

Aus der Poliklinik für Präventive Zahnmedizin, Parodontologie und Kariologie

(Prof. Dr. med. dent. A. Wiegand)

im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Antibakterielle Wirksamkeit der photodynamischen Therapie
bei verschiedenen Insertionstiefen einer LED- Lichtquelle
anhand eines *Enterococcus faecalis*- Biofilm- Modells**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades für Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät der
Georg- August- Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Sarah Endres

aus

Hannover

Göttingen 2017

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent: Priv.- Doz. Dr. med. dent. T. Rödiger

Ko- Referent/in:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Die vorliegende Promotionschrift war Grundlage für folgende Veröffentlichung:

Rödig T, Endres S, Konietschke F, Zimmermann O, Sydow HG, Wiegand A (2016):

Effect of fiber insertion depth on antibacterial efficacy of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* in root canals. Clin Oral Investig, im Druck

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Antibakterielle Wirksamkeit der photodynamischen Therapie bei verschiedenen Insertionstiefen einer LED- Lichtquelle anhand eines *Enterococcus faecalis*- Biofilm- Modells" eigenständig angefertigt und keine anderen als von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Die antibakterielle photodynamische Therapie in der Endodontie	3
2.1.1 Photochemische Reaktion	4
2.1.2 Lichtquellen	5
2.1.3 Photosensibilatoren	7
2.2 Bakterieller Biofilm	9
2.2.1 Orale Biofilme	10
2.3 Enterococcus faecalis	11
3 Material und Methode	14
3.1 Studiendesign	14
3.2 Versuchsdurchführung	17
3.2.1 Auswahl und Vorbereitung der Zähne	17
3.2.2 Gruppeneinteilung	19
3.2.3 Infektion der Proben	19
3.2.4 Vorbereitung der Proben für die REM- Untersuchung	20
3.2.5 Hauptversuch	21
3.2.6 Probenentnahme	23
4 Ergebnisse	25
4.1 Ergebnisse des Hauptversuchs	25
4.2 Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskop Untersuchung	28
5 Diskussion	30
5.1 Diskussion der Methode	30
5.1.1 Versuchsaufbau und Probenmaterial	30
5.1.2 Testbakterium <i>Enterococcus faecalis</i> und Biofilmentwicklung	31
5.1.3 Belichtung und Photosensibilisator	32

5.1.4 Probengewinnung	34
5.2 Diskussion der Ergebnisse	35
5.2.1 Effektivität der photodynamischen Therapie	35
5.2.2 Antibakterielle Wirkung des Photosensibilisators	37
5.2.3 Unterschiedliche Insertionstiefen der optischen Faser	38
6 Zusammenfassung.....	42
7 Anhang Materialliste.....	44
8 Literaturverzeichnis.....	45

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Prinzip der photodynamischen Therapie (modifiziert nach und mit freundlicher Genehmigung von Konopka und Goslinski 2007, S. 695)...4
Abbildung 2:	Prozesse der Biofilmentstehung (modifiziert nach und mit freundlicher Genehmigung von Stoodley et al. 2002, S. 189)..... 9
Abbildung 3:	FotoSan®- Gerät und Photosensibilisator..... 15
Abbildung 4:	Schematische Darstellung des Versuchsablaufs..... 16
Abbildung 5:	Eingebettete Zahnwurzel mit standardisiert präpariertem Wurzelkanal 19
Abbildung 6:	Aktiviertes LED- Licht im Wurzelkanal mit optischer Faser..... 23
Abbildung 7:	Boxplot- Diagramm zur Darstellung der kolonienbildenden Einheiten (CFU) von <i>E. faecalis</i> in den einzelnen Testgruppen. 27
Abbildung 8:	REM- Aufnahme der Wurzeloberfläche mit freigelegten Dentintubuli nach Entfernung der Schmierschicht bei 1500- facher Vergrößerung (Rödig et al. 2016)..... 28
Abbildung 9:	REM- Aufnahme der Wurzeloberfläche nach Infektion mit <i>E. faecalis</i> bei 5000- facher Vergrößerung (Rödig et al. 2016). 29

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Auswahlkriterien der Versuchszähne..... 17
Tabelle 2:	Reihenfolge der Instrumente für die Wurzelkanalpräparation mit entsprechender Arbeitslänge. 18
Tabelle 3:	Einteilung der experimentellen Gruppen..... 21
Tabelle 4:	Mittelwerte der einzelnen Testgruppen 26
Tabelle 5:	Paarvergleiche der einzelnen Testgruppen..... 26

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AL	Arbeitslänge
BF	Biofilm
BHI	Brain Heart Infusion
CFU	Colony Forming Units
E. faecalis	Enterococcus faecalis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPS	Extrazelluläre Polymere Substanzen
LED	Licht- emittierende Diode
MB	Methylenblau
NaCl	Natriumchlorid
NaOCl	Natriumhypochlorit
NiTi	Nickel- Titan
PDT	Photodynamische Therapie
PS	Photosensibilisator
REM	Rasterelektronenmikroskop
ROS	Reactive Oxygen Species
SL	Smear Layer
TBO	Toluidinblau O

1 EINLEITUNG

Eine Erkrankung der pulpalen und periapikalen Gewebe wird durch Mikroorganismen ausgelöst, die in das Wurzelkanalsystem gelangen (Love et al. 1996; Kakehashi et al. 1966). Die häufigste Ursache dafür ist Karies, bei der kariogene Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukte durch den Zahnschmelz bis in das Dentin vordringen und eine Entzündung der Pulpa (*Pulpitis*) auslösen. Eine solche Pulpitis ist in der Regel reversibel, wenn der Reiz frühzeitig beseitigt wird. Sofern keine Therapie vorgenommen wird, geht die reversible Pulpitis in eine irreversible Pulpitis mit anschließender Pulpanekrose über. Aufgrund der fehlenden Blutzirkulation tritt eine bakterielle Infektion des nekrotischen Gewebes ein und diese Mikroorganismen können folglich eine entzündliche Reaktion der periapikalen Gewebe (*Parodontitis apicalis*) hervorrufen (Hellwig et al. 2013). Das Ziel einer endodontischen Behandlung ist es, die Anzahl der Mikroorganismen im Wurzelkanalsystem soweit zu reduzieren, dass eine Ausheilung des periapikalen Gewebes möglich ist (Gründling et al. 2011; Siqueira und Rôças 2008; Nair 2004). Das Standardprotokoll einer solchen konventionellen Behandlung besteht aus dem mechanischen Abtrag des infizierten Wurzelkanaldentins (mechanische Aufbereitung) und der Spülung mit desinfizierenden Lösungen (chemische Aufbereitung) (Chrepa et al. 2014; Özdemir et al. 2010; Estrela et al. 2007; Zehnder 2006; Byström und Sundqvist 1985). Anatomische Gegebenheiten, wie zum Beispiel gekrümmte Wurzelkanäle, Isthmen zwischen einzelnen Kanälen sowie apikale Ramifikationen können die endodontischen Behandlungsmaßnahmen erschweren (Narayanan und Vaishnavi 2010; Schneider 1971). Therapiemisserfolge treten dann auf, wenn keine ausreichende Keimarmut im Wurzelkanalsystem erzielt werden konnte und die Entzündung des periapikalen Gewebes persistiert (Sunde et al. 2002). Das Bakterium *E. faecalis* zählt zu den am häufigsten nachgewiesenen Keimen bei persistierenden endodontischen Infektionen (Stuart et al. 2006; Zoletti et al. 2006; Pinheiro et al. 2003b; Sundqvist et al. 1998). In mehreren Untersuchungen konnte belegt werden, dass eine vollständige Keimfreiheit mit konventionellen Maßnahmen nicht erzielt werden kann (Paiva et al. 2013; Mickel et al. 2007; Shuping et al. 2000; Siqueira et al. 1999). Daher werden stetig Erweiterungen der bereits etablierten

Therapiemaßnahmen oder neue Desinfektionsmaßnahmen des Wurzelkanals mit dem Ziel der vollständigen Keimelimination untersucht (Sahar-Helft et al. 2013; Bhuvu et al. 2010; Heilborn et al. 2010; Huffaker et al. 2010; Huth et al. 2009).

Die photodynamische Therapie (PDT) stellt eine neuartige Desinfektionsmethode in der Endodontie dar, bei der eine Lichtreaktion mit dem Ziel der Zerstörung von Mikroorganismen durchgeführt wird (Tennert et al. 2015; Xhevdet et al. 2014; Garcez et al. 2013b). Es konnte bereits mehrfach eine signifikante antimikrobielle Wirkung dieser Methode *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden (Vaziri et al. 2012; Foschi et al. 2007; Bonsor et al. 2006; Soukos et al. 2006). Die PDT wird bis heute aber überwiegend als zusätzliche desinfizierende Methode und als Ergänzung zur chemo- mechanischen Aufbereitung empfohlen (Ng et al. 2011; Souza et al. 2010; George und Kishen 2008; Garcez et al. 2007). Im Gegensatz zu vielen anderen Studien, in denen Lasersysteme für die antibakterielle PDT verwendet wurden (Vaziri et al. 2012; Souza et al. 2010; Foschi et al. 2007; Soukos et al. 2006), kam in der vorliegenden Arbeit ein neueres PDT- System mit einer Licht- emittierenden- Diode (LED) als Lichtquelle zur Anwendung (FotoSan®; CMS Dental, Kopenhagen, Dänemark). Bei diesem System wird eine konische Kunststofffaser, auch optische Faser genannt, auf das LED-Handstück aufgesetzt und in den Wurzelkanal infizierter Zähne inseriert. Den Herstellerangaben zufolge soll die optische Faser dabei so tief wie möglich ohne Friktion in den Wurzelkanal eingebracht werden. Bei stark gekrümmten oder langen Wurzeln sowie bei schwer zugänglichen Molaren ist eine tiefe Insertion jedoch nicht oder nur bedingt möglich. Das Ziel der vorliegenden *in vitro*- Studie war es daher, den Einfluss der Insertionstiefe der optischen Faser bei der PDT auf die antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) in Wurzelkanälen infizierter extrahierter Zähne zu untersuchen.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 DIE ANTIBAKTERIELLE PHOTODYNAMISCHE THERAPIE IN DER ENDODONTIE

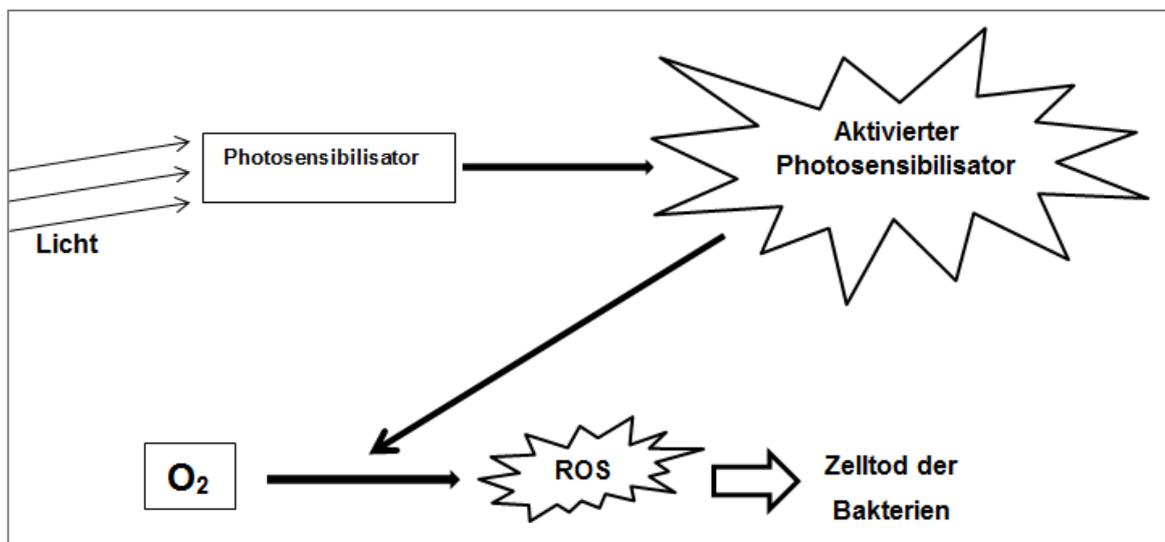
Die PDT, auch als photoaktivierte Chemotherapie (PACT) oder photoaktivierte Desinfektion (PAD) bezeichnet, besteht aus den drei Komponenten Photosensibilisator (PS), Lichtquelle und Sauerstoff (Cieplik et al. 2014; Konopka und Goslinski 2007). Das Prinzip der PDT liegt darin, dass Bakterien mit einem PS angefärbt und anschließend mit Licht einer bestimmten Wellenlänge belichtet werden. Unter Vorhandensein von Sauerstoff entstehen daraufhin freie Radikale, die zu irreversibler Schädigung und Zelltod der Bakterien führen. Erstmals wurde dieser photodynamische Effekt von Oskar Raab beschrieben, der die toxische Wirkung eines fluoreszierenden Farbstoffes unter Lichteinwirkung auf *Paramecium* (Pantoffeltierchen) zufällig feststellte (Raab 1900). In den 1970er Jahren etablierte sich die PDT als Therapieform in der Humanmedizin zur selektiven Zerstörung von Tumorgewebe (Mitton und Ackroyd 2008). Seitdem wird diese Therapieform in vielen medizinischen Bereichen, beispielsweise in der Dermatologie zur Entfernung von Hautveränderungen und zur Behandlung bakterieller Entzündungen (Maisch et al. 2004) sowie in der Augenheilkunde bei Makuladegenerationen (Tsuchihashi et al. 2013) standardmäßig verwendet.

Die antimikrobielle Wirksamkeit der PDT in der Endodontie wurde bereits vielfach in *in vitro*- und *in vivo*- Studien überprüft (Xhevdet et al. 2014; Bago et al. 2013; Garcez et al. 2013b; Hecker et al. 2013; Cheng et al. 2012; Vaziri et al. 2012; Ng et al. 2011; Rios et al. 2011; Schlafer et al. 2010; Upadya und Kishen 2010; Bergmans et al. 2008; Fimple et al. 2008; Foschi et al. 2007; Garcez et al. 2007; Soukos et al. 2006). In einer großen Anzahl von Studien konnte eine statistisch signifikante Keimreduktion durch die PDT erzielt werden (Bago et al. 2013; Garcez et al. 2013b; Cheng et al. 2012; Vaziri et al. 2012; Ng et al. 2011; Rios et al. 2011; Schlafer et al. 2010; Bergmans et al. 2008; Fimple et al. 2008; Garcez et al. 2007; Bonsor et al. 2006; Soukos et al. 2006; Williams et al. 2006). Als alleinige Desinfektionsmaßnahme ist die PDT aber nicht geeignet, da eine ausreichende Keimarmut für eine erfolgreiche endodontische Therapie noch nicht gewährleistet werden kann (Bergmans et al. 2008; Fimple et al. 2008; Garcez et al. 2007; Williams et al. 2006). Insbesondere die Spülung mit Natriumhypochlorit (NaOCl)

während der chemo- mechanischen Aufbereitung gilt nach wie vor als Goldstandard zur Desinfektion von infizierten Wurzelkanälen (Xhevdet et al. 2014; Souza et al. 2010; Meire et al. 2009; Seal et al. 2002). Es bedarf der Weiterentwicklung der PDT in Bezug auf die Lichtübertragungssysteme, die Anwendungstechniken und die Parameter des PS, um eine ausreichende Keimreduktion in infizierten Wurzelkanälen erzielen zu können (Xhevdet et al. 2014; Ng et al. 2011; Meire et al. 2009).

2.1.1 PHOTOCHEMISCHE REAKTION

Der PS wird in das Zielgewebe eingebracht und lagert sich dort an die Bakterienzellmembranen an. Das Gewebe wird anschließend mit Licht spezifischer Wellenlänge bestrahlt. Die Wellenlänge der verwendeten Lichtquelle muss auf das Absorptionsmaximum des PS abgestimmt sein, so dass dieser aktiviert werden kann. Zunächst findet eine Energieübertragung von dem aktivierten PS auf den im Gewebe vorkommenden Sauerstoff statt. Der Sauerstoff wird dann in reaktive, zytotoxische Sauerstoffspezies, wie Singulett-Sauerstoff oder freie Radikale, aufgespalten. Diese werden als *reactive oxygen species* (ROS) bezeichnet. Die ROS sind in der Lage, bakterielle Zellmoleküle wie Membranlipide, Proteine oder Nukleinsäuren zu schädigen und somit den Zelltod der Bakterien zu verursachen (Konopka und Goslinski 2007) (Abbildung 1).



**ABBILDUNG 1: PRINZIP DER PHOTODYNAMISCHEN THERAPIE (MODIFIZIERT NACH UND MIT FREUNDLICHER GENEHMIGUNG VON KONOPKA UND GOSLINSKI 2007, S. 695)
ROS (REACTIVE OXYGEN SPECIES), O₂ (SAUERSTOFF)**

Im Detail werden bei der photochemischen Reaktion die Moleküle des PS durch die Lichtquelle von einem niedrigenergetischen Grundzustand in einen angeregten Singulettzustand überführt. Die Moleküle fallen dann aus diesem Zustand unter Abgabe von Wärme oder Fluoreszenz entweder in den Grundzustand zurück oder gehen in einen stabileren Triplettzustand über. Von diesem energiereichen Triplettzustand ausgehend, sind zwei Reaktionstypen möglich (Soukos und Goodson 2011). Bei der Typ- I- Reaktion entstehen durch direkten Elektronentransfer von dem PS- Triplettstadium auf das umliegende Gewebe hochreaktive zytotoxische Radikale wie Hyperoxide, Peroxide und Hydroxylradikale. Bei der Typ- II- Reaktion findet ein Elektronentransfer vom PS- Triplettstadium auf molekularen Sauerstoff statt, wodurch ein hochreaktiver, sehr energiereicher Sauerstoff, sogenannter Singulett-Sauerstoff, entsteht. Die beiden Reaktionen laufen parallel ab, wobei die Typ- II- Reaktion hauptsächlich für die Zytotoxizität der PDT verantwortlich ist. Die Bakterienzellschädigung ist dabei von der Konzentration des PS und vom Sauerstoffpartialdruck des Gewebes abhängig (Cieplik et al. 2014; Soukos und Goodson 2011; Konopka und Goslinski 2007; Wainwright 1998). Die PDT führt zur irreversiblen Schädigung der Bakterien, ohne dabei eine mutagene oder genotoxische Wirkung auf gesundes körpereigenes Gewebe zu haben (Xu et al. 2009; Halkiotis et al. 1999).

2.1.2 LICHTQUELLEN

Für die Wirksamkeit der PDT ist entscheidend, dass das ausgestrahlte Licht im Wellenlängenbereich des verwendeten PS liegt und somit von diesem absorbiert werden kann (Cieplik et al. 2014). Die meisten PS werden durch rotes Licht mit Wellenlängen > 600 nm aktiviert (Soukos und Goodson 2011). In vielen Studien werden klassische Laser, zum Beispiel Diodenlaser, Nd:YAG oder Er:YAG verwendet (Cheng et al. 2012; Meire et al. 2012; Meire et al. 2009; Foschi et al. 2007; Soukos et al. 2006; Seal et al. 2002). Laserwellen liegen im sichtbaren Infrarot- bis Ultraviolettbereich, sind sehr energiereich und können dadurch zu einer Hitzeentwicklung führen (Kimura et al. 2000). Klassische Laser werden auch allein, ohne Photoreaktion mit einem PS, zur Wurzelkanal desinfektion verwendet (Sahar-Helft et al. 2013; Meire et al. 2009; Ramsköld et al. 1997; Gutknecht et al. 1996; Fegan und Steiman 1995). Der antibakterielle

Effekt bei der alleinigen Anwendung von Lasern im Wurzelkanal beruht dabei nur auf einer thermalen Schädigung der Bakterien. Die Keimreduktion wird durch einen Temperaturanstieg in der Umgebung, der über letale Werte hinausgeht, durch lokale Hitze im Inneren der Bakterien oder durch lichtinduzierte Veränderung der bakteriellen Enzymaktivität verursacht (Hellingwerf et al. 1996). Die Desinfektion durch hochenergetische Laserstrahlen ist jedoch problematisch, da eine thermale Schädigung der umliegenden Gewebe möglich ist (Asnaashari und Safavi 2013; Kimura et al. 2000). Es wurden beispielsweise Schädigungen des parodontalen Gewebes, Wurzelankylosen oder -resorptionen beschrieben (Khan et al. 1997; Ramsköld et al. 1997; Bahcall et al. 1992). Die Problematik der Hitzeschädigung bei hochenergetischen Lasern führt dazu, dass diese weitestgehend durch niedrigenergetische Diodenlaser abgelöst werden (Vaziri et al. 2012; Ng et al. 2011; Bergmans et al. 2008). Das Problem der Hitzeentwicklung wird bei der Anwendung von LEDs jedoch gänzlich vermieden, da diese keine Hitze generieren (Rios et al. 2011). In aktuelleren Untersuchungen zur PDT, so auch in der vorliegenden, wird das LED- Licht aus genannten Gründen angewendet (Tennert et al. 2015; Muhammad et al. 2014; Rios et al. 2011).

Einige Autoren untersuchten, ob eine Streuung des Lichts und eine damit einhergehende, gleichmäßigere Verteilung im Wurzelkanal den antibakteriellen Effekt erhöhen. Dabei wurden sogenannte optische Fasern an die verwendeten Lichtsysteme gekoppelt, die das Licht als Diffusoren in einem Winkel von 360° im Wurzelkanal verteilen (Garcez et al. 2013a; Cheng et al. 2012; Nunes et al. 2011; Fimple et al. 2008; Soukos et al. 2006). In einer Studie von Garcez et al. (2013a) war die Keimelimination mit Diffusor signifikant höher (99,99 %), da die Verteilung des Lichts gleichmäßiger war als in den Gruppen ohne optische Faser. Die Verwendung der optischen Faser führte zu einer signifikant höheren ROS- Produktion im Vergleich zur Verwendung der Lichtquelle ohne Diffusor. Auch Fimple et al. (2008) stellten in einer früheren Studie fest, dass der Gebrauch einer optischen Faser als Diffusor zu einem signifikanten, antimikrobiellen Effekt der PDT führt. In der vorliegenden Studie wurde ebenfalls eine optische Faser verwendet.

Zusammengefasst gibt es mehrere Lichtquellen und Lichtübertragungssysteme mit unterschiedlichen Parametern, die für eine PDT geeignet sind. Niedrigenergetische

Diodenlaser zur Photoaktivierung des PS haben im Gegensatz zu hochenergetischen Lasersystemen weniger thermische Nebeneffekte. Neuere Methoden verwenden anstelle von Laserlicht LEDs, die keinerlei Hitze generieren und einfach in der Handhabung sind (Rios et al. 2011; Schlafer et al. 2010; Konopka und Goslinski 2007).

2.1.3 PHOTOSENSIBILATOREN

Für die PDT wurden verschiedene PS entwickelt. Idealerweise sollten diese eine hohe Bindungsaffinität zu Bakterien, eine niedrige zu körpereigenen Zellen aufweisen sowie eine hohe Menge an Singulett-Sauerstoff bilden (Soukos und Goodson 2011; Jori et al. 2006). Die in der Zahnmedizin gebräuchlichsten PS sind Toluidinblau O (TBO) und Methylenblau (MB), die zur chemischen Gruppe der Phenothiazine gehören. Das Absorptionsmaximum dieser PS liegt nahe des Infrarotbereichs zwischen 620 bis 660 nm (Wainwright 1998). Beide PS weisen eine vergleichbare antibakterielle Aktivität auf (Souza et al. 2010; Usacheva et al. 2001; Wainwright 1998) und werden für die PDT im Wurzelkanal verwendet (Soukos und Goodson 2011). Um eine phototoxische Wirkung auszulösen, müssen sich zunächst die Farbstoffmoleküle des PS an die Bakterienzellen binden. Die Anlagerung an die äußere Membran der Bakterien verursacht bei Lichtaktivierung lokalisierte Schäden am Bakterium (Soukos und Goodson 2011; Jori et al. 2006; Usacheva et al. 2003; Wainwright 1998). TBO wirkt membranaktiv, indem es die Membrandurchlässigkeit der äußeren Schutzhülle der Bakterien erhöht. MB ist aufgrund seines hydrophilen Charakters und seines leichten Molekulargewichts eher fähig, durch Porin- Proteinkanäle der Bakterienmembran ins Zellinnere zu gelangen, um dort Schäden an der DNA zu verursachen (Soukos und Goodson 2011; Jori et al. 2006; Rohs und Sklenar 2004; Wainwright 1998). Die Bindung an die Bakterienzellen kann durch Hinzufügen von positiv geladenen chemischen Gruppen (Jori et al. 2006) oder durch spezifische Antikörperbindung (Bhatti et al. 2000) erhöht werden, so dass eine Steigerung des antibakteriellen Effekts erzielt wird. Gramnegative Bakterien sind allgemein etwas schwieriger zugänglich für die PDT als grampositive Bakterien, da sie grundlegende Unterschiede in Bezug auf ihre Zellwandstruktur aufweisen (Jori et al. 2006). Die äußere Membran von grampositiven Bakterien ist überwiegend negativ geladen und relativ porös, so dass der PS zu einem gewissen

Grad durch die Zellwand ins Innere diffundieren kann (Friedrich et al. 2000). Im Gegensatz dazu tragen gramnegative Bakterien neben der Zellmembran noch eine sehr dicht gepackte, negativ geladene und heterogen strukturierte Schicht aus Lipopolysacchariden und Proteinen. Diese hochorganisierte äußere Struktur setzt die Angreifbarkeit von gramnegativen Bakterien gegenüber der PDT herab (Jori et al. 2006). Wainwright et al. (1998) zeigten in ihrer Studie, dass TBO und MB bei der PDT effektiver gegen die grampositiven Bakterien *E. faecalis*, *S. aureus* und *B. cereus* waren als gegen gramnegative Bakterien wie *E. coli* und *P. aeruginosa*. Durch die Zugabe von Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (EDTA) oder kationischen Molekülen kann die Hülle von gramnegativen Bakterien für die PS jedoch zugänglicher gemacht werden, so dass auch bei diesen Bakterien eine effektive antimikrobielle Wirksamkeit der PDT nachweisbar ist (Maisch et al. 2009; Jori et al. 2006). TBO und MB sind in der Lage, eine große Menge an Singulett-Sauerstoff bei verhältnismäßig geringer Belichtungsdauer zu produzieren. Sie sind nicht schädlich für menschliche Zellen und daher auch für eine *in vivo*-Anwendung geeignet (Soukos et al. 2006; Wainwright 1998). Der antibakterielle Effekt der PDT ist neben der Bakterienart (Usacheva et al. 2003) auch von der Konzentration des PS abhängig. Es wurden Konzentrationen von 6,25 µg/ml bis 25 mg/ml für MB und 10 bis 100 µg/ml für TBO getestet (Meire et al. 2009; Bergmans et al. 2008; Fimple et al. 2008; Foschi et al. 2007; Bonsor et al. 2006; Soukos et al. 2006; Williams et al. 2006). Foschi et al. (2007) verwendeten MB in einer Konzentration von 6,25 µg/ml und Soukos et al. 2006 in vierfach höherer Konzentration (25 µg/ml). Bei erhöhter Farbstoffkonzentration lag auch die Bakterienreduktion von *E. faecalis* circa 20 % höher (Soukos et al. 2006). Seal et al. (2002) testeten die antibakterielle Wirksamkeit der PDT *in vitro* ebenfalls mit unterschiedlichen Konzentrationen von TBO (12,5 bis 100 µg/ml), wobei die Konzentration von 100 µg/ml den signifikant höchsten antibakteriellen Effekt zeigte. Mehrere Autoren konnten bei dieser Konzentration von TBO eine statistisch signifikante antibakterielle Effektivität der PDT nachweisen (Nunes et al. 2011; Poggio et al. 2011; Schlafer et al. 2010). In der vorliegenden Untersuchung wird TBO ebenfalls in der genannten Konzentration von 100 µg/ml verwendet. In einigen Studien zur PDT wurde festgestellt, dass der PS auch ohne Lichtaktivierung zu einer signifikanten Bakterienreduktion führte, wobei dieser Effekt als Dunkeltoxizität

bezeichnet wird (Rios et al. 2011; Upadya und Kishen 2010; Soukos et al. 2006). Es kann festgehalten werden, dass die Effektivität der PDT auch von unterschiedlichen Parametern des PS abhängig ist. Eine einheitliche Aussage darüber, ob der PS allein ohne Lichtaktivierung bereits einen antibakteriellen Effekt erzielt, ist bis jetzt nicht möglich, da in den Studien unterschiedliche PS, Konzentrationen des PS, Einwirkzeiten und Testbakterien verwendet wurden. In der vorliegenden Untersuchung wurde neben der Hauptfragestellung zusätzlich eine mögliche antibakterielle Wirkung des PS TBO ohne Lichtaktivierung untersucht.

2.2 BAKTERIELLER BIOFILM

Die Mehrheit der Mikroben in der Natur (99 %) lebt vorzugsweise in einem strukturierten Biofilm- Ökosystem. Biofilme sind ubiquitär, das heißt, sie entstehen überall dort, wo Wasser und Nährstoffe vorhanden sind. Biofilme entstehen immer auf die gleiche Art und Weise, unabhängig davon, welches Ökosystem sie bewohnen. Der Entstehungsprozess kann grundsätzlich in drei Schritte unterteilt werden: a) die Adhäsion der Bakterien an eine Oberfläche, b) die Bildung von Mikrokolonien und Entstehung eines jungen Biofilms und c) die Freisetzung von Tochterkolonien und Entstehung eines ausgereiften Biofilms (Watnick und Kolter 2000) (*Abbildung 2*).

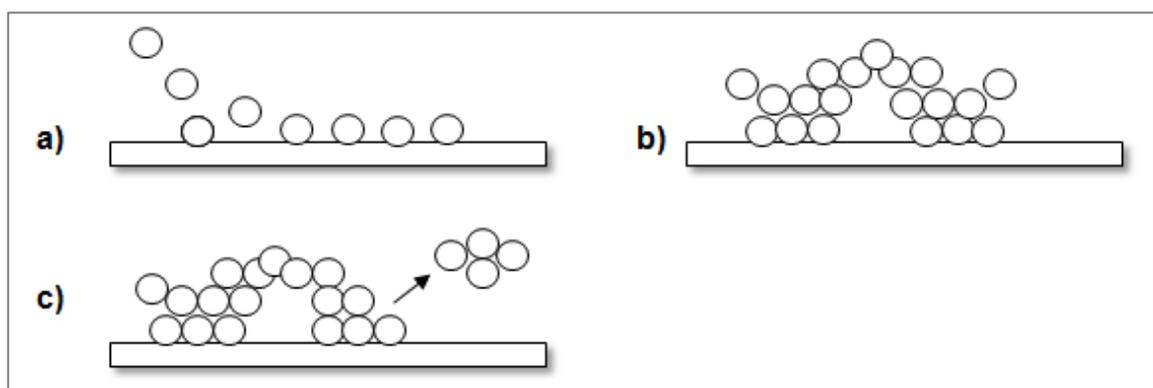


ABBILDUNG 2: PROZESSE DER BIOFILMENTSTEHUNG (MODIFIZIERT NACH UND MIT FREUNDLICHER GENEHMIGUNG VON STOODLEY ET AL. 2002, S. 189)

- A) ADHÄSION DER BAKTERIEN AN EINE OBERFLÄCHE**
- B) BILDUNG EINES STRUKTURIERTEN BIOFILMS**
- C) FREISETZUNG VON TOCHTERZELLEN**

Zur Entstehung eines Biofilms lagern sich Bakterien fest an bewegliche oder unbewegliche Oberflächen sowie an Grenzflächen wie z. B. Gas- und Flüssigphasen an. Der Biofilm stellt eine mikrobielle Lebensgemeinschaft aus zumeist unterschiedlichen Bakterienarten dar (Donlan und Costerton 2002; Costerton 1995). Die Bakterien im Biofilm schließen sich zu Zellaggregaten zusammen und sind in eine Matrix aus sogenannten extrazellulären Polymeren Substanzen (EPS) eingebettet (Branda et al. 2005; Costerton 1995). Die Mikroorganismen machen bis zu ca. 15 Vol.-% eines Biofilms aus und die Matrix bis zu 85 Vol.-% (Flemming et al. 2016), wobei diese das Gerüst zur Stabilisierung des Biofilms darstellt. Die Hauptkomponenten der Matrix sind EPS und Proteine im Verbund mit Wasser (Wei und Ma 2013; Branda et al. 2005). Andere Bestandteile sind Aminosäuren, Zucker, aromatische Verbindungen, Proteine, Nukleinsäuren, Lipide, Zellreste und verschiedene Ionen (Ca^{2+} , Mg^{2+} , SO_4^{2-} , Fe^{3+}) (Flemming et al. 2016). Zusammen mit den Bakterienzellen führt die Matrix zur Bildung von typischen dreidimensionalen, pilz- und turmartigen Strukturen des Biofilms (ten Cate 2006; Davies 1998). Biofilme können durch diese Struktur bis zu mehrere 100 μm dick werden (Wimpenny 2000). Zwischen den Zellen liegen wassergefüllte Tunnel die den gesamten Biofilm durchziehen (Davey und O'Toole 2000) und wichtig für die Kommunikation und Nährstoffversorgung innerhalb des Biofilms sind. Durch diesen Aufbau unterscheiden sich im Biofilm lebende Bakterien strikt von Zellen der planktonischen Lebensform (Costerton et al. 1995). Aus der hochdifferenzierten Lebensform des Biofilms lassen sich viele Vorteile ziehen: Hohe Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen oder antimikrobiellen Substanzen, erhöhte Stabilität gegenüber mechanischen Scherkräften, optimale Nährstoffversorgung sowie optimaler Informations- und Genaustausch (Davies 1998; Costerton et al. 1987).

2.2.1 ORALE BIOFILME

In der gesunden menschlichen Mundhöhle liegt eine natürliche Bakterienflora mit 700- 1000 verschiedenen Bakterienarten vor (Socransky und Haffajee 2005). Die beiden häufigsten bakteriellen Erkrankungen des Menschen, Karies und Parodontitis, entstehen aufgrund von pathogenen Mikroorganismen, die in die Mundhöhle gelangen und nicht zur normalen Flora gehören (Konopka und Goslinski 2007; ten Cate

2006; Bowden und Li 1997). Die ursächlichen Bakterien für diese Erkrankungen können die Mundhöhle erst nach dem Durchbruch der Zähne kolonisieren und verschwinden, wenn keine Zähne mehr vorhanden sind. Sie werden durch andere Individuen (zum Beispiel Eltern) im Sinne einer Infektionserkrankung übertragen (Hellwig et al. 2013). Bakterien der Mundhöhle können Biofilme mit den gleichen physiologischen und strukturellen Merkmalen anderer natürlicher Biofilme bilden (Marsh 2004). Planktonische Mikroorganismen im Speichel sind dabei die Hauptquelle für die Biofilmbildung im Mund (Bowden und Li 1997).

In der Endodontie wurde der Zusammenhang von Mikroorganismen und Pulpaerkrankungen erstmalig durch Miller beschrieben (Miller 1894). Bakterien, die zu einer Entzündung und Nekrose der Pulpa führen, stammen aus pulpanahen Schichten einer Kariesläsion und dem umgebenden Speichel. Sie kolonisieren nach Eindringen in die Pulpa die Oberfläche des Wurzelkanals und bilden Biofilme im klassischen Sinne. Durch den Apex oder durch Seitenkanäle des Wurzelkanals treten sie in Kontakt mit dem parodontalen Ligament und führen dort zu Entzündungsreaktionen der periradikulären Gewebe. Dieser Prozess führt dann zur Entstehung der apikalen Parodontitis (Siqueira und Rôças 2007). Typischerweise sind primäre endodontische Infektionen polymikrobiell (Baldasso et al. 2012; Donlan und Costerton 2002). Durch die besonderen ökologischen Verhältnisse im Wurzelkanal findet eine Selektion der eindringenden Bakterien statt. Es etabliert sich eine spezielle pathogene Flora (Sundqvist 1992). Das sauerstoffarme Milieu im Wurzelkanalsystem fördert eine starke Dominanz von Anaerobiern (Aw 2016; Sundqvist 1994).

2.3 ENTEROCOCCUS FAECALIS

Enterokokken sind grampositive, fakultative Anaerobier, die sich paarig oder in kurzen Ketten anordnen und kugelförmig sind. Früher wurden Enterokokken den Streptokokken zugeordnet. Nach neuerer Klassifikation werden sie der Familie der Enterokokken zugerechnet (Neumeister et al. 2009). Die am häufigsten auftretenden humanpathogenen Stämme der Enterokokkengruppe sind der *E. faecalis* und der *E. faecium* (Murray 1990). *E. faecalis* kommt vornehmlich im Gastrointestinaltrakt vor (Murray

1990), zählt aber auch bei nosokomialen Infektionen zu den drei häufigsten ursächlichen Keimen (Duggan und Sedgley 2007). *E. faecalis* gelangt als pathogenes Bakterium durch exogene Infektion in die Mundhöhle (Sundqvist et al. 1998) und gehört nicht zu der typischen oralen Bakterienflora. Es siedelt sich als transientes Bakterium in der Mundhöhle an, sofern eine Prädilektionsstelle wie zum Beispiel ein behandelter Wurzelkanal vorliegt.

E. faecalis gelangt in den meisten Fällen durch Speisen, meistens Milchprodukte, in die Mundhöhle. Es ist möglich, dass *E. faecalis* zu jedem Zeitpunkt während oder nach einer Wurzelkanalbehandlung in das Endodont gelangt. Dort findet er dann optimale Bedingungen für eine resistente Besiedlung vor (Zehnder und Guggenheim 2009). Bei einem gesunden Menschen mit guter Mundhygiene und ohne Prädilektionsstellen für das Bakterium kann sich *E. faecalis* nicht gegen die normale Flora durchsetzen und verschwindet auch wieder aus der Mundhöhle (Kampfer et al. 2007; Razavi et al. 2007). In der Zahnheilkunde wird *E. faecalis* insbesondere mit persistierenden apikalen Parodontitiden bei bereits endodontisch behandelten Zähnen in Verbindung gebracht (Zhu et al. 2010; Zoletti et al. 2006; Pinheiro et al. 2003a; Sundqvist et al. 1998; Ørstavik und Haapasalo 1990). Seltener kommt *E. faecalis* bei Primärinfektionen des Wurzelkanals mit nekrotischer Pulpa vor (Sundqvist 1992). Molander et al. (1998) isolierten bei bereits endodontisch behandelten Zähnen und bestehender apikaler Parodontitis in 69 % der Proben Anaerobier, wovon die meisten der Enterokokkengruppe zugeordnet werden konnten. In einer *in vivo*- Untersuchung von Zhu et al. (2010) wurden mikrobielle Proben aus Zähnen mit persistierender apikaler Parodontitis entnommen. Die Auswertung ergab, dass die meisten Zähne ebenfalls mit *E. faecalis* infiziert waren. Siren et al. (1997) wiesen den Keim *in vivo* in 33 % der Fälle als Monoinfektion und auch in Mischinfektionen durch mikrobiologische Proben während der Wurzelkanalbehandlung nach. Auch bei Pinheiro et al. (2003b) war in Zähnen mit apikaler Parodontitis *E. faecalis* der am häufigsten isolierte Keim. Viele *in vitro*- Studien belegen ebenfalls, dass *E. faecalis* die Fähigkeit besitzt, Biofilme an der Wurzelkanalwand zu bilden (Kishen et al. 2006; George et al. 2005; Distel et al. 2002). Die Pathogenität des Bakteriums äußert sich durch eine hohe Anzahl an Virulenzgenen, die dem Bakterium die Fähigkeit verschaffen, im Wurzelkanal zu persistieren und so

Schäden am periapikalen Gewebe zu verursachen (Zoletti et al. 2011). Zu den typischen Virulenzgenen zählen Aggregationssubstanz (asa), Cytolysin- Aktivator (cylA), Oberflächenadhäsion (Esp), Gelatinase (gelE) und Adhärenzfaktoren (EfaA, Ace) (Zhu et al. 2010). *E. faecalis* zeigt zusätzlich eine hohe Toleranz gegenüber schwierigen Umweltbedingungen (George et al. 2005; Huycke et al. 1998). Der Keim ist zum Beispiel hitzestabil bis zu 60°C, toleriert große pH- Schwankungen und kann im alkalischen Milieu überleben (Love 2001; Ørstavik und Haapasalo 1990). Darüber hinaus kann er auch bei geringem Nährstoffangebot lange überleben und sich regenerieren, sobald eine Nährstoffquelle wieder vorhanden ist (Wang et al. 2012a; Siren et al. 1997). Die starke Resistenz des Keimes im Wurzelkanal wird zusätzlich auf die Fähigkeit zurückgeführt, dass er ungefähr 400 µm und teilweise sogar tiefer in die Dentintubuli eindringen kann (Haapasalo und Ørstavik 1987). Die Fähigkeit, sich an Kollagen Typ- I zu binden, spielt dabei eine wichtige Rolle. Kollagen Typ- I ist die organische Hauptkomponente des Wurzelzements, wodurch das feste Anhaften von *E. faecalis* in den Tubuli ermöglicht wird (Saber und El-Hady 2012; Kowalski et al. 2006; Love 2001). Als weitere besondere Eigenschaft gilt, dass *E. faecalis*, insbesondere im apikalen Drittel, einen sogenannten kalzifizierenden Biofilm bilden kann. Dazu erfolgt nach der Anhaftung der Bakterien ein Herauslösen von Mineralien aus dem Dentin. Diese gelösten Mineralien bilden präzipitierte Apatitschichten, so dass schwer entfernbare, kalzifizierte Biofilmbereiche entstehen (Kishen et al. 2006). Insgesamt problematisch ist seine hohe Resistenz gegenüber vielen, in der Endodontie gebräuchlichen, antibakteriellen Spüllösungen und Medikamenten (Sun et al. 2016; Saatchi et al. 2014; Estrela et al. 2007; Zehnder et al. 2004). In einer *in vitro*- Studie von Saber und El-Hady (2012) fand trotz einwöchiger Behandlung des Wurzelkanals mit einer medizinischen Kalziumhydroxideinlage eine vollständige Kolonisation mit einem *E. faecalis*- Biofilm statt. Zehnder et al. (2004) konnten ebenfalls zeigen, dass Kalziumhydroxid nur einen limitierten Effekt gegen *E. faecalis* aufweist. Die in klassischen Spülprotokollen verwendeten endodontischen Spüllösungen CHX (Chlorhexidindigluconat) und NaOCl sind ebenfalls nicht in der Lage, *E. faecalis* komplett aus dem Wurzelkanalsystem zu eliminieren (Estrela et al. 2007). Aus den genannten Gründen ist die Entfernung des Bakteriums sehr problematisch. Aufgrund der resistenten Eigenschaften eignet sich das Bakterium jedoch hervor-

ragend für *in vitro*- Untersuchungen. Die Anwendung von *E. faecalis* hat sich in vielen wissenschaftlichen Studien bewährt (Sun et al. 2016; Bhuvu et al. 2010; Zehnder 2006). Das Bakterium wird dabei überwiegend zur Untersuchung verschiedener endodontischer Behandlungstechniken (Baca et al. 2011; Gründling et al. 2011; Brito et al. 2009) sowie zur Untersuchung der Wirksamkeit endodontischer Spüllösungen und Medikamente eingesetzt (Chávez de Paz et al. 2010; Soares et al. 2010; Sena et al. 2006; Evans et al. 2002). Die Mehrzahl der *in vitro*- Studien zur PDT wählten ebenfalls *E. faecalis* als Testbakterium aus (Sebrão et al. 2017; Silva et al. 2014; Garcez et al. 2013b; Vaziri et al. 2012; Rios et al. 2011; Souza et al. 2010; Upadya und Kishen 2010).

3 MATERIAL UND METHODE

3.1 STUDIENDESIGN

Mit dieser *in vitro*- Untersuchung wurde die antibakterielle Wirksamkeit der PDT bei verschiedenen Insertionstiefen einer LED- Lichtquelle anhand eines *E. faecalis*- Biofilm- Modells untersucht. Die antibakterielle Wirksamkeit des PS TBO wurde ebenfalls untersucht und mit der Effektivität der PDT verglichen.

Es wurden 70 extrahierte Zähne nach bestimmten Kriterien (*Tabelle 1*) ausgewählt und für den Versuch vorbereitet. Bei 60 Zähnen wurden die Zahnkronen abgetrennt, die Wurzelkanäle maschinell präpariert und die präparationsbedingte Schmierschicht mit Spülungen (NaOCl 1 %, EDTA 17 %) entfernt. Die Zahnwurzeln wurden anschließend sterilisiert. Es erfolgte eine Einteilung in sechs experimentelle Gruppen für den Hauptversuch und in zwei Gruppen für Nachweise im Rasterelektronenmikroskop (REM). Die sechs Gruppen des Hauptversuchs teilten sich auf in zwei Kontrollgruppen (Positiv- und Negativkontrolle) und in vier weitere Testgruppen. Alle Proben, ausgenommen die Negativkontrolle und eine REM- Gruppe, wurden mit *E. faecalis* infiziert. In einer Testgruppe zur PDT wurde nur LED- Licht angewendet, in einer anderen nur TBO, in zwei weiteren die PDT mit unterschiedlichen Insertionstiefen der optischen Faser. Das verwendete PDT- System war FotoSan® (CMS Dental), bestehend aus einer LED- Lampe und einer gebrauchsfertigen Farbstofflösung TBO (*Abbildung 3*). Die zwei

REM- Gruppen dienen dem Nachweis der Schmierschichtenfernung und der Infektionskontrolle mit *E. faecalis*. Nach Durchführung aller Versuche wurden aus allen Zahnwurzeln der Testgruppen Proben entnommen. Diese wurden dann inkubiert und anschließend ausgezählt. Abschließend erfolgte die statistische Auswertung der Ergebnisse. Die Einteilung der Proben und der gesamte Versuchsablauf sind in *Abbildung 4* schematisch dargestellt. Das Studiendesign und die Behandlung der Proben wurden im Rahmen eines Partnersversuchs mit unterschiedlichen Fragestellungen entwickelt (Hoffmann 2016).



ABBILDUNG 3: FOTOSAN®- GERÄT UND PHOTOSENSIBILISATOR

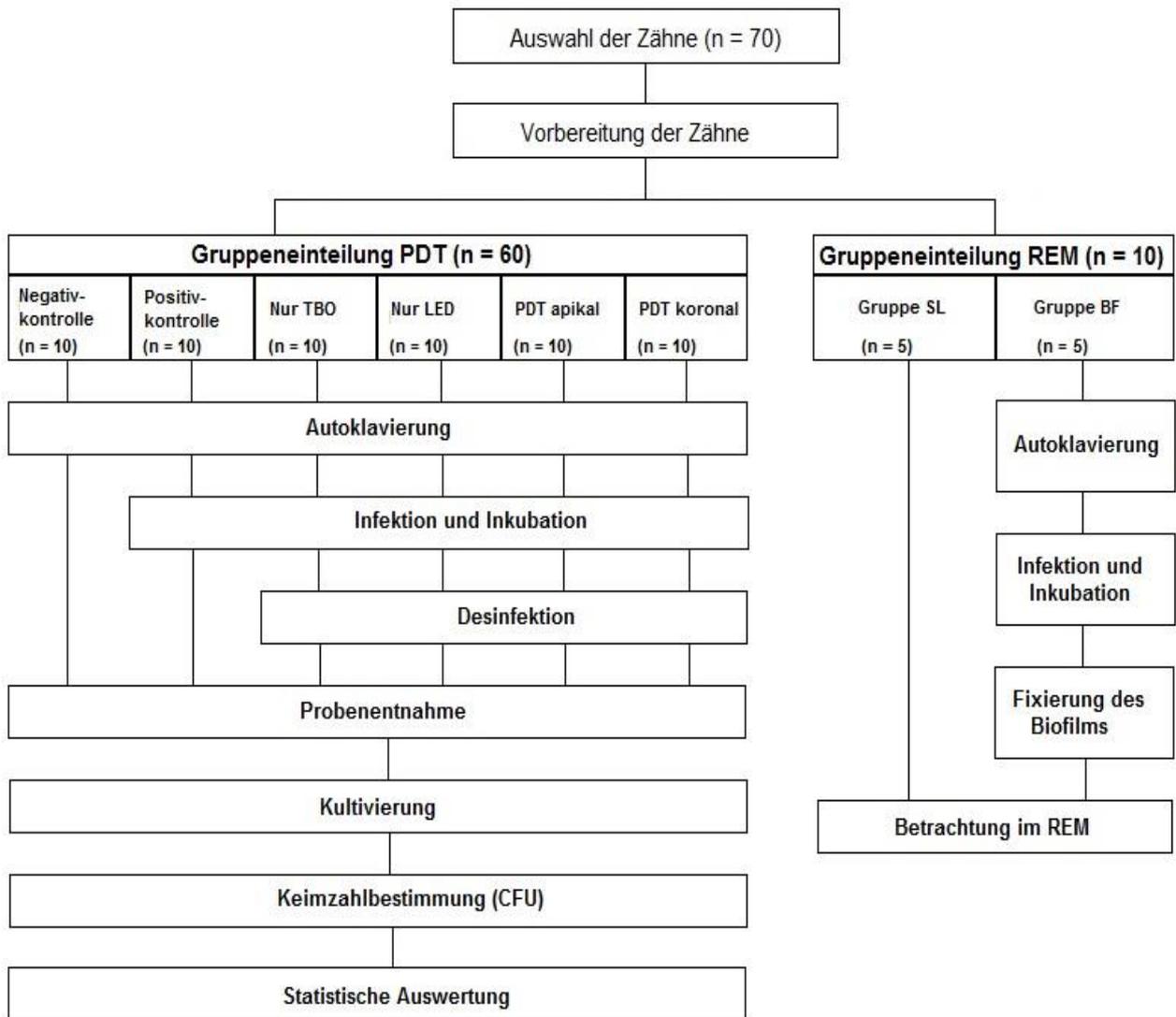


ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES VERSUCHSABLAUFS

TBO (TOLUIDINBLAU O), LED (LICHT- EMITTIERENDE- DIODE), PDT (PHOTODYNAMISCHE THERAPIE), SL (SMEAR LAYER), BF (BIOFILM), REM (RASTERELEKTRONENMIKROSKOP), CFU (COLONY FORMING UNITS)

3.2 VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

3.2.1 AUSWAHL UND VORBEREITUNG DER ZÄHNE

Für die Versuche wurden 70 einwurzelige menschliche Frontzähne und Prämolaren der bleibenden Dentition verwendet, die im Rahmen zahnärztlicher Eingriffe extrahiert wurden. Die Extraktion der Zähne stand in keinem Bezug zur Durchführung der vorliegenden Arbeit. Die ausgewählten Zähne mussten bestimmte Kriterien erfüllen (Tabelle 1).

TABELLE 1: AUSWAHLKRITERIEN DER VERSUCHSZÄHNE

Die Wurzeloberflächen wurden mit Küretten gereinigt, um Konkremente und parodontales Weichgewebe zu entfernen. Anschließend wurden die Zähne mit einem Diamantbohrer trepaniert und mithilfe eines Reamers der ISO- Größe 10 auf apikale Gängigkeit überprüft. Es wurden ausschließlich Zähne verwendet, bei denen maximal ein Reamer der ISO- Größe 20 bis zum Apex eingebracht werden konnte. Nach standardisierter Abmessung und Markierung der Zähne auf eine Wurzellänge von 15 mm wurden die Zahnkronen mit einer Trennscheibe abgetrennt. Die Arbeitslänge (AL) wurde auf 14 mm festgelegt. Es folgte die standardisierte maschinelle Präparation der Wurzelkanäle mit Gates- Glidden- Bohrern der Größe #4, #3 und #2 sowie mit FlexMaster®- Nickel- Titan- Instrumenten (NiTi) mit dem Endomotor Endo IT professional®. Unter Anwendung der *crowd down*- Technik wurden die Wurzelkanäle standardisiert bis zur Größe .02/40 präpariert. Die Reihenfolge der Instrumente sowie die Eindringtiefen bei der maschinellen Präparation wurden wie folgt festgelegt (Tabelle 2).

TABELLE 2: REIHENFOLGE DER INSTRUMENTE FÜR DIE WURZELKANALPRÄPARATION MIT ENTSPRECHENDER ARBEITSLÄNGE
GG (GATES- GLIDDEN- BOHRER), AL (ARBEITSLÄNGE), FM (FLEXMASTER®), # (INSTRUMENTENGRÖSSE)

• Instrument	• Arbeitslänge (14mm)
• GG #4	• AL minus 11 mm
• GG #3	• AL minus 8 mm
• GG #2	• AL minus 5 mm
• FM .06/30	• AL minus 3 mm
• FM .06/25	• AL minus 1 mm
• FM .04/30	• AL
• FM .02/35	• AL
• FM .02/40	• AL

Nach jedem Instrumentenwechsel erfolgte eine Wurzelkanalspülung mit 2 ml NaOCl 1 % auf AL, bei der eine 5 ml- Einwegspritze und eine sterile Kanüle verwendet wurden. Abschließend wurde mit 5 ml EDTA 17 % und 2 ml NaOCl 1 % für jeweils zwei Minuten gespült. Die Zähne wurden nach der Extraktion und zwischen den Arbeitsschritten bis zur Probenherstellung in thymolhaltigem Leitungswasser aufbewahrt, um sie vor Austrocknung zu schützen. Es wurden anschließend 60 der 70 Zahnwurzeln randomisiert ausgewählt und einzeln in Zylinder aus kaltpolymerisierenden Prothesenkunststoff Paladur® eingebettet (*Abbildung 5*). Dazu wurde der flüssige Kunststoff in selbst hergestellte Förmchen aus Silaplast Futur® eingefüllt. Anschließend wurden die Zahnwurzeln mithilfe einer sterilen Pinzette vertikal bis zur Schliffkante in den noch flüssigen Kunststoff eingebracht, so dass die gesamte äußere Wurzelfläche von Kunststoff umgeben war. Die Proben wurden bis zur vollständigen Aushärtung des Kunststoffes mit der Pinzette fixiert, wobei darauf geachtet wurde, dass die koronale Fläche mit dem offenen Kanallumen frei von Kunststoff blieb. Anschließend wurden alle 60 eingebetteten Zahnwurzeln für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Die restlichen zehn nicht eingebetteten Zahnwurzeln wurden für die Untersuchung im REM vorbereitet.



ABBILDUNG 5: EINGEBETTETE ZAHNWURZEL MIT STANDARDISIERT PRÄPARIERTEM WURZELKANAL

3.2.2 GRUPPENEINTEILUNG

Sechzig von insgesamt 70 Zahnwurzeln wurden randomisiert in sechs experimentelle Gruppen mit jeweils $n = 10$ für den Hauptversuch zur PDT eingeteilt (Nur TBO, Nur LED, PDT apikal, PDT koronal, Positiv- und Negativkontrolle). Die übrigen zehn Wurzeln wurden ebenfalls randomisiert in zwei Gruppen mit $n = 5$ für REM- Aufnahmen aufgeteilt (Gruppe SL, Gruppe BF) (Abbildung 4).

3.2.3 INFEKTION DER PROBEN

Für die bakterielle Infektion der sterilen Zahnwurzeln wurde der grampositive, fakultativ anaerobe Keim *E. faecalis* vom Stamm ATCC 29212 verwendet. Das Bakterium stammte aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Göttingen. Zunächst wurde eine Impfschlinge durch die isolierte *E. faecalis*- Kultur zur Aufnahme der Bakterien gestrichen. Anschließend wurden 10 ml *brain heart infusion* mit der Impfschlinge inokuliert und für 24 h bei 37°C inkubiert. Die Reinheit der Bakteriensuspension wurde durch eine Kultivierung für zwölf Stunden auf einer Blutagarplatte überprüft. Nach der Inkubation für 24 Stunden wurde die Gesamtzellzahl mit einem Spektrophotometer bestimmt. Für einen standardisierten Ausgangswert wurde

die Suspension in reiner BHI so verdünnt, dass ein Extinktionswert von 0,3 bei einer Wellenlänge von 600 nm erreicht wurde. Eine optische Dichte von 0,3 entspricht einer Infektionslösung mit der Bakterienmenge von $1,5 \times 10^8$ CFU pro ml. Diese Lösung wurde mit einer sterilen 2 ml- Einwegspritze aufgesaugt und mit einer Spülkanüle (NaviTip®) unter einer sterilen Abzugshaube in die Wurzelkanäle appliziert. Die standardisiert präparierten Wurzelkanäle wurden jeweils vollständig mit der Bakterien suspension gefüllt. Alle Testgruppen außer der Negativkontrolle wurden mit dieser Infektionslösung infiziert. Anschließend wurden die Proben bei 35°C für 72 Stunden inkubiert.

3.2.4 VORBEREITUNG DER PROBEN FÜR DIE REM- UNTERSUCHUNG

Für die Untersuchung im REM wurden die Proben in die **Gruppe SL** (*smear layer*) und **Gruppe BF** (Biofilm) unterteilt. In der **Gruppe SL** wurde die Entfernung der präparationsbedingten Schmierschicht auf der Wurzelkanalwand mithilfe der Spüllösungen EDTA (17 %) und NaOCl (1 %) überprüft. Die Infektion der Proben mit *E. faecalis* wurde in der **Gruppe BF** nachgewiesen.

Gruppe SL (n = 5)

Ein steriler Guttaperchastift wurde zur besseren Darstellung des Kanalverlaufs in den Wurzelkanal eingebracht. Die Wurzeln wurden mit der Trennscheibe in Längsrichtung soweit getrennt, bis nur noch eine minimale Restdentinschicht zum Kanallumen vorhanden war. Anschließend wurden die Wurzeln mit einem Hebel nach Bein in zwei Hälften gespalten. Die Zahnhälften wurden zum Trocknen in einen Exsikkator gegeben und anschließend auf Trägern mit der Wurzelaußenseite mit Sekundenkleber befestigt. Die Zahnhälften wurden auf der Wurzelinnenseite mit einem Sputter mit Gold- Palladium in einer Argon- Atmosphäre bedampft. Die Schichtdicke betrug dabei zwischen 40 bis 48 nm. Es erfolgte die REM- Auswertung der Proben bei 1500- facher Vergrößerung, wobei Mikrofotografien der Wurzelkanaloberflächen angefertigt wurden (*Abbildung 8*).

Gruppe BF (n = 5)

Die Zahnwurzeln wurden mit dem Kanallumen nach oben in Gewebekulturschalen mit Silaplast Futur® fixiert und wie oben beschrieben mit *E. faecalis* infiziert, inkubiert und ebenfalls in Hälften gespalten. Anschließend wurden die Wurzelhälften dreimal in jeweils frischem, physiologischem Natriumchlorid 0,9 % (NaCl) durch Schwenken gewaschen. Die Hälften wurden dann mit einem Fixationsgemisch aus 25 % Glutaraldehyd und 25 % Paraformaldehyd in 0,2 M Phosphatpuffer fixiert. Die Lösungen zur Fixierung wurden im Labor frisch angesetzt. Nach der Fixation wurden die Proben mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 80 %, 90 %, 95 % und absolutem Alkohol) entwässert und anschließend mit der *criticle point drying*- Methode getrocknet. Die Zahnhälften wurden dann wie in der **Gruppe SL** beschrieben auf Trägern befestigt, mit dem Sputter bedampft und im REM betrachtet. Es wurden Mikrofotografien der Wurzelkanaloberflächen mit 5000- facher Vergrößerung angefertigt (*Abbildung 9*).

3.2.5 HAUPTVERSUCH

**TABELLE 3: EINTEILUNG DER EXPERIMENTELLEN GRUPPEN
TBO (TOLUIDINBLAU O), LED (LICHT- EMITTIERENDE- DIODE), PDT (PHOTODYNAMISCHE THERAPIE), PS
(PHOTOSENSIBILISATOR)**

Positivkontrolle	Infektion, keine Desinfektion
Negativkontrolle	Keine Infektion, Desinfektion
Nur TBO	PS, kein LED- Licht
Nur LED	LED- Licht, kein PS
PDT apikal	PS, LED apikal mit 10 mm Eindringtiefe
PDT koronal	PS, LED koronal mit 5 mm Eindringtiefe

Positivkontrolle (n = 10)

Diese Proben wurden mit *E. faecalis* infiziert, es wurde keine desinfizierende Maßnahme durchgeführt

Negativkontrolle (n = 10)

In dieser Gruppe erfolgte keine Infektion der Proben. Die weitere Behandlung entsprach der bei **PDT apikal** (siehe unten) beschriebenen Vorgehensweise.

Nur TBO (n = 10)

Der PS (FotoSan Agent low®) ist zusätzlich in dem PDT- System enthalten. Der Wirkstoff des PS ist TBO (C₁₅H₁₆ClN₃S), welcher gebrauchsfertig in wässriger Lösung mit einer Konzentration von 100 µg/ml vorliegt. TBO wurde mit einer sterilen NaviTip® aus dem unmittelbar vor der Anwendung geöffneten Gefäß entnommen. TBO wurde von apikal nach koronal in den Wurzelkanal appliziert, um den Einschluss von Luftblasen zu vermeiden. Nach einer Einwirkdauer von zwei Minuten wurde dieser mit Papierspitzen aus dem Wurzelkanal entfernt.

Nur LED (n = 10)

Das PDT- System FotoSan® enthält eine LED- Lampe, welche rotes Licht mit einem *powerpeak* von 628 nm (Nennleistung 15 W, Ausgangsintensität 2.000 mW/cm²) aussendet und optische Fasern als austauschbare Einmaltips (EndoTips), welche auf das LED- Handstück gesteckt werden. Diese schmal zulaufenden Endotips haben einen Durchmesser von 500 µm mit einem Konus von 0,03 im apikalen Anteil und Markierungsrillen bei 5 und 8 mm (*Abbildung 6*). Die Proben wurden ohne die vorherige Applikation von TBO mit dem LED- Licht belichtet. Dazu wurde eine sterile EndoTip auf die LED- Lampe aufgesteckt und 10 mm tief in den Wurzelkanal eingebracht. Die Lampe wurde anschließend für zwei Intervalle à 30 Sekunden entsprechend den Herstellerangaben aktiviert. Für jede Probe wurde eine neue EndoTip verwendet.

PDT apikal (n = 10)

Die Wurzelkanäle der Proben wurden wie in der Gruppe **Nur TBO** mit TBO gefüllt und nach einer Einwirkdauer von zwei Minuten mit der LED- Lichtquelle wie in der Gruppe **Nur LED** bestrahlt. Die Eindringtiefe der Lichtquelle betrug dabei 10 mm. Um eine standardisierte Insertionstiefe zu gewährleisten, wurde die optische Faser bis zu einer

Markierung bei 10 mm eingebracht. Anschließend wurde TBO mit Papierspitzen entfernt (*Abbildung 6*).

PDT koronal (n = 10)

Die Wurzelkanäle wurden wie in **PDT apikal** behandelt, wobei die Insertionstiefe der LED- Lichtquelle in den Wurzelkanal 5 mm betrug.



ABBILDUNG 6: AKTIVIERTES LED- LICHT IM WURZELKANAL MIT OPTISCHER FASER

3.2.6 PROBENENTNAHME

Mithilfe einer Pipette wurden 60 sterile Eppendorf- Tubes® mit jeweils 1000 µl sterilem NaCl befüllt. Zur Probenentnahme wurden für jede Wurzel jeweils drei sterile Hedström- Feilen der ISO- Größen 35, 40 und 45 verwendet, mit denen durch zirkumferente Bearbeitung der Wurzelkanalwand bis auf AL Dentinspäne gewonnen wurden. Die Entnahme der Dentinspäne wurde pro Feile dreimal wiederholt. Nach jeder Anwendung wurde die Feile in das Eppendorf- Tube® eingetaucht, um die Späne von

der Feile in die Flüssigkeit zu übertragen. Alle drei Feilen wurden nach ihrer Anwendung in das Röhrchen überführt, welches entsprechend der Probennummer (1 bis 60) beschriftet und dicht verschlossen wurde. Anschließend wurde die Flüssigkeit in den Röhrchen für 30 Sekunden mit dem Vortexer durchmischt und die Hedström-Feilen mit einer sterilen Pinzette entfernt. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass alle Proben mit Ausnahme der Gruppe **Negativkontrolle** verdünnt werden mussten, um eine visuelle Auszählung der CFU zu ermöglichen. Die Gruppe **Positivkontrolle** wurde 1:200, **Nur TBO** und **Nur LED** 1:100 und **PDT apikal** und PDT koronal 1:50 jeweils mit NaCl verdünnt. Aus jedem Röhrchen wurden jeweils 50 µl Flüssigkeit mit einer 100 µl-Pipette entnommen und auf eine Blutagarplatte mit Columbia-Blut plattiert, wobei die Flüssigkeit im Röhrchen kurz vor der Entnahme nochmals für 30 Sekunden mit dem Vortexer durchmischt wurde. Anschließend wurde die Flüssigkeit mit sterilen 10 µl-Impfschlingen gleichmäßig auf den Agarplatten verteilt. Dieser Vorgang wurde für jede Probe dreimal wiederholt, so dass pro Zahnwurzel drei Platten mit jeweils 50 µl der gleichen Bakterienlösung kultiviert wurden. Die Agarplatten wurden für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Anzahl der CFU pro Platte visuell mithilfe einer mechanischen Zählhilfe ausgezählt. Um Verunreinigungen des mitgelieferten PS TBO auszuschließen, wurde eine Agarplatte mit 10 µl der PS-Lösung für 24 Stunden inkubiert. Die statistischen Analysen wurden mit der Statistical Analysis Software SAS9.2 durchgeführt. Die paarweisen Gruppenvergleiche wurden mit nicht-parametrischer Varianzanalyse (ANOVA) für Daten mit Messwiederholungen durchgeführt (Brunner et al. 2002). Das Signifikanzniveau liegt bei $\alpha = 5\%$. Die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde durch das Programm Statistica Version 10 vorgenommen. Sämtliche verwendeten Chemikalien, Materialien, Geräte und Laborprodukte sind im *Kapitel 7 Anhang Materialliste*.

4 ERGEBNISSE

4.1 ERGEBNISSE DES HAUPTVERSUCHS

Die Ergebnisse zeigen, dass die Gruppen **PDT apikal** und **PDT koronal** im Vergleich zur **Positivkontrolle** eine signifikante antibakterielle Wirkung aufwiesen ($p = 0,000$) (*Tabelle 5*). Für die Gruppe **PDT apikal** ergab sich ein Mittelwert von 12,5 CFU (*Tabelle 4*), was einer signifikanten Keimreduktion um 91 % entspricht ($p = 0,000$). Für die **PDT koronal** ergab sich ein Mittelwert von 15,1 CFU entsprechend einer signifikanten Keimreduktion um 89 % ($p = 0,000$). Der Mittelwert der CFU betrug in der **Positivkontrolle** 135,7 CFU, die **Negativkontrolle** wies keine Bakterienkolonien auf. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der antibakteriellen Wirksamkeit in Abhängigkeit von der Insertionstiefe der Lichtquelle in den Wurzelkanal. Der statistische Vergleich der beiden Gruppen **PDT apikal** und **PDT koronal** ergab einen nicht signifikanten p-Wert von 0,455. Die Anwendung von TBO ohne Lichtaktivierung (**Nur TBO**) führte im Vergleich zur **Positivkontrolle** zu einer signifikanten Keimreduktion um 71 % ($p = 0,001$). Der Unterschied zwischen der antibakteriellen Wirksamkeit bei alleiniger Anwendung von TBO und der PDT im apikalen bzw. koronalen Wurzel Drittel (**PDT apikal, PDT koronal**) war ebenfalls signifikant ($p = 0,024$). Bei der Gruppe **Nur LED** wurden im Mittel 154,3 CFU ausgezählt, wobei diese Gruppe im Vergleich zur **Positivkontrolle** keinen signifikanten Unterschied zeigte ($p = 0,540$). Die genannten Ergebnisse sind zusätzlich in einem Box Plot grafisch dargestellt (*Abbildung 7*).

TABELLE 4: MITTELWERTE DER EINZELNEN TESTGRUPPEN
TBO (TOLUIDINBLAU O), LED (LICHT- EMITTIERENDE- DIODE), PDT (PHOTODYNAMISCHE THERAPIE),
CFU (COLONY FORMING UNITS)

Testgruppe	Anzahl der Proben	Mittelwert der CFU
Positivkontrolle	30	135,7
Negativkontrolle	30	0
Nur TBO	30	39,4
Nur LED	30	154,3
PDT apikal	30	12,5
PDT koronal	30	15,1

TABELLE 5: PAARVERGLEICHE DER EINZELNEN TESTGRUPPEN
DIE P-WERTE WURDEN MIT BONFERRONI- HOLM KORRIGIERT. TBO (TOLUIDINBLAU O), LED (LICHT-
EMITTIERENDE DIODE), PDT (PHOTODYNAMISCHE THERAPIE)

Paarvergleich	wald.p	wald.p.adjusted	signifikant
Positivkontrolle vs. Nur TBO	0,000	0,001	Ja
Positivkontrolle vs. Nur LED	0,540	0,540	Nein
Positivkontrolle vs. PDT apikal	0,000	0,000	Ja
Positivkontrolle vs. PDT koronal	0,000	0,000	Ja
PDT apikal vs. PDT koronal	0,227	0,455	Nein
Nur TBO vs. Nur LED	0,000	0,000	Ja
Nur TBO vs. PDT apikal	0,007	0,024	Ja
Nur TBO vs. PDT koronal	0,006	0,024	Ja

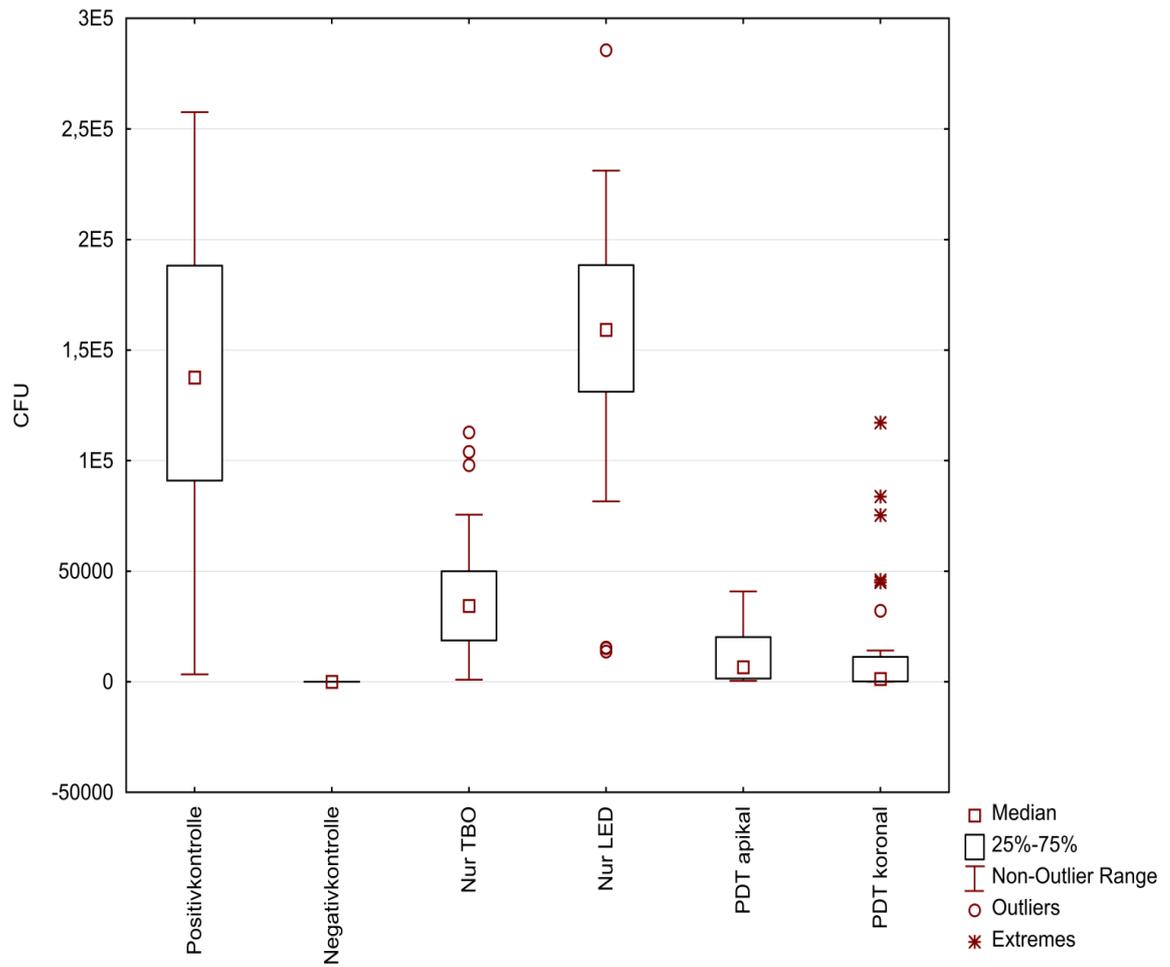


ABBILDUNG 7: BOX PLOT- DIAGRAMM ZUR DARSTELLUNG DER KOLONIENBILDENDEN EINHEITEN (CFU) VON *E. FAECALIS* IN DEN EINZELNEN TESTGRUPPEN

4.2 ERGEBNISSE DER RASTERELEKTRONENMIKROSKOP UNTERSUCHUNG

Die zehn Wurzelhälften der **Gruppe SL** wurden bei 1500- facher Vergrößerung im REM betrachtet. Es wurden Mikrofotografien in verschiedenen Regionen jeder Wurzelhälfte angefertigt. Die Begutachtung der Fotografien zeigte, dass die präparationsbedingte Schmierschicht durch die Spüllösungen EDTA 17 % und NaOCl 1 % effektiv entfernt wurde, da die Öffnungen der Dentintubuli deutlich freiliegen und nicht von einer Schmierschicht bedeckt sind (*Abbildung 8*).

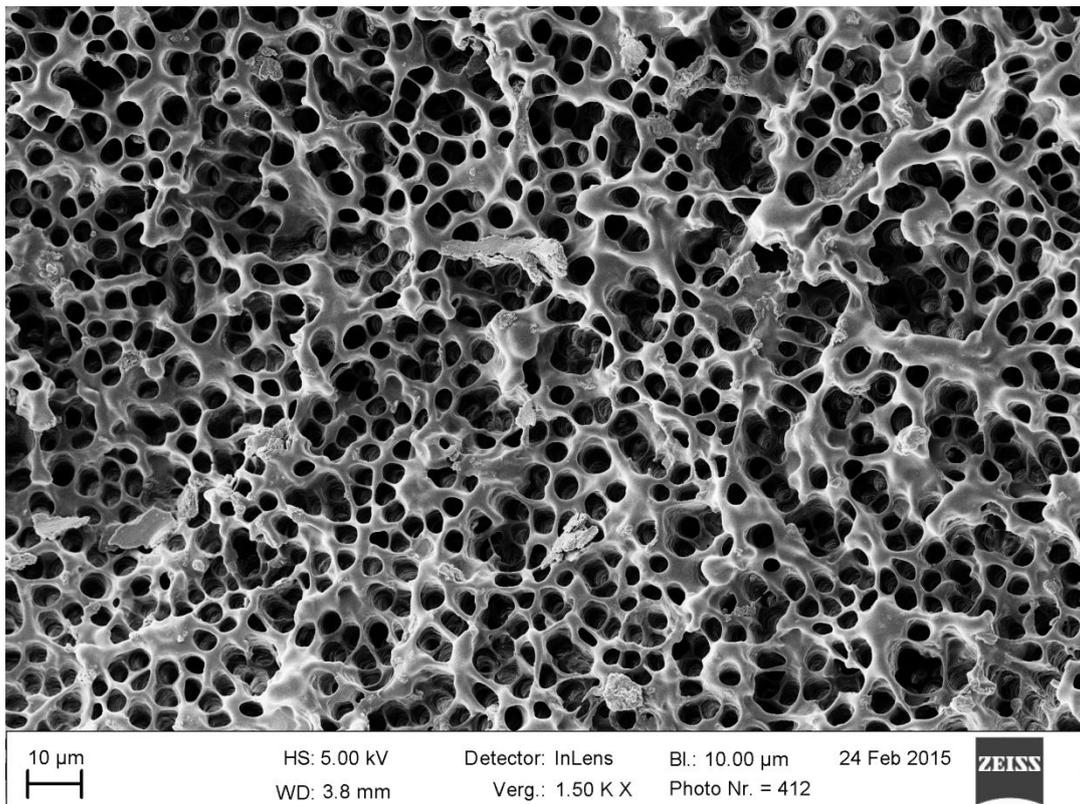


ABBILDUNG 8: REM- AUFNAHME DER WURZELOBERFLÄCHE MIT FREIGELEGTE DENTINTUBULI NACH ENTFERNUNG DER SCHMIERSCHICHT BEI 1500- FACHER VERGRÖSSERUNG (RÖDIG ET AL. 2016)

Die Wurzelhälften der **Gruppe BF** wurden bei 5000- facher Vergrößerung betrachtet und dienten dem Nachweis der Infektion der Proben mit *E. faecalis*. Bei Betrachtung der Aufnahme waren biofilmartige Strukturen und Mikrokolonien des Bakteriums *E. faecalis* zu erkennen. Die homogene Verteilung auf der Wurzeloberfläche als auch die typische Penetration der Bakterien in die Dentintubuli war deutlich erkennbar (*Abbildung 9*).

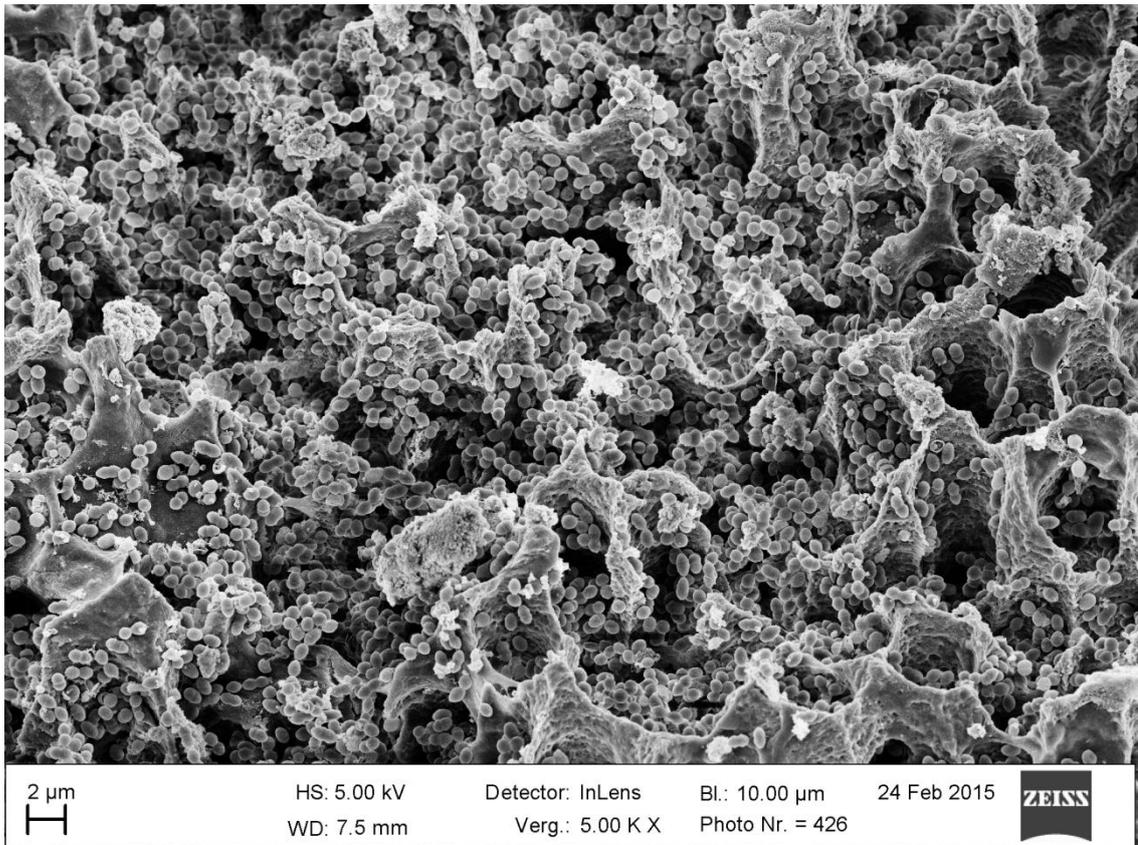


ABBILDUNG 9: REM- AUFNAHME DER WURZELOBERFLÄCHE NACH INFREKTION MIT *E. FAECALIS* BEI 5000- FACHER VERGRÖSSERUNG (RÖDIG ET AL. 2016)

5 DISKUSSION

5.1 DISKUSSION DER METHODE

5.1.1 VERSUCHSAUFBAU UND PROBENMATERIAL

Der Versuchsaufbau der Studie wurde in mehreren Vorversuchen entwickelt und entspricht in einigen Punkten den Versuchsanordnungen von Rios et al. (2011), Estrela et al. (2007) und Soukos et al. (2006). Die in vielen Studien zur PDT getesteten Protokolle sind sehr aufwendig und zeitintensiv. Daher wurde ein den Herstellerangaben des PDT- Systems entsprechender Versuchsablauf angewendet, der klinisch in einem praktikablen Umfang durchgeführt werden kann. Das Einbringen des PS in den Wurzelkanal mit einer Einwirkdauer von zwei Minuten, die Belichtung für 60 Sekunden zur Aktivierung des PS und die anschließende Entfernung der Farbstofflösung mit Papierspitzen hat somit eine maximale Anwendungsdauer von drei bis vier Minuten. In allen Testgruppen wurde die Anwendungsdauer standardisiert, um den antibakteriellen Effekt auf *E. faecalis* bestimmen und die Ergebnisse vergleichen zu können.

Als Probenmaterial wurden menschliche einwurzelige Zähne mit geraden Wurzeln ausgewählt, die im Rahmen zahnärztlicher Behandlungen extrahiert wurden. Die Gründe für die Extraktionen standen in keinem Zusammenhang mit der vorliegenden Untersuchung. In vielen *in vitro*- Modellen hat sich der Einsatz humaner Zähne bewährt (Meire et al. 2012; Ng et al. 2011; Souza et al. 2010; Foschi et al. 2007), da sie, im Gegensatz zu künstlichen Prüfkörpern oder bovinen Zähnen, der klinischen Situation am ehesten entsprechen. Die ausgewählten geraden Zähne mit rundem Kanalquerschnitt wurden durch Abtrennen der Zahnkrone auf eine identische Wurzellänge gekürzt. Obwohl dieses Kürzen nicht der klinischen Situation entspricht, erlaubt es jedoch eine Standardisierung der Prüfkörper (Barletta et al. 2007). Die Wurzelkanäle wurden mit einer festgelegten Sequenz von NiTi- Instrumenten bis zur gleichen AL präpariert. Die natürliche Wurzelkanalmorphologie der Zähne wurde anhand der vorliegenden Ein- und Ausschlusskriterien und der beschriebenen Methodik weitestgehend standardisiert. Das Probenmaterial war daher für die vorliegende Fragestellung geeignet.

5.1.2 TESTBAKTERIUM *ENTEROCOCCUS FAECALIS* UND BIOFILMENTWICKLUNG

Als Testbakterium wurde der fakultativ anaerobe, grampositive *E. faecalis* verwendet. Dieser Keim zeigt eine starke Resistenz gegenüber endodontischen Behandlungsmaßnahmen und wird mit persistierenden apikalen Parodontitiden in Verbindung gebracht (Barbosa-Ribeiro et al. 2016; Wang et al. 2012a). *E. faecalis* ist aufgrund seiner Eigenschaften ein geeigneter Keim für *in vitro*-Studien. Er besitzt die Fähigkeit, tief in die Dentintubuli einzudringen und sich innerhalb des Wurzelkanals biofilmartig zu organisieren (Vaziri et al. 2012). Aufgrund seiner starken Resistenz gegen äußere Einflüsse, zum Beispiel pH- oder Temperaturschwankungen oder das Fehlen einer Nahrungsquelle über längere Zeit, ist ein Absterben der Bakterien während der Versuchsdurchführung nahezu ausgeschlossen. Außerdem lässt er sich auf vielen gebräuchlichen Nährmedien gut kultivieren. Es entstehen circa 1 mm große, gewölbte Kolonien auf den Nährböden, die einfach voneinander abzugrenzen sind und so die Auszählung zur Auswertung der Ergebnisse erleichtern. Die überwiegende Anzahl der Studien zur PDT wurde ebenfalls mit einem Monospezies-Biofilm aus *E. faecalis* in extrahierten Zähnen durchgeführt (Pinheiro et al. 2016; Tennert et al. 2014; Yao et al. 2012; Rios et al. 2011; Schlafer et al. 2010; Upadya und Kishen 2010; Meire et al. 2009). Anhand mehrerer Vorversuche wurde die Inkubationszeit für diesen Versuchsaufbau entwickelt. Die Inkubationszeiten variieren in den meisten Studien sehr stark. Die Wurzelkanäle wurden von zwei Tagen (Vaziri et al. 2012; Meire et al. 2009; Seal et al. 2002) bis zu mehreren Wochen inkubiert (Lin et al. 2013; Cheng et al. 2012; Haapasalo und Ørstavik 1987). In der vorliegenden Studie wurden daher Vorversuche mit Inkubationszeiten von 48 Stunden, 72 Stunden, 120 Stunden, 7 Tagen und 14 Tagen durchgeführt. Anschließend wurden jeweils Proben gewonnen. Es zeigte sich, dass nach 72 Stunden eine optimale Infektion mit *E. faecalis* stattfand, da die Keimzahlen bei einer Inkubationsdauer von 120 Stunden, 7 Tagen und 14 Tagen wieder rückläufig waren. Bei der Inkubation über 48 Stunden lagen geringere Keimzahlen als nach 72 Stunden vor, so dass eine Inkubationsdauer von 72 Stunden für den Versuch ausgewählt wurde. Man kann davon ausgehen, dass es sich dabei um die Entstehung eines jungen Biofilms handelt (Wang et al. 2012b), der für klinische Situationen durchaus repräsentativ ist. Infektionen des Wurzelkanals mit *E. faecalis* können *in vivo* während

einer Wurzelkanalbehandlung auftreten und so innerhalb kurzer Zeit zur Entstehung eines jungen Biofilms führen (Zehnder und Guggenheim 2009). Viele Autoren haben ebenfalls eine Inkubationszeit von 72 Stunden zur Entwicklung eines jungen Biofilms gewählt (Tennert et al. 2014; Garcez et al. 2013b; Fimple et al. 2008; Soukos et al. 2006; Foschi et al. 2007; Garcez et al. 2007). Zum Nachweis des Biofilms wurden nach der Inkubation REM- Aufnahmen angefertigt. In *Abbildung 9* ist eine dichte Besiedlung der Wurzelkanalwand sowie die Penetration von *E. faecalis* in die Dentintubuli zu erkennen, was auf die erfolgreiche Formation eines jungen Monospezies- Biofilms schließen lässt (Wang et al. 2012b). Die Positivkontrolle bestätigte neben der REM- Untersuchung ebenfalls die erfolgreiche Infektion mit *E. faecalis*.

5.1.3 BELICHTUNG UND PHOTOSENSIBILISATOR

In der überwiegenden Anzahl der Untersuchungen zur PDT in der Endodontie wurden klassische hochenergetische Laser oder niedrigenergetische Diodenlaser verwendet (Soares et al. 2016; Garcez et al. 2013b; Bago et al. 2013; Cheng et al. 2012; Meire et al. 2012; Foschi et al. 2007; Bonsor et al. 2006; Seal et al. 2002). Klassische hochenergetische Laser beinhalten das Risiko einer Hitzeschädigung des Zahnhalteapparates und des umliegenden Gewebes (Asnaashari and Safavi 2013; Kimura et al. 2000; Khan et al. 1997; Bahcall et al. 1992). Um diese unerwünschten Nebenwirkungen zu minimieren, wurden niedrigenergetische Diodenlaser entwickelt, die Licht in einem Wellenlängenbereich zwischen 625 nm und 805 nm aussenden (Siddiqui et al. 2013). Alternativ zur Anwendung von Lasern steht die Anwendung einer LED- Lichtquelle, wie sie auch in dieser Studie verwendet wurde. Die Vorteile liegen darin, dass bei Anwendung von LED- Licht im Gegensatz zu Laserlicht eine Schädigung des periapikalen Gewebes ausgeschlossen werden kann und dieses eine höhere Effektivität im Vergleich zu einem Diodenlaser hat (Asnaashari et al. 2016). Ein weiterer Vorteil gegenüber klassischen Lasersystemen ist, dass ein LED- System kostengünstiger und einfacher in der Handhabung und somit für klinische Situationen geeigneter ist (Rios et al. 2011, Schlafer et al. 2010). Die Belichtungsdauer lag in unserer Untersuchung bei 2 x 30 Sekunden, da diese Zeit laut Herstellerangaben für eine effektive Wirksamkeit des Systems ausreichend ist (CMS Dental). Es stellte sich die Frage, ob eine längere

Belichtungsdauer den antibakteriellen Effekt möglicherweise erhöhen könnte. In einer Studie mit unterschiedlichen Belichtungsdauern von 60 Sekunden bis 5 Minuten war die Anwendungsdauer von 60 Sekunden am wenigsten effektiv (Xhevdet et al. 2014). Dabei wurde allerdings anstelle einer LED- Lichtquelle ein Laser- System (HELBO®Endo) verwendet, was der Grund für die unterschiedlichen Resultate sein könnte. In einer Studie, bei der ebenfalls ein LED- System (Aseptim®Plus) verwendet wurde, führte eine doppelt so hohe Belichtungsdauer (120 Sekunden) zu keiner höheren Keimzahlreduktion (Muhammad et al. 2014). George und Kishen (2007) konnten hingegen zeigen, dass die Überlebensrate von *E. faecalis* mit längerer Belichtungsdauer von einer Minute bis hin zu 20 Minuten sinkt. Es bleibt somit fraglich, ob eine längere Belichtungsdauer einen zusätzlichen antibakteriellen Effekt erzielen kann.

Der PS zur Aktivierung der photodynamischen Reaktion TBO wurde in vorangegangenen Studien häufig verwendet, jedoch in unterschiedlichen Konzentrationen. Der antibakterielle Effekt der PDT kann auch von der Konzentration des PS abhängen (Seal et al. 2002). In der vorliegenden Untersuchung wurde mit der oft verwendeten Konzentration von 100 µg/ml gearbeitet (Rios et al. 2011; Schlafer et al. 2010; Seal et al. 2002). Der PS wurde in dieser Konzentration vom Hersteller mitgeliefert (FotoSan Agent low®) und liegt gebrauchsfertig in niedriger Viskosität speziell für die Anwendung im Wurzelkanal vor. Um neben der gleichen Konzentration auch die gleiche Menge der Farbstofflösung zu gewährleisten, wurde jede Wurzel bis zum Kanaleingang mit TBO gefüllt. Aufgrund der Standardisierung der Wurzelkanalpräparation ist davon auszugehen, dass in allen Kanälen eine annähernd vergleichbare Menge PS vorhanden war. In einigen Studien wurde der PS zu Sterilisationszwecken vor der Verwendung durch eine Membran gefiltert. Da die Farbstoffmoleküle und mögliche Mikroorganismen unterschiedliche Größen haben, fand mithilfe der Membran so eine Filterung des Farbstoffs statt (Meire et al. 2009; Seal et al. 2002). Die Sterilität des PS wurde in der vorliegenden Studie überprüft, indem Proben des TBO auf Blutagarplatten appliziert und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert wurden. Ein mögliches Bakterienwachstum konnte ausgeschlossen werden. Zu keiner Zeit des Versuchsablaufs lag eine Kontamination der Farbstofflösung vor.

5.1.4 PROBENGWINNUNG

Die Probengewinnung durch mechanisches Abfeilen des Wurzelkanalodontins mit Wurzelkanalinstrumenten ist zu diskutieren, da in einigen anderen Studien Papierspitzen zur Probengewinnung verwendet wurden (Garcez et al. 2013a; Souza et al. 2010; Seal et al. 2002). Eine weitere Methode zur Probengewinnung war das Durchspülen des Wurzelkanals mit anschließendem Aufsammeln der Flüssigkeit (Ng et al. 2011; Meire et al. 2009; Foschi et al. 2007; Soukos et al. 2006). Der Nachteil dieser beiden Methoden liegt jedoch darin, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit nur planktonische Mikroorganismen gewonnen werden. Es ist davon auszugehen, dass Papierspitzen keine Bakterien aus dem Biofilmverbund und aus den Dentintubuli aufsaugen, sondern eher planktonische Zellen. Diese Zellen sind nicht repräsentativ für die Umgebung eines Wurzelkanals, in dem sich bakterielle Biofilme bilden. Da diese Art der Probengewinnung jedoch häufig in früheren Studien durchgeführt wurde, fanden für die vorliegende Untersuchung weitere Vorversuche zur Probengewinnung statt. Die Ergebnisse der Testgruppe, bei der die Proben mit Papierspitzen entnommen wurden, zeigten insgesamt deutlich niedrigere Keimzahlen auf als die, bei der mit Hedström-Feilen gearbeitet wurde. Durch das mechanische Abfeilen der Wurzelkanalwand mit Handfeilen wurden Dentinspäne gewonnen, die eine wesentlich größere Anzahl von Bakterien enthielten. Es wurden drei Feilen in aufsteigender Größe verwendet (Hedström-Feilen ISO 35, 40, 45), so dass auch die Entnahme von Bakterien aus tieferen Dentinschichten gewährleistet werden konnte. Dieser Vorversuch bestätigte die Methodik der Probengewinnung des späteren Versuchsaufbau.

5.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

5.2.1 EFFEKTIVITÄT DER PHOTODYNAMISCHEN THERAPIE

Das Ziel einer endodontischen Behandlung ist eine höchstmögliche Keimzahlreduktion (Molander et al. 2007; Sjogren et al. 1997; Byström und Sundqvist 1981). Viele *in vitro*- und *in vivo*- Studien belegen die antibakterielle Wirksamkeit der PDT in infizierten Wurzelkanälen (Firmino et al. 2016; Garcez et al. 2013b; Vaziri et al. 2012; Rios et al. 2011; Schlafer et al. 2010; Foschi et al. 2007; Soukos et al. 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden *in vitro*- Untersuchung zeigen, dass die PDT eine signifikante antimikrobielle Wirksamkeit auf einen intrakanalären *E. faecalis*- Biofilm mit einer Keimreduktion von 91 % besitzt. Auch andere Autoren konnten bei der Anwendung von LED- Systemen zur PDT eine signifikante antibakterielle Effektivität auf Bakterien- suspensionen und in infizierten Wurzelkanälen feststellen (Rios et al. 2011, Schlafer et al. 2010). In der vorliegenden Untersuchung führte die PDT zwar zu einer signifikanten Reduktion der Keimzahl, eine vollständige Keimfreiheit wurde jedoch nicht erreicht, was mit den Ergebnissen anderer Autoren übereinstimmt (Ng et al. 2011, Meire et al. 2009, Bergmans et al. 2008, Soukos et al. 2006). Vermutlich ist die Penetration des PS innerhalb der Biofilmstruktur limitiert, so dass eine Anlagerung an die Zellmembran von Bakterien in tieferen Schichten des Biofilms nicht stattfindet (Ng et al. 2011). Ein weiterer Grund für die limitierte photodynamische Inaktivierung in Biofilmen könnte sein, dass in den Dentintubuli und Nischen des Wurzelkanalsystems eine ungenügende Sauerstoffkonzentration für die photochemische Reaktion vorhanden ist (Souza et al. 2010). Eine ausreichende Konzentration von Sauerstoffmolekülen ist aber Voraussetzung für die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies, welche maßgeblich für die bakterizide Wirkung der PDT verantwortlich sind (Garcez et al. 2013a). Ein weiterer limitierender Faktor könnte die komplexe Anatomie des Wurzelkanalsystems sein, die sowohl das Eindringen des PS als auch des Lichtes in tiefere Bereiche verhindert. Daher ist davon auszugehen, dass in einigen Bereichen des Endodonts, wie beispielweise in Isthmen, Nischen und Ramifikationen, eine bakterielle Kontamination trotz PDT bestehen bleibt. Die überwiegende Anzahl der bis jetzt untersuchten Methoden zur PDT führten zu einer signifikanten Keimreduktion, die mit den Ergebnissen der

vorliegenden Studie vergleichbar ist (Bago et al. 2016; Pinheiro et al. 2016; Tennert et al. 2015; Vaziri et al. 2012; 2004; Vaziri et al. 2012; Ng et al. 2011; Rios et al. 2011; Schlafer et al. 2010; Fimple et al. 2008; Foschi et al. 2007; Garcez et al. 2007; Soukos et al. 2006). Da in den meisten Untersuchungen zur PDT jedoch kein erhöhter antibakterieller Effekt im Vergleich zur herkömmlichen chemo- mechanischen Präparation festgestellt werden konnte, empfiehlt die Mehrheit der Autoren die PDT als ergänzende Therapiemethode zur konventionellen Wurzelkanalbehandlung (Chrepa et al. 2014; Xhevdet et al. 2014; Garcez et al. 2013a; Ng et al. 2011; Rios et al. 2011; Bergmans et al. 2008; Fimple et al. 2008; Garcez et al. 2008; Soukos et al. 2006; Seal et al. 2002). Auch in einigen *in vivo*- Studien wurde eine signifikante antimikrobielle Wirkung der PDT nachgewiesen (Asnaashari et al. 2016; Silva et al. 2012; Garcez et al. 2008; Bonsor et al. 2006). In einer Untersuchung von Garcez et al. (2008) wurde die PDT mit einer konventionellen endodontischen Therapie in zwei Behandlungsterminen kombiniert. Es zeigte sich, dass schon in der ersten Sitzung die PDT zusätzlich eine signifikante Bakterienreduktion im Vergleich zur alleinigen Anwendung der konventionellen Therapie in der ersten Sitzung erzielen konnte. Darüber hinaus führte die wiederholte Anwendung der PDT in einem zweiten Behandlungstermin zu einer weiteren signifikanten Reduktion der Bakterien. Die Autoren empfehlen daher zur herkömmlichen endodontischen Therapie eine adjuvante Anwendung der PDT. In einer weiteren klinischen Untersuchung wurde die PDT ebenfalls als zusätzliche Maßnahme während der konventionellen chemo- mechanischen Therapie verwendet (Bonsor et al. 2006). Zuerst wurden die Wurzelkanäle konventionell mechanisch präpariert und mit einem Chelator (20 % Zitronensäure) gespült. Anschließend erfolgte die Anwendung der PDT mit Toloniumchlorid als PS und einer Lichtquelle (633 ± 2 nm, 100 mW) für zwei Minuten. Diese Methode zeigte einen signifikant höheren antibakteriellen Effekt der PDT im Vergleich zur konventionellen chemo- mechanischen Präparation mit NaOCl. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass der Chelator eine biofilmzerstörende Wirkung aufweist, so dass die PDT effektiver wirken kann. Sie geben diese Methode als Alternative zur konventionellen NaOCl- Spülung innerhalb des üblichen Desinfektionsprotokolls an. Auch andere Autoren gaben an, dass eine mechanische Zerstörung der Biofilmstruktur oder Spülung des Wurzelkanals mit Chelatoren vor Anwendung der

PDT zu einem erhöhten antibakteriellen Effekt der PDT führt (Meire et al. 2009, Bergmans et al. 2008, Bonsor et al. 2006). Eine gesteigerte Effektivität der PDT auf einen intrakanalären Biofilm konnte durch Lösen des PS in einem Glycerol-, Ethanol-, Wasser- Gemisch nachgewiesen werden (Upadya und Kishen 2010). Weiterhin wird die Anwendung von Ultraschallwellen zur Aktivierung des PS diskutiert. Das Ziel ist dabei die Verteilung und Penetration des PS und die Sauerstoffkonzentration im Wurzelzement zu erhöhen (Ng et al. 2011). Ebenso werden andere PS untersucht, beispielsweise aus der Gruppe der Fluoreszin- Derivate (Eosin Y, Erythrosin, Bengalrosa) (Marinic et al. 2015). Es wird vermutet, dass Fluoreszin- Derivate als PS bei der PDT über eine verbesserte antimikrobielle Wirkung auf orale Biofilme verfügen als herkömmliche PS wie zum Beispiel MB. Es konnte gezeigt werden, dass Erythrosin im Vergleich zu MB einen signifikant höheren antibakteriellen Effekt auf einen 288 Stunden inkubierten polymikrobiellen Biofilm mit einer Dicke von 200 µm aufwies (Wood et al. 2006). In einer Studie von Shrestha et al. (2015) wurden Lipopolysaccharide in Bakterienzellen gezielt mit chitosan- konjugierten- bengalrosa Nanopartikeln (CSRBnps) inaktiviert. Dazu wurden Lipopolysaccharide aus *Pseudomonas aeruginosa* mit CSRBnps als PS photoaktiviert. Es zeigte sich, dass die PDT mit Verwendung von CSRBnps eine signifikante, selektive Inaktivierung von bakteriellen Endotoxinen erzielen kann. Für eine weitere Verbesserung der antimikrobiellen Effektivität der PDT *in vivo* müssen jedoch Parameter wie die Lichtquelle, der PS und dessen Penetration sowie die Lichtübertragungstechnik noch weiter optimiert werden (Foschi et al. 2007, Soukos et al. 2006).

5.2.2 ANTIBAKTERIELLE WIRKUNG DES PHOTOSENSIBILISATORS

In der vorliegenden Studie führte die alleinige Anwendung des PS TBO ohne Aktivierung mit der LED- Lichtquelle bereits zu einer signifikanten Reduktion der Bakterien um 71 % im Vergleich zur Positivkontrolle. Usacheva et al. (2001) konnten bei einem Vergleich der Wirkung von MB und TBO auf verschiedene Bakteriensuspensionen zeigen, dass beide PS eine signifikante Dunkeltoxizität gegen *E. faecalis* aufweisen. Dabei steigerte sowohl die Erhöhung der Konzentration als auch eine verlängerte Einwirkdauer den Effekt. Man geht davon aus, dass insbesondere TBO über ein

gewisses Energiepotential verfügt, welches auch ohne Lichtaktivierung zu Schäden in der Bakterienmembran führen kann (Usacheva et al. 2001). In einer vergleichbaren *in vitro*-Studie einer anderen Arbeitsgruppe, bei der das gleiche PDT-System wie in dieser Untersuchung verwendet wurde, führte die alleinige Anwendung von TBO nach einer Einwirkzeit von nur 30 Sekunden ebenfalls zu einer signifikanten Bakterienreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe (Rios et al. 2011). Es liegen jedoch auch Studien vor, bei denen gar kein oder lediglich ein geringer antibakterieller Effekt des PS festgestellt wurde (Schlafer et al. 2010; Bergmans et al. 2008; Fimple et al. 2008; Seal et al. 2002). Da TBO in der vorliegenden Untersuchung eine hohe bakterizide Wirkung aufwies, stellte sich die Frage, inwieweit die Lichtaktivierung des PS dessen antibakterielle Wirkung steigern kann. Beim Vergleich der entsprechenden experimentellen Gruppen zeigte sich, dass die Lichtaktivierung des PS nur zu einer signifikant höheren Keimreduktion um 20 % im Vergleich zur alleinigen Anwendung des PS (71 %) führte. Diesen Ergebnissen zufolge liegt der hauptsächliche Effekt der antibakteriellen Wirkung des getesteten PDT-Systems in der antibakteriellen Wirksamkeit des PS. Da die PDT bei der kombinierten Anwendung von PS und Lichtaktivierung jedoch eine signifikant höhere antibakterielle Effektivität aufwies als bei alleiniger Verwendung des PS, ist die Anwendung des Systems entsprechend den Herstellerangaben mit beiden Komponenten PS und LED-Licht empfehlenswert.

5.2.3 UNTERSCHIEDLICHE INSERTIONSTIEFEN DER OPTISCHEN FASER

Die Desinfektion des Wurzelkanals ist entscheidend für den langfristigen Erfolg einer endodontischen Therapie (Sundqvist et al. 1998; Haapasalo und Ørstavik 1987). Die chemo-mechanische Aufbereitung des Wurzelkanalsystems sollte dabei immer möglichst bis zum *Foramen physiologicum* stattfinden (Hülsmann 2008), da verbleibende Keime in diesem Bereich maßgeblich für Behandlungsmisserfolge oder chronische apikale Parodontitiden verantwortlich sind (Nair 2006). Desinfektionsmaßnahmen werden durch die Komplexität des Endodonts erschwert, da vor allem der apikale Bereich des Wurzelkanals akzessorische Kanäle, Anastomosen und Ramifikationen aufweist (Chen et al. 2015; Nair 2006). Die meisten Lichtübertragungssysteme zur PDT im Wurzelkanal sind zwar so gestaltet, dass sie in den Wurzelkanal inseriert wer-

den können, eine Penetration in den apikalen Bereich ist jedoch aufgrund der Kanalkrümmung oder des apikalen Durchmessers des Lichtleiters meist nicht möglich. In dieser Studie wurde die optische Faser unterschiedlich tief in den Wurzelkanal eingeführt (5 mm und 10 mm) und bei der Aktivierung nicht bewegt. Eine Insertion auf eine Tiefe von 10 mm war möglich, da die Zahnkronen abgetrennt worden waren. Das bedeutet, dass die optische Faser bis in das apikale Drittel des Wurzelkanals inseriert werden konnte. In der klinischen Situation mit gleicher Wurzellänge wäre dies aufgrund der noch vorhandenen Zahnkrone nicht möglich. Es stellte sich demnach die Frage, ob eine signifikante Keimreduktion durch die PDT auch dann erzielt wird, wenn die Lichtquelle aufgrund der Wurzelkanalanatomie nicht bis in den apikalen Bereich eingebracht werden kann und ob eine Diffusion des Lichtes durch die optische Faser möglicherweise ausreichend ist. Daher war die Hauptfragestellung der vorliegenden Studie, inwieweit unterschiedliche Insertionstiefen der LED- Lichtquelle im Wurzelkanal eine Auswirkung auf die antibakterielle Wirksamkeit der PDT haben. Die Ergebnisse zeigten, dass die Insertionstiefe in geraden Wurzelkanälen mit Anwendung einer optischen Faser als Lichtdiffusor keinen signifikanten Effekt auf die antibakterielle Wirkung der photodynamischen Therapie hat.

Bis jetzt liegen nur wenige *in vivo*- oder *in vitro*- Untersuchungen mit verschiedenen Insertionstiefen einer LED- Lichtquelle im Wurzelkanal vor. Es gibt aber ähnliche Ansätze einiger Autoren, welche einen vergleichenden Überblick erlauben. Bago et al. (2013) führten in ihren Versuchen unterschiedliche Anwendungstechniken mit einem Diodenlaser durch. In einer Testgruppe wurde der Laser bei der Aktivierung für 60 Sekunden spiralförmig von apikal nach zervikal bewegt, in der anderen Gruppe auf AL belassen. Die unterschiedlichen Anwendungstechniken zeigten keine signifikanten Unterschiede und führten zu einer Bakterienelimination von 99,99 %. In einer Untersuchung von Nunes et al. (2011) wurde die PDT mit und ohne optischer Faser *in vitro* anhand von einkanaligen, mit *E. faecalis* infizierten Zähnen durchgeführt. Die Lichtquelle war ein Diodenlaser (660 nm, 100 mW). In einer Testgruppe wurde eine intrakanaläre optische Faser (216 µm Durchmesser) bis auf AL gebracht und während der Lichtaktivierung mit spiralförmigen Bewegungen bis zum Kanaleingang bewegt. In der anderen Testgruppe wurde der Diodenlaser mit einem 600 µm- Aufsatz nur an den

Kanaleingang gehalten. Die tiefe Insertion führte in dieser Untersuchung zu keinem signifikanten Unterschied im Vergleich zur Belichtung des Kanaleingangs, was mit dem Ergebnis dieser Studie ähnlich ist. Nunez et al. (2011) untersuchten den antibakteriellen Effekt der PDT auf *E. faecalis* mit Licht im apikalen Drittel des Wurzelkanals im Vergleich zur Belichtung des Kanaleingangs. Die PDT führte in allen Testgruppen zu einer signifikanten Bakterienreduktion von mehr als 99 % unabhängig von der Belichtungstiefe. Die Ergebnisse stimmen ebenfalls mit denen der vorliegenden Studie überein. Ein ungewöhnliches Ergebnis stellten Zand et al. (2014) in ihrer Untersuchung zur PDT mit LED- Licht und TBO vor. Sie konnten eine Bakterienelimination von 100 % in extrahierten, ebenfalls mit *E. faecalis* infizierten, Zähnen erzielen. Die Autoren gaben an, dass die tiefe Insertion der optischen Faser und die damit verbundene gute Lichtpenetration innerhalb des Wurzelkanals maßgeblich für die hervorragende Desinfektionswirkung der PDT verantwortlich waren. In dem Versuchsaufbau hatte der PS eine Einwirkzeit von fünf Minuten mit anschließender Belichtung für weitere fünf Minuten. Möglicherweise ist das gute Ergebnis dieser Autorengruppe auch auf die längere Einwirk- und Belichtungszeit bei der PDT zurückzuführen. George und Kishen (2007) bestätigen diese Vermutung in einer ähnlichen Untersuchung, bei der die Überlebensrate von *E. faecalis* mit längerer Belichtungsdauer gesunken ist. Es ist festzustellen, dass aufgrund der vorliegenden Literatur keine einheitliche Aussage darüber getroffen werden kann, ob sich unterschiedliche Insertionstiefen der Lichtquelle signifikant auf den antibakteriellen Effekt der PDT auswirken. Die Verwendung einer optischen Faser im Wurzelkanal als Lichtdiffusor führt aber in jedem Fall zu besseren Ergebnissen und wird unabhängig von der Insertionstiefe auch empfohlen (Soares et al. 2016; Zand et al. 2014; Garcez et al. 2013a; Nunes et al. 2011; Fimple et al. 2008; Soukos et al. 2006); insbesondere bei schwierigen anatomischen Verhältnissen (Sabino et al. 2015). Garcez et al. (2013a) stellten fest, dass die Verwendung einer optischen Faser im Wurzelkanal den Effekt der PDT im Vergleich zu einer Bestrahlung nur im Bereich des Kanaleingangs signifikant erhöht. Während der Anwendung der optischen Faser wurden spiralförmige Auf- und Abwärtsbewegungen durchgeführt, um zusätzlich eine gleichmäßige Lichtdiffusion sicherzustellen. Ebenfalls vermuteten die Autoren, dass durch die Bewegung mehr Sauerstoffmoleküle durch die wässrige

Lösung diffundieren können und so die Photoreaktion gesteigert werden kann. Die Autoren gaben auch an, dass Licht ohne Diffusor, welches nur an den Kanaleingang gehalten wird, zu einem gewissen Teil durch die Kristalle des Zahnschmelzes abgelenkt wird und dieser Effekt die Wirkung der PDT abschwächt. Aus diesen Gründen empfehlen sie die Verwendung einer optischen Faser mit einer gleichmäßigen Lichtverteilung bis zum Wurzelapex. Die von Garcez et al. (2013a) ermittelte, signifikant verbesserte antibakterielle Wirksamkeit bei der Anwendung im Wurzelkanal kann vermutlich ebenfalls auf die gute Lichtdiffusion der optischen Faser und nicht auf eine erhöhte Insertionstiefe zurückgeführt werden. Die zuvor beschriebenen Untersuchungen mit optischen Fasern (Zand et al. 2014, Garcez et al. 2013a, Nunez et al. 2011, Fimple et al. 2008) wurden jedoch in geraden Wurzelkanälen vorgenommen, bei denen die Zahnkronen abgetrennt worden waren. Im Gegensatz dazu untersuchten Sabino et al. (2015) die antimikrobielle Effektivität der PDT anhand von Molaren mit gekrümmten Wurzelkanälen, bei denen die Zahnkronen belassen wurden. In einer Testgruppe wurde die LED- Lichtquelle lediglich an den Wurzelkanaleingängen positioniert, in der anderen mittels optischer Faser in den Wurzelkanal auf AL (Apex minus 1 mm) appliziert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Anwendung der intrakanalären optischen Faser in gekrümmten Kanälen eine signifikant höhere Effektivität aufwies als die Anwendung des Lichtes am Kanaleingang. Die Lichtintensität war nahe des Apex bei Verwendung des Diffusors höher und homogener. Daher wird bei gekrümmten Wurzelkanälen die Anwendung eines Lichtdiffusors so tief wie möglich empfohlen und ist insbesondere bei schwierigeren anatomischen Verhältnissen vorteilhaft (Sabino et al. 2015).

Zusammengefasst verfügt die PDT über eine ausreichende Effektivität, um *E. faecalis* im Wurzelkanal von extrahierten, infizierten Zähnen *in vitro* signifikant zu reduzieren. Beachtenswert in der vorliegenden Untersuchung ist, dass der PS TBO ohne Lichtaktivierung den größten Anteil der signifikanten Bakterienreduktion erzielte. Viele Autoren empfehlen die Anwendung einer optischen Faser zur Lichtübertragung bei der PDT im Wurzelkanal (Sabino et al. 2015; Garcez et al. 2013a). In der vorliegenden Studie zeigten die unterschiedlichen getesteten Insertionstiefen der optischen Faser jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Bakterienreduktion von *E. faecalis*. Für die

klinische Anwendung lässt sich daher schlussfolgern, dass eine Insertion einer optischen Faser bei der PDT in den Kanaleingang oder im koronalen Drittel von geraden Wurzelkanälen möglicherweise ausreichend ist (Nunez et al. 2011).

6 ZUSAMMENFASSUNG

ZIEL DER STUDIE: Therapiemisserfolge bei endodontischen Infektionen stehen häufig mit dem äußerst resistenten Bakterium *E. faecalis* in Verbindung. Dieser Keim verbleibt häufig trotz sorgfältiger chemo- mechanischer Aufbereitung in schwer zugänglichen Bereichen und kann zur Persistenz apikaler Parodontitiden führen (Stuart et al. 2006). Ziel der vorliegenden Studie war, die PDT zur Keimreduktion von *E. faecalis* in einem *in vitro*- Biofilm- Modell zu untersuchen. Dafür wurde das PDT- System FotoSan® verwendet. Die Hauptfragestellung dabei war, ob sich unterschiedliche Insertionstiefen der LED- Lichtquelle auf den antibakteriellen Effekt der PDT im Wurzelkanal menschlicher Zähne signifikant auswirken.

MATERIAL UND METHODE: Für das *in vitro*- Modell wurden 70 humane extrahierte einwurzelige Zähne verwendet. Nach Abtrennung der Zahnkrone, standardisierter mechanischer Aufbereitung der Wurzelkanäle mit FlexMaster®- Instrumenten und Spülung mit 5 ml EDTA (17 %) und 2 ml NaOCl (1 %) zur Schmier-schichtentfernung erfolgte die Einteilung in acht experimentelle Gruppen. Sechs Testgruppen mit jeweils zehn Zahnwurzeln dienten der Untersuchung zur PDT. Zwei weitere Gruppen mit jeweils fünf Zahnwurzeln wurden für Aufnahmen im REM zum Nachweis der Schmier-schichtentfernung (Gruppe SL) und der bakteriellen Infektion (Gruppe BF) verwendet. Die sechs Versuchsgruppen zur PDT wurden wie folgt randomisiert aufgeteilt: Positiv- und Negativkontrolle, Nur TBO, Nur LED, PDT apikal und PDT koronal. Bis auf die Gruppe SL und Negativkontrolle wurden alle mit *E. faecalis* infiziert. Das in dieser Untersuchung verwendete PDT- System FotoSan® besteht aus einer LED- Lichtquelle mit einer Wellenlänge von 628 nm und dem PS TBO. Die Lichtquelle besitzt als Aufsatz zur Insertion in den Wurzelkanal eine dünne, konisch zulaufende Kunststofffaser (optische Faser, EndoTip). In den Gruppen PDT apikal und PDT koronal wurde der PS TBO in die Wurzelkanäle appliziert und nach einer Einwirkzeit von zwei Minuten für

jeweils 60 Sekunden belichtet. In PDT apikal wurde dabei die optische Faser 10 mm in den Wurzelkanal eingebracht, in PDT koronal nur auf 5 mm. In der Gruppe Nur TBO wurde die alleinige Wirkung des TBO untersucht, in der Gruppe Nur LED die alleinige Anwendung der LED- Lichtquelle. In allen Gruppen erfolgte eine Probenentnahme mit Hedström- Feilen aufsteigender Größe durch mechanisches Abfeilen der Wurzelkanalwand. Die dabei entnommenen Dentinspäne wurden in mit NaCl gefüllte Eppendorf- Tubes® gegeben und gemischt. Aus dieser Flüssigkeit wurden Proben entnommen und pro Zahnwurzel in dreifacher Ausführung auf Blutagarplatten gegeben und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die CFU ausgezählt und statistisch ausgewertet.

ERGEBNISSE: Der Nachweis der Schmierschichtentfernung (Gruppe SL) und der bakteriellen Infektion der Zahnwurzeln mit *E. faecalis* (Gruppe BF) wurde durch REM-Aufnahmen bestätigt. Die Positivkontrolle diente als Vergleichswert für die Ergebnisse aller Testgruppen. Die Negativkontrollgruppe wies keine kultivierbaren Zellen auf, so dass eine Kontamination der Testkörper ausgeschlossen werden konnte. Die Ergebnisse zeigten, dass TBO ohne Belichtung einen signifikanten antibakteriellen Effekt hatte ($p = 0,001$) und im Vergleich mit der Positivkontrollgruppe zu einer Bakterienreduktion um 71 % führte. Die Anwendung der Lichtquelle ohne PS führte zu keiner signifikanten Bakterienelimination ($p = 0,540$). Die Anwendung der PDT mit Lichtquelle und PS zusammen erzielte die höchste signifikante Bakterienreduktion aller Testgruppen ($p = 0,0001$); für die Gruppe PDT apikal um 91 % und für die Gruppe PDT koronal um 89 %. Es konnte kein signifikanter Unterschied bei der Anwendung unterschiedlicher Insertionstiefen festgestellt werden ($p = 0,455$).

SCHLUSSFOLGERUNG: Die vorliegende *in vitro*- Studie stellt dar, dass die PDT eine signifikante Bakterienreduktion von *E. faecalis* in einem Biofilm- Modell mit geraden Wurzelkanälen erzielen kann. Es wurde festgestellt, dass unterschiedliche Insertionstiefen der optischen Faser in geraden Wurzelkanälen zu keinem signifikanten Unterschied in der antibakteriellen Effektivität der PDT führen. Weitere Untersuchungen zur Anwendung der PDT in Zähnen mit komplexerer Wurzelkanalanatomie, zum Beispiel bei mehrwurzeligen Zähnen mit gekrümmten Wurzelkanälen, sind empfehlenswert.

7 ANHANG MATERIALLISTE

Blutagarplatten, Columbia- Blut	Biomerieux GmbH, Nürtingen
Brain Heart Infusion	Oxoid GmbH, Wesel
Diamantbohrer	Gebr. Brasseler GmbH & Co. KG, Lemgo
Einwegspritze 5 ml, 2 ml	B. Braun AG, Melsungen
Endomotor Endo IT professional®	VDW GmbH, München
Endotips (Einmaltips)	CMS Dental, Kopenhagen, Dänemark
Enterococcus faecalis (ATCC29212)	Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Göttingen
Eppendorf- Tube®	Eppendorf AG, Hamburg
Ethanol 99 % vergällt	Zentralapotheke der Universitätsmedizin Göttingen
Ethylendiamintetraessigsäure 17 %	lege artis Pharma GmbH & Co. KG, Dettenhausen
FlexMaster® Nickel- Titan- Instrumente	VDW GmbH, München
FotoSan®	CMS Dental, Kopenhagen, Dänemark
Gates- Glidden- Bohrer	Henry Schein GmbH, Hamburg
Glutaraldehyd 25 %	Merck, Darmstadt
Guttaperchastift	Roeko, Langenau
Hebel nach Bein	B. Braun AG, Melsungen
Hedström- Feilen ISO- Größe 35,40,45	VDW GmbH, München
Impfeschlingen 10 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Kürette	Hu-Friedy, Chicago, Illinois USA
Natriumchlorid 0,9 %	B. Braun AG, Melsungen
Natriumhypochlorit 1 %	Hedinger GmbH & Co. KG, Stuttgart
NaviTip®	Ultradent South Jordan, UT, USA
Optische Faser	CMS Dental, Kopenhagen, Dänemark
Paladur®	Heraeus Kulzer GmbH, Hanau
Papierspitzen ISO- Größe 40	Roeko, Langenau
Paraformaldehyd 25 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phosphatpuffer 0,2 M	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pinzette	B. Braun AG, Melsungen

Pipette	Eppendorf AG, Hamburg
Rasterelektronenmikroskop	DSM 960, Carl Zeiss AG, Oberkochen
Reamer ISO- Größe 10, 20	VDW GmbH, München
Sekundenkleber UHU®	Uhu GmbH & Co. KG, Bühl
Silaplast Futur®	Detax GmbH & Co. KG, Ettlingen
Spektrophotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Sputter	Fisons Instruments, East Sussex, UK
Statistica Version 10	StatSoft GmbH, Hamburg
Statistische Software SAS 9.2	SAS Institute Inc., Cary, USA
Trennscheibe	Henry Schein vet GmbH, Hamburg
Vortexer	Heidolph Elektro KG, Kelheim

8 LITERATURVERZEICHNIS

Asnaashari M, Safavi N (2013):

Application of Low level Lasers in Dentistry (Endodontic). *J Lasers Med Sci* 4, 57–66

Asnaashari M, Mojahedi SM, Asadi Z, Azari-Marhabi S, Maleki A (2016):

A comparison of the antibacterial activity of the two methods of photodynamic therapy (using diode laser 810 nm and LED lamp 630 nm) against *Enterococcus faecalis* in extracted human anterior teeth. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 13, 233–237

Aw V (2016):

Discuss the role of microorganisms in the aetiology and pathogenesis of periapical disease. *Aust Endod J* 42, 53–59

Baca P, Mendoza-Llamas ML, Arias-Moliz MT, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM (2011):

Residual Effectiveness of Final Irrigation Regimens on *Enterococcus faecalis*-infected Root Canals. *J Endod* 37, 1121–1123

Bago I, Plečko V, Gabrić Pandurić D, Schauperl Z, Baraba A, Anić I (2013):

Antimicrobial efficacy of a high-power diode laser, photo-activated disinfection, conventional and sonic activated irrigation during root canal treatment. *Int Endod J* 46, 339–347

Bago Jurič I, Plečko V, Anić I, Pleško S, Jakovljević S, Rocca JP, Medioni E (2016):

Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy, Nd:YAG laser and QMiX solution against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 13, 238–243

Bahcall J, Howard P, Miserendino L, Walia H (1992):

Preliminary investigation of the histological effects of laser endodontic treatment on the periradicular tissues in dogs. *J Endod* 18, 47–51

Baldasso FE, Stürmer CP, Luisi SB, Petruzzi MN, Scarparo RK, de Figueiredo JA (2012):

Microflora associated with primary endodontic infections: correlations among SEM evaluation, clinical features, and radiographic findings. *Microsc Res Tech* 75, 1557–1563

Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP (2016):

Antimicrobial Susceptibility and Characterization of Virulence Genes of *Enterococcus faecalis* Isolates from Teeth with Failure of the Endodontic Treatment. *J Endod* 42, 1022–1028

Barletta FB, Rahde NdeM, Limongi O, Moura AA, Zanesco C, Mazocatto G (2007):

In vitro comparative analysis of 2 mechanical techniques for removing gutta-percha during retreatment. *J Can Dent Assoc* 73, 65

Bergmans L, Moisiadis P, Huybrechts B, van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P (2008):

Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. *Int Endod J* 41, 227–239

Bhatti M, MacRobert A, Henderson B, Shepherd P, Cridland J, Wilson M (2000):

Antibody-Targeted Lethal Photosensitization of *Porphyromonas gingivalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 2615–2618

Bhuva B, Patel S, Wilson R, Niazi S, Beighton D, Mannocci F (2010):

The effectiveness of passive ultrasonic irrigation on intraradicular *Enterococcus faecalis* biofilms in extracted single-rooted human teeth. *Int Endod J* 43, 241–250

Bonsor SJ, Nichol R, Reid TMS, Pearson GJ (2006):

Microbiological evaluation of photo-activated disinfection in endodontics (An in vivo study). *Br Dent J* 200, 337–341

Bowden GH, Li YH (1997):

Nutritional influences on biofilm development. *Adv Dent Res* 11, 81–99

Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R (2005):

Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 13, 20–26

Brito PR, Souza LC, Machado de Oliveira JC, Alves FR, De-Deus G, Lopes HP, Siqueira JF JR (2009):

Comparison of the effectiveness of three irrigation techniques in reducing intracanal *Enterococcus faecalis* populations: an in vitro study. *J Endod* 35, 1422–1427

Byström A, Sundqvist G (1981):

Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 89, 321–328

Byström A, Sundqvist G (1985):

The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 18, 35–40

Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensäter G (2010):

The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod* 36, 70–77

Chen J, Li X, Su Y, Zhang D, Wen X, Nie X, An J, Liu L, Deng M (2015):

A micro-computed tomography study of the relationship between radicular grooves and root canal morphology in mandibular first premolars. *Clin Oral Investig* 19, 329–334

- Cheng X, Guan S, Lu H, Zhao C, Chen X, Li N, Bai Q, Tian Y, Yu Q (2012):**
Evaluation of the bactericidal effect of Nd:YAG, Er:YAG, Er,Cr:YSGG laser radiation, and antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in experimentally infected root canals. *Lasers Surg Med* 44, 824–831
- Chrepa V, Kotsakis GA, Pagonis TC, Hargreaves KM (2014):**
The effect of photodynamic therapy in root canal disinfection: a systematic review. *J Endod* 40, 891–898
- Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T (2014):**
Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Front Microbiol* 5, 405
- CMS Dental (Hrsg.):**
FotoSan Behandlungsanleitung, Kopenhagen 2009
- Costerton JW (1995):**
Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* 15, 137–140
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ (1987):**
Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 41, 435–464
- Davey ME, O'Toole GA (2000):**
Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 847–867
- Davies DG (1998):**
The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science* 280, 295–298
- Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ (2002):**
Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 28, 689–693
- Donlan RM, Costerton JW (2002):**
Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15, 167–193
- Duggan JM, Sedgley CM (2007):**
Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 33, 815–818
- Estrela C, Estrela CR, Decurcio DA, Hollanda AC, Silva JA (2007):**
Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *Int Endod J* 40, 85–93
- Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D (2002):**
Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 35, 221–228

Fegan SE, Steiman HR (1995):

Comparative evaluation of the antibacterial effects of intracanal Nd:YAG laser irradiation: an in vitro study. *J Endod* 21, 415–417

Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, Tanner AC, Kent R, Doukas AG, Stashenko PP et al. (2008):

Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod* 34, 728–734

Firmino RT, Brandt LM, Ribeiro GL, Dos Santos KS, Catão MH, Gomes DQ (2016):

Endodontic treatment associated with photodynamic therapy: case report. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 15, 105–108

Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S (2016):

Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 14, 563–575

Foschi F, Fontana CR, Ruggiero K, Riahi R, Vera A, Doukas AG, Pagonis TC, Kent R, Stashenko PP, Soukos NS (2007):

Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. *Lasers Surg Med* 39, 782–787

Friedrich CL, Moyles D, Beveridge TJ, Hancock RE (2000):

Antibacterial Action of Structurally Diverse Cationic Peptides on Gram-Positive Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 2086–2092

Garcez AS, Nuñez SC, Hamblin MR, Ribeiro MS (2008):

Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *J Endod* 34, 138–142

Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Nuñez SC, Jorge AO, Hamblin MR (2007):

Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med* 39, 59–66

Garcez AS, Fregnani ER, Rodriguez HM, Nuñez SC, Sabino CP, Suzuki H, Ribeiro MS (2013a):

The use of optical fiber in endodontic photodynamic therapy. Is it really relevant? *Lasers Med Sci* 28, 79–85

Garcez AS, Nuñez SC, Azambuja N, Fregnani ER, Rodriguez HM, Hamblin MR, Suzuki H, Ribeiro MS (2013b):

Effects of Photodynamic Therapy on Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Biofilms by Bioluminescence Imaging and Scanning Electron Microscopic Analysis. *Photomed Laser Surg* 31, 519–525

George S, Kishen A (2007):

Advanced noninvasive light-activated disinfection: assessment of cytotoxicity on fibroblast versus antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 33, 599–602

George S, Kishen A (2008):

Influence of photosensitizer solvent on the mechanisms of photoactivated killing of *Enterococcus faecalis*. *Photochem Photobiol* 84, 734–740

George S, Kishen A, Song KP (2005):

The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 31, 867–872

Gründling GL, Zechin JG, Jardim WM, de Oliveira SD, de Figueiredo JA (2011):

Effect of ultrasonics on *Enterococcus faecalis* biofilm in a bovine tooth model. *J Endod* 37, 1128–1133

Gutknecht N, Kaiser F, Hassan A, Lampert F (1996):

Long-term clinical evaluation of endodontically treated teeth by Nd:YAG lasers. *J Clin Laser Med Surg* 14, 7–11

Haapasalo M, Ørstavik D (1987):

In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 66, 1375–1379

Halkiotis K, Yova D, Pantelias G (1999):

In vitro evaluation of the genotoxic and clastogenic potential of photodynamic therapy. *Mutagenesis* 14, 193–198

Hecker S, Hiller KA, Galler KM, Erb S, Mader T, Schmalz G (2013):

Establishment of an optimized ex vivo system for artificial root canal infection evaluated by use of sodium hypochlorite and the photodynamic therapy. *Int Endod J* 46, 449–457

Heilborn C, Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N (2010):

Cleaning efficacy of an apical negative-pressure irrigation system at different exposure times. *Quintessence Int* 41, 759–767

Hellingwerf KJ, Hoff WD, Crielaard W (1996):

Photobiology of microorganisms: how photosensors catch a photon to initialize signaling. *Mol Microbiol* 21, 683–693

Hellwig E, Klimek J, Attin T:

Einführung in die Zahnerhaltung. Prüfungswissen Kariologie, Endodontologie und Parodontologie. 6. überarbeitete Auflage; Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln 2013

Hoffmann YC:

In-vitro-Analyse der antimikrobiellen Effektivität von Octenidol, Natriumhypochlorit und Chlorhexidin gegen *Enterococcus faecalis* anhand eines intrakanalären Biofilm-Modells. Med. Diss. Göttingen 2015

Huffaker SK, Safavi K, Spangberg LS, Kaufman B (2010):

Influence of a passive sonic irrigation system on the elimination of bacteria from root canal systems: a clinical study. *J Endod* 36, 1315–1318

Hülsmann M:

Endodontie. Thieme, Stuttgart 2008

Huth KC, Quirling M, Maier S, Kamereck K, Alkhayer M, Paschos E, Welsch U, Miethke T, Brand K, Hickel R (2009):

Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *Int Endod J* 42, 3–13

Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS (1998):

Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis* 4, 239–249

Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, Fantetti L, Chiti G, Roncucci G (2006):

Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med* 38, 468–481

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ (1966):

The effects of surgical exposures of dental pulps in germfree and conventional laboratory rats. *J South Calif Dent Assoc* 34, 449–451

Kampfer J, Göhring TN, Attin T, Zehnder M (2007):

Leakage of food-borne *Enterococcus faecalis* through temporary fillings in a simulated oral environment. *Int Endod J* 40, 471–477

Khan MA, Khan MF, Khan MW, Wakabayashi H, Matsumoto K (1997):

Effect of laser treatment on the root canal of human teeth. *Endod Dent Traumatol* 13, 139–145

Kimura Y, Wilder-Smith P, Matsumoto K (2000):

Lasers in endodontics: a review. *Int Endod J* 33, 173–185

Kishen A, George S, Kumar R (2006):

Enterococcus faecalis-mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine in vitro. *J Biomed Mater Res* 77A, 406–415

Konopka K, Goslinski T (2007):

Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res* 86, 694–707

Kowalski WJ, Kasper EL, Hatton JF, Murray BE, Nallapareddy SR, Gillespie MJ (2006):

Enterococcus faecalis adhesin, Ace, mediates attachment to particulate dentin. *J Endod* 32, 634–637

Lin J, Shen Y, Haapasalo M (2013):

A comparative study of biofilm removal with hand, rotary nickel-titanium, and self-adjusting file instrumentation using a novel in vitro biofilm model. *J Endod* 39, 658–663

Love RM (2001):

Enterococcus faecalis - a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 34, 399–405

Love RM, Chandler NP, Jenkinson HF (1996):

Penetration of smeared or nonsmeared dentine by *Streptococcus gordonii*. *Int Endod J* 29, 2–12

Maisch T, Szeimies RM, Jori G, Abels C (2004):

Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochem Photobiol Sci* 3, 907–917

Maisch T, Wagner J, Papastamou V, Nerl HJ, Hiller KA, Szeimies RM, Schmalz G (2009):

Combination of 10% EDTA, Photosan, and a blue light hand-held photopolymerizer to inactivate leading oral bacteria in dentistry in vitro. *J Appl Microbiol* 107, 1569–1578

Marinic K, Manoil D, Filieri A, Wataha JC, Schrenzel J, Lange N, Bouillaguet S (2015):

Repeated exposures to blue light-activated eosin Y enhance inactivation of *E. faecalis* biofilms, in vitro. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 12, 393–400

Marsh PD (2004):

Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* 38, 204–211

Meire MA, Coenye T, Nelis HJ, de Moor RJ (2012):

Evaluation of Nd:YAG and Er:YAG irradiation, antibacterial photodynamic therapy and sodium hypochlorite treatment on *Enterococcus faecalis* biofilms. *Int Endod J* 45, 482–491

Meire MA, de Prijck K, Coenye T, Nelis HJ, de Moor RJ (2009):

Effectiveness of different laser systems to kill *Enterococcus faecalis* in aqueous suspension and in an infected tooth model. *Int Endod J* 42, 351–359

Mickel AK, Chogle S, Liddle J, Huffaker K, Jones JJ (2007):

The role of apical size determination and enlargement in the reduction of intracanal bacteria. *J Endod* 33, 21–23

Miller (1894):

An Introduction of the study of the bacterio- pathology of the dental pulp. *Dent Cosmos* 36, 505–524

Mitton D, Ackroyd R (2008):

A brief overview of photodynamic therapy in Europe. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 5, 103–111

Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T (1998):

Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 31, 1–7

Molander A, Warfvinge J, Reit C, Kvist T (2007):

Clinical and radiographic evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of asymptomatic necrotic teeth with apical periodontitis: a randomized clinical trial. *J Endod* 33, 1145–1148

Muhammad OH, Chevalier M, Rocca JP, Brulat-Bouchard N, Medioni E (2014):

Photodynamic therapy versus ultrasonic irrigation: interaction with endodontic microbial biofilm, an ex vivo study. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 11, 171–181

Murray BE (1990):

The life and times of the Enterococcus. *Clin Microbiol Rev* 3, 46–65

Nair PN (2004):

Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med* 15, 348–381

Nair PN (2006):

On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J* 39, 249–281

Narayanan LL, Vaishnavi C (2010):

Endodontic microbiology. *J Conserv Dent* 13, 233–239

Neumeister B, Geiss HK, Braun R, Kimmig P:

Mikrobiologische Diagnostik. Thieme, Stuttgart 2009

Ng R, Singh F, Papamanou DA, Song X, Patel C, Holewa C, Patel N, Klepac-Ceraj V, Fontana CR, Kent R (2011):

Endodontic photodynamic therapy ex vivo. *J Endod* 37, 217–222

Nunes MI, Franco GC, de Medeiros J, Dos Santos SS, Habitante SM, Lage-Marques JL, Raldi DP (2011):

Effectiveness of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis*, with and without the use of an intracanal optical fiber: an in vitro study. *Photomed Laser Surg* 29, 803–808

Ørstavik D, Haapasalo M (1990):

Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 6, 142–149

- Özdemir HO, Buzoglu HD, Calt S, Stabholz A, Steinberg D (2010):**
Effect of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium hypochlorite irrigation on *Enterococcus faecalis* biofilm colonization in young and old human root canal dentin: in vitro study. *J Endod* 36, 842–846
- Paiva SS, Siqueira JF JR, Rôças IN, Carmo FL, Leite DC, Ferreira DC, Rachid CT, Rosado AS (2013):**
Clinical antimicrobial efficacy of NiTi rotary instrumentation with NaOCl irrigation, final rinse with chlorhexidine and interappointment medication: a molecular study. *Int Endod J* 46, 225–233
- Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2003a):**
Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 36, 1–11
- Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ (2003b):**
Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 18, 100–103
- Pinheiro SL, Azenha GR, Democh YM, Nunes DC, Provasi S, Fontanetti GM, Duarte DA, Fontana CE, Bueno CE (2016):**
Antimicrobial Activity of Photodynamic Therapy Against *Enterococcus faecalis* Before and After Reciprocating Instrumentation in Permanent Molars. *Photomed Laser Surg*, *Photomed Laser Surg* 34, 646–651
- Poggio C, Arciola CR, Dagna A, Florindi F, Chiesa M, Saino E, Imbriani M, Visai L (2011):**
Photoactivated disinfection (PAD) in endodontics: an in vitro microbiological evaluation. *Int J Artif Organs* 34, 889–897
- Raab O (1900):**
Über die Wirkung von fluoreszierenden Stoffen auf Infusorien. *Z Biol* 39, 524–526
- Ramsköld LO, Fong CD, Strömberg T (1997):**
Thermal effects and antibacterial properties of energy levels required to sterilize stained root canals with an Nd:YAG laser. *J Endod* 23, 96–100
- Razavi A, Gmur R, Imfeld T, Zehnder M (2007):**
Recovery of *Enterococcus faecalis* from cheese in the oral cavity of healthy subjects. *Oral Microbiol Immunol* 22, 248–251
- Rios A, He J, Glickman GN, Spears R, Schneiderman ED, Honeyman AL (2011):**
Evaluation of Photodynamic Therapy Using a Light-emitting Diode Lamp against *Enterococcus faecalis* in Extracted Human Teeth. *J Endod* 37, 856–859

Rohs R, Sklenar H (2004):

Methylene blue binding to DNA with alternating AT base sequence: minor groove binding is favored over intercalation. *J Biomol Struct Dyn* 21, 699–711

Saatchi M, Shokraneh A, Navaei H, Maracy MR, Shojaei H (2014):

Antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: a systematic review and meta-analysis. *J Appl Oral Sci* 22, 356–365

Saber SE, El-Hady SA (2012):

Development of an intracanal mature *Enterococcus faecalis* biofilm and its susceptibility to some antimicrobial intracanal medications; an in vitro study. *Eur J Dent* 6, 43–50

Sabino CP, Garcez AS, Núñez SC, Ribeiro MS, Hamblin MR (2015):

Real-time evaluation of two light delivery systems for photodynamic disinfection of *Candida albicans* biofilm in curved root canals. *Lasers Med Sci* 30, 1657–1665

Sahar-Helft S, Stabholtz A, Moshonov J, Gutkin V, Redenski I, Steinberg D (2013):

Effect of Er:YAG Laser-Activated Irrigation Solution on *Enterococcus Faecalis* Biofilm in an Ex-Vivo Root Canal Model. *Photomed Laser Surg* 31, 334–341

Schlafer S, Vaeth M, Horsted-Bindslev P, Frandsen EV (2010):

Endodontic photoactivated disinfection using a conventional light source: an in vitro and ex vivo study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 109, 634–641

Schneider SW (1971):

A comparison of canal preparations in straight and curved root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 32, 271–275

Seal GJ, Ng YL, Spratt D, Bhatti M, Gulabivala K (2002):

An in vitro comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilms in root canals. *Int Endod J* 35, 268–274

Sebrão CC, Bezerra Junior AG, de Franca, PH, Ferreira LE, Westphalen VP (2016):

Comparison of the Efficiency of Rose Bengal and Methylene Blue as Photosensitizers in Photodynamic Therapy Techniques for *Enterococcus faecalis* Inactivation. *Photomed Laser Surg* 35, 18–23

Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ (2006):

In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J* 39, 878–885

Shrestha A, Cordova M, Kishen A (2015):

Photoactivated polycationic bioactive chitosan nanoparticles inactivate bacterial endotoxins. *J Endod* 41, 686–691

Shuping GB, Orstavik D, Sigurdsson A, Trope M (2000):

Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod* 26, 751–755

Siddiqui SH, Awan KH, Javed F (2013):

Bactericidal efficacy of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* in infected root canals: a systematic literature review. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 10, 632–643

Silva EJ, Coutinho-Filho WP, Andrade AO, Herrera DR, Coutinho-Filho TS, Krebs RL (2014):

Evaluation of photodynamic therapy using a diode laser and different photosensitizers against *enterococcus faecalis*. *Acta Odontol Latinoam* 27, 63–65

Silva LA, Novaes AB, JR, de Oliveira RR, Nelson-Filho P, Santamaria M, JR, Silva RA (2012):

Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of teeth with apical periodontitis: a histopathological evaluation. *J Endod* 38, 360–366

Siqueira JF JR, Rôças I (2007):

Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J* 18, 267–280

Siqueira JF, Rôças I (2008):

Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* 34, 1291–1301

Siqueira JF, Lima KC, Magalhães FA, Lopes HP, de Uzeda M (1999):

Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. *J Endod* 25, 332–335

Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN (1997):

Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J* 30, 91–95

Sjogren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G (1997):

Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 30, 297–306

Soares JA, Roque de Carvalho MA, Cunha Santos SM, Mendonça RM, Ribeiro-Sobrinho AP, Brito-Júnior M, Magalhães PP, Santos MH, de Macêdo Farias L (2010):

Effectiveness of chemomechanical preparation with alternating use of sodium hypochlorite and EDTA in eliminating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod* 36, 894–898

Soares JA, Santos Soares SM, Santos César CA, de Carvalho MA, Brito-Júnior M, de Sousa GR, Soares BM, de Macêdo Farias L (2016):

Monitoring the effectiveness of photodynamic therapy with periodic renewal of the photosensitizer on intracanal *Enterococcus faecalis* biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 13, 123–127

Socransky SS, Haffajee AD (2005):

Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000* 38, 135–187

Soukos NS, Goodson JM (2011):

Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000* 55, 143–166

Soukos NS, Chen PS, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, Foschi F, Doucette S, Bammann LL, Fontana CR (2006):

Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod* 32, 979–984

Souza LC, Brito PR, de Oliveira JC, Alves FR, Moreira EJ, Sampaio-Filho HR, Rôças IN, Siqueira JF JR (2010):

Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 36, 292–296

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB (2006):

Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 32, 93–98

Sun X, Wang S, Yang Y, Luo C, Hou B (2016):

Study of invasion and colonization of *E. faecalis* in microtubes by a novel device. *Bio-med Microdevices* 18, 82

Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L (2002):

Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod* 28, 304–310

Sundqvist G (1992):

Ecology of the root canal flora. *J Endod* 18, 427–430

Sundqvist G (1994):

Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 78, 522–530

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U (1998):

Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 85, 86–93

ten Cate JM (2006): Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology* 94, 1–9

Tennert C, Feldmann K, Haamann E, Al-Ahmad A, Follo M, Wrbas KT, Hellwig E, Altenburger MJ (2014):

Effect of photodynamic therapy (PDT) on *Enterococcus faecalis* biofilm in experimental primary and secondary endodontic infections. *BMC Oral Health* 14, 132

Tennert C, Drews AM, Walther V, Altenburger MJ, Karygianni L, Wrbas KT, Hellwig E, Al-Ahmad A (2015):

Ultrasonic activation and chemical modification of photosensitizers enhances the effects of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* root-canal isolates. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 12, 244–251

Tsuchihashi T, Mori K, Ueyama K, Yoneya S (2013):

Five-year results of photodynamic therapy with verteporfin for Japanese patients with neovascular age-related macular degeneration. *Clin Ophthalmol* 7, 615–620

Upadya MH, Kishen A (2010):

Influence of bacterial growth modes on the susceptibility to light-activated disinfection. *International Endodontic Journal* 43, 978–987

Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA (2001):

Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med* 29, 165–173

Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA (2003):

The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. *Lasers Surg Med* 33, 311–319

Vaziri S, Kangarlou A, Shahbazi R, Nazari Nasab A, Naseri M (2012):

Comparison of the bactericidal efficacy of photodynamic therapy, 2.5% sodium hypochlorite, and 2% chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in root canals; an in vitro study. *Dent Res J* 9, 613–618

Wainwright M (1998):

Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* 42, 13–28

Wang QQ, Zhang CF, Chu CH, Zhu XF (2012a):

Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. *Int J Oral Sci* 4, 19–23

Wang Z, Shen Y, Haapasalo M (2012b):

Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *J Endod* 38, 1376–1379

Watnick P, Kolter R (2000):

Biofilm, City of Microbes. *J Bacteriol* 182, 2675–2679

Wei Q, Ma LZ (2013):

Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci* 14, 20983–21005

Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ (2006):

Antibacterial action of photoactivated disinfection {PAD} used on endodontic bacteria in planktonic suspension and in artificial and human root canals. *J Dent* 34, 363–371

Wimpenny J (2000):

Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 661–671

Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C (2006):

Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother* 57, 680–684

Xhevdet A, Stubljar D, Kriznar I, Jukic T, Skvarc M, Veranic P, Ihan A (2014):

The disinfecting efficacy of root canals with laser photodynamic therapy. *J Lasers Med Sci* 5, 19–26

Xu Y, Young MJ, Battaglino RA, Morse LR, Fontana CR, Pagonis TC, Kent R, Soukos NS (2009):

Endodontic antimicrobial photodynamic therapy: safety assessment in mammalian cell cultures. *J Endod* 35, 1567–1572

Yao N, Zhang C, Chu C (2012):

Effectiveness of photoactivated disinfection (PAD) to kill enterococcus faecalis in planktonic solution and in an infected tooth model. *Photomed Laser Surg* 30, 699–704

Zand V, Milani AS, Amini M, Barhaghi MH, Lotfi M, Rikhtegaran S, Sohrabi A (2014):

Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy and sodium hypochlorite on monoculture biofilms of *Enterococcus faecalis* at different stages of development. *Photomed Laser Surg* 32, 245–251

Zehnder M (2006):

Root canal irrigants. *J Endod* 32, 389–398

Zehnder M, Guggenheim B (2009):

The mysterious appearance of enterococci in filled root canals. *Int Endod J* 42, 277–287

Zehnder M, Soderling E, Salonen J, Waltimo T (2004):

Preliminary evaluation of bioactive glass S53P4 as an endodontic medication in vitro. *J Endod* 30, 220–224

Zhu X, Wang Q, Zhang C, Cheung GS, Shen Y (2010):

Prevalence, phenotype, and genotype of *Enterococcus faecalis* isolated from saliva and root canals in patients with persistent apical periodontitis. *J Endod* 36, 1950–1955

Zoletti GO, Siqueira JF JR, Santos K (2006):

Identification of *Enterococcus faecalis* in Root-filled Teeth With or Without Periradicular Lesions by Culture-dependent and—Independent Approaches. *J Endod* 32, 722–726

Zoletti GO, Pereira EM, Schuenck RP, Teixeira LM, Siqueira JF JR, dos Santos KR (2011):

Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals. *Res Microbiol* 162, 151–158

Danksagung

Ich möchte mich bei Priv.- Doz. Dr. Tina Rödiger vom Zentrum Zahn- Mund- Kieferheilkunde der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit unter ihrer Leitung durchführen zu können. Ich bedanke mich für die außerordentlich freundliche und engagierte Begleitung bei der Planung und Durchführung der Experimente sowie für die ausführliche Arbeit bei der Korrektur des schriftlichen Teils. Die überaus umfangreiche Betreuung habe ich während der gesamten Zeit zur Umsetzung dieser Arbeit sehr geschätzt. Ich bedanke mich ebenfalls für die Erstellung des Erstgutachtens.

Herrn Oberarzt Prof. Dr. Michael Hülsmann vom Zentrum für Zahn- Mund- Kieferheilkunde der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen danke ich für die Betreuung bei allgemeinen Fragen zur Umsetzung der Dissertation.

Frau Dipl. Biol. Ortrud Zimmermann möchte ich für die freundliche Unterstützung beim Entwurf und der Durchführung des Versuchsaufbaus im Labor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Universität Göttingen danken.

Ebenso danke ich Herrn Priv.- Doz. Dr. Konietzke vom Institut für Medizinische Statistik der Universität Göttingen für die intensive fachliche Beratung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Für die Betreuung bei der Erstellung der Rasterelektronenmikroskop Aufnahmen danke ich Herrn Hans- Georg Sydow vom Institut für Anatomie und Embryologie der Universitätsmedizin Göttingen.

Ich möchte mich ganz besonders herzlich bei Frau Dr. Carolin Yvonne Keller (geb. Hoffmann) für die gute Zusammenarbeit bei der Umsetzung dieser Arbeit bedanken.

