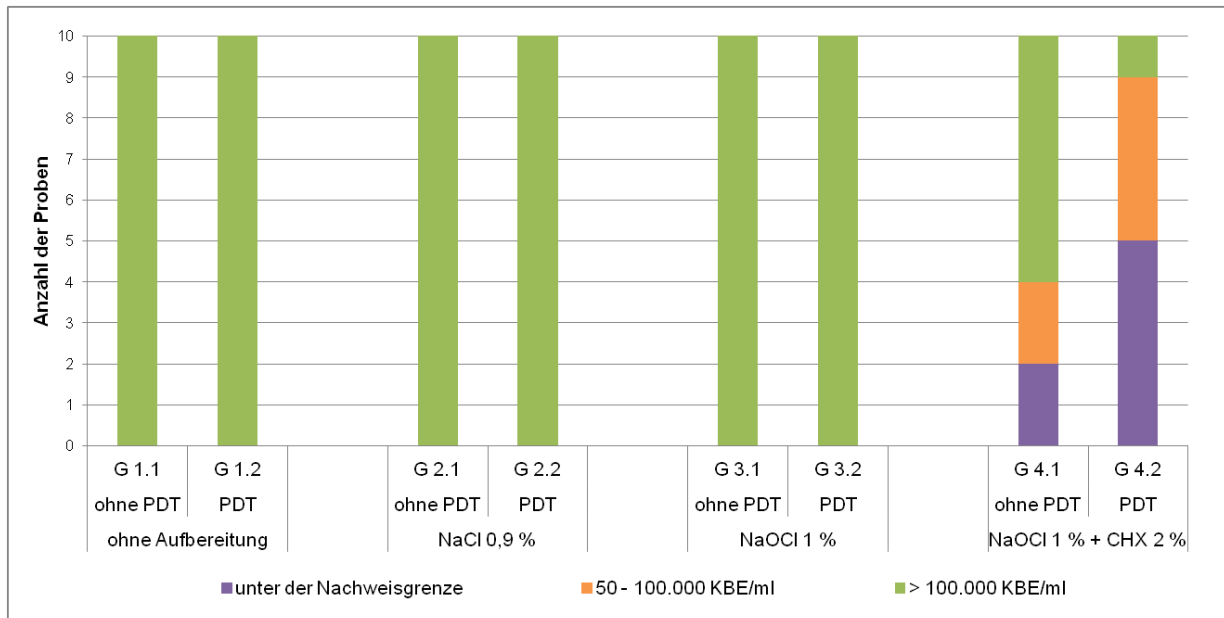


Abbildung 14: Bakterienkonzentration im Dentin zum Zeitpunkt T2

T2, fünf Tage nach Therapie; **NaCl**, Natriumchlorid; **NaOCl**, Natriumhypochlorit; **CHX**, Chlorhexidin; **PDT**, photodynamische Therapie; **KBE/ml**, koloniebildende Einheiten pro Milliliter

5.4.2 Nicht-parametrische Tests der Verteilung der dentinadhärenten Bakterienkonzentrationen nach der Therapie bei sofortiger Probenentnahme (T1) nach erfolgter Therapie

Der Kruskal-Wallis-Test stratifiziert nach den Hauptgruppen zeigte signifikante Unterschiede in der Verteilung der Kategorien für die Bakterienkonzentration im Dentin. Es konnte kein signifikanter Einfluss der PDT auf die Konzentration der dentinadhärenten Bakterien nachgewiesen werden ($p = 0,9$; Kruskal-Wallis-Test).

Anhand der paarweisen Vergleiche ließen sich für die Proben, die im Anschluss an die chemomechanische Aufbereitung keine adjuvante PDT erhielten (NG 1) folgende Aussagen treffen: Wurde während der Aufbereitung mit desinfizierenden Lösungen gespült (G 3.1, G 4.1), waren im Dentin signifikant geringere Bakterienkonzentrationen zu ermitteln als in der Kontrollgruppe ohne Aufbereitung (G 1.1) (G 3.1 und G 4.1 $p < 0,0001$; Mann-Whitney-U). Die Spülung des Wurzelkanals mit NaCl 0,9 % während

der Aufbereitung (G 2.1) ergab keine signifikanten Unterschiede in der Bakterienkonzentration im Dentin im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = 0,32$; Mann-Whitney-U).

Die paarweisen Vergleiche der Gruppen, in denen eine adjuvante PDT durchgeführt wurde (NG 2), mit der Kontrollgruppe G 1.2 führten zu identischen Ergebnissen. Die Aufbereitung unter Spülung mit desinfizierenden Medien resultierte in einer signifikant geringeren Bakterienadhärenz am Dentin als keine Aufbereitung (G 3.2 und G 4.2 $p < 0,0001$; Mann-Whitney-U). Das Spülen mit Kochsalzlösung (G 2.2) führte zu keiner signifikanten Reduktion der Bakterien im Kanalwanddentin im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = 0,32$; Mann-Whitney-U).

5.4.3 Nicht-parametrische Tests der Verteilung der Bakterienkonzentrationen nach der Therapie bei Probenentnahme fünf Tage nach erfolgter Therapie (T2)

Der Kruskal-Wallis-Test stratifiziert nach den Hauptgruppen zeigte für den Zeitpunkt T2 ebenfalls signifikante Unterschiede in der Verteilung der Kategorien für die Bakterienkonzentration im Dentin.

Die PDT zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Konzentration der dentinadhärenten Bakterien ($p = 0,1$; Kruskal-Wallis-Test).

Nach fünf Tagen war ausschließlich in der HG 4 ein signifikanter Unterschied in der Konzentration der dentinadhärenten Bakterien gegenüber der Kontrollgruppe HG 1 vorhanden. Die Behandlung der Wurzelkanäle ohne adjuvante PDT (NG 1) erreichte in der HG 4 einen p-Wert von $p = 0,03$ (Mann-Whitney-U). Die zusätzliche Anwendung der PDT (NG 2) in dieser Hauptgruppe erzielte einen p-Wert von $p < 0,0001$ (Mann-Whitney-U).

5.5 Vergleich planktonischer und dentinadhärenter Bakterienkonzentrationen

5.5.1 Kreuztabelle der planktonischen und dentinadhärenten Bakterienkonzentrationen nach der Therapie bei sofortiger Probenentnahme (T1) nach erfolgter Therapie

Ohne Aufbereitung (HG 1) zeigten alle zwanzig Wurzelkanäle eine planktonische Bakterienkonzentration größer als 100.000 KBE/ml; in 90 % der Proben lag die Konzentration im Dentin ebenfalls über 100.000 KBE/ml. Die Aufbereitung unter Kochsalzspülung (HG 2) zeigte in 95 % der Proben keine bakterienreduzierende

Wirkung (Kategorie 3, > 100.000 KBE/ml) auf die planktonischen Zellen. Alle Proben wiesen im Kanalwanddentin eine Bakterienkonzentration größer als 100.000 KBE/ml auf. Die Spülung mit NaOCl 1 % während der Aufbereitung (HG 3) hatte zur Folge, dass in 60 % der Proben sowohl im Kanallumen als auch im Dentin keine Bakterien mehr nachgewiesen werden konnten. In allen Wurzelkanälen der HG 3 wurde nach der Therapie im Dentin eine Bakterienkonzentration kleiner als 100.000 KBE/ml erreicht. Nach der Desinfektion des Kanals mit NaOCl 1 % und CHX 2 % (HG 4) waren in 40 % der Proben weder planktonische noch dentinadhärente Bakterien nachweisbar. In 25 % der Wurzelkanäle traten Bakterienkonzentrationen entsprechend der Kategorie 2 sowohl im Kanallumen als auch an der Kanalwand auf. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass eine hohe Übereinstimmung der kategorialen Ergebnisse hinsichtlich der Bakterienkonzentrationen im Lumen und an der Wurzelkanalwand im Anschluss an die Therapie auftrat. In 24 der insgesamt 80 Wurzelkanäle lag die planktonische Bakterienkonzentration unter der Nachweisgrenze. In zwanzig dieser 24 Proben konnten auch im Dentin keine Bakterien mehr nachgewiesen werden. Sieben Wurzelkanäle zeigten Bakterienkonzentrationen entsprechend der Kategorie 2 (planktonische Zellen, 500 - 100.000 KBE/ml; dentinadhärente Zellen 50 - 100.000 KBE/ml) und 37 Proben Konzentrationen größer als 100.000 KBE/ml sowohl im Dentin als auch im Wurzelkanallumen. Insgesamt lag in 64 von 80 Wurzelkanälen eine Übereinstimmung der kategorialen Ergebnisse für die planktonische Bakterienkonzentration und der Bakterienkonzentration im Dentin vor (Abb. 15). Der Kappa-Koeffizient betrug 0,68.

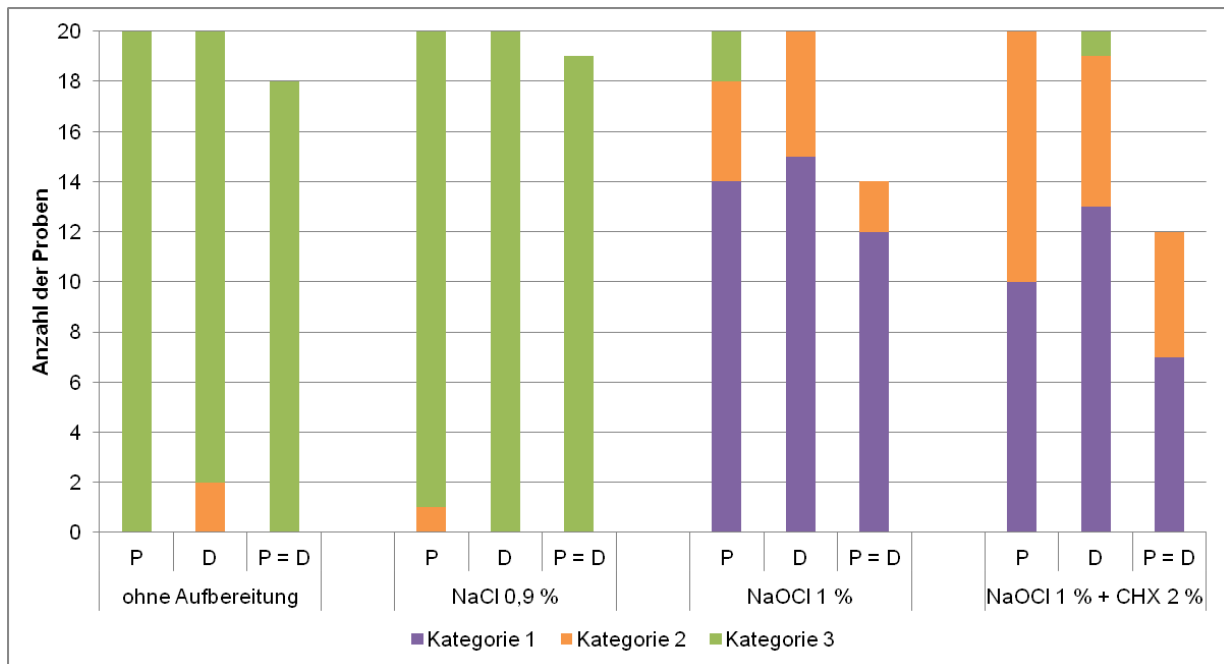


Abbildung 15: kategoriale Verteilung der Bakterienkonzentrationen im Wurzelkanallumen und im Dentin zum Zeitpunkt T1

T1, sofort nach Therapie; **NaCl**, Natriumchlorid; **NaOCl**, Natriumhypochlorit; **CHX**, Chlorhexidin; **P** planktonische Bakterien, **D** dentinadhärente Bakterien, **P = D** kategoriale Übereinstimmung der planktonischen und dentinadhärenten Bakterienkonzentration;

Kategorie 1 Bakterienkonzentration unter der Nachweisgrenze, **Kategorie 2** Bakterienkonzentration über der Nachweisgrenze < 100.000 KBE/ml, **Kategorie 3** Bakterienkonzentration > 100.000 KBE/ml

5.5.2 Kreuztabelle der planktonischen und dentinadhärenten Bakterienkonzentrationen nach der Therapie bei Probenentnahme fünf Tage nach erfolgter Therapie (T2)

Nach fünf Tagen waren in drei von 80 Wurzelkanälen keine planktonischen Bakterien nachweisbar. In allen drei Proben lag auch die Konzentration der dentinadhärenten Bakterien unterhalb der Nachweisgrenze. Planktonische und dentinadhärente Bakterienkonzentrationen entsprechend der Kategorie 2 fanden sich in vier Wurzelkanälen. 67 Proben wiesen sowohl im Kanallumen als auch im Dentin eine Konzentration an Bakterien größer als 100.000 KBE/ml auf. Insgesamt stimmten in 74 der 80 Wurzelkanäle die kategorialen Ergebnisse der planktonischen und der dentinadhärenten Bakterienkonzentrationen überein (Kappa = 0,72).

In den HG 1 - 3 zeigten alle Proben sowohl im Lumen als auch an der Kanalwand Bakterienkonzentrationen größer als 100.000 KBE/ml.

Ausschließlich in Wurzelkanälen der HG 4 kam es zu Bakterienkonzentrationen kleiner als 100.000 KBE/ml. 15 % zeigten weder planktonisch noch im Dentin nachweisbare Bakterien. Insgesamt wiesen 65 % der Wurzelkanäle im Dentin und 55 % im Kanallumen Bakterienkonzentrationen kleiner als 100.000 KBE/ml auf (Abb. 16).

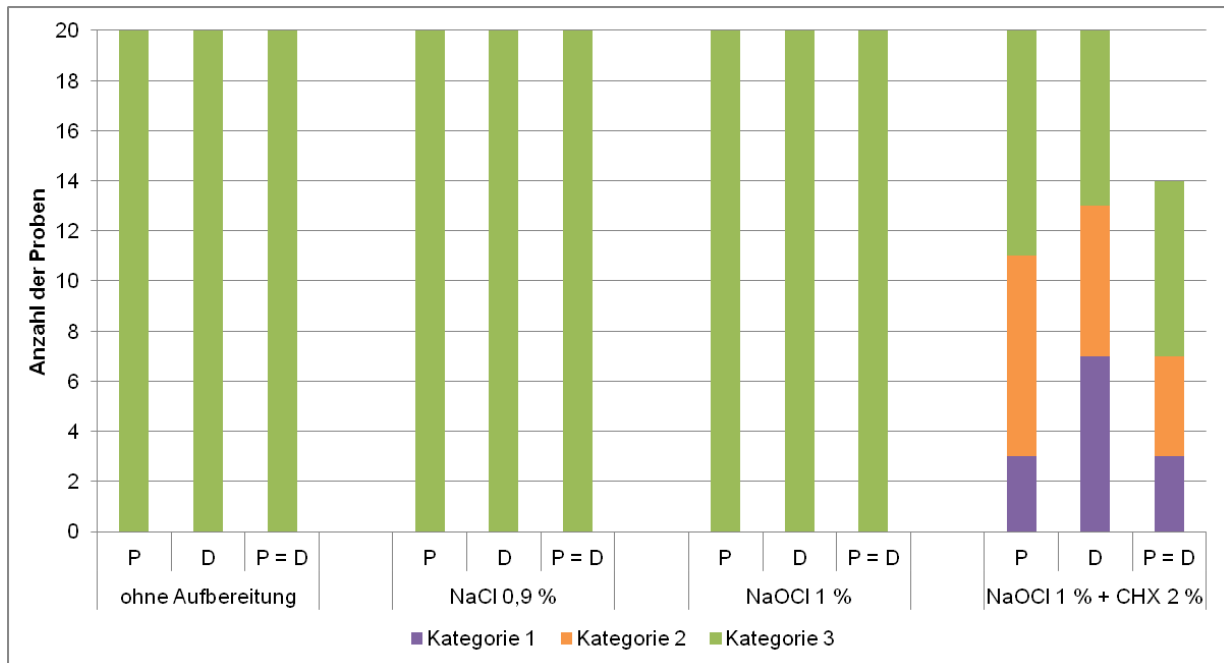


Abbildung 16: kategoriale Verteilung der Bakterienkonzentrationen im Wurzelkanallumen und im Dentin zum Zeitpunkt T2

T2, fünf Tage nach Therapie; **NaCl**, Natriumchlorid; **NaOCl**, Natriumhypochlorit; **CHX**, Chlorhexidin;

P planktonische Bakterien, **D** dentinadhärente Bakterien, **P = D** kategoriale Übereinstimmung der planktonischen und dentinadhärenten Bakterienkonzentration;

Kategorie 1 Bakterienkonzentration unter der Nachweisgrenze, **Kategorie 2** Bakterienkonzentration über der Nachweisgrenze < 100.000 KBE/ml, **Kategorie 3** Bakterienkonzentration > 100.000 KBE/ml

6 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde die bakterienreduzierende Wirksamkeit verschiedener Spülprotokolle während der mechanischen Aufbereitung auf einen Multispeziesbiofilm bestehend aus *E. faecalis*, *S. oralis* und *P. intermedia* im Rahmen der Wurzelkanalbehandlung untersucht. Der Effekt der PDT als adjuvante Maßnahme war von besonderem Interesse.

Die aufgestellte Nullhypothese, dass die verschiedenen Aufbereitungsprotokolle wie auch die adjuvante PDT sich hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Infektion des Wurzelkanals nicht unterscheiden, wurde teilweise widerlegt.

Für die chemomechanische Aufbereitung ließen sich sowohl direkt im Anschluss an die Therapie als auch nach erneuter fünftägiger Inkubation unterschiedliche Effekte auf die Reduktion planktonischer und dentinadhärenter Bakterien nachweisen.

Die Spülung mit desinfizierenden Lösungen während der maschinellen Aufbereitung des Wurzelkanals resultierte direkt nach der Therapie in einer signifikanten Reduktion der Bakterienkonzentration um 6 log₁₀-Stufen. Nach erneuter Inkubation für fünf Tage war ein desinfizierender Effekt des angewandten Spülprotokolls nur noch für NaOCl 1 % in Kombination mit CHX 2 % nachweisbar.

Eine signifikant höhere Bakterienreduktion zeigte sich nach Anwendung der adjuvanten PDT direkt nach der Behandlung in den Proben ohne Aufbereitung und in denen, die während der maschinellen Erweiterung des Kanals mit NaCl 0,9 % gespült wurden. Die Reduktion der Bakterienkonzentration umfasste 2 log₁₀-Stufen und fiel damit vergleichsweise gering aus. Ein wesentlich stärkerer Effekt der adjuvanten PDT zeigte sich nach erneuter fünftägiger Bebrütung der Proben, die zuvor mit NaOCl 1 % und CHX 2 % behandelt wurden. Im Vergleich zur Ausgangskonzentration betrug die Reduktion der Mikroorganismen in dieser Gruppe 6 log₁₀-Stufen.

6.1 Diskussion von Material und Methode

6.1.1 Biofilmmodell

Der Biofilm wurde in extrahierten, humanen Zähnen künstlich etabliert. Es gibt eine Vielzahl an Biofilmmodellen, die für die Evaluation der Wirksamkeit endodontischer Spülmedien zum Einsatz kommen. Eine Möglichkeit, das Adhäsionsverhalten von

Mikroorganismen, das Biofilmwachstum und die Reaktion der Zellen auf veränderte Umweltfaktoren zu untersuchen, bietet die Durchflussskammer. In einer Fluidkammer wird eine kontrollierte Strömung über einer infizierten Oberfläche erzeugt [134]. Chavéz de Paz *et al.* [85] untersuchten in der Durchflussskammer die desinfizierende Wirkung verschiedener Spülmedien auf endodontische Biofilme. Es zeigte sich eine gesteigerte Resistenz der Bakterien gegenüber den Spülmedien, wenn die hydrophile Oberfläche, auf denen der Biofilm wuchs, mit Kollagen Typ IV benetzt war. Ein weiteres häufig eingesetztes Verfahren ist die Etablierung von Biofilmen auf Hydroxylapatit. In einer Studie von Shen *et al.* [135] wurden Hydroxylapatitscheiben für drei Wochen in einer Plaquesuspension gelagert und anschließend die Wirksamkeit von CHX auf den entstandenen Biofilm untersucht. Waren die Hydroxylapatitscheiben mit bovinem Kollagen Typ I überzogen, bildeten die Mikroorganismen dickere Biofilme aus. Darüber hinaus verminderte das Kollagen die antibakterielle Wirkung von CHX. Hope *et al.* [40] untersuchten die Wirksamkeit endodontischer Spülmedien in zwei verschiedenen Biofilmmodellen und verglichen die Ergebnisse miteinander. Biofilme, die auf einer Membran wuchsen und anschließend in die antibakterielle Lösung getaucht wurden, reagierten deutlich empfindlicher auf eine einprozentige Natriumhypochloritlösung als die Biofilme, die in einem Echtzahnmodell damit behandelt wurden. Hope *et al.* schlussfolgerten, dass nicht allein das Wachstum der Bakterien im Biofilm eine effektive bakterizide Wirkung der Spüllösung verhindert, sondern vielmehr die eingeschränkte Erreichbarkeit der Mikroorganismen im Wurzelkanal durch dessen komplexe Anatomie.

6.1.2 Vorbereitende Präparation der Versuchsproben

Es wurden ausschließlich gerade Wurzeln mit genau einem Wurzelkanal eingesetzt. In Vorbereitung auf die Versuchsdurchführung erfolgte die standardisierte Erweiterung des Wurzelkanals in der HG 1 bis zu einer MAF ISO 02/60 und in den HG 2 - HG 4 bis MAF ISO 02/40. Diese Vorgehensweise soll die natürlichen Bedingungen so realitätsnah wie möglich simulieren und dabei gleichzeitig reproduzierbare und vergleichbare Versuchsbedingungen schaffen. Durch die einheitliche Aufbereitung der Wurzelkanäle wurde eventuell vorhandenes totes Zellmaterial (Pulpagewebe, Mikroorganismen) entfernt und ein annähernd gleiches Kanalvolumen von rund 17,4 mm³ (MAF ISO 40) bzw. rund 23,0 mm³ (MAF ISO 60) in den einzelnen Proben geschaffen. Tardivo *et al.*

[136] ermittelten in bleibenden Eckzähnen ein Pulpavolumen von 1,4 - 49,1 mm³. Oberkiefereckzähne zeigten im Median ein Pulpavolumen von 17 mm³.

Allgemein weisen Molaren schmalere Wurzelkanäle auf als Frontzähne. Nach Kerekes *et al.* [137-139] wäre gemessen am apikalen Durchmesser des Wurzelkanals in der Mehrzahl der Molaren und Prämolaren die Aufbereitung mit einer initialen Aufbereitungsfeile (IAF) der ISO-Größen 10 - 30 denkbar. Der apikale Durchmesser der oberen seitlichen Inzisivi sowie der der Unterkieferschneidezähne entspricht mehrheitlich einer IAF der ISO-Größen 15 - 40. Die initiale Aufbereitung von Eckzähnen und mittleren Schneidezähnen im Oberkiefer wäre entsprechend des apikalen Wurzelkanalquerschnitts theoretisch mit einer IAF der ISO-Größen 30 - 40 möglich. Jedoch ist nicht allein der apikale Durchmesser für die Wahl der IAF entscheidend sondern auch eventuell vorhandene Krümmungen im Kanalverlauf. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Wu *et al.* 2000 [140]. Mizutani *et al.* [141] ermittelten in über 50 % der untersuchten Einser und Dreier im Oberkiefer eine theoretische IAF der ISO-Größe 30.

In der Studie von Kasahara *et al.* [142] entsprach in einem Drittel der untersuchten Oberkieferschneidezähne der apikale Durchmesser einer IAF der ISO-Größe 40-60.

Die in der vorliegenden Studie geschaffene Ausgangssituation in den einzelnen Proben simuliert einen geraden, vergleichsweise weiten Wurzelkanal mit annähernd rundem Querschnitt, wie er natürlicherweise in den Frontzähnen des Oberkiefers und den Eckzähnen des Unterkiefers junger Patienten zu erwarten ist. Diese Situation stellt klinisch eine geringere Herausforderung bezüglich der Desinfektion und der mechanischen Aufbereitung dar als enge, gekrümmte Kanäle in schwer zu erreichenden Kieferregionen. Darüber hinaus bieten endodontisch vorbehandelte Zähne ähnliche anatomische Voraussetzungen wie die Wurzelkanäle in dieser Studie.

Die abschließende Spülung des Wurzelkanals während der Probenvorbereitung mit EDTA 18 % diente der Freilegung der Dentintubuli und eventuell vorhandener akzessorischer Kanäle durch Entfernung der bei der Aufbereitung entstandenen Schmierschicht [143]. Vor der Sterilisation der präparierten Zahnproben, fand eine Versiegelung der äußeren Dentinschicht statt. Dafür wurde die Wurzeloberfläche mit Nagellack bestrichen. Anschließend wurden die Proben in Kunststoffblöcke eingebettet. Diese Arbeitsschritte erfolgten analog zu dem in der Studie von Noetzel *et al.* [144] beschriebenen Vorgehen. Der Nagellack sollte den durch die

Polymerisationsschrumpfung entstandenen Spalt zwischen Kunststoff und Zahn abdichten. Eine Migration von Mikroorganismen aus der Peripherie in den Wurzelkanal wurde so unterbunden. Nach der Sterilisation der Zahnproben und vor dem Beimpfen der Wurzelkanäle mit den drei Spezies wurde an allen Proben eine Sterilisationskontrolle durchgeführt. Hierfür wurden die Kunststoffblöcke einzeln für fünf Tage in Nährlösung gelagert [145]. Dieser Zeitraum ermöglichte es, eine Kontamination der Proben, durch Sichtkontrolle auf eine ausbleibende Trübung der Lösung, eindeutig auszuschließen. Darüber hinaus wurde der Flüssigkeitsverlust im Dentin, der durch die notwendige trockene Lagerung der Proben während des Sterilisationsvorganges stattfand, ausgeglichen.

Vor dem Beimpfen der Wurzelkanäle wurden in jedem Anaerobiertopf vier Zähne, jeweils eine Probe aus jeder Hauptgruppe, positioniert. Diese Aufteilung sollte eine gleichmäßige Streuung über alle Hauptgruppen der eventuell versuchsbedingt auftretenden Millieuschwankungen während der Wachstumsphase des Biofilmes sicherstellen.

6.1.3 Etablierung des Multispeziesbiofilmes im Wurzelkanal

Zur Etablierung eines Multispeziesbiofilmes bestehend aus *E. faecalis*, *S. oralis* und *P. intermedia* wurde eine Nährlösung, die die drei Spezies enthielt, in den Wurzelkanal injiziert. Um zu gewährleisten, dass sich die Nährlösung zu drei gleichen Teilen aus den einzelnen Spezies zusammensetzt, wurden zunächst drei identische Volumina der Nährlösung mit je einer Spezies beimpft und anschließend zusammengeführt. Durch Messung der optischen Dichte im Photometer konnte die Konzentration der Monospezies suspension ermittelt werden. Die Extinktion durch die Suspension war abhängig von der Bakterienart und der Konzentration der Zellen in der Lösung. Im Rahmen eines Vorversuches wurde für jede Spezies durch die Messung der Extinktion verschiedener Konzentrationen die optische Dichte ermittelt, die bei einer Wellenlänge von 600 nm der Konzentration von $2,5 \times 10^8$ KBE/ml entsprach. Diese Art der Konzentrationsbestimmung für Zellsuspensionen ist ein erprobtes Verfahren, welches in der Fachliteratur beschrieben ist [146, 147]. Eine andere häufig angewandte Methode zur Herstellung von Keimsuspensionen definierter Konzentrationen orientiert sich an den McFarland-Standards. Dabei wird der Trübungsgrad einer geeichten Standardlösung mit bekannter Konzentration mit der Testlösung verglichen. Dieses

Verfahren hängt stark von der subjektiven visuellen Wahrnehmung des Anwenders bei nicht näher definierten Umgebungsfaktoren (Raumhelligkeit) ab. Die speziesabhängige Morphologie der einzelnen Zellen wird bei diesem Verfahren nicht berücksichtigt. Demzufolge wäre eine ähnlich starke Trübung einer Suspension von großen dunklen Zellen in geringer Konzentration und einer hochkonzentrierten Suspension von kleinen hellen Zellen denkbar. Zwischen den in dieser Studie verwendeten Spezies sind deutliche Unterschiede in der Farbe und Größe der Bakterienzellen vorhanden. Die Bestimmung der Konzentration der Monospezies suspension durch die Messung der optischen Dichte berücksichtigt diese morphologischen Unterschiede und stellt das geeignetere Verfahren im Rahmen dieses Versuchsaufbaus dar [146].

Nach dem Beimpfen der Wurzelkanäle mit der Multispezies suspension wurden die Proben unter anaeroben Bedingungen inkubiert.

Naturgemäß besiedeln Mikroorganismen den Wurzelkanal sowohl in planktonischer Phase als auch in Form adhärenter Zellgemeinschaften [27]. In künstlich erzeugten Biofilmen herrscht aufgrund der fehlenden Wirtsabwehr und der eingeschränkten Speziesvielfalt ein veränderter Selektionsdruck auf die einzelnen Mikroorganismen. Es konnte gezeigt werden, dass die Entwicklungsstadien von Bakterien im Labor nicht dieselben sind, wie die unter natürlichen Bedingungen. In labortechnisch erzeugten Biofilmen werden Entwicklungsstadien übersprungen. Bakterielle Adhäsine werden unter bestimmten Bedingungen, beispielsweise Anzucht auf unnatürlichen Oberflächen wie Agarnährböden, nicht ausgebildet. Adhäsine können jedoch als Virulenzfaktoren fungieren [148].

In der vorliegenden Studie wurden drei Bakterienspezies eingesetzt, die zuvor aus einem infizierten, endodontisch unbehandelten Wurzelkanal eines Probanden gewonnen wurden. Es wurde angenommen, dass die aus dem natürlichen Lebensraum isolierten Stämme eine Varietät an Virulenzfaktoren und eine der Primärinfektion angepassten Genexpression aufwiesen [37, 44].

Klinisch stellt die Primärinfektion eine Mischinfektion bestehend aus 10 - 30 Spezies dar und wird von gramnegativen Anaerobiern dominiert. Streptokokken und die Spezies *P. intermedia* gehören zu den dominierenden Spezies in der Primärinfektion. Sie wurden jedoch auch an Infektionen revisionsbedürftiger Wurzelkanäle nachgewiesen [4]. Darüber hinaus wird ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von *P. intermedia* und der apikalen Parodontitis vermutet [4, 149]. *E. faecalis* wurde in der Vergangenheit besonders häufig mit revisionsbedürftigen Wurzelkanalbehandlungen

assoziiert und als der Verursacher der therapieresistenten endodontischen Erkrankungen propagiert. Jüngere Studien diskutieren diesen Fakt kritisch und belegen eine weitaus größere Speziesvielfalt der persistierenden Infektion [4, 5, 7, 42].

Anhand der Ergebnisse einer im Vorfeld der Versuche durchgeführten Wachstumsreihe wurde ein Bebrütungszeitraum von vier Tagen festgelegt. Dieser ermöglichte die Ausbildung eines Biofilmes. Ein Versuchsaufbau ähnlich zu dem in dieser Studie nutzten Fimble *et al.* [150] und wiesen bereits nach drei Tagen einen Multispeziesbiofilm im Wurzelkanal nach. Stojicic *et al.* [35] zeigten in ihrer Studie, dass eine gesteigerte Resistenz gegenüber antimikrobiellen Substanzen der im Biofilm lebenden Mikroorganismen erst nach circa 21 Tagen umfangreich entwickelt war. Jüngere Biofilme reagierten auf desinfizierende Maßnahmen deutlich sensibler. Sie züchteten auf Hydroxylapatitscheiben sechs verschiedene Multispeziesbiofilme aus Plaquebakterien von sechs Probanden. Nach einer, zwei, drei, vier und acht Wochen wurden die Biofilme mit verschiedenen endodontischen Spülmedien behandelt und die Überlebensrate der Bakterien ermittelt. Zwischen der zweiten und der dritten Woche änderte sich die Sensitivität gegenüber der Desinfektiva signifikant. Ab der dritten Woche konnten nur noch 10 - 30 % der im Biofilm wachsenden Mikroorganismen abgetötet werden. In ein und zwei Wochen alten Biofilmen konnte eine 20- bis 100%ige Eradikation durch die Spülmedien erreicht werden. Der Wechsel von sensibel zu resistent vollzog sich in allen sechs Multispeziesbiofilmen im gleichen Zeitraum unabhängig von den beteiligten Spezies und den eingesetzten desinfizierenden Agenzien.

In der vorliegenden Studie wurde ein deutlich kürzerer Bebrütungszeitraum als 21 Tage gewählt. Dieser Entscheidung lag die Absicht zu Grunde, die Fehleranfälligkeit in der Vorbereitung der Versuche gering zu halten. Folgende Fehlerquellen ergaben sich aus dem Versuchsaufbau: Das Studiendesign beinhaltete eine tägliche Zufuhr frischer BHI in den Wurzelkanal. Für diesen Arbeitsschritt wurden die Inkubationstöpfe jedes Mal aus dem Brutschrank genommen und in der sterilen Werkbank geöffnet. Dadurch wurden die Proben täglich für mehrere Minuten einer Temperaturschwankung um mindestens 10° C und einem Atmosphärenwechsel von sauerstoffarm hin zu sauerstoffreich und einem erneuten Aufbau eines sauerstoffarmen Milieus ausgesetzt. Dies bedeutet Stress für die Bakterien im Wurzelkanal, der sich auf das Wachstum der Mikroorganismen auswirken kann. Das Einbringen des Nährmediums in den

Wurzelkanal mit sterilen Einmalspritzen birgt das Risiko, den Biofilm teilweise oder vollständig zu zerstören. Darüber hinaus steigt die Wahrscheinlichkeit für menschliches Versagen wie Verunreinigung der Proben oder Umstoßen der einzelnen Proben oder des Topfes mit jedem zusätzlichen Bebrütungstag.

6.1.4 Therapieprotokolle

In der vorliegenden Studie wurde die antibakterielle Wirksamkeit der Wurzelkanalaufbereitung unter Anwendung verschiedener Spülprotokolle untersucht. Die HG 1, in der keine weitere Aufbereitung stattfand, stellte die Positivkontrolle dar. Die Spülung mit NaCl 0,9 % während der Erweiterung des Wurzelkanals in der HG 2 diente der Interpretation der mechanischen Reinigungswirkung im Rahmen der endodontischen Therapie. In den HG 3 und HG 4 wurde die mechanische Reinigung durch eine chemische Desinfektion ergänzt. Während der mechanischen Aufbereitung wurde in beiden Gruppen intermittierend mit NaOCl 1 % gespült. Die HG 4 beinhaltete eine zusätzliche Behandlung mit CHX 2 %. Das ungebundene CHX im Wurzelkanallumen wurde vor der Probenentnahme durch eine Spülung mit einer Kochsalzlösung 0,9 %, welche Tween 80 3 % und L- α -Lecithin 0,3 % enthielt, neutralisiert [151]. Dies war nötig, da bereits der Übertrag kleinster Mengen des CHX auf den Nährboden das Wachstum der Bakterien beeinflusst und zu falsch negativen Testergebnissen führen kann [152].

Die kombinierte Anwendung von NaOCl und CHX zur Desinfektion des Wurzelkanals birgt das Risiko einer chemischen Reaktion zwischen diesen Spülmedien, bei der sich ein orange-brauner Niederschlag bildet. Das Präzipitat kann durch die Verlegung von Seitenkanälen und Dentintubuli die desinfizierende Wirkung der chemomechanischen Aufbereitung mindern [153]. Desweiteren werden eine mögliche irreversible Verfärbung der Zahnhartsubstanz und ein verringerter Haftverbund zwischen Wurzelfüllpaste und Kanalwanddentin diskutiert. Letzteres konnte für Wurzelfüllpasten auf Epoxidharzbasis in Studien nicht bestätigt werden [153, 154]. Eine Vielzahl von Studien vermutet Parachloranilin als potentiell toxisches und kanzerogenes Produkt im gebildeten Präzipitat [155]. Neuere Studien widerlegen diese Annahme [155]. Die Fällung eines schwerlöslichen Salzes bei der Reaktion zwischen NaOCl und CHX, welches die Erreichbarkeit der Mikroorganismen in den Seitenkanälen und Dentintubuli erschwert, sollte verhindert werden. Eine Zwischenspülung mit Alkohol kann einer Studie von

Krishnamurthy *et al.* [156] zufolge effektiv die Fällungsreaktion verhindern. Dem gegenüber steht die Studie von Magro *et al.* [153], in der trotz ähnlicher Versuchsparemeter auch nach einer Zwischenspülung mit Isopropylalkohol das Vorhandensein des Präzipitates in den Dentintubuli nachgewiesen wurde. In der aktuellen Studie sollte eine chemische Reaktion zwischen NaOCl und CHX durch eine Zwischenspülung mit 70-prozentigem Ethanol verhindert werden.

6.1.5 Nachweismethoden für planktonische und dentinadhärente Bakterienkonzentrationen

Zur Bestimmung der Bakterienkonzentration im Wurzelkanal wurde mittels einer Papierspitze Flüssigkeit aus dem Kanallumen entnommen. Die Probe wurde mehrfach verdünnt und auf Universalnährböden ausplattiert. Die Bakterienkonzentration im Wurzelkanal wurde anschließend durch Auszählen der KBE und unter Berücksichtigung des entsprechenden Verdünnungsfaktors berechnet. Dies ist eine etablierte und zudem kostengünstige Methode zum Nachweis von Mikroorganismen. Dennoch weist das Verfahren diverse Einschränkungen auf. Es werden ausschließlich die planktonischen Bakterien erfasst. Darüber hinaus werden nur teilungsfähige, stoffwechselaktive Zellen durch ihr Wachstum auf dem Agar sichtbar. Ein alternatives Nachweisverfahren ist die Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung (Live/Dead BacLight). Die Bakterien im Biofilm werden mit fluoreszierenden Substanzen markiert. Durch die unterschiedliche Aufnahme der Farbstoffe kann unter dem Fluoreszenzmikroskop eine Differenzierung zwischen toten und vitalen Zellen erfolgen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass auch stoffwechselinaktive Mikroorganismen, deren Vitalität auf dem Nährboden durch fehlendes Wachstum unerkannt bleibt, durch diese Methode sichtbar gemacht werden. Eine Reaktivierung solcher Zellen durch ein erhöhtes Nährstoffangebot ist nachgewiesen. Eine erneut zunehmende Pathogenität dieser reaktivierten Bakterien ist nicht ausgeschlossen [157]. Shen *et al.* [157] stellten fest, dass in nährstoffarmen Phasen die Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung die Anzahl an lebensfähigen Bakterien zuverlässiger nachweist als die Kultivierung der Mikroorganismen auf dem Nährboden. Während Wachstumsphasen konnte sowohl durch das Anzuchtverfahren als auch durch die Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung die Bakterienzahl zuverlässig bestimmt werden. Im Labor erfolgt das Kultivieren von Mikroorganismen immer unter unnatürlichen Bedingungen. Durch eine tägliche Zugabe von Nährlösung, wie in der

vorliegenden Studie, besteht durchgehend ein ausreichend hohes Nährstoffangebot. Hungerphasen treten praktisch nicht auf. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das angewandte Nachweisverfahren, die Anzucht der Bakterien auf Nährböden, durchaus die tatsächliche Konzentration an Mikroorganismen im Wurzelkanal widerspiegelt [148]. Ein weiterer zu berücksichtigender Aspekt im Rahmen der methodischen Planung war, dass Nachweisverfahren, welche die Betrachtung des Biofilmes unter dem Mikroskop voraussetzen, für den gewählten Versuchsaufbau nicht in Frage kamen. Eine Beurteilung des Biofilmes sowohl vor als auch nach erfolgter Therapie innerhalb desselben Wurzelkanals wäre nicht möglich gewesen.

Die Probenentnahme via Papierspitze ermöglichte die Bestimmung der planktonischen Bakterienkonzentration im Wurzelkanallumen. Die Bestimmung der Konzentration der dentinadhärenten Zellen erfolgte im Anschluss an die Behandlung. Aus jedem therapierten Kanal wurde mit Hilfe einer Headströmfeile eine Dentinprobe gewonnen. Da bei diesem Vorgehen der Biofilm zerstört wird, wurde die Konzentration der Mikroorganismen entlang der Kanalwand vor der Therapie an drei exemplarischen Proben erhoben. Mit der *FISH* konnte ein Konglomerat aus den drei Spezies entlang der Kanalwand nachgewiesen werden. Im Zusammenhang mit dem gewählten Inkubationszeitraum konnte auf das Vorhandensein eines Biofilmes geschlossen werden. Diese Annahme wird durch die Studie von Fimble *et al.* [150] gestützt. In dieser wurden Zahnproben ähnlich wie die in der vorliegenden Studie vorbereitet und inkubiert. Mit Hilfe von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen und Untersuchungen der dentinadhärenten Zellen mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop wurde anschließend der Nachweis für einen Biofilm entlang der Kanalwand erbracht.

6.1.6 Zeitpunkte der Probenentnahme

Die Bestimmung der Bakterienkonzentration erfolgte zu zwei verschiedenen Zeitpunkten. Die Zähne wurden entsprechend auf zwei Untergruppen verteilt (T1, Probenentnahme sofort nach erfolgter Therapie; T2, Probenentnahme fünf Tage nach erfolgter Therapie). Die Gruppe T1 entspricht klinisch dem Zeitpunkt direkt vor dem Einbringen der Wurzelkanalfüllung im Rahmen einer einzeitigen Wurzelkanalbehandlung. Die Nachweisgrenze für die planktonischen Bakterien lag bei 500 KBE/ml. Konzentrationen kleiner als 500 KBE/ml konnten nicht erfasst werden. Die Probenentnahme zum Zeitpunkt T2 diente der Kontrolle der Ergebnisse zum Zeitpunkt

T1. Waren direkt nach der Therapie keine Mikroorganismen nachweisbar, so war der Wurzelkanal entweder a) frei von Bakterien oder b) die Konzentration dieser befand sich unterhalb der Nachweisgrenze. Die Bebrütung der Wurzelkanäle für weitere fünf Tage unter täglicher Zugabe von sterilem Nährmedium erlaubte Bakterien, deren Konzentration direkt nach der Therapie unterhalb der Nachweisgrenze lag, sich erneut zu vermehren. Durch die Identifikation von Mikroorganismen zum Zeitpunkt T2 in Kombination mit einem fehlenden Nachweis von Bakterien zum Zeitpunkt T1 hätte eine Interpretation der Ergebnisse im Sinne von b) nahegelegt. Da es in der Gruppe T2 ebenfalls eine Nachweisgrenze von 500 KBE/ml gab, konnte auch bei ausbleibendem Zellwachstum auf dem Nährboden nicht sicher auf eine Sterilität des Wurzelkanals geschlossen werden, diese jedoch als sehr wahrscheinlich angenommen werden. Die Gruppe T2 diente nicht der Simulation einer klinisch zweizeitig durchgeführten Wurzelkanalbehandlung. Es erfolgte keine medikamentöse Einlage und der Wurzelkanalzugang wurde während der fünftägigen Bebrütung nicht verschlossen. Darüber hinaus erfolgte bewusst eine tägliche Zugabe von Nährmedium in den Kanal. Medikamentöse Einlagen wie Kalziumhydroxidpasten oder andere temporär eingebrachte Desinfektiva zielen auf eine weitere Reduktion der Mikroorganismen im Kanal und wären für die konkrete Fragestellung an die Gruppe T2, Bestätigung oder Entkräftung der Ergebnisse zum Zeitpunkt T1, kontraproduktiv gewesen [158]. Hinsichtlich der Frage, ob Proben, in denen zum Zeitpunkt T1 keine Bakterien nachgewiesen werden konnten, auch nach fünf Tagen erneuter Bebrütung kein Zellwachstum aufweisen, wäre ein Versuchsaufbau, der die Probenentnahme nach der Therapie zu den Zeitpunkten T1 und T2 aus demselben Wurzelkanal vorsieht, aussagekräftiger gewesen. Dieses Vorgehen wurde jedoch nicht umgesetzt, da die Entnahme von Dentinproben zur Zerstörung des Biofilmes geführt und die Ergebnisse zum Zeitpunkt T2 verfälscht hätte. In der statistischen Auswertung wurde folglich kein Vergleich der Bakterienkonzentrationen im Wurzelkanallumen beziehungsweise im Dentin zu den verschiedenen Zeitpunkten angestrebt.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Bakterielle Besiedelung des Wurzelkanals vor der Therapie

Nach vier Tagen anaerober Bebrütung bei 37 °C hatte sich im Wurzelkanal das anteilige Verhältnis der drei Spezies zueinander im Vergleich zur Ausgangssituation

geändert. Während die Spezies *P. intermedia* (43 %) und *E. faecalis* (38 %) nährungsweise je zwei Fünftel der Gesamtpopulation im Kanallumen ausmachten, war der Anteil der Spezies *S. oralis* mit 19 % auf circa ein Fünftel gesunken. Dies war aufgrund der Interaktion der drei Spezies miteinander, die Konkurrenz um Nährstoffe und die unterschiedliche Adaptationsfähigkeit der einzelnen Spezies an das Habitat zu erwarten und verdeutlichte den im Wurzelkanal herrschenden Selektionsdruck auf die verschiedenen Spezies [27, 37].

Die Startkonzentration der Multispeziessuspension von $7,5 \times 10^8$ KBE/ml hatte sich während der viertägigen Inkubation geringfügig erhöht. Zu Beginn der experimentellen Versuche betrug die mediane Bakterienkonzentration im Wurzelkanallumen $4,5 \times 10^9$ KBE/ml (Interquartilsabstand (IQR) $1,2 - 9,8 \times 10^9$ KBE/ml; T1) beziehungsweise $5,2 \times 10^9$ KBE/ml (IQR $2,4 - 10,5 \times 10^9$ KBE/ml; T2). Dies entsprach etwa $78,3 \times 10^6$ (T1) respektive $90,5 \times 10^6$ (T2) Bakterienzellen pro Kanal bei einer Aufbereitungsgröße von ISO 02/40. In klinischen Untersuchungen fand man heraus, dass hinsichtlich der initialen Bakterienkonzentration im Wurzelkanal signifikante Unterschiede zwischen Primär- und Sekundärinfektionen auftreten [132]. Revisionsbedürftige Zähne sind häufig weniger stark von Mikroorganismen besiedelt als Zähne mit nekrotischer Pulpa und apikaler Läsion. In endodontisch vorbehandelten Zähnen wurden nach Entfernung des Wurzelfüllmaterials Bakterienkonzentrationen zwischen $5,14 \times 10^3$ KBE/ml und 1×10^5 KBE/ml nachgewiesen [159, 160]. Primärinfektionen zeigten wiederholt Bakterienkonzentrationen in der Größenordnung zwischen 10^5 und 10^7 KBE/ml [132, 161, 162]. Baumotte *et al.* [163] fanden in jugendlichen Zähnen mit ausschließlich einem Wurzelkanal und apikaler Parodontitis eine mittlere Bakteriendichte von $5,7 \times 10^6$ KBE/ml. Die in der vorliegenden Studie erzeugte planktonische Bakterienkonzentration ist deutlich höher als die *in vivo* nachgewiesenen Konzentrationen. Ebenso verhält es sich mit der in dieser Studie erzeugten Konzentration für die dentinadhärenten Bakterien. Die mediane Bakterienkonzentration der dentinadhärenten Mikroorganismen betrug zu Beginn der Versuche 94×10^6 KBE/ml (IQR $58,5 - 103 \times 10^6$ KBE/ml) und ist deutlich höher als die *in vivo* von Peters *et al.* [67] ermittelte bakterielle Besiedlung des Dentins. Jedoch ist der angegebene Grad der Infektion der Dentintubuli durch Mikroorganismen von Studie zu Studie sehr variabel. Dafür sind mehrere Faktoren verantwortlich. Einen entscheidenden Einfluss auf die Penetrationstiefe einzelner Mikroorganismen in das Dentin haben der Innendurchmesser der Tubuli und damit im Zusammenhang stehend

die Morphologie und die Physiologie der Bakterienzellen. Allgemein nimmt der Innendurchmesser der Dentinkanälchen vom Wurzelkanal bis zur äußeren Wurzeloberfläche ab. Hinzu kommt, dass mit zunehmendem Alter des Patienten ausgehend von der Pulpakammer eine vermehrte Mineralisation der Dentinmatrix beobachtet wird, wodurch die Tubuli enger werden. Dies kann bis zur vollständigen Obliteration der Tubuli fortschreiten [164]. Durch die Aufbereitung der Wurzelkanäle im Vorfeld der Versuche wurde in der vorliegenden Studie ein vergleichsweise weites Wurzelkanallumen geschaffen. Zusätzlich wurden durch Behandlung des Kanals mit EDTA 18 % eventuell verlegte Dentintubuli eröffnet, sodass eine Kanalwandoberfläche geschaffen wurde, wie sie klinisch in jugendlichen Zähnen zu erwarten ist. Ein weites Wurzelkanallumen bedingt eine bessere Erreichbarkeit der Bakterien durch Nährstoffe bis in das apikale Wurzel Drittel und eine vergrößerte Kanalwandoberfläche. Diese schafft durch eine hohe Dichte an offenen Dentintubuli optimale Bedingungen für eine intensive Besiedelung des Dentins durch die ausgewählten Spezies.

Chivatxaranukul *et al.* [46] untersuchten die Eindringtiefe in die Dentintubuli durch *E. faecalis in vitro*. Unter anderem prüften sie, welchen Einfluss verschiedene Nährmedien, die Art des Sterilisationsverfahrens und der Grad der Probenpräparation dabei ausübten. Die Entfernung der Schmierschicht, die bei der chemomechanischen Aufbereitung des Wurzelkanals entsteht, scheint ein wesentlicher Schritt in der Probenvorbereitung zu sein. Sie bedingt eine deutlich erhöhte Penetrationstiefe und vermehrte Zellzahl in den Tubuli. Unter diesen Voraussetzungen wurde eine mittlere Eindringtiefe von 156 µm durch die Spezies *E. faecalis* erreicht. Darüber hinaus wurde bestätigt, dass sich pulpenah deutlich mehr Mikroorganismen ansiedelten als in peripheren Dentinschichten. Ein weiterer diskutierter Aspekt, der *in vivo* die Penetrationstiefe von Mikroorganismen in die Tubuli limitiert, ist die durch das Dentinfluid vermittelte Wirtsabwehr [164]. Die verhältnismäßig hohe Konzentration an dentinadhärenten Bakterien in der vorliegenden In-vitro-Studie entspricht nicht der allgemein anzutreffenden klinischen Situation, stellte jedoch einen guten Ausgangspunkt für die Untersuchung der Wirkung der einzelnen Therapien auf den Biofilm dar.

6.2.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die Durchführung und Auswertung der *FISH* erfolgte durch das zahnmedizinische Institut der Universität Aarhus, Dänemark. Durch die freundliche Genehmigung von Dr. S. Schlafer und I. Dige konnten die gewonnenen Ergebnisse zum Nachweis der Etablierung des Biofilmes in den exemplarisch untersuchten Wurzelkanälen herangezogen werden.

Bakterienzellen aller drei Spezies zeigten sich dicht gepackt entlang der Kanalwand. Dünne Zelllagen bedeckten die koronale sowie die apikale Dentinoberfläche. In einigen Abschnitten konnten Bakterienzellen der Spezies *E. faecalis* und *S. oralis* innerhalb der Tubuli sichtbar gemacht werden. Die Ausbildung eines Biofilmes mit partieller Invasion der Tubuli durch zwei der drei Spezies galt somit als bestätigt.

6.2.3 Korrelation der planktonischen und dentinadhärenten Bakterienkonzentrationen

Der gewählte Versuchsaufbau imitiert die klinische Situation eines jugendlichen Zahnes mit nekrotischer Pulpa. Darüber hinaus verfügt das Modell über ätiologische Aspekte der persistierenden Infektion bei unzureichend gefülltem Wurzelkanal. In beiden Fällen kolonisieren Mikroorganismen der Mundhöhlenflora den Wurzelkanal indem sie adhärente Zellgemeinschaften in Form eines Biofilmes entlang des Dentins ausbilden. Gleichzeitig existiert im Lumen des Kanals eine planktonische Phase, in der sich verschiedene Spezies frei bewegen. Die Ausbildung eines Biofilmes ist ein dynamischer Prozess, bei dem es fortwährend zur Anlagerung von Mikroorganismen kommt und sich gleichzeitig Bakterien aus der Zellgemeinschaft lösen [27].

In dieser Studie wurden in jeder Probe sowohl die planktonischen als auch die dentinadhärenten Bakterienkonzentration im Anschluss an die Therapie bestimmt. Die Zuordnung der ermittelten Konzentration zu einer von drei Kategorien, ermöglichte den Vergleich der Bakteriendichte im Wurzelkanallumen mit der Bakterienkonzentration an der Kanalwand. Die Kategorie 1 entsprach jeweils der halben Nachweisgrenze. In Proben, die dieser Kategorie zugeordnet wurden, konnte im Anschluss an die Therapie kein Bakterienwachstum mehr nachgewiesen werden. Bakterienkonzentrationen größer als 100.000 KBE/ml wurden der Kategorie 3 zugeordnet und waren mit einer unzureichenden Desinfektion des Kanalsystems gleichzusetzen. Zähne die nach der Therapie weiterhin bakterielles Wachstum bis zu einer Konzentration von bis zu

100.000 KBE/ml aufwiesen, wurden der Kategorie 2 zugeordnet. Bakterienkonzentrationen bis zu 100.000 KBE/ml entsprechen im Vergleich zu den Ausgangskonzentrationen einer Reduktion von mehr als 99,9 %. Dies kann als wirksam bakterizider Effekt der jeweiligen Therapie interpretiert werden, auch wenn in diesen Fällen keine vollständige Bakterienfreiheit in der Probe erreicht wurde. Der Vergleich der planktonischen und dentinadhärenten Bakterienkonzentrationen ergab ein hohes Maß an Übereinstimmung der kategorialen Ergebnisse. Zum Zeitpunkt T1 waren in zwanzig von 24 Fällen, in denen im Wurzelkanallumen die Bakterienkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze lag, auch die Dentinproben negativ für bakterielles Wachstum. Insgesamt zeigten zum Zeitpunkt T1 64 von 80 Wurzelkanälen eine Übereinstimmung der kategorialen Ergebnisse für die planktonische Bakterienkonzentration und der Bakterienkonzentration im Dentin (Kappa-Koeffizient = 0,68). Zum Zeitpunkt T2 war die Anzahl der Übereinstimmungen mit 74 von 80 Wurzelkanälen deutlich größer (Kappa-Koeffizient = 0,72). Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass in drei von vier Hauptgruppen, dies entspricht insgesamt 60 Proben, weiterhin eine massive bakterielle Besiedlung des Kanalsystems entsprechend der Kategorie 3 vorlag. Ausschließlich in Wurzelkanälen, die eine Behandlung mit NaOCl 1 % und CHX 2 % erhielten, konnte eine desinfizierende Wirkung der chemomechanischen Aufbereitung auch in den gewonnenen Dentinproben nachgewiesen werden. In dieser Gruppe gab es insgesamt vierzehn Übereinstimmungen der kategorialen Ergebnisse, wovon drei der Kategorie 1 und vier der Kategorie 2 entsprachen. Die übrigen sieben Proben waren der Kategorie 3 zuzuordnen. Die hohe Anzahl an Übereinstimmungen in Verbindung mit den jeweiligen Kappa-Koeffizienten zu den Zeitpunkten T1 und T2 lässt einen möglichen Zusammenhang zwischen der planktonischen und der dentinadhärenten Bakterienkonzentration vermuten.

6.2.4 Therapieergebnisse

Die HG 1 ohne Aufbereitung diente als Kontrollgruppe. In dieser Gruppe bewirkten bereits die einmalige Spülung mit 2 ml NaCl 0,9 % und das sich anschließende Trocknen des Kanals mit Papierspitzen eine Reduktion der planktonischen Bakterienkonzentration um eine \log_{10} -Stufe. Zum Zeitpunkt T1 bedeutete das eine Reduktion der Ausgangskonzentration um 98 %, zum Zeitpunkt T2 entsprach dies

immer noch einer Reduktion um 81 %. Durch die mechanische Aufbereitung des Wurzelkanals unter Spülung mit NaCl 0,9 % wurde direkt im Anschluss an die Therapie eine im Vergleich zu HG 1 gesteigerte Bakterienreduktion erzielt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in anderen Studien war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant. Die Aufbereitung des Kanals ohne desinfizierende Lösungen spiegelt das Vermögen der mechanischen Reinigung zur Bakterienreduktion wieder. In mehreren Studien wurde durch entsprechende Aufbereitungsprotokolle eine signifikante Verringerung der bakteriellen Besiedlung des Kanals hervorgerufen [92, 165-167]. Nach erneuter fünftägiger Bebrütung der Wurzelkanäle im Anschluss an die ausschließlich mechanische Aufbereitung war in der aktuellen Untersuchung kein Unterschied mehr in der Bakterienreduktion gegenüber der Kontrollgruppe erkennbar. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen bereits Dametto *et al.* [168]. Sieben Tage nach erfolgter Aufbereitung unter Spülung mit destilliertem Wasser waren die Bakterienkonzentrationen im Wurzelkanal höher als zu Beginn der Therapie. Eine rein mechanische Aufbereitung verringert die Zahl der lebensfähigen Mikroorganismen im Kanal weder ausreichend noch nachhaltig.

Einen signifikanten Einfluss auf die Bakterienkonzentration hatte die Aufbereitung unter Spülung mit NaOCl 1 % beziehungsweise NaOCl 1 % und CHX 2 %. Direkt nach der Behandlung zeigten Wurzelkanäle dieser Gruppen eine Reduktion der Mikroorganismen um 6 log₁₀-Stufen. Dies stellt eine vergleichsweise hohe Reduktion dar, die auch in anderen Studien erreicht wurde. Oliveira *et al.* [167] erzielten durch die Spülung des Kanalsystems mit CHX 2 % oder NaOCl in unterschiedlichen Konzentrationen ebenfalls eine nahezu vollständige Elimination der Mikroorganismen. In einer *ex-vivo*-Studie von Paiva *et al.* [117] mit frisch extrahierten Zähnen konnte durch die Behandlung des Wurzelkanals mit NaOCl 2,5 % und EDTA 17 % eine Reduktion der Bakterien um 98,8 % erreicht werden. Eine zusätzliche Spülung mit CHX 2 % reduzierte die verbleibenden Bakterien um weitere 70,1 %, jedoch wurde für die Wirkung des CHX das Signifikanzniveau nicht erreicht.

In der vorliegenden Studie ergab sich direkt im Anschluss an die Therapie keine signifikante Wirkung der PDT in den Gruppen, in denen mit NaOCl 1 % beziehungsweise NaOCl 1 % und CHX 2 % gespült wurde. Interessanterweise war zu diesem Zeitpunkt der Probenentnahme sowohl in der Kontrollgruppe ohne chemomechanische Aufbereitung als auch in der Gruppe, in der intermittierend mit NaCl 0,9 % gespült wurde, ein signifikanter Einfluss der PDT erkennbar. In beiden

Gruppen erhöhte sich die Bakterienreduktion jedoch nur geringfügig um eine \log_{10} -Stufe. Bei alleiniger Anwendung der PDT (G 1.2) erhöhte sich der LRF von $1,0 \pm 1,2$ (Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD); G 1.1) auf einen LRF von $2,2 \pm 1,4$ (MW \pm SD; G 1.2). Wurde der Kanal zuvor unter Spülung mit NaCl 0,9 % aufbereitet, steigerte die adjuvante PDT den LRF von $2,3 \pm 1,0$ (MW \pm SD; G 2.1) auf $3,2 \pm 1,4$ (MW \pm SD; G 2.2).

Souza *et al.* [169] untersuchten die desinfizierende Wirkung unterschiedlicher Aufbereitungsprotokolle mit oder ohne zusätzliche PDT auf einen *E. faecalis*-Biofilm und bestätigen mit ihren Beobachtungen die Ergebnisse der vorliegenden Studie: Die Aufbereitung des Wurzelkanals unter Spülung mit NaOCl hatte einen signifikant höheren bakteriziden Effekt als die Aufbereitung mit Kochsalzlösung. Weiterhin zeigte sich, dass die adjuvante PDT in Kombination mit desinfizierenden Spüllösungen keine zusätzliche Bakterienreduktion auf signifikantem Niveau erzielte. Es zeigte sich jedoch ein signifikanter Einfluss der PDT, wenn der Wurzelkanal mit nicht desinfizierend wirksamen NaCl 0,9 % behandelt wurde. Der ermittelte LRF von 0,76 in dieser Gruppe war ähnlich gering wie der in der vorliegenden Studie. In einer anderen Untersuchung von Bergmans *et al.* [170] wurde die Wirkung der PDT auf Monospeziesbiofilme untersucht. Auf eine chemomechanische Erweiterung des Kanalsystems wurde verzichtet. In Abhängigkeit von der jeweiligen Spezies wurden Reduktionen mit einem LRF von 0,9 bis 1,9 erzielt. *E. faecalis* zeigte sich in besagter Studie als die widerstandsfähigste Spezies. Es wurde für diese eine Reduktion von 88,4 % durch die alleinige Anwendung der PDT erreicht.

In der vorliegenden Untersuchung entsprach die Konzentration der planktonischen Bakterien zum Zeitpunkt T1 in der Gruppe mit 1%iger Natriumhypochloritspülung (G 3.1) einer Reduktion um 100 %. Methodisch bedingt ergibt sich eine Endkonzentration von 750 KBE/ml (siehe Tab. XI). Bei fehlendem Wachstum einer Spezies auf dem Nährboden wurde anstelle des Wertes „0“ für die jeweilige Spezies eine Konzentration von 250 KBE/ml, entsprechend der halben Nachweisgrenze, für die statistische Auswertung herangezogen. Fand im Anschluss an die Therapie kein Zellwachstum auf dem Nährboden statt, ergab dies eine Gesamtkonzentration von 750 KBE/ml gemäß der Summe aus den drei Spezies. Da für den Zeitpunkt T1 kein signifikanter Einfluss der Nebengruppe auf die Bakterienreduktion ermittelt werden konnte, wäre bei tatsächlicher Bakterienfreiheit im Kanallumen in der G 3.2 ebenfalls

eine planktonische Konzentration von 750 KBE/ml zu erwarten gewesen. Die G 3.2 zeigte nach der Therapie im Median eine Konzentration von 1400 KBE/ml (siehe Tab. XI). Theoretisch ist eine Kontamination durch die Arbeitsabläufe während der Durchführung der PDT denkbar. Diese Möglichkeit wurde jedoch weitestgehend ausgeschlossen, da nur steril verpackte Einmalapplikatoren für den Photosensitizer und jeweils ein steril verpackter Lichtleiter zum Einmalgebrauch verwandt wurden. Weiterhin waren ausschließlich die drei in der Studie eingesetzten Spezies auf den Universalnährböden nachweisbar, so dass eine externe Verunreinigung als sehr unwahrscheinlich anzusehen ist. Darüber hinaus sollten im Falle einer Eradikation keine dentinadhärenten Bakterien mehr in den G 3.1 und G 3.2 auftreten. Sowohl in der Gruppe mit adjuvanter PDT als auch in der Gruppe ohne PDT waren im Anschluss der Therapie in insgesamt fünf Zähnen noch Bakterien an der Kanalwand in Konzentrationen von 50 - 100.000 KBE/ml nachweisbar. Es lässt sich festhalten, dass in der vorliegenden Arbeit die Aufbereitung unter Spülung mit NaOCl 1 % die höchste Bakterienreduktion erzielte (LRF $6,7 \pm 0,7$), jedoch keine vollständige Elimination der Mikroorganismen im Kanal eintrat. Ferner erscheinen planktonische Mikroorganismen sensibler auf die Behandlung mit NaOCl zu reagieren als solche im Biofilm. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen früherer Studien [171].

In einigen Untersuchungen konnte eine zusätzliche Behandlung des Wurzelkanals mit CHX nach erfolgter Aufbereitung unter Spülung mit NaOCl unter bestimmten Voraussetzungen die Bakterienreduktion steigern. Dies traf insbesondere dann zu, wenn *E. faecalis* an der Infektion beteiligt war [116, 117]. Andere Studien konnten diesen Effekt nicht bestätigen [117]. In der Literatur wird dem CHX ein höheres bakterizides Potential gegenüber *E. faecalis* zugesprochen als niedrig konzentriertem NaOCl [107, 167, 172]. Gomes *et al.* [106] brachten Suspensionen der Spezies *E. faecalis* in direkten Kontakt mit CHX beziehungsweise NaOCl und zeigten, dass eine 2%ige Chlorhexidindigluconatlösung weniger als 30 Sekunden benötigte, um das Bakterienwachstum vollständig zu hemmen. Eine 1%ige Natriumhypochloritlösung benötigte für das gleiche Ergebnis zwanzig Minuten. Die Kombination der beiden Substanzen ermöglicht die Reduktion der Natriumhypochloritkonzentration zum Schutz des periapikalen Gewebes bei gleichzeitig hoher antibakterieller Wirkung gegenüber *E. faecalis*.

In der vorliegenden Studie ergab sich direkt im Anschluss an die Therapie kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit alleiniger

Natriumhypochloritspülung und Spülung mit NaOCl 1 % in Kombination mit CHX 2 %. Die Bakterienreduktion war ungeachtet der Nebengruppen in beiden Hauptgruppen gleich groß und betrug im Median 6 log₁₀-Stufen. Wurden die Zähne nach der Therapie für weitere fünf Tage inkubiert, stellte sich in der Gruppe, in der während der Aufbereitung ausschließlich mit NaOCl 1 % gespült wurde, ein stark zunehmendes Bakterienwachstum ein. Die Konzentration planktonischer Zellen stieg teilweise über die der Ausgangskonzentration an. Ähnliche Beobachtungen machten auch Oliveira *et al.* [167]. Direkt im Anschluss der Wurzelkanalaufbereitung mit verschiedenen Desinfektiva konnten sie keinen Unterschied zwischen CHX-Gel 2 %, NaOCl 1,5 % und NaOCl 5,25 % nachweisen. Nach erneuter Inkubation der behandelten Wurzelkanäle für weitere sieben Tage war das niedrigkonzentrierte NaOCl sowohl der hochkonzentrierten Natriumhypochloritlösung als auch dem CHX-Gel deutlich unterlegen. Es fand analog zu den Ergebnissen der aktuellen Studie in der Gruppe mit NaOCl 1,5 % ein erneut starkes Bakterienwachstum statt und die Konzentration von *E. faecalis* unterschied sich nicht mehr von der in der Kontrollgruppe. In zwei weiteren Studien konnte selbst durch hochkonzentriertes NaOCl keine anhaltende Bakterienreduktion über sieben Tage aufrecht erhalten werden [168, 173]. Die Anwendung von CHX bewirkte im Gegensatz dazu eine nachhaltige Eradikation im Wurzelkanal [168]. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangt die vorliegende Studie. Die kombinierte Spülung des Kanals mit NaOCl 1 % und CHX 2 % erzielte auch über den Zeitraum von fünf Tagen, in denen täglich steriles Nährmedium in den Kanal appliziert wurde, eine signifikant höhere Bakterienreduktion als die Behandlungsprotokolle aller übrigen Hauptgruppen. Ohne adjuvante PDT wurde in dieser Hauptgruppe ein LRF von 2,4 (MW) erreicht. Das entsprach einer Reduktion der Ausgangskonzentration um 99,54 %. Diese Beobachtung lässt sich mit der für CHX bereits in anderen Studien nachgewiesenen Substantivität erklären [99, 100]. Darüber hinaus zeigte sich ein signifikant gesteigerter bakterizider Effekt durch die adjuvante PDT in dieser Gruppe. Erfolgte zusätzlich eine photodynamische Behandlung, konnte die zum Zeitpunkt T1 erreichte Reduktion der Bakterien um 6 log₁₀-Stufen auch über fünf Tage aufrecht erhalten werden. Dies ist ein Aspekt, der bisher in dieser Form noch nicht diskutiert wurde. Auffällig ist der deutlich kleinere LRF bei ausbleibender PDT. Ohne adjuvante PDT sank der LRF von 6,4 (MW) zum Zeitpunkt T1 auf 2,4 (MW) nach fünf Tagen erneuter Inkubation. Nach Anwendung der PDT blieb die Größenordnung der Bakterienreduktion zwischen den Zeitpunkten T1 und T2 näherungsweise konstant (T1

LRF = 6,1 (MW); T2 LRF = 5,5 (MW)). Es ist zu klären, ob und in welcher Weise die Wirkung des CHX und der ausgedehnte bakterizide Effekt der PDT miteinander in Zusammenhang stehen. Eine grundsätzlich prolongierte Wirkung der PDT wird ausgeschlossen, da diese auch in den anderen Hauptgruppen erkennbar gewesen wäre.

Denkbar wäre, dass die gesteigerte Permeabilität der Zellwand, wie sie durch die Behandlung mit CHX hervorgerufen wird [94], zusätzlich durch die Schädigung membranständiger Transportsysteme und Enzyme, die von der PDT ausgeht [118], erhöht wird und dadurch ein stärkerer bakterizider Effekt des CHX eintritt. Letztlich kann der zugrundeliegende Mechanismus mit den in dieser Studie erhobenen Daten nicht endgültig geklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

6.2.5 Die PDT in der Endodontie - die aktuellen Ergebnisse im klinischen Kontext

Es lassen sich nur aus wenigen Untersuchungen Empfehlungen für ein konkretes Protokoll für den adjuvanten Einsatz der PDT im Rahmen der Wurzelkanalbehandlung ableiten [174]. Die Anzahl klinischer Studien zum Einsatz der PDT ist weitaus geringer als die der In-vitro-Untersuchungen. Dennoch sprechen auch in diesen die Ergebnisse mehrheitlich für einen zusätzlichen antibakteriellen Effekt [129, 130]. Juric *et al.* [160] konnten klinisch eine signifikante Steigerung der Bakterienreduktion durch die zusätzliche Anwendung des photodynamischen Desinfektionssystems der Firma Helbo nachweisen. Hierfür untersuchten sie 21 einwurzelige Zähne mit insuffizienter endodontischer Behandlung in der Vergangenheit. Der Nachweis für bakterielles Wachstum im Wurzelkanal wurde anhand von entnommenen Flüssigkeitsproben erbracht. Diese wurden jeweils auf unterschiedlichen selektiven und nicht selektiven Blutagarplatten bebrütet. Zusätzlich wurden die KBE makro- sowie mikroskopisch betrachtet und mit dem API eine biochemische Identifikation der Spezies vorgenommen. Nach Entfernen der alten Wurzelfüllung wurden die Kanäle zunächst konventionell mit NaOCl 2,5 % und EDTA 17 % aufbereitet. Dies führte bereits zu einer signifikant geringeren Bakterienkonzentration. Ein Zahn zeigte nach der chemomechanischen Aufbereitung kein Bakterienwachstum mehr. Die adjuvante PDT steigerte die Zahl der bakterienfreien Wurzelkanäle signifikant. In zehn weiteren Zähnen konnten anschließend keine Mikroorganismen mehr nachgewiesen werden. Die zusätzlich bakterizide Wirkung durch die PDT betraf unter den nachgewiesenen

Spezies gramnegative ebenso wie grampositive und wirkte gleichermaßen auf die obligat anaerob als auch die fakultativ anaerob lebenden Mikroorganismen. Weiterhin bewirkte die PDT eine statistisch höhere Eradikation der Spezies *E. faecalis* im Vergleich zur alleinigen chemomechanischen Aufbereitung.

Es liegen bisher keine Langzeituntersuchungen vor, die das Therapieergebnis der PDT nach ein, zwei oder drei Jahren beurteilen. In der aktuellen In-vitro-Studie bestand in einigen Proben der HG 3 beziehungsweise HG 4 der begründete Verdacht, dass die endodontische Therapie eine vollständige Bakterienfreiheit im Kanal erzielt habe. Es konnten im Anschluss an die Therapie keine KBE auf den Nährböden nachgewiesen werden. Die Anzucht der Mikroorganismen auf Nährböden zum Nachweis der bakteriellen Besiedelung des Wurzelkanals ist ein anerkanntes und seit langem etabliertes Verfahren. Jedoch schließt es nicht sicher aus, dass bei initial ausbleibendem Wachstum im Anschluss an die Therapie möglicherweise lebensfähige Bakterien im Kanalsystem verblieben sind. Die zusätzlich durchgeführte Ermittlung der dentinadhärenten Mikroorganismen parallel zur Bestimmung der planktonischen Zellen diente der Validierung der Untersuchung der Effektivität der angewendeten Therapiemethoden zur Behandlung eines endodontischen Multispeziesbiofilms. Dennoch verblieb eine geringe Wahrscheinlichkeit für eine residuale Besiedelung. Die Dentintubuli, akzessorische Kanäle und von der Aufbereitung nicht erfasste Isthmen stellen mögliche Bakterienreservoirs dar. Die Fähigkeit einiger Spezies, in unserem Falle des *E. faecalis*, über einen langen Zeitraum auch bei ausbleibender Nährstoffzufuhr in der sogenannten stationären Phase (Nicht-Wachstums-Phase) überleben zu können stellt *in vivo* ebenfalls ein Risiko für eine spätere Reinfektion dar [175].

7 Schlussfolgerung

Die chemomechanische Aufbereitung, bestehend aus mechanischer Erweiterung des Wurzelkanals und intermittierender Spülung mit desinfizierenden Lösungen, bewirkte direkt im Anschluss an die Therapie bereits eine nahezu vollständige Bakterienreduktion auf Signifikanzniveau. Diese konnte jedoch nicht über einen Zeitraum von fünf Tagen aufrecht erhalten werden. Zum Zeitpunkt T1 konnte keine gesteigerte Bakterienreduktion durch die zusätzliche Spülung des Kanalsystems mit CHX 2 % erzielt werden. Darüber hinaus zeigte zu diesem Zeitpunkt auch die adjuvante PDT keinen signifikanten Einfluss auf das Therapieergebnis in den betreffenden Gruppen. Betrachtet man diese Ergebnisse im klinischen Kontext, so lässt sich mutmaßen, dass bei einer einzeitigen endodontischen Behandlung bereits die Spülung mit NaOCl 1 % während der Aufbereitung ausreichend ist, um ein suffizientes Ergebnis mit langfristig guter Prognose zu erzielen. Vorausgesetzt der Kanal wird mit einer wandständigen, homogenen Wurzelfüllung bis zum Apex und mit einem speicheldichten Verschluss der Zugangskavität versehen.

Nach erneuter fünftägiger Inkubation der behandelten Wurzelkanäle wurde für die Gruppe, in der zusätzlich zum NaOCl 1 % mit CHX 2 % gespült wurde, eine signifikant höhere Bakterienreduktion gegenüber der Kontrollgruppe ohne Aufbereitung nachgewiesen. Diese Beobachtung ist auf eine anhaltend antibakterielle Wirkung des CHX über den Applikationszeitraum hinaus zurückzuführen. Durch die adjuvante PDT konnte in dieser Hauptgruppe eine signifikant gesteigerte Bakterienreduktion erzielt werden. Inwiefern dieses Therapieergebnis reproduzierbar ist und ob ein kausaler Zusammenhang zwischen der chemomechanischen Aufbereitung mit NaOCl 1 % und CHX 2 % mit anschließender PDT besteht, sollte in zukünftigen Untersuchungen geprüft werden.

Eine allgemein gesteigerte Bakterienreduktion durch die zusätzliche Anwendung der PDT konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen, zu denen die Mehrzahl der zu diesem Thema veröffentlichten Arbeiten gelangt ist. Eine mögliche Erklärung hierfür können die in der aktuellen Studie gewählten Versuchsparameter sein. Ein gerader, weiter Wurzelkanal entspricht einer vergleichsweise unkomplizierten klinischen Situation. Konventionelle Therapiemaßnahmen wie die chemomechanische Aufbereitung des infizierten Wurzelkanals mit Spüllösungen wie NaOCl und CHX erzielen in solchen Fällen bereits

eine weitest gehende Desinfektion des Kanalsystems. Diese kann dann durch die adjuvante PDT nicht mehr deutlich gesteigert werden.

Hinsichtlich der Wirkung der untersuchten Therapiemaßnahmen auf einen Multispeziesbiofilm im Vergleich zu planktonisch lebenden Mikroorganismen wurden die planktonischen Bakterienkonzentrationen durch die Behandlungsmaßnahmen stärker beeinflusst als die der dentinadhärenten Mikroorganismen. *E. faecalis* zeigte sich in dieser Untersuchung als resistanteste Spezies. Die bakterizide Wirkung der endodontischen Behandlung unabhängig vom angewandten Therapieprotokoll auf diese Spezies fiel im Vergleich zu den anderen beiden Spezies, *S. oralis* und *P. intermedia*, deutlich geringer aus.

Aus den gewonnenen Ergebnissen dieser Studie kann geschlussfolgert werden, dass die PDT keine Alternative zur konventionellen endodontischen Behandlung darstellt, jedoch unter bestimmten Voraussetzungen als ergänzende Therapiemaßnahme die Bakterienreduktion steigern kann.

8 Literaturverzeichnis

1. Siqueira JF, Jr., Araujo MC, Garcia PF, Fraga RC, Dantas CJ. Histological evaluation of the effectiveness of five instrumentation techniques for cleaning the apical third of root canals. *J Endod.* 1997 Aug;23(8):499-502. PubMed PMID: 9587319.
2. Paque F, Balmer M, Attin T, Peters OA. Preparation of oval-shaped root canals in mandibular molars using nickel-titanium rotary instruments: a micro-computed tomography study. *J Endod.* 2010 Apr;36(4):703-7. PubMed PMID: 20307747.
3. Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 2004 Apr;19(2):71-6. PubMed PMID: 14871344.
4. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *Journal of dental research.* 2009 Nov;88(11):969-81. PubMed PMID: 19828883.
5. Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa EL, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. *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 Aug;102(2):247-53. PubMed PMID: 16876070.
6. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003 Jan;36(1):1-11. PubMed PMID: 12656508.
7. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2--Redefining the endodontic microbiota. *J Endod.* 2005 Jul;31(7):488-98. PubMed PMID: 15980706.
8. Rödiger T. Antimikrobielle Wirksamkeit der photodynamischen Desinfektion in der Endodontie. *Quintessenz Endodontie.* 2009;18(4):401-10.
9. Hellwig E, Klimek J, Attin T. Einführung in die Zahnerhaltung. 5. Auflage. Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag; 2009.
10. Seltzer S, Bender IB, Ziontz M. The dynamics of pulp inflammation: correlations between diagnostic data and actual histologic findings in the pulp. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology.* 1963 Jul;16:846-71 contd. PubMed PMID: 13987830.
11. Heyeraas KJ, Sveen OB, Mjor IA. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 3: Pulpal inflammation and its sequelae. *Quintessence international.* 2001 Sep;32(8):611-25. PubMed PMID: 11526889.
12. Levin LG, Law AS, Holland GR, Abbott PV, Roda RS. Identify and define all diagnostic terms for pulpal health and disease states. *J Endod.* 2009 Dec;35(12):1645-57. PubMed PMID: 19932339.
13. Ricucci D, Loghin S, Siqueira JF, Jr. Correlation between clinical and histologic pulp diagnoses. *J Endod.* 2014 Dec;40(12):1932-9. PubMed PMID: 25312886.
14. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology.* 1965 Sep;20:340-9. PubMed PMID: 14342926.
15. Nair SP, Meghji S, Wilson M, Reddi K, White P, Henderson B. Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infection and immunity.* 1996 Jul;64(7):2371-80. PubMed PMID: 8698454. Pubmed Central PMCID: 174085.
16. Ko HJ, Lim SS. Production of macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta by human polymorphonuclear neutrophils stimulated with *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. *J Endod.* 2002 Nov;28(11):754-7. PubMed PMID: 12470018.
17. Shinoda S, Murayama Y, Okada H. Immunopathological role of pulpal tissue components in periapical pathosis. I. Detection of "new" antigens in modified dog pulpal extracts. *J Endod.* 1986 Sep;12(9):388-95. PubMed PMID: 2428895.
18. Ramachandran Nair PN, Pajarola G, Schroeder HE. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996 Jan;81(1):93-102. PubMed PMID: 8850492.

19. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology* 2000. 2006;42:80-7. PubMed PMID: 16930307.
20. Siqueira JF, Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002 Sep;94(3):281-93. PubMed PMID: 12324780.
21. Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *Journal of dental research.* 2002 Nov;81(11):761-6. PubMed PMID: 12407091.
22. Siqueira JF, Jr., Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 May;97(5):632-41. PubMed PMID: 15153878.
23. Chavez de Paz L, Svensater G, Dahlen G, Bergenholtz G. Streptococci from root canals in teeth with apical periodontitis receiving endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005 Aug;100(2):232-41. PubMed PMID: 16037782.
24. Haapasalo M, Ranta H, Ranta K, Shah H. Black-pigmented *Bacteroides* spp. in human apical periodontitis. *Infection and immunity.* 1986 Jul;53(1):149-53. PubMed PMID: 3721577. Pubmed Central PMCID: 260089.
25. Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology.* 1994 Oct;78(4):522-30. PubMed PMID: 7800383.
26. Svensäter GB, G. Biofilms in endodontic infections. *Endodontic Topics* 2004. 2004;9(1):27-36.
27. Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence.* 2011 Sep-Oct;2(5):435-44. PubMed PMID: 21778817. Pubmed Central PMCID: 3322631.
28. Beighton D, Smith K, Hayday H. The growth of bacteria and the production of exoglycosidic enzymes in the dental plaque of macaque monkeys. *Archives of oral biology.* 1986;31(12):829-35. PubMed PMID: 3479958.
29. Sifri CD. Healthcare epidemiology: quorum sensing: bacteria talk sense. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2008 Oct 15;47(8):1070-6. PubMed PMID: 18781869.
30. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annual review of microbiology.* 2001;55:165-99. PubMed PMID: 11544353.
31. Allison DG. The biofilm matrix. *Biofouling.* 2003 Apr;19(2):139-50. PubMed PMID: 14618698.
32. Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C. Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infection and immunity.* 1998 Oct;66(10):4729-32. PubMed PMID: 9746571. Pubmed Central PMCID: 108582.
33. Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *Journal of clinical periodontology.* 2005;32 Suppl 6:7-15. PubMed PMID: 16128825.
34. Sedlacek MJ, Walker C. Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. *Oral Microbiol Immunol.* 2007 Oct;22(5):333-9. PubMed PMID: 17803631. Pubmed Central PMCID: 2040071.
35. Stojcic S, Shen Y, Haapasalo M. Effect of the source of biofilm bacteria, level of biofilm maturation, and type of disinfecting agent on the susceptibility of biofilm bacteria to antibacterial agents. *J Endod.* 2013 Apr;39(4):473-7. PubMed PMID: 23522539.
36. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2001 Apr;45(4):999-1007. PubMed PMID: 11257008. Pubmed Central PMCID: 90417.
37. Chavez de Paz LE. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *J Endod.* 2007 Jun;33(6):652-62. PubMed PMID: 17509401.
38. Nair RPN. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod.* 1987 Jan;13(1):29-39. PubMed PMID: 3469299.
39. Jhajharia K, Parolia A, Shetty KV, Mehta LK. Biofilm in endodontics: A review. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry.* 2015 Jan-Feb;5(1):1-12. PubMed PMID: 25767760. Pubmed Central PMCID: 4355843.

40. 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*. *Archives of microbiology*. 2010 Sep;192(9):775-81. PubMed PMID: 20652229.
41. Sedgley C, Buck G, Appelbe O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J Endod*. 2006 Feb;32(2):104-9. PubMed PMID: 16427455.
42. Portenier I, Waltimo TM, M. H. *Enterococcus faecalis* - the root canal survivor and 'star' in posttreatment disease. *Endod Topics*. 2003;8:135-59.
43. Dahlen G, Blomqvist S, Almstahl A, Carlen A. Virulence factors and antibiotic susceptibility in enterococci isolated from oral mucosal and deep infections. *Journal of oral microbiology*. 2012;4. PubMed PMID: 22368771. Pubmed Central PMCID: 3285953.
44. Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE, Nagel AC, Appelbe OK, Clewell DB, et al. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. *Oral Microbiol Immunol*. 2005 Feb;20(1):10-9. PubMed PMID: 15612939.
45. Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol*. 2003 Apr;18(2):121-6. PubMed PMID: 12654103.
46. Chivatxaranukul P, Dashper SG, Messer HH. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2008 Oct;41(10):873-82. PubMed PMID: 18822013.
47. Hartke A, Giard JC, Laplace JM, Auffray Y. Survival of *Enterococcus faecalis* in an oligotrophic microcosm: changes in morphology, development of general stress resistance, and analysis of protein synthesis. *Applied and environmental microbiology*. 1998 Nov;64(11):4238-45. PubMed PMID: 9797271. Pubmed Central PMCID: 106633.
48. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J*. 2002 Mar;35(3):221-8. PubMed PMID: 11985673.
49. Haapasalo HK, Siren EK, Waltimo TM, Orstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J*. 2000 Mar;33(2):126-31. PubMed PMID: 11307453.
50. Reichert R. Streptokokken-Infektionen – Aktuelle Aspekte zur Diagnostik, Prophylaxe und Therapie. Erste Aufl. Bremen: UNI-MED Verlag; 2007.
51. Patterson MJ. Streptococcus. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston (TX)1996.
52. Do T, Jolley KA, Maiden MC, Gilbert SC, Clark D, Wade WG, Beighton D. Population structure of *Streptococcus oralis*. *Microbiology*. 2009 Aug;155(Pt 8):2593-602. PubMed PMID: 19423627. Pubmed Central PMCID: 2885674.
53. Kilian MM, L.; Henrichsen, J. Taxonomic Study of Viridans Streptococci: Description of *Streptococcus gordonii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Streptococcus sanguis* (White and Niven 1946), *Streptococcus oralis* (Bridge and Sneath 1982), and *Streptococcus mitis* (Andrewes and Horder 1906. *International journal of systematic bacteriology*. 1989;39(4):471-84.
54. Douglas CW, Heath J, Hampton KK, Preston FE. Identity of viridans streptococci isolated from cases of infective endocarditis. *Journal of medical microbiology*. 1993 Sep;39(3):179-82. PubMed PMID: 8366515.
55. Beighton D, Carr AD, Oppenheim BA. Identification of viridans streptococci associated with bacteraemia in neutropenic cancer patients. *Journal of medical microbiology*. 1994 Mar;40(3):202-4. PubMed PMID: 8114071.
56. Byers HL, Tarelli E, Homer KA, Beighton D. Isolation and characterisation of sialidase from a strain of *Streptococcus oralis*. *Journal of medical microbiology*. 2000 Mar;49(3):235-44. PubMed PMID: 10707943.
57. Cassels FJ, Hughes CV, Nauss JL. Adhesin receptors of human oral bacteria and modeling of putative adhesin-binding domains. *Journal of industrial microbiology*. 1995 Sep;15(3):176-85. PubMed PMID: 8519475.

58. Nyvad B, Kilian M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scandinavian journal of dental research*. 1987 Oct;95(5):369-80. PubMed PMID: 3477852.
59. Wilkins JC, Beighton D, Homer KA. Effect of acidic pH on expression of surface-associated proteins of *Streptococcus oralis*. *Applied and environmental microbiology*. 2003 Sep;69(9):5290-6. PubMed PMID: 12957916. Pubmed Central PMCID: 194962.
60. Love RM, McMillan MD, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral streptococci is associated with collagen recognition mediated by the antigen I/II family of polypeptides. *Infection and immunity*. 1997 Dec;65(12):5157-64. PubMed PMID: 9393810. Pubmed Central PMCID: 175743.
61. Rafay AM, Homer KA, Beighton D. Effect of mucin and glucose on proteolytic and glycosidic activities of *Streptococcus oralis*. *Journal of medical microbiology*. 1996 Jun;44(6):409-17. PubMed PMID: 8636957.
62. Shah HN, Collins DM. *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *International journal of systematic bacteriology*. 1990 Apr;40(2):205-8. PubMed PMID: 2223612.
63. Pelt P, Zimmermann B, Ulbrich N, Bernimoulin JP. Effects of lipopolysaccharide extracted from *Prevotella intermedia* on bone formation and on the release of osteolytic mediators by fetal mouse osteoblasts in vitro. *Archives of oral biology*. 2002 Dec;47(12):859-66. PubMed PMID: 12450517.
64. Persson S, Edlund MB, Claesson R, Carlsson J. The formation of hydrogen sulfide and methyl mercaptan by oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol*. 1990 Aug;5(4):195-201. PubMed PMID: 2082242.
65. Sundqvist G, Carlsson J, Herrmann B, Tarnvik A. Degradation of human immunoglobulins G and M and complement factors C3 and C5 by black-pigmented *Bacteroides*. *Journal of medical microbiology*. 1985 Feb;19(1):85-94. PubMed PMID: 3968707.
66. Matsuo T, Shirakami T, Ozaki K, Nakanishi T, Yumoto H, Ebisu S. An immunohistological study of the localization of bacteria invading root pulpal walls of teeth with periapical lesions. *J Endod*. 2003 Mar;29(3):194-200. PubMed PMID: 12669880.
67. Peters LB, Wesselink PR, Buijs JF, van Winkelhoff AJ. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod*. 2001 Feb;27(2):76-81. PubMed PMID: 11491642.
68. Takahashi N, Yamada T. Glucose metabolism by *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol*. 2000 Jun;15(3):188-95. PubMed PMID: 11154402.
69. Jansen HJ, van der Hoeven JS. Protein degradation by *Prevotella intermedia* and *Actinomyces meyeri* supports the growth of non-protein-cleaving oral bacteria in serum. *Journal of clinical periodontology*. 1997 May;24(5):346-53. PubMed PMID: 9178115.
70. Gibbons RJ, Macdonald JB. Hemin and vitamin K compounds as required factors for the cultivation of certain strains of *Bacteroides melaninogenicus*. *Journal of bacteriology*. 1960 Aug;80:164-70. PubMed PMID: 13827907. Pubmed Central PMCID: 278836.
71. Beem JE, Nesbitt WE, Leung KP. Identification of hemolytic activity in *Prevotella intermedia*. *Oral Microbiol Immunol*. 1998 Apr;13(2):97-105. PubMed PMID: 9573800.
72. Silva TA, Rodrigues PH, Ribeiro RN, Noronha FS, Farias Lde M, Carvalho MA. Hemolytic activity of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* strains: influence of abiotic factors in solid and liquid assays. *Research in microbiology*. 2003 Jan-Feb;154(1):29-35. PubMed PMID: 12576156.
73. Yang NY, Zhang Q, Li JL, Yang SH, Shi Q. Progression of periodontal inflammation in adolescents is associated with increased number of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, and *Fusobacterium nucleatum*. *International journal of paediatric dentistry*. 2014 May;24(3):226-33. PubMed PMID: 24025042.
74. van Winkelhoff AJ, Carlee AW, de Graaff J. *Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses. *Infection and immunity*. 1985 Sep;49(3):494-7. PubMed PMID: 4030089. Pubmed Central PMCID: 261188.

75. Grossman LI, Oliet S, Del Rioe CE. Endodontic practice. 11th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1988.
76. Baugh D, Wallace J. The role of apical instrumentation in root canal treatment: a review of the literature. *J Endod.* 2005 May;31(5):333-40. PubMed PMID: 15851925.
77. Endodontologie EGf. Qualitätsrichtlinien endodontischer Behandlungen. *Endodontie.* 2006;15(4):387 - 401.
78. Hülsmann M. Die Desinfektion des endodontischen Systems. *Quintessenz Endodontie.* 2006;15(2):147-68.
79. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod.* 2006 May;32(5):389-98. PubMed PMID: 16631834.
80. Ng YL, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of nonsurgical root canal treatment: part 1: periapical health. *Int Endod J.* 2011 Jul;44(7):583-609. PubMed PMID: 21366626.
81. Savani GM, Sabbah W, Sedgley CM, Whitten B. Current trends in endodontic treatment by general dental practitioners: report of a United States national survey. *J Endod.* 2014 May;40(5):618-24. PubMed PMID: 24767553.
82. Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *International dental journal.* 2008 Dec;58(6):329-41. PubMed PMID: 19145794.
83. Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan MA, Pecora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian dental journal.* 2002;13(2):113-7. PubMed PMID: 12238801.
84. Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *J Endod.* 2006 May;32(5):434-7. PubMed PMID: 16631843.
85. Chavez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensater G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod.* 2010 Jan;36(1):70-7. PubMed PMID: 20003938.
86. Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JA. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J.* 2004 Jan;37(1):38-41. PubMed PMID: 14718055.
87. De-Deus G, de Berredo Pinho MA, Reis C, Fidel S, Souza E, Zehnder M. Sodium hypochlorite with reduced surface tension does not improve in situ pulp tissue dissolution. *J Endod.* 2013 Aug;39(8):1039-43. PubMed PMID: 23880273.
88. Gomes BP, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J Endod.* 2009 Oct;35(10):1350-3. PubMed PMID: 19801228.
89. Martinho FC, Chiesa WM, Marinho AC, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Clinical investigation of the efficacy of chemomechanical preparation with rotary nickel-titanium files for removal of endotoxin from primarily infected root canals. *J Endod.* 2010 Nov;36(11):1766-9. PubMed PMID: 20951284.
90. Slutzky-Goldberg I, Hanut A, Matalon S, Baev V, Slutzky H. The effect of dentin on the pulp tissue dissolution capacity of sodium hypochlorite and calcium hydroxide. *J Endod.* 2013 Aug;39(8):980-3. PubMed PMID: 23880263.
91. Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J.* 2003 Feb;36(2):75-85. PubMed PMID: 12657150.
92. Siqueira JF, Jr., Rocas 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 Jun;26(6):331-4. PubMed PMID: 11199749.
93. Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J.* 1985 Jan;18(1):35-40. PubMed PMID: 3922900.
94. Safavi K, Spangberg, L.S.W. Chlorhexidin in der Endodontie. Chemie, antimikrobielle Wirkung und mögliche Indikation. *Quintessenz Endodontie.* 2006;15(2):171-6.

95. Saatchi M, Shokrane A, Navaei H, Maracy MR, Shojaei H. Antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: a systematic review and meta-analysis. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2014 Sep-Oct;22(5):356-65. PubMed PMID: 25466470. Pubmed Central PMCID: 4245746.
96. Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod*. 2004 Nov;30(11):785-7. PubMed PMID: 15505511.
97. de Oliveira LD, Jorge AO, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Valera MC. In vitro effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Jul;104(1):135-42. PubMed PMID: 17376712.
98. Mitic A, Mitic N, Zivkovic S, Tosic G, Savic V, Dacic S, Stojanović M. [Efficiency of final irrigation of root canal in removal of smear layer]. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo*. 2009 Sep-Oct;137(9-10):482-9. PubMed PMID: 19950753.
99. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod*. 1997 Apr;23(4):229-31. PubMed PMID: 9594771.
100. Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Oct;98(4):488-92. PubMed PMID: 15472666.
101. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J*. 2009 Apr;42(4):288-302. PubMed PMID: 19220510.
102. Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LA, Anibal FF, Faccioli LH. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. *Int Endod J*. 2002 Sep;35(9):735-9. PubMed PMID: 12449023.
103. Tatnall FM, Leigh IM, Gibson JR. Comparative study of antiseptic toxicity on basal keratinocytes, transformed human keratinocytes and fibroblasts. *Skin pharmacology : the official journal of the Skin Pharmacology Society*. 1990;3(3):157-63. PubMed PMID: 2078350.
104. Babich H, Wurzbarger BJ, Rubin YL, Sinensky MC, Blau L. An in vitro study on the cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to human gingival cells. *Cell biology and toxicology*. 1995 Apr;11(2):79-88. PubMed PMID: 7583874.
105. Portenier I, Haapasalo H, Orstavik D, Yamauchi M, Haapasalo M. Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against *Enterococcus faecalis* by dentin, dentin matrix, type-I collagen, and heat-killed microbial whole cells. *J Endod*. 2002 Sep;28(9):634-7. PubMed PMID: 12236305.
106. 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 Sep;34(6):424-8. PubMed PMID: 11556507.
107. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Jan;97(1):79-84. PubMed PMID: 14716261.
108. Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *Journal of periodontology*. 1986 Jun;57(6):370-7. PubMed PMID: 3522851.
109. Hugo WB, Longworth AR. Some Aspects of the Mode of Action of Chlorhexidine. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 1964 Oct;16:655-62. PubMed PMID: 14226440.
110. Davies A. The mode of action of chlorhexidine. *Journal of periodontal research Supplement*. 1973;12:68-75. PubMed PMID: 4269603.
111. Rölla G, Loe H, Schiott CR. The affinity of chlorhexidine for hydroxyapatite and salivary mucins. *Journal of periodontal research*. 1970;5(2):90-5. PubMed PMID: 4254174.
112. de Souza CA, Colombo AP, Souto RM, Silva-Boghossian CM, Granjeiro JM, Alves GG, et al. Adsorption of chlorhexidine on synthetic hydroxyapatite and in vitro biological activity. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2011 Oct 15;87(2):310-8. PubMed PMID: 21676601.

113. Pratten J, Wills K, Barnett P, Wilson M. In vitro studies of the effect of antiseptic-containing mouthwashes on the formation and viability of *Streptococcus sanguis* biofilms. *Journal of applied microbiology*. 1998 Jun;84(6):1149-55. PubMed PMID: 9717301.
114. Frater M, Braunitzer G, Urban E, Bereczki L, Antal M, Nagy K. In vitro efficacy of different irrigating solutions against polymicrobial human root canal bacterial biofilms. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*. 2013 Jun;60(2):187-99. PubMed PMID: 23827750.
115. Niazi SA, Al-Ali WM, Patel S, Foschi F, Mannocci F. Synergistic effect of 2% chlorhexidine combined with proteolytic enzymes on biofilm disruption and killing. *Int Endod J*. 2014 Dec 5. PubMed PMID: 25482847.
116. Zamany A, Safavi K, Spangberg LS. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 Nov;96(5):578-81. PubMed PMID: 14600693.
117. Paiva SS, Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Carmo FL, Leite DC, Ferreira DC, Rachid CT, Rosado AS. Clinical antimicrobial efficacy of NiTi rotary instrumentation with NaOCl irrigation, final rinse with chlorhexidine and interappointment medication: a molecular study. *Int Endod J*. 2013 Mar;46(3):225-33. PubMed PMID: 22889410.
118. Bertoloni G, Lauro FM, Cortella G, Merchat M. Photosensitizing activity of hematoporphyrin on *Staphylococcus aureus* cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2000 Jul 3;1475(2):169-74. PubMed PMID: 10832032.
119. Moan J, Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochemistry and photobiology*. 1991 Apr;53(4):549-53. PubMed PMID: 1830395.
120. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1998 Jul;42(1):13-28. PubMed PMID: 9700525.
121. Javed F, Romanos GE. Does photodynamic therapy enhance standard antibacterial therapy in dentistry? *Photomedicine and laser surgery*. 2013 Nov;31(11):512-8. PubMed PMID: 24138192.
122. Andersen R, Loebel N, Hammond D, Wilson M. Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing. *The Journal of clinical dentistry*. 2007;18(2):34-8. PubMed PMID: 17508621.
123. Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *Journal of clinical periodontology*. 2008 Oct;35(10):877-84. PubMed PMID: 18713259.
124. GURSOY H, OZCAKIR-TOMRUK C, TANALP J, YILMAZ S. Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clinical oral investigations*. 2013 May;17(4):1113-25. PubMed PMID: 23015026.
125. Merchat M, Bertolini G, Giacomini P, Villanueva A, Jori G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 1996 Feb;32(3):153-7. PubMed PMID: 8622178.
126. Bertoloni G, Rossi F, Valduga G, Jori G, van Lier J. Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*. 1990 Sep 1;59(1-2):149-55. PubMed PMID: 2125956.
127. Tegos GP, Anbe M, Yang C, Demidova TN, Satti M, Mroz P, Janjua S, Gad F, Hamblin MR. Protease-stable polycationic photosensitizer conjugates between polyethyleneimine and chlorin(e6) for broad-spectrum antimicrobial photoinactivation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006 Apr;50(4):1402-10. PubMed PMID: 16569858. Pubmed Central PMCID: 1426948.
128. Garcez AS, Nunez SC, Hamblin MR, Ribeiro MS. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *J Endod*. 2008 Feb;34(2):138-42. PubMed PMID: 18215668. Pubmed Central PMCID: 2808698.

129. Bonsor SJ, Nichol R, Reid TM, Pearson GJ. Microbiological evaluation of photo-activated disinfection in endodontics (an in vivo study). *British dental journal*. 2006 Mar 25;200(6):337-41, discussion 29. PubMed PMID: 16568063.
130. Garcez AS, Nunez SC, Hamblim MR, Suzuki H, Ribeiro MS. Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: a preliminary report. *J Endod*. 2010 Sep;36(9):1463-6. PubMed PMID: 20728710.
131. Sakamoto M, Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Benno Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Feb;22(1):19-23. PubMed PMID: 17241166.
132. Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Oct;23(5):384-90. PubMed PMID: 18793361.
133. 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 Jul;24(7):472-6. PubMed PMID: 9693573.
134. Tolker-Nielsen T, Sternberg C. Methods for studying biofilm formation: flow cells and confocal laser scanning microscopy. *Methods in molecular biology*. 2014;1149:615-29. PubMed PMID: 24818937.
135. Shen Y, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria in vitro: a three-dimensional quantitative analysis. *J Endod*. 2009 Jul;35(7):981-5. PubMed PMID: 19567319.
136. Tardivo D, Sastre J, Ruquet M, Thollon L, Adalian P, Leonetti G, Foti B. Three-dimensional modeling of the various volumes of canines to determine age and sex: a preliminary study. *Journal of forensic sciences*. 2011 May;56(3):766-70. PubMed PMID: 21361946.
137. Kerekes K, Tronstad L. Morphometric observations on the root canals of human molars. *J Endod*. 1977 Mar;3(3):114-8. PubMed PMID: 266013.
138. Kerekes K, Tronstad L. Morphometric observations on root canals of human premolars. *J Endod*. 1977 Feb;3(2):74-9. PubMed PMID: 264937.
139. Kerekes K, Tronstad L. Morphometric observations on root canals of human anterior teeth. *J Endod*. 1977 Jan;3(1):24-9. PubMed PMID: 264928.
140. Wu MK, R'Oris A, Barkis D, Wesselink PR. Prevalence and extent of long oval canals in the apical third. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2000 Jun;89(6):739-43. PubMed PMID: 10846130.
141. Mizutani T, Ohno N, Nakamura H. Anatomical study of the root apex in the maxillary anterior teeth. *J Endod*. 1992 Jul;18(7):344-7. PubMed PMID: 1402598.
142. Kasahara E, Yasuda E, Yamamoto A, Anzai M. Root canal system of the maxillary central incisor. *J Endod*. 1990 Apr;16(4):158-61. PubMed PMID: 2074404.
143. Garberoglio R, Becce C. Smear layer removal by root canal irrigants. A comparative scanning electron microscopic study. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1994 Sep;78(3):359-67. PubMed PMID: 7970599.
144. Noetzel J, Nonhoff J, Bitter K, Wagner J, Neumann K, Kielbassa AM. Efficacy of calcium hydroxide, Er:YAG laser or gaseous ozone against *Enterococcus faecalis* in root canals. *American journal of dentistry*. 2009 Feb;22(1):14-8. PubMed PMID: 19281107.
145. Xie Q, Johnson BR, Wenckus CS, Fayad MI, Wu CD. Efficacy of berberine, an antimicrobial plant alkaloid, as an endodontic irrigant against a mixed-culture biofilm in an in vitro tooth model. *J Endod*. 2012 Aug;38(8):1114-7. PubMed PMID: 22794217.
146. Bast E. *Mikrobiologische Methoden: Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken*. Spektrum Akademischer Verlag; 2010.
147. Pianetti A, Falcioni T, Bruscolini F, Sabatini L, Sisti E, Papa S. Determination of the viability of *Aeromonas hydrophila* in different types of water by flow cytometry, and comparison with classical methods. *Applied and environmental microbiology*. 2005 Dec;71(12):7948-54. PubMed PMID: 16332772. Pubmed Central PMCID: 1317354.

148. Isenberg HD. Pathogenicity and virulence: another view. *Clinical microbiology reviews*. 1988 Jan;1(1):40-53. PubMed PMID: 3060244. Pubmed Central PMCID: 358028.
149. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol*. 1992 Oct;7(5):257-62. PubMed PMID: 1494447.
150. Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, Tanner AC, Kent R, Doukas AG, Stashenko PP, Soukos NS. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod*. 2008 Jun;34(6):728-34. PubMed PMID: 18498901. Pubmed Central PMCID: 2596687.
151. Zamany A, Spangberg LS. An effective method of inactivating chlorhexidine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002 May;93(5):617-20. PubMed PMID: 12075214.
152. Zerella JA, Fouad AF, Spangberg 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 Dec;100(6):756-61. PubMed PMID: 16301159.
153. Magro MG, Kuga MC, Aranda-Garcia AJ, Victorino KR, Chavez-Andrade GM, Faria G, Keine KC, Só MV. Effectiveness of several solutions to prevent the formation of precipitate due to the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine and its effect on bond strength of an epoxy-based sealer. *Int Endod J*. 2015 May;48(5):478-83. PubMed PMID: 24962548.
154. Magro MG, Kuga MC, Regina Victorino K, Vazquez-Garcia FA, Aranda-Garcia AJ, Faria-Junior NB, Faria G, Luis Shinohara A. Evaluation of the interaction between sodium hypochlorite and several formulations containing chlorhexidine and its effect on the radicular dentin--SEM and push-out bond strength analysis. *Microscopy research and technique*. 2014 Jan;77(1):17-22. PubMed PMID: 24190651.
155. Orhan EO, Irmak O, Hur D, Yaman BC, Karabucak B. Does Para-chloroaniline Really Form after Mixing Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine? *J Endod*. 2016 Mar;42(3):455-9. PubMed PMID: 26830426.
156. Krishnamurthy S, Sudhakaran S. Evaluation and prevention of the precipitate formed on interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Endod*. 2010 Jul;36(7):1154-7. PubMed PMID: 20630289.
157. Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: comparison of viability staining and direct culture. *J Endod*. 2010 Nov;36(11):1820-3. PubMed PMID: 20951294.
158. Lima RK, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Junior NB, Tanomaru-Filho M. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2012 Apr;45(4):311-6. PubMed PMID: 22077915.
159. Endo MS, Ferraz CC, Zaia AA, Almeida JF, Gomes BP. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the endodontic retreatment. *European journal of dentistry*. 2013 Jul;7(3):302-9. PubMed PMID: 24926210. Pubmed Central PMCID: 4053619.
160. Juric IB, Plecko V, Panduric DG, Anic I. The antimicrobial effectiveness of photodynamic therapy used as an addition to the conventional endodontic re-treatment: a clinical study. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2014 Dec;11(4):549-55. PubMed PMID: 25461966.
161. Cardoso FG, Ferreira NS, Martinho FC, Nascimento GG, Manhaes LR, Jr., Rocco MA, et al. Correlation between Volume of Apical Periodontitis Determined by Cone-beam Computed Tomography Analysis and Endotoxin Levels Found in Primary Root Canal Infection. *J Endod*. 2015 Jul;41(7):1015-9. PubMed PMID: 25935504.
162. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Feres M, Gomes BP. Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Aug;23(4):282-90. PubMed PMID: 18582327.
163. Baumotte K, Bombana AC, Cai S. Microbiologic endodontic status of young traumatized tooth. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2011 Dec;27(6):438-41. PubMed PMID: 21895973.

164. Taschieri S, Del Fabbro M, Samaranayake L, Chang JW, Corbella S. Microbial invasion of dentinal tubules: a literature review and a new perspective. *Journal of investigative and clinical dentistry*. 2014 Aug;5(3):163-70. PubMed PMID: 25044266.
165. Pataký L, Ivanyi I, Grigar A, Fazekas A. Antimicrobial efficacy of various root canal preparation techniques: an in vitro comparative study. *J Endod*. 2002 Aug;28(8):603-5. PubMed PMID: 12184424.
166. Siqueira JF, Jr., Lima KC, Magalhaes FA, Lopes HP, de Uzeda M. Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. *J Endod*. 1999 May;25(5):332-5. PubMed PMID: 10530256.
167. Oliveira DP, Barbizam JV, Trope M, Teixeira FB. In vitro antibacterial efficacy of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 May;103(5):702-6. PubMed PMID: 17368057.
168. Dametto FR, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005 Jun;99(6):768-72. PubMed PMID: 15897866.
169. Souza LC, Brito PR, de Oliveira JC, Alves FR, Moreira EJ, Sampaio-Filho HR, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2010 Feb;36(2):292-6. PubMed PMID: 20113793.
170. Bergmans L, Moisiadis P, Huybrechts B, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. *Int Endod J*. 2008 Mar;41(3):227-39. PubMed PMID: 18081808.
171. Stewart PS, Rayner J, Roe F, Rees WM. Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. *Journal of applied microbiology*. 2001 Sep;91(3):525-32. PubMed PMID: 11556920.
172. Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Hababbeh N, Qualtrough A, Worthington H, Drucker DB. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2004 Jul;37(7):438-46. PubMed PMID: 15189432.
173. Shih M, Marshall FJ, Rosen S. The bactericidal efficiency of sodium hypochlorite as an endodontic irrigant. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1970 Apr;29(4):613-9. PubMed PMID: 5264905.
174. Trindade AC, De Figueiredo JA, Steier L, Weber JB. Photodynamic therapy in endodontics: a literature review. *Photomedicine and laser surgery*. 2015 Mar;33(3):175-82. PubMed PMID: 25719896.
175. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol*. 2003 Aug;18(4):234-9. PubMed PMID: 12823799.

9 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Claudia Enseleit, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „In-vitro-Untersuchung zur Wirksamkeit verschiedener Spülprotokolle, der photodynamischen Therapie (PDT) sowie der kombinierten Anwendung von chemomechanischer Aufbereitung und adjuvanter PDT auf einen endodontischen Multispeziesbiofilm“ 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 Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, 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.“

Datum

Unterschrift

10 Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Claudia Enseleit hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1:

Hoedke D, Enseleit C, Gruner D, Dommisch H, Schlafer S, Dige I, Bitter K. Effect of photodynamic therapy in combination with various irrigation protocols on an endodontic multispecies biofilm ex vivo. Int Endod J. 2018 Jan; 51 Suppl 1:e23-e34. PubMed PMID: 28276583.

Beitrag im Einzelnen: Versuchsvorbereitung und -organisation, Versuchsdurchführung, Datenerhebung, statistische Auswertung der erhobenen Daten. Ausgenommen davon waren alle Arbeitsschritte im Rahmen der *Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung* sowie deren Auswertung.

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

11 Lebenslauf

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

12 Publikationsliste

Hoedke D, Enseleit C, Gruner D, Dommisch H, Schlafer S, Dige I, Bitter K. Effect of photodynamic therapy in combination with various irrigation protocols on an endodontic multispecies biofilm ex vivo. *Int Endod J.* 2018 Jan; 51 Suppl 1:e23-e34. PubMed PMID: 28276583.

13 Danksagung

Zunächst möchte ich Frau PD Dr. Bitter und Frau Dr. Hoedke für die Überlassung des interessanten Themas danken sowie für die geduldige und konstruktive Unterstützung im Rahmen dieser Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Hoedke, die mich während der gesamten Zeit persönlich betreute, für die immer freundliche und produktive Zusammenarbeit während der gesamten Arbeit, die hilfreichen Kommentare und Ihr Engagement über diesen langen Zeitraum.

Weiterhin danke ich Frau Dr. Gruner und Frau Kanitz für die tatkräftige Unterstützung im Labor.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Schlafer und Fr. Dige vom zahnmedizinischen Institut der Universität Aarhus in Dänemark für die Durchführung der *Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung* und deren Auswertung sowie die freundliche Genehmigung für die Verwendung ihrer Ergebnisse und Bilder in dieser Dissertation. Ihr Beitrag hat mit dem Nachweis für einen Biofilm im Wurzelkanal die Aussagekraft dieser Arbeit noch gesteigert.

Herrn Dr. Neumann danke ich für die fachkundige Hilfe bei der statistischen Auswertung der erhobenen Daten.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern und meinem Mann für ihre anhaltende Unterstützung, ihre unermüdliche Motivation sowie für ihr Vertrauen in meine Fähigkeiten und mein Leistungsvermögen.