

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE  
DIREKTOR: PROF. DR. G. SCHMALZ  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

ANTIMIKROBIELLE WIRKUNG VERSCHIEDENER SUBSTANZEN AUF  
ARTIFIZIELL INFIZIERTEM DENTIN

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Elisabeth Tabenski-Bosakowski

2009

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Schmalz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. T. Reichert
Tag der mündlichen Prüfung:	24.06.2010

Inhaltsverzeichnis					
I	Einleitung	5	1.6	Vorbereitungen der Bakterienkulturen	26
II	Literaturübersicht	7	1.7	Bottle Top Filter	26
1	Dentin	7	2	Methode	28
1.1	Zusammensetzung und Struktur	7	2.1	Artifizielle Infizierung von Rinderdentin	28
1.1.1	Organische Matrix	7	2.2	Rinderzähnegewinnung	28
1.1.1.1	Aufbau	7	2.3	Bearbeitung und Lagerung der extrahierten Zähne	28
1.1.1.2	Entstehung	7	2.4	Dentinscheibenherstellung	28
1.1.2	Anorganische Bestandteile	8	2.5	Versuchsaufbau und –ablauf	30
1.1.2.1	Aufbau	8	3	Datenerfassung und statistische Auswertung	33
1.1.2.2	Mineralisation	8	4	Rasterelektronenmikroskopische Bilder	35
1.1.3	Dentintubuli	8	V	Ergebnisse	36
1.1.4	Permeabilität	10	1	Die optische Dichte in der Lag- und Plateau-Phase	36
1.1.5	Schmierschicht	10	2	Die Zeitpunkte des Beginns und des Endes der Log-Phase	38
1.1.5.1	Zusammensetzung	11	3	Zeitpunkt und OD im Wendepunkt	42
1.1.5.2	Eigenschaften	11	4	Differenz des Zeitpunktes maximalen Wachstums zwischen Test- und Kontrollkultur	46
2	<i>Enterococcus faecalis</i>	12	5	Rasterelektronenmikroskopische Bilder	48
2.1	Taxonomie	12	VI	Diskussion	51
2.2	Morphologie	13	1	Rinderdentin	51
2.3	Eigenschaften	13	2	Bakterienauswahl	51
2.4	<i>Enterococcus faecalis</i> in der Zahnmedizin	13	3	Methode	52
3	Desinfektion des Dentins und Wurzelkanalsystems	14	4	Ergebnisse	54
3.1	Spüllösungen	15	4.1	Infektionsdauer	54
3.1.1	Natriumhypochlorid	15	4.2	Wirkung der antibakteriellen Mittel	55
3.1.2	Chlorhexidin	18	4.3	Visualisierung der Infektion der Dentinscheiben am Rasterelektronenmikroskop	56
4	Artifizielle Infektion von Dentins	21	VII	Zusammenfassung	57
III	Fragestellung	23	VIII	Anhang	59
IV	Material und Methode	24	1	Tabellarischer Anhang	59
1	Materialien	24	2	Verwendete Materialien und Geräte	61
1.1	Eingesetzte Mikroorganismen	24	2.1	Nährmedien und Standardlösungen	61
1.2	Testmaterialien	24	2.2	Verbrauchsmaterialien	61
1.3	Nährmedium	25	2.3	Gerätschaften	62
1.4	Inkubation der Mikroorganismen	25	IX	Literaturverzeichnis	63
1.5	Sicherheitsvorkehrungen	25	X	Lebenslauf	76
			XI	Danksagung	77

## I Einleitung

Mikrobielle Faktoren sind im klinischen Alltag häufig die Ursache für das Scheitern einer Wurzelkanalbehandlung. Eine persistierende intrakanaläre mikrobielle Besiedlung geht von Mikroorganismen aus, die Desinfektionsmaßnahmen während der Wurzelkanalbehandlung überlebt haben. Das kann begründet sein in komplexen anatomischen Verhältnissen oder Limitierungen konventioneller Verfahren zur Wurzelkanalaufbereitung, unabhängig von Aufbereitungstechnik und -instrumentarium (94;159). Mit dem Verbleib von Mikroorganismen im Wurzelkanalsystem steigt die Wahrscheinlichkeit, dass eine Wurzelkanalbehandlung klinisch scheitert. *Enterococcus faecalis* spielt in diesem Zusammenhang eine Schlüsselrolle (108;165;183).

Das Hauptanliegen der endodontischen Therapie ist daher die Elimination der Mikroorganismen aus den kontaminierten Wurzelkanälen und die Verhinderung einer neuerlichen Infektion. Eine komplette chemisch-mechanische Aufarbeitung der Wurzelkanäle bleibt der wichtigste Schritt in der Wurzelkanalreinigung. Aber selbst nach gründlichster Reinigung, Formgebung und Desinfektion mit antiseptischen Mitteln ist es schwierig in allen behandelten Fällen eine völlige Elimination der Mikroorganismen zu erreichen (21;22). Mit Sicherheit kann eine Reduzierung der Anzahl der lebenden Mikroorganismen in den Wurzelkanälen erreicht werden, die komplexe Anatomie der Wurzelkanäle erschwert jedoch die vollständige Desinfektion (9).

Die Erfolgsrate von Wurzelkanalbehandlungen bei Zähnen mit infiziertem Endodont und periapikaler Parodontitis liegt im Bereich von 46% bis 95% (186). In der Mehrheit der Fälle lassen sich endodontische Misserfolge auf Überinstrumentierung, Wurzelkanalüberfüllung und undichte Wurzelkanalfüllung sowie Sekundärkaries zurückführen. Trotzdem kann es unabhängig von der Qualität einer Wurzelkanalbehandlung zum Misserfolg kommen (186).

Grundsätzlich lassen sich sowohl mikrobielle als auch nicht-mikrobielle Ursachen für therapieresistente periapikale Parodontitiden angeben (158). Gelangen Mikroorganismen in den extraradikulären Raum, so bleiben Spüllösungen und Medikamente, die im Wurzelkanal eingesetzt werden, unwirksam (82).

Die Existenz von Bakterien in Dentintubuli *in vivo* wurde in verschiedenen Untersuchungen nachgewiesen (5;110;133). Auch nach adäquater Wurzelkanalbehandlung können Mikroorganismen dort zurückbleiben. Welche Rolle diese Mikroorganismen unter günstigen oder ungünstigen äußeren Bedingungen spielen, ist nach wie vor ungeklärt. Es drängt sich

unter anderem die Frage auf, ob sie in der Tiefe des Wurzelentins Bedingungen vorfinden, die ihnen ein Überleben ermöglichen (9).

In der vorliegenden Untersuchung sollte daher der Frage nachgegangen werden, ob man in möglichst kurzer Zeit eine gezielte, dichte bakterielle Infektion *in vitro* 200µm dicker Rinderdentinscheiben erreichen kann, um dann die antibakterielle Wirkung von NaOCl (0,5%, 1,0%, 3,0%) und CHX (0,2%) auf *Enterococcus faecalis* zu testen.

## II Literaturübersicht

### 1 Dentin

#### 1.1 Zusammensetzung und Struktur

Grundlegend für das Verständnis der antimikrobiellen Wirkung verschiedener Substanzen auf infiziertem Dentin ist das Wissen über dessen Entwicklung und Anatomie. Dentin besteht aus einer kollagenen Matrix (103), die mit Apatitkristallen gefüllt ist. Diese Matrix umgibt ein System aus parallel ausgerichteten Hohlzylindern, die Dentintubuli. Dentin besteht aus anorganischen Anteilen (45-50 Vol%), aus organischen Anteilen (34-40 Vol%) und aus Wasser (20-23 Vol%), wobei die Zusammensetzung innerhalb eines Zahnes nicht konstant ist. Der Grund hierfür liegt in der tubulären Struktur des Dentins (118).

##### 1.1.1 Organische Matrix

###### 1.1.1.1 Aufbau

Dentin besteht, ebenso wie Knochen und Zement, hauptsächlich aus Typ-I-Kollagen, einem Heterotrimer mit zwei identischen  $\alpha$ -Ketten und einer damit nicht identischen Kette (93). Von Odontoblasten exprimierte Kollagene vom Typ I Trimer, Typ III, Typ V und Typ VI sind im Dentin nachgewiesen worden (99). Mineralisiertes Dentin enthält kein Typ III Kollagen. Typ VI Kollagen kommt sowohl in Prädentin, als auch in Dentin vor (100).

###### 1.1.1.2 Entstehung

Die organische Matrix des Dentins wird von Zellen der kranialen Neuralleiste, den Odontoblasten, während der Dentinogenese gebildet (145). Die Odontoblasten weisen zytoplasmatische Fortsätze, die sogenannten Odontoblastenfortsätze auf. Odontoblasten sezernieren die organischen Komponenten des Prädentin-Dentin-Komplexes, wobei ein Teil dieser Sezernierung vom Zellkörper und ein Teil vom Odontoblastenfortsatz erfolgt (145).

Die Kollagenmoleküle organisieren sich durch kovalente Bindungen zu sehr stabilen Fibrillen, die weder durch Proteasen zerstört werden, noch durch Säureeinwirkung quellen (18). Durch die kontinuierliche Anlagerung von Kollagenfasern im Prädentin nimmt der Durchmesser der Kollagenfasern zur Mineralisationsfront hin von 20nm auf 75nm zu (96).

Die Odontoblasten spielen auch für den Transport von Kalzium und Phosphaten eine Rolle. Kalzium wird von den Blutgefäßen durch die Odontoblastenschicht entweder durch die Zellen hindurch oder in den Zellzwischenräumen zur Mineralisationsfront transportiert (74;95).

##### 1.1.2 Anorganische Bestandteile

###### 1.1.2.1 Aufbau

Der anorganische Anteil des Dentins besteht aus 20nm langen und 3,5nm breiten, plättchenförmigen Hydroxylapatitkristallen, die deutlich kleiner sind als die Schmelzkristalle. Der Kalziumanteil ist geringer und der Karbonanteil höher als im Schmelz (107;136). Diese Unterschiede machen Dentin reaktiver zur Ionenaufnahme aus Körperflüssigkeiten (136). Daneben kommen auch verschiedene anorganische Salze wie Karbonate, Phosphate und Sulfate sowie Spuren von Fluor, Kupfer, Zink und Eisen (106) vor.

###### 1.1.2.2 Mineralisation

Das Kristallwachstum des Dentins erfolgt nach initialer Keimbildung durch Präzipitation von Ionen und Molekülen aus einer flüssigen Phase und nachfolgende Bindung (136). Bei der Umwandlung von Prädentin in Dentin während des Mineralisationsprozesses spielen nicht-kollagene Proteine eine tragende Rolle (141). Die eigentliche Mineralisation erfolgt durch Fusion der sich zunächst innerhalb der organischen Matrix bildenden sphärischen mineralischen Strukturen, der sogenannten Kalkosphärite. Während dieses Reifungsvorganges kommt es zum Einschluss des Hauptfortsatzes jedes Odontoblasten im Dentin, wobei die Dentintubuli entstehen (141).

###### 1.1.3 Dentintubuli

Dentintubuli, die von der Pulpa zur Schmelz-Dentin- bzw. Schmelz-Zement-Grenze verlaufen, sind nicht gerade, sondern gekrümmt und manchmal sogar S-förmig (107). Im Wurzel dentin und Reperatur dentin sind die Tubuli peripher oft verzweigt (20). Speziell im äußeren koronalen Drittel nahe der Schmelz-Dentin-Grenze existieren zahlreiche Seitenkanälchen, deren Anzahl im mittleren Dentin abnimmt und die im inneren koronalen Dentin nicht mehr vorkommen (16). Diese Kanälchen scheinen für die Ernährung des Dentins

eine Rolle zu spielen (96), wobei Anostomosen auch zwischen entfernteren Tubuli bestehen. Zudem werden im Inneren der Tubuli, vor allem im pulpanahen Dentin, Kollagenfasern gefunden (47;50). Diese treten als einzelne Fibrillen bis hin zu dichten Bündeln auf. Anzahl und Durchmesser der Dentintubuli pro mm<sup>2</sup> nehmen von innen nach außen ab. Der Anteil am Dentintubulivolumen beträgt pulpanah 28% und schmelznah 4% (31).

Durch Entfernung des peritubulären Dentins erhöht Demineralisation den Durchmesser der Kanälchen (50). Dabei sollen nach Angaben von Gaberoglio und Brannstrom (50) aus dem Jahr 1976 im dekalzifiziertem Dentin die Durchmesser pulpanah und pulpafern gleich sein. Dentinscheiben vom okklusalen Anteil des Zahnes weisen meist mehr quergeschnittene Öffnungen auf als Dentinscheiben vom bukkalen Anteil (115). Wurzeldentin weist weniger Tubuli auf als koronales Dentin (48). Die vestibulären und oralen Seiten weisen mehr Kanälchen auf als die mesialen und distalen (149). Ältere Zähne weisen eine geringere Tubulidichte auf als jüngere (25).

In der Literatur wird die Existenz eines Odontoblastenfortsatzes im äußeren Anteil der Tubuli kontrovers diskutiert. Neuste Untersuchungen mit konfokaler Lasermikroskopie (CLSM) und Feldemissionselektronenmikroskopie (FE-SEM) haben gezeigt, dass diese Fortsätze nur im pulpanahen Drittel der Dentintubuli existierten (53). Bei den weiter peripher beschriebenen Strukturen in den Tubuli handelt es sich wahrscheinlich um die bereits von Thomas und Carella (178) und Weber und Zaki (185) identifizierte blattartige Struktur, der inneren hypomineralisierten Schicht des peritubulären Dentins, der sogenannten lamina limitans (53). Die peritubuläre Matrix wird nach Entstehen des intertubulären Dentins in den Raum zwischen der Tubuliwand und der lamina limitans sezerniert (80).

Der Durchmesser der Tubuli hängt vom Anteil an peritubulärem Dentin ab, das von der Schmelz-Dentingrenze bis ca. 150µm vor das Prädentin reicht. Peritubuläres Dentin enthält sehr wenige Kollagenfasern und kohlenhydratreiche Strukturen (52) und ist höher mineralisiert als intertubuläres Dentin, hauptsächlich durch Hydroxylapatit, aber auch durch Magnesium und Carbonat (96). Obliteration der Dentintubuli kann durch eine Beschädigung der lamina limitans (178) oder durch Präzipitation von Kristallen im Kanallumen entstehen (76).

Kollagenfasern im intertubulären Dentin sind zufällig ausgerichtet (80;124). Im radikulären Dentin verlaufen die Kollagenfasern parallel zur Längsachse der Wurzel (96). Die äußere Dentinschicht unter dem Zement ist nicht mehr so streng tubulär aufgebaut. Hier gibt es eine hypomineralisierte interglobuläre Zone, die sogenannte Tomesche Körnerschicht (80;107).

#### 1.1.4 Permeabilität

Permeabilität bezeichnet die Eigenschaft, die es ermöglicht, dass eine Substanz in eine Diffusionsbarriere hinein- und durch diese hindurchgelangen kann (111). Prinzipiell unterscheidet man beim Dentin zwei Arten von Permeabilität. Die physiologische, intratubuläre Permeabilität und die durch Demineralisation des Dentins induzierte intertubuläre Permeabilität (111).

Bei der intratubulären Permeabilität kommt es durch den Gewebedruck in der Pulpa zu einem nach außen gerichteten Flüssigkeitsstrom des in den Tubuli befindlichen Dentinliquors. Dieser kann z. B. das Eindringen von Bakterien erschweren (126;181), aber nicht verhindern (113). Pashley et al. (122) beschrieben, dass die Dentinpermeabilität je nach Lokalisation stark variiert. Am höchsten ist sie direkt über den Pulpahörnern im koronalen Dentin. Koronales Dentin hat im Vergleich zu Wurzeldentin eine 4-fach höhere Permeabilität (45). Dies ist wahrscheinlich auf die höhere Dichte der Tubuli im koronalen Dentin zurückzuführen. Auch hängt die Permeabilität vom Durchmesser der Dentintubuli (122) und der Dentindicke ab (45;120;152). Dickeres Dentin zeigt einen höheren Widerstand gegen den Fluss von Dentinliquor (138;152). Die Permeabilität korreliert generell eng mit der Dentinmorphologie, ist aber auch von exogenen Faktoren, wie zum Beispiel der Schmierschicht abhängig, welche durch die Bearbeitung von Dentin mit rotierenden zahnärztlichen Instrumenten entsteht (54;115;127).

Auch die Dentinhypersensitivität hängt mit der Dentinpermeabilität zusammen. Es gibt verschiedene Hypothesen für das Entstehen dieser Hypersensitivität. Die vorherrschende ist die hydrodynamische Theorie von Brannström (14), nach der taktile, mechanische oder osmotische Reize zu Flüssigkeitsbewegungen in den Tubuli und anschließend zur mechanischen Reizung der Nerven führen. Wenn endogen keine Plasmaproteine oder Kristalle in den Tubuli abgelagert werden, die zu einer Reduzierung der Hypersensitivität führen, kann dies auch durch exogenen Verschluss der Eingänge zum Beispiel durch Fluoride (54), Kalziumoxalat (26) oder Adhäsivsysteme (195) erreicht werden.

#### 1.1.5 Schmierschicht

Die Bearbeitung von Dentin mit rotierenden zahnärztlichen Instrumenten, diamantierten Scheiben oder Schleifpapier führt durch mechanische Scherbeanspruchung und thermische

Denaturierung (129) immer zur Bildung der sogenannten Schmierschicht (55). Diese besteht aus in die Dentinkanälchen gepressten und einer auf das Dentin aufgelagerten Schicht Material (35;125). Struktur und Dicke der Schmierschicht hängen von der Art des Präparationsinstrumentes und dessen Kühlung ab (55). Ohne Kühlung werden dabei Schichtstärken von bis zu 15µm erreicht. Gekühlte zahnärztliche Präparationsinstrumente produzieren ca. 1µm bis 5µm dicke Schmierschichten (119).

#### 1.1.5.1 Zusammensetzung

Die genaue Zusammensetzung der Schmierschicht wurde zum ersten Mal von Eick et al. (37) untersucht. Diesen Autoren zufolge besteht die Schmierschicht aus flachen anorganischen Hydroxylapatitteilen mit 0,5µm-15µm Durchmesser, die wie kleine Plättchen in eine Matrix aus organischen Kollagenbestandteilen eingelagert sind, wobei das Kollagen an der Oberfläche der Schmierschicht denaturiert ist (35;36). In anderen Studien wurde eine globuläre Struktur der Schmierschicht mit 0,05µm-0,1µm großen Untereinheiten, die von kleinen, flüssigkeitsgefüllten Kanälchen umgeben sind, postuliert (125;129). Die chemische Zusammensetzung der Schmierschicht gleicht der des Dentins, durch dessen Abtrag die Schicht entstand. Zusätzlich kann die Schmierschicht auch Bakterien und deren Toxine enthalten (38;121;146;171;184).

#### 1.1.5.2 Eigenschaften

Die Partikel der Schmierschicht haften untereinander und am strukturierten Dentin (35;123). Da die globulären Strukturen jedoch von flüssigkeitsgefüllten Kanälchen umgeben sind, wird die Permeabilität des Dentins durch die Schmierschicht zwar herabgesetzt, aber nicht verhindert (1;61-63;121;128). So entsteht eine wirksame Permeabilitätsbarriere gegen Bakterien, jedoch kann die Diffusion von bakteriellen Toxinen in Richtung Pulpa nicht vermieden werden (15). Gleichzeitig ist jedoch auch eine Diffusion von Immunoglobulinen aus der interstitiellen Flüssigkeit des Pulpagewebes in die Gegenrichtung möglich (86). Diese stellen ebenfalls eine Permeabilitätsbarriere dar (58). Die Schmierschicht ist im oralen Milieu über einen längeren Zeitraum nicht beständig (111;121).

## 2 Enterokokken

### 2.1 Taxonomie

Die Bezeichnung *Enterococcus* wurde erstmals 1903 in einer Veröffentlichung von Thiercelin und Jouhaud (177) für grampositive Diplokokken aus dem menschlichen Verdauungstrakt verwendet. Diese Bakterien wurden wegen ihrer Fähigkeit, kurze und lange Ketten zu bilden, in *Streptococcus faecalis* umbenannt (6). Auf Grund dieser Nomenklatur lässt sich die Geschichte der Enterokokken nicht separat von der des Genus *Streptococcus* betrachten. Über viele Jahre hinweg gab es sehr unterschiedliche Systematiken und Terminologien der Enterokokken, meist wurden sie als Streptokokken bezeichnet.

1937 schlug Sherman (156) ein Klassifikationsschema für Streptokokken mit vier separaten Gruppen vor: Pyogenic, Viridans, Lactic und Enterococcus. Der Ausdruck Enterococcus wurde für Streptokokken benutzt, die über die typischen Eigenschaften von Streptokokken hinaus Wachstum bei Temperaturen zwischen 10°C und 45°C, in bis zu 6,5%iger NaCl-Lösung sowie bei einem pH-Wert bis 9,6 zeigen und 30min bei 60°C überleben. Außerdem besitzen sie die Fähigkeit, Äskulin zu spalten.

Jones (79) erweiterte 1978 die Einteilung von Sherman (156) und änderte die Bezeichnungen Enterococcus und Viridans in 'orale' und 'fäkale' Enterokokken. Er fügte die Gruppen Pneumococcus, Anaerob und 'Andere' Streptokokken hinzu.

Anfang der achtziger Jahre brachte die DNS-Hybridisierung Klarheit in die Systematik der Enterokokken. Farrow et al. (43) zeigten anhand bestimmter biochemischer Leistungen und vor allem der DNS-Hybridisierung, dass unterschiedlich benannte Enterokokkenspezies ein und dieselbe Art darstellen. Gleichzeitig bestätigte sich aber eine große Speziesvielfalt. Schleifer und Kilpper-Bälz (151) belegten durch DNS-DNS- und DNS-rRNS-Hybridisierung die grundsätzlichen Unterschiede zwischen *Streptococcus faecalis* und *Streptococcus faecium* einerseits und den anderen Streptokokken-Arten andererseits. Sie schlugen die Eingliederung von '*Streptococcus*' *faecalis* und '*Streptococcus*' *faecium* in die als Genus neu geschaffene Gruppe der Enterokokken vor (*Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium*). Seit Etablierung des Genus *Enterococcus* 1984 durch Schleifer und Kilpper-Bälz (151) sind 19 unterschiedliche Spezies dem Genus *Enterococcus* hinzugefügt worden.

Auf Grund der 16S-rRNS-Sequenzanalyse des Genus *Enterococcus* zeichnen sich verschiedene Speziesgruppen ab (190): die *Enterococcus faecium*-Gruppe, die *Enterococcus*

avium-Gruppe und die *Enterococcus gallinarum*-Gruppe. Für *Enterococcus faecalis* und vier weitere Arten bestehen individuelle Abstammungslinien (104).

## 2.2 Morphologie

Enterokokken sind kleine, grampositive Bakterien, die zum Teil kurze Ketten oder Paare bilden und zur physiologischen Flora des Magendarmtraktes bei Mensch und Tier gehören. Enterokokken-Kolonien sind ungefähr 2 mm im Durchmesser, von runder Gestalt, glatt und hellgrau. Sie sind unbegeißelt und daher unbeweglich (154). In der Regel wachsen sie mit alpha-Hämolyse auf Schafblutagar.

## 2.3 Eigenschaften

Als Begleitkeime machen Enterokokken im Intestinum einen Anteil von weniger als 1% der Gesamtflora aus (87). Enterokokken sind in der Lage, ein breites Spektrum an Umweltbedingungen zum Wachstum zu nutzen. Die meisten Enterokokken wachsen unter aeroben und fakultativ anaeroben Bedingungen, bei Temperaturen von 10°C bis 45°C, einem pH-Wert des Mediums bis zu 9,6 und in Anwesenheit von 6,5% NaCl oder 40% Rindergalle. Ebenso findet Wachstum bei Zugabe von 0,1% Methyleneblau statt (154). Die Äskulinspaltung durch Enterokokken ist eine Eigenschaft, die als diagnostisches Kriterium zur Abgrenzung von Streptokokken (42) benutzt wurde. Enterokokkeninfektionen sind empfindlich gegen verschiedene Antibiotika (vor allem  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, Aminoglykoside). Verhält sich jedoch ein Erreger gegen diese Antibiotika resistent oder besteht eine entsprechende Allergie, müssen Glycopeptidantibiotika wie Vancomycin und Teicoplanin als Reservetherapeutika eingesetzt werden (192).

## 2.4 *Enterococcus faecalis* in der Zahnmedizin

In der Zahnmedizin wird *Enterococcus faecalis* mit persistenter apikaler Parodontitis in Verbindung gebracht (65;108;174). Obwohl sie nur einen kleinen Teil der initialen Flora charakterisieren, konnte *Enterococcus faecalis* häufig in gefüllten Wurzelkanälen mit Anzeichen einer chronischen apikalen Parodontitis ausgemacht werden (143;164;173). Bis zu 70% der positiven Kulturen, die aus solchen Zähnen isoliert wurden, stellten den *Enterococcus faecalis* dar (65;108;174). Oft traten diese Bakterien auch als Monokulturen auf (30;65;130;174). *Enterococcus faecalis* sind resistent gegen extreme Umwelteinflüsse, nicht

ausgenommen hohe pH-Werte. So bestätigte Sherman (156), dass *Enterococcus faecalis* pH-Werte bis 11,9 tolerieren kann. Weiterhin konnte die Kalzium-Hydroxid-Resistenz von *Enterococcus faecalis* nachgewiesen werden (21;41;56;57;116).

Eine Grundvoraussetzung und der erste Schritt im Verlauf der meisten infektiösen Krankheiten ist, dass Bakterien den Wirt besiedeln können (83). Zareba et al. (196), Xiao et al. (193), Rich et al. (139), Nallapareddy et al. (112) und Love (98) wiesen die Haftung von *Enterococcus faecalis* an extrazelluläre Matrixproteine einschließlich Kollagen Typ I nach. Da Kollagen Typ I ein organischer Hauptbestandteil des Dentins ist, findet der *Enterococcus faecalis* günstige Bedingungen für die Besiedelung vor (96).

*Enterococcus faecalis* wird häufig als Testkeim gewählt (56;57;116), da er sich leicht identifizieren lässt, unter aeroben und fakultativ anaeroben Bedingungen wächst, leicht zu kultivieren und nicht anspruchsvoll ist. Von allen in den *in vitro* Versuchen verwendeten Bakterien bevölkert er die Dentinkanälchen mit am schnellsten (57;101).

Orstavik und Haapasalo (116) beschrieben, dass *Enterococcus faecalis in vitro* nach nur 3 Tagen Inkubation die gesamte Weite des circumpulpalen Dentins penetriert hatte. Waltimo et al. (182) demonstrierten die Besiedlung von Dentintubuli in ihrer Gesamtlänge durch *Enterococcus faecalis* innerhalb von 1 bis 5 Tagen. Vahadaty et al. (180) zeigten, dass der *Enterococcus faecalis* innerhalb einer Woche die Kanälchen bis zu einer Tiefe von 300µm besiedelte. Im Vergleich dazu zeigten Berkiten et al. (12) *in vitro*, dass *Prevotella intermedia* innerhalb von 20 Tagen nur etwa 26µm in die Dentintubuli eindrang, wohingegen *Streptococcus sanguis* in bis zu 380µm Tiefe gefunden wurde (12).

Im Vergleich zu anderen in der Mundflora vorhandenen Bakterien besiedelt *Enterococcus faecalis* der Wurzelkanäle relativ schnell (116). Seine Resistenz gegen einige antiseptische Mittel, vor allem in niedrigeren Konzentrationen sowie die oft in Studien festgestellte Korrelation mit periapikalen Entzündungen machen diese Bakterienart zu einem geeigneten Testobjekt in der zahnmedizinischen Forschung (88;108;166;174).

## 3 Desinfektion des Dentins und Wurzelkanalsystems

Laut Definition im Psychrembel (137) ist Desinfektion eine Maßnahme, die durch Abtöten, Inaktivieren bzw. Entfernen von Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen) eine Reduzierung der Keimzahl um mindestens 5 Zehnerpotenzen erreicht, damit von dem desinfizierten Material keine Infektion mehr ausgehen kann. Boyce und Pittet (13)

beschreiben nach den Richtlinien für Händedesinfektion eine Reduzierung der Keimzahl um mindestens 3 Zehnerpotenzen als biologisch relevant. Eine Desinfektion kann mechanisch, z.B. durch Scheuern oder Reiben, physikalisch durch Strahlen (UV Licht) oder Hitze, sowie chemisch durch Desinfektionsmittel durchgeführt werden (137). Die Wirkung der Desinfektionsmittel wird durch Proteinschädigung, Permeabilitätsschädigung der Zellmembran oder die Blockade von Enzymsystemen erzielt (109). Das Problem der Desinfektion des Dentins oder sogar des Wurzelkanalsystems besteht in der Präsenz vitaler Gewebe in unmittelbarer Nachbarschaft des Desinfektionsortes. Es wäre daher idealerweise ein Desinfektionsverfahren erforderlich, das pathogene Keime abtötet, Wirtszellen jedoch nicht beschädigt (4;176).

### 3.1 Spüllösungen

Um die Desinfektionswirkung während der Aufbereitung eines Wurzelkanals zu verbessern, werden antimikrobielle Spüllösungen eingesetzt. Diese dienen zugleich dem Abtransport der beim Instrumentieren entstehenden Dentinspäne und als Gleitmittel für die Wurzelkanalinstrumente. Als Spüllösungen wurden bisher verschiedene Agenzien angewendet, wie z.B. Wasserstoffperoxid, Ethylalkohol, Phenolderivate, Schwermetallsalze, quaternäre Ammoniumverbindungen, Halogenverbindungen (169) oder Säuren wie z.B. Peressigsäure (90). Obwohl die meisten dieser Lösungen eine mehr oder weniger starke antimikrobielle Wirkung zeigen, hat sich Natriumhypochlorit (NaOCl) als Spüllösung in der täglichen Praxis überwiegend durchgesetzt (68).

#### 3.1.1 Natriumhypochlorit

Natriumhypochlorit (NaOCl) wurde ursprünglich im Ersten Weltkrieg als Desinfektionslösung für Wunden eingesetzt (32). Es zeigt neben seinen antimikrobiellen Eigenschaften die Fähigkeit, nekrotische Gewebe aufzulösen (4;66;69;179;194). Dies ist auch in der Endodontie vorteilhaft, da durch die verzweigte Wurzelkanalmorphologie nicht alle Areale des Wurzelkanalsystems mechanisch erreicht werden können. Jedoch dauert die Auflösung von 6,5mg pulpalem Gewebe mit 1 ml 2%igem NaOCl bei 37°C ca. zweieinhalb Stunden (4). Die Gewebe auflösende Eigenschaft nimmt mit der Konzentration des NaOCl zu (66;176). Der Gewebe auflösende Effekt wird reduziert, wenn das Gewebe vorher durch protein-koagulierende Medikamente (z.B. Formokresol) verändert wurde. In einem solchen Fall muss die Konzentration zwei bis dreimal höher gewählt werden (176). Eine

Temperaturerhöhung einer 2,6%igen NaOCl-Lösung von Raumtemperatur (21°C) auf Körpertemperatur (37°C) bewirkt einen gesteigerten Gewebe auflösenden Effekt, der dem einer 5,2%igen NaOCl-Lösung bei Raumtemperatur entspricht. Wird jedoch 5,2%iges NaOCl erwärmt, so wird der ursprüngliche Effekt nicht verstärkt (27).

NaOCl besitzt die Fähigkeit, Bakterienzellwandbestandteile, wie Lipopolysaccharide (LPS) oder Endotoxine zu inaktivieren (19;59). Es ist bekannt, dass LPS entzündliche Reaktionen hervorrufen (11) und tierexperimentell sogar zur Lyse periapikalen Knochens führen können, wenn sie in den Wurzelkanal eingebracht werden (29). LPS werden bei der Vermehrung oder beim Tod von gramnegativen Mikroorganismen freigesetzt (105). Denkbar ist, dass ein antibakteriell wirksames Agens zwar Mikroorganismen abtötet, dass jedoch die dadurch freigesetzten LPS eine Entzündung persistieren lassen (105).

Calas et al. (24) untersuchten die Adhäsion von Mikroorganismen an mit NaOCl vorbehandelten Dentinproben, im Vergleich zu Dentinproben, die mit Kochsalzlösung vorbehandelt worden waren. Sie fanden an den dem Natriumhypochlorit exponierten Proben signifikant weniger Mikroorganismen.

*In vivo* zeigte NaOCl in Kombination mit der mechanischen Aufbereitung eine deutliche Verbesserung der Keimreduktion im Vergleich zu physiologischer Kochsalzlösung (22). Während die Aufbereitung mit physiologischer Kochsalzlösung bei Dalton et al. (33) nur in 28% der Fälle keimfreie Kanäle erbrachte, erreichten Shuping et al. (157) bei gleichem Studiendesign, jedoch mit 1,25%iger NaOCl-Lösung in 62% der Fälle keimfreie Wurzelkanäle. Ähnliche Ergebnisse konnten auch Sjögren et al. (166) nach Aufbereitung mit NaOCl 0,5% erzielen. Diese Daten zeigen, dass auf ein Desinfektionsmittel wie zum Beispiel NaOCl aufgrund seiner unterstützend keimreduzierenden Wirkung bei der mechanischen Aufbereitung nicht verzichtet werden sollte (157;166).

Umstritten ist, welche NaOCl-Konzentration im Rahmen der Aufbereitung als günstigste anzusehen ist. Je höher die Konzentration der Spüllösung, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass periapikale Gewebe geschädigt werden (170).

D'Arcangelo et al. (28) züchteten 13 verschiedene endopathogene Keime an und gaben 1ml des jeweiligen Inokulates zu 9ml NaOCl-Lösungen in diversen Konzentrationen. Alle Lösungen zeigten ähnlich starke antimikrobielle Wirkung. Siqueira et al. (163) instrumentierten extrahierte Zähne mit nekrotischem Endodont mit 1%igem, 2,5%igem und 5%igem NaOCl und konnten für alle Lösungen eine ähnlich starke, jedoch nicht signifikant unterschiedliche Reduktion der Keimzahl feststellen, in keinem der Fälle konnte jedoch



absolute Keimfreiheit erzielt werden. Ebenso beobachteten Seichter et al. (153) für die Reduktion der Bakterienzahl keinen Unterschied bei Applikation von 0,9%igem oder 3%igem NaOCl, nachdem sie extrahierte Zähne mit *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Actinomyces viscosus* inkubiert und chemomechanisch aufbereitet hatten. Auch Vahdaty et al. (180) konnten in einem *in vitro* Experiment keinen Unterschied bezüglich der Desinfektionskraft verschieden stark konzentrierter NaOCl-Lösungen (0,2% und 2%) feststellen. Im Gegensatz zu den vier zuletzt zitierten Studien beobachteten Siqueira et al. (160) *in vitro* im Agar-Diffusionstest eine signifikant höhere Wachstums-Inhibition acht schwarzpigmentierender Spezies durch 2,5%iges oder 4%iges im Vergleich zu 0,5%igem NaOCl. In einem ähnlichen Experiment konnten Ayhan et al. (7) diese Beobachtung mit anderem Keimspektrum bestätigen. Byström et al. (23) fanden *in vivo* keinen signifikanten Einfluss verschiedener NaOCl Konzentration (0,5% und 5,0%) auf die Reduktion der Bakterienzahl.

Eine 3 bis 6%ige NaOCl-Lösung zeigt im Vergleich zu niedrigeren Konzentrationen einen wesentlich besseren desorptiven Effekt für Proteine, was letztendlich zu verschlechterten Lebens- und Adhäsionsbedingungen von Mikroorganismen führt (60). Zu beachten scheint auch der Aspekt zu sein, dass frisch angemischtes 5%iges NaOCl seine Gewebe auflösende Eigenschaft für etwa 10 Wochen beibehält, während eine 2,62%ige oder 1%ige Lösung diese Eigenschaft nach ein bis zwei Wochen verliert (78).

Cunningham und Joseph (27) konnten in einem *in vitro* Experiment durch Erwärmung von 2,5%igem NaOCl von 22°C auf 37°C in signifikant kürzerer Zeit eine Elimination von Bakterien erzielen. Das so erwärmte NaOCl ist jedoch nur noch für vier Stunden stabil. Sjögren und Sundqvist (168) untersuchten die antimikrobielle Wirkung von 0,5%igem NaOCl *in vivo* und verglichen hierbei die Aufbereitung mit Ultraschall oder Hand. Durch Ultraschallapplikation waren nur noch in 29% der Fälle Mikroorganismen nachweisbar, wohingegen bei Handaufbereitung signifikant mehr, nämlich in 55% der Fälle, Bakterien isolierbar waren. Dies ist möglicherweise auf die Erwärmung des NaOCl durch Ultraschallanwendung zurückzuführen, denn der sogenannte Kavitationseffekt durch Ultraschallapplikation ist nach Ahmad im Wurzelkanal nicht von klinischer Relevanz (2).

Die alternierende Spülung mit Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und NaOCl, wie sie im deutschsprachigen Raum häufig durchgeführt wird, bringt gegenüber der alleinigen Applikation von NaOCl keine relevanten Vorteile. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alleine ist mäßig antibakteriell wirksam (172) und führt durch den „schäumenden“ Effekt zu einer verbesserten Entfernung

von Debris (75). Svec und Harrison (175) konnten im apikalen Wurzelkanalanteil eine verbesserte Reinigung beobachten, wenn H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und NaOCl bei der Instrumentierung alternierend eingesetzt wurden im Gegensatz zur alleinigen Applikation von Kochsalzlösung. Die Autoren testeten leider nicht, inwieweit NaOCl alleine ähnliche Ergebnisse erzielen kann. Die Verwendung beider Spüllösungen führt zu einer Reaktion, aus der Kochsalz, Wasser und Sauerstoff entstehen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NaOCl↔H<sub>2</sub>O+NaCl+O<sub>2</sub>). Dass *in vivo* nach Aufbereitung weniger Schmerzempfindungen registriert werden, wenn beide Spüllösungen gemeinsam angewendet wurden im Vergleich zur alleinigen Applikation von NaOCl (67), kann nach Harrison *et al.* (67) damit begründet werden, dass die Kombination beider Lösungen den gewebeauflösenden Effekt von NaOCl noch verstärkt. The (176) jedoch beschrieb, dass die bakterizide Wirkung dieser Wirkstoffkombination nicht gesichert ist und der Gewebe auflösende Effekt des NaOCl durch Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nahezu vollständig aufgehoben wird.

### 3.1.2 Chlorhexidin

Chlorhexidin (CHX) wurde 1954 von Davies et al. (46) als Desinfektionsmittel eingeführt und wird seither in vielen Bereichen der Medizin, u.a. auch zur Haut- und Händedesinfektion, angewendet. 1970 zeigten Loe et al. (97), dass durch die zweimal tägliche Anwendung einer 0,2%igen CHX Lösung die Plaquebildung und damit gleichzeitig die Ausbildung einer Gingivitis verhindert werden konnte.

CHX gehört zur Gruppe der Bisguanide, liegt in reiner Form als weißes, geruchloses Pulver vor und besitzt kationischen Charakter. Die freie Base ist in Wasser bei 20°C nur zu 0,08% löslich, als Diacetat beträgt die Löslichkeit 1,9%, als Digluconat jedoch mehr als 50% (46). Winrow (191) untersuchte, auf welchem Wege CHX nach oraler Verabreichung ausgeschieden wird und stellte fest, dass es beim Menschen zu 81,9% und bei der Ratte zu 99,5% über den Stuhl ausgeschieden wird.

CHX wird in der Zahnmedizin meist als Digluconat verwendet. Es wirkt in Konzentrationen von ca. 100ppm bakterizid und besitzt noch bei Konzentrationen von ca. 0,19ppm bakteriostatische Eigenschaften (72). Das Spektrum der auf CHX sensitiven Mikroorganismen erstreckt sich über eine breite Spanne grampositiver und gramnegativer Bakterien, von denen jedoch die grampositiven sensibler zu sein scheinen als einige gramnegative, wie z.B. *Pseudomonas aeruginosa* (39;72).

Durch seinen kationischen Charakter hat CHX die Fähigkeit, sich an alle negativ geladenen Flächen anzulagern, wodurch es zu einer Art Reservoirbildung kommt. Diese Flächen können

Speichelmuzine, Bakterienzellen, Pellikel oder Hydroxylapatit sein (34;40;102;144). Die Bindung an diese Flächen kommt über anionische Gruppen wie Phosphat- Sulfat- oder Carboxylgruppen zustande (51). CHX besitzt eine starke, jedoch pH-abhängige Bindung an Serumalbumin, in dessen Gegenwart auch die antibakteriellen Eigenschaften abnehmen (72). Während Bassetti und Kallenberger (10) nach CHX-Applikation eine verzögerte Wundheilung in Mukosa oder Knochenläsionen beobachteten, fanden Saatman et al. (147), Hirst et al. (73) und Brennan et al. (17) keine Wundheilungsstörungen nach CHX-Applikation, allerdings war bei den zuletzt zitierten Studien kein knöchernes Gewebe involviert. Die hohe antimikrobielle Effektivität, seine geringe Toxizität und seine ausgeprägte Substantivität legen nahe, CHX als Desinfektionslösung im Wurzelkanal zu applizieren (9).

Orstavik und Haapasalo (116) konnten beim Vergleich zwischen 0,2%igem CHX und 5,25%igem NaOCl keine Unterschiede bezüglich der Tiefe der Desinfektion in den Dentintubuli feststellen. Vahdaty et al. (180) und Heling et al. (70) fanden mit dieser Testmethode keinen Unterschied zwischen unterschiedlich konzentrierten NaOCl und CHX-Lösungen. Komorowski et al. (88) untersuchten die Wirksamkeit von 0,2%igem und 2,5%igem NaOCl gegen *Enterococcus faecalis*, einem Keim, der als Problemkeim gilt. Er wurde des öfteren in Wurzelkanälen mit persistierenden apikalen Parodontitiden nach erfolgter Wurzelkanalbehandlung gefunden (108;174). Komorowski et al. (88) beobachteten zwar keine Unterschiede zwischen einer 2,5%igen NaOCl-Lösung und einer 0,2%igen CHX-Lösung bezüglich der antimikrobiellen Wirkung bei Applikation der Testlösungen für 5min. Bei einer Einwirkzeit von sieben Tagen hingegen zeigte sich CHX im Gegensatz zu NaOCl signifikant überlegen.

Leonardo et al. (92) und White et al. (188) konnten auch für den Wurzelkanal einen bleibenden Resteffekt von CHX nachweisen, Jung et al. (81) obturierten Wurzelkanäle nach 5min CHX- oder NaOCl-Exposition und konnten in den mit CHX-behandelten Proben für 35 Tage kein Bakterienwachstum beobachten, während in den mit NaOCl behandelten Wurzeln bereits nach 24 Stunden Bakterienwachstum vorhanden war. Roach et al. (142) legten diverse medikamentöse Einlagen in unverschlossene Wurzelkanäle, darunter Ca(OH)<sub>2</sub>, 1%iges CHX-Gel und eine kalziumhydroxidhaltige Guttaperchaspitze, um anschließend die bakterielle Penetration durch diese Wurzelkanäle zu testen. Das CHX-Gel war zwar der Kalziumhydroxid-Guttapercha-Spitze signifikant überlegen, konnte aber die bakterielle Penetration nicht so gut verhindern wie Ca(OH)<sub>2</sub>-Paste. Die meisten der bisher zitierten Studien, die sich mit CHX auseinandersetzten, konnten keinen konzentrationsabhängigen Unterschied der antimikrobiellen Wirkung beim Einsatz von Lösungen zwischen 0,1% und

2% beobachten. Jedoch konnten White et al. (188) eine signifikant bessere Reduktion von Mikroorganismen bei 2%igem im Vergleich zu 0,12%igem CHX demonstrieren.

Sen et al. (155) beobachteten für eine 0,12%ige CHX-Lösung zwar einen fungiziden Effekt, der jedoch erst eintrat, wenn die Kontaktzeit länger als eine Stunde war. Eine fungizide Wirkung des CHX konnte auch in anderen Studien bestätigt werden (7;28;44;89).

In diversen *in vivo* Studien wurde CHX allein oder im Vergleich zu kampferhaltigem Monochlorphenol (CMCP), NaOCl oder Ca(OH)<sub>2</sub> getestet. So untersuchten Klimm et al. (85) die Ausheilung periapikaler Läsionen nach Aufbereitung und mehrfacher Spülung mit CHX ohne anschließende Einlage. Die Autoren konnten in 60% der Fälle nach 6 bis 40 Monaten eine vollständige Knochenregeneration feststellen und in 24% der Fälle wurde nach 3 bis 8 Monaten eine Verkleinerung der Läsionen beobachtet. Leonardo et al. (92) bereiteten ebenfalls *in vivo* Zähne mit nekrotischem Endodont mit 2%iger CHX Lösung auf und untersuchten die Zähne vor und 48 Stunden nach Aufbereitung auf nachweisbare Mikroorganismen. Von 18 Zähnen mit isolierbaren Keimen konnten zwei Tage nach CHX-Applikation nur noch in 3 Zähnen anaerobe Keime nachgewiesen werden. Die Zahl der *Streptococcus mutans* Kolonien war in allen Fällen auf 0 reduziert (92). Ringel et al. (140) bereiteten in ähnlicher Weise 60 Zähne auf, jedoch verglichen sie 0,2%ige CHX-Lösung mit 2,5%iger NaOCl-Lösung. Die Autoren untersuchten hierbei, wie viele Sitzungen nötig waren, bis alle Wurzelkanäle nur durch Aufbereitung und Spülung keine Bakterien mehr aufwiesen. Für beide Lösungen musste eine ähnliche Anzahl von Sitzungen anberaumt werden. Während jedoch in den mit NaOCl behandelten Zähnen in 11 Fällen nach bereits erreichter Keimfreiheit wieder Wachstum beobachtet wurde, konnte dies in den durch CHX behandelten Zähnen in 24 Fällen festgestellt werden. Dieser Unterschied war statistisch signifikant. Die Ergebnisse dieser Studie stellen somit den dem CHX zugeschriebenen Residualeffekt in Frage. In einer weiteren Studie von Kuruvilla und Kamath (91) wurden ebenfalls die antimikrobiellen Eigenschaften von CHX und NaOCl *in vivo* verglichen. In Zähnen, die mit NaOCl gespült wurden, konnten in 3 von 10 Fällen keimfreie Bedingungen geschaffen werden. Ähnliche Ergebnisse wurden bei 4 von 10 mit CHX behandelten Fällen und 6 von 10 Fällen in einer weiteren Gruppe, in der mit einer Kombination aus NaOCl und CHX gespült wurde, erzielt. Die letzte Gruppe war hierbei signifikant effektiver als die erste. Die Autoren untersuchten nicht, inwieweit diese Mischung der beiden Lösungen in der Lage ist, nekrotische Gewebe aufzulösen.

Barbosa et al. (8) instrumentierten zur Bestimmung der antimikrobiellen Wirkung verschiedener Substanzen Zähne mit nekrotischem Endodont *in vivo* und legten anschließend

CPCM, Ca(OH)<sub>2</sub> oder 0,12%iges CHX ein. Die Autoren konnten keinen signifikanten Unterschied in der Desinfektionswirkung der eingelegten Medikamente feststellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass CHX bezüglich der antimikrobiellen Eigenschaften NaOCl durchaus ähnlich ist, wobei vor allem seine geringe Toxizität für den Wirt überzeugt (84;187). CHX vermag es jedoch nicht - wie NaOCl - Endotoxine zu neutralisieren (3). Bisher konnte auch noch kein Gewebe auflösender Effekt von CHX nachgewiesen werden.

#### 4 Artificielle Infektion von Dentin

Um die Wirkung antibakterieller Substanzen auf Bakterien in Dentinkanälchen *in vitro* zu testen, ist es notwendig, vorher Dentin erfolgreich artifiziell zu infizieren. Vorreiter auf diesem Gebiet sind Haapasalo und Orstavik. 1987 entwickelten sie eine Methode zur artifiziellen Infektion von Dentin, die von vielen Autoren mit Veränderungen der antiseptischen Substanzen, ihrer Konzentrationen, der Mikroorganismen und der Inkubationszeiten nachgeahmt wurde (49;71;101;132;161;180). In dem ursprünglichen Versuch Haapasalos und Orstaviks (57) wurden aus frisch extrahierten Rinderzähnen zylindrische Dentinblöcke mit 4mm Höhe, 6mm Breite und einem Durchmesser des Kanallumens von 2,3mm hergestellt. Wurzelzement wurde von allen Dentinblöcken entfernt. Die Dentinkanälchen wurden durch eine 4 minütige Behandlung mit 17% EDTA und 5,25% NaOCl geöffnet. Als nächstes wurden die Testobjekte in Yeast-Extrakt-Glukose-Broth für 24h bei 37°C eingelegt. Dann wurden die Dentinblöcke für 10min mit Ultraschall behandelt, um die Penetration des Mediums in die Dentinkanälchen zu verbessern. Die Inkubationszeit der Dentinblöcke mit Bakterien betrug 3 Wochen. Vor dem Testen der antiseptischen Substanzen wurde die äußere Fläche der Dentinblöcke mit Nagellack versiegelt. Die Testsubstanzen (Kalziumhydroxid und CMCP) wurden in die Pulpalumen gefüllt, bis auch die freie Oberfläche der Dentinblöcke bedeckt war (57).

Im Jahr 1990 veröffentlichten die Autoren einen weiteren Versuch nach dem gleichen Schema. Sie veränderten jedoch die Bakterienarten und testeten drei weitere antiseptische Mittel (116). Zehn Jahre später wurde unter der Leitung von Haapasalo (56) eine andere Methode zur artifiziellen Infektion des Dentins vorgestellt. Sterilisiertes Dentin wurde zu Dentinspänen mit einer Partikelgröße 0,2 bis 20 Mikrometer verarbeitet. Den Dentinspänen wurden zunächst die antiseptischen Testsubstanzen hinzugefügt und für 24h bei 37°C

inkubiert. Anschließend erfolgte die Infektion mit *Enterococcus faecalis*. 5min, 1h und 24h nach Infektion der desinfizierten Dentinspäne wurden Stichproben entnommen.

Im selben Jahr erarbeitete Waltimo (182), in Zusammenarbeit mit Haapasalo und Orstavik, eine weitere Methode zur artifiziellen Infektion des Dentins. 2mm dicke Dentinscheiben wurden zwischen zwei Küvetten platziert. Die beiden Küvetten hatten jeweils eine zirkuläre Öffnung zur Dentinscheibe hin. Die Küvette der pulpanahen Seite der Dentinscheibe wurde mit Medium gefüllt und die Konstruktion für 48h bei 37°C inkubiert, um so eine Penetration des Mediums von der einen Küvette, durch die Dentinscheibe in die zweite Küvette zu initiieren. Erst dann wurde 0,1ml der Bakteriensuspension in die pulpanahe Küvette injiziert. Die Inkubation bei 37°C wurde so lange durchgeführt, bis Bakterienwachstum in der nicht infizierten Küvette auftrat.

### III Fragestellung

Ziel der vorliegenden Studie war es, in möglichst kurzer Zeit eine gezielte, dichte bakterielle Infektion 200µm dicker, zuvor keimfreier Rinderdentinscheiben zu erreichen. Hierzu sollte eine Methode entwickelt werden, welche von den bisher in der Literatur angewendeten Methoden in der Art der Infektion abwich. Die Eignung dieser Methode sollte nachgewiesen werden. Dazu wurde die antibakterielle Wirkung von NaOCl (0,5%, 1,0%, 3,0%) und CHX (0,2%) auf *Enterococcus faecalis* untersucht. Zur Kontrolle der Tiefe des Eindringens der Bakterien in die Dentinkanälchen wurden einzelne rasterelektronenmikroskopische Bilder gemacht.

### IV Material und Methode

#### 1. Materialien

##### 1.1 Eingesetzte Mikroorganismen

Für die artifizielle Infizierung von bovinem Dentin wurde *Enterococcus faecalis* (ATTC 29212) verwendet. Die primären tiefgefrorenen Bakterienkulturen stammten aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Klinikum der Universität Regensburg und wurden auf Glasperlen mit zentralem Hohlzylinder zur Verfügung gestellt. Sie wurden als Gefrierkultur bei -7°C aufbewahrt.

##### 1.2 Testmaterialien

Als Testsubstanzen wurden Chlorhexidin (CHX) und Natriumhypochlorit (NaOCl) benutzt. CHX wurde als 0,2% ige Lösung (bezogen aus der Apotheke der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg) verwendet. Das NaOCl wurde als 5,25% ige Lösung der Firma Speiko (Hypochlorit-Speiko, Wirkstoff: Natrium-hypochlorit 5,25%; Speiko, Münster, Deutschland) bestellt und als 1% iges Natriumhypochlorit aus der Apotheke der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg bezogen. Die im Versuch verwendeten NaOCl Konzentration 0,5% und 3,0% wurden aus der 5,25% Lösung durch Verdünnung mit 18 Ω-Millipore-Wasser aus dem Millipore-Apparat (MilliQUFplus, Millipore; Molsheim, Frankreich) im eigenen Labor hergestellt. Die Lagerung der Substanzen erfolgte in verschlossenen, braunen Glasflaschen im Laborkühlschrank (Privileg de luxe, Typ 2647) bei 7,5°C. Die im Experiment benötigten Mengen der Testsubstanzen wurden stets mit sterilen, automatischen Pipetten (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) aus den Vorratsflaschen entnommen. Alle zwei Wochen wurden Sterilkontrollen genommen. Hierzu wurden jeweils 100µl der Testsubstanzen auf sterilen CASO-Platten (hergestellt im Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Regensburg, Deutschland, Leiter Prof. Dr. H. Wolf) ausplattiert und die Platten für 24h bei 37°C inkubiert (Inkubator, T 5050E; Heraus; Hanau, Deutschland). Ausbleiben von Bakterienwachstum war der Beweis für die Sterilität der Substanzen. Als Kontrollsubstanz wurde eine 0,9% ige Kochsalzlösung verwendet, welche im eigenen Labor durch Lösen der entsprechenden Mengen NaCl (Artikelnummer 1.06404, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in 18 Ω-Millipore-Wasser, hergestellt wurde.

### 1.3 Nährmedium

Als Nährmedium für *Enterococcus faecalis* wurde Trypticase-Soy-Broth Pulver (TSB-Beckton Dickinson, USA) verwendet. Das Flüssigmedium wurde im eigenen Labor hergestellt. Es wurden 30g TSB in 1 Liter 18  $\Omega$ -Millipore-Wasser aufgelöst. Die 500ml Flaschen mit dem sterilen Medium wurden bis zu ihrem Einsatz im Versuch im Laborkühlschrank bei 7,5°C aufbewahrt. Die Lagerdauer überschritt nie den Zeitraum von 2 Wochen. Es wurden regelmäßige Sterilitätskontrollen durchgeführt (siehe 1.2).

### 1.4 Inkubation der Mikroorganismen

Die Bakterienkulturen wurden im Inkubator (T5050E, Heraeus; Hanau, Deutschland) bei 37°C ohne CO<sub>2</sub>-Zusatz inkubiert. Der Luftdruck und die Luftfeuchtigkeit in der Inkubationskammer wurden durch die Umgebungsluft bestimmt. Bei geschlossenem Inkubator herrschte in der Inkubationskammer Dunkelheit.

### 1.5 Sicherheitsvorkehrungen

Die Durchführung der Versuche erfolgte unter sterilen Laborbedingungen in einer sterilen Werkbank (HF48, GelaireFlow Laboratoires; Opera, Italien). Bei allen Arbeiten mit den Bakterien wurde vom Experimentator Schutzbrillen, Schutzkittel, Nitril-Handschuhe (Sempercare, Semperit Technische Produkte; Wien, Österreich) und ein Mundschutz (Sentinex, Lite El, Lohmann&Rauscher; Neuwied, Deutschland) getragen. Zur Händedesinfektion vor, während und nach den verschiedenen Arbeiten wurde Mucasept (Merz; Frankfurt am Main, Deutschland) verwendet. Zur Desinfektion von Arbeitsgeräten und Flächen wurde Ethanol in einer 70%igen Lösung eingesetzt. Dieser wurde im Labor durch Verdünnung von Ethanol abs. (Chemikalienausgabe, Universität Regensburg, Deutschland) mit entionisiertem Wasser (18 $\Omega$ ) aus dem Millipore-Apparat angesetzt. Lediglich das Messen der optischen Dichte der Bakterienkulturen am Photometer (Ultraspex 3300 pro,UV/Visible Spectrophotometer, Amersham Biosciences, UK) wurden aus technischen Gründen am Photometrie-Arbeitsplatz außerhalb der Werkbank durchgeführt. Der Arbeitstisch wurde vor und nach den Arbeiten gründlich mit 70%igem Ethanol desinfiziert.

### 1.6 Vorbereitung der Bakterienkulturen

Für die Versuche wurden 500 $\mu$ l Gefrierkulturen von *Enterococcus faecalis* hergestellt. Die Lagerung der portionierten Gefrierkulturen erfolgte bei -86°C in einem ULT-Tiefkühlschrank (Forma-86 Freezer, Thermo Electron Corporation; Marietta, USA). Um die Bakteriensuspension für die Versuche herzustellen, wurden aus einem für 30min bei Raumtemperatur aufgetauten, 2,5ml fassenden Eppendorfcup (Eppendorf, Hamburg, Deutschland), das eine 500 $\mu$ l Portion der tiefgefrorenen Bakteriensuspension enthielt, jeweils 200 $\mu$ l der Suspension in zwei Erlenmeierkolben (Weithals, 100ml; Schott Instruments, Mainz, Deutschland), gefüllt mit jeweils 50ml TBS, eingimpft. Die Kolben mit dem angeimpften Medium wurden für 24h inkubiert. Danach wurde die optische Dichte der gewonnenen Bakteriensuspension am Photometer bestimmt. Hierzu wurden mit sterilen Glaspipetten 100 $\mu$ l aus der Suspension entnommen und in Glasküvetten (104-OS, Hellma; Müllheim, Deutschland) gefüllt, diese mit Parafilm (Pechiney plastic packaging; Menasha, USA) abgedichtet, und die optische Dichte am Photometer bei einer Wellenlänge von 600nm gemessen. Die Suspension musste eine minimale OD von 1,200 erreichen, um im Versuch eingesetzt zu werden. Ein oberer Grenzwert war nicht gesetzt. Die von uns gemessene OD überschritt jedoch selten einen Wert von 1,300. Die Einmal-Glasküvetten wurden vor Gebrauch für 20min in einem 70%igen Ethanolbad eingelegt, in der Sterilbank getrocknet, eingeschweißt und für 2 Stunden unter das UV-Licht in der Sterilbank gelegt.

### 1.7 Bottle Top Filter

Für diesen Versuch wurden aus dem steril verpackten Bottle Top Filter (Bottle Top-Filter 150ml, Falcon 35, 7105 Becton Dickson Labware, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, N.J., USA; Abb.1) die 22 $\mu$ m Porendichte (Herstellerangabe) Zellulose Nitrat Membran (Bottle Top-Filter 150ml, Falcon 35, 7105 Becton Dickson Labware, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, N.J., USA) durch eine 1mm dicke Silikonmatte ersetzt, aus der vorher mit einem Skalpell zwei 2mm x 8mm große Rechtecke ausgeschnitten wurden (Abb. 2). Die Silikonmatten wurden nach jedem Versuch autoklaviert (Fedegari Autoclavi; Albuzzano, Italien) und spätestens nach sechsmaligen Gebrauch durch neue ersetzt.

Abb. 1:



Abb.1: Bottle Top Filter auf Auffangflasche mit Verbindungsschlauch zur Vakuum-Pumpe

Abb. 2:



Abb. 2: Silikonmatte in Bottle Top fixiert. Mit Unterdruck angesaugte Dentinscheibe mit deutlich sichtbaren 2mm x 8mm Durchziehbereich

Der Unterdruck zum Durchziehen der Bakteriensuspension durch die Dentinscheiben wurde mit einer Membran-Vakuumpumpe (Membranpumpe einstufig, ME4, Vacuubrand GmbH, Wertheim, Deutschland) bei einem Druck von 3,7m<sup>3</sup>/h; 80mbar erzeugt. Die Pumpe wurde durch einen Schlauch mit dem Bottle Top Filter verbunden (Abb.1).

## 2 Methode

### 2.1 Artifizielle Infizierung von Rinderdentin

Ein Ansatz zur artifiziiellen Infizierung der Rinderdentinscheiben dauerte 5 Werkstage. Er beinhaltete 4 Dentinscheiben in 2 Bottle Top Filtern.

### 2.2 Rinderzähnegewinnung

Im Zerlegetrieb Henke in Feuchtwangen (EZ-Nummer 152, Inhaber Hr. Henke, Feuchtwangen, Deutschland) wurden von frisch geschlachteten 2 bis 3 Jahre alten Rindern die 4 mittleren, bleibenden Frontzähne entnommen. Mit einem Hebel und einer Eckzahn- und Prämolarenzange für den Oberkiefer wurden die Zähne extrahiert. Nachdem mit dem Hebel zirkulär der obere Anteil des Parodonts gelöst wurde, konnte mit leicht luxierenden Bewegungen der Rest des Zahnhalteapparates gelöst und die Zähne vorsichtig extrahiert werden. Zähne, deren Kronen absplitterten, oder die frakturierten, wurden nicht verwendet, da eine Fraktur des Dentins nicht ausgeschlossen werden konnte.

### 2.3 Bearbeitung und Lagerung der extrahierten Rinderzähne

Die extrahierten Zähne wurden in Plastikbehältern mit 0,5%-iger Chloramin-T-Lösung (Artikelnummer 1.02426, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) vom Zerlegetrieb in Feuchtwangen ins Labor transportiert. Die Bindegewebsanteile und die Wurzelhaut wurden mit einem Skalpell entfernt. Die gereinigten Rinderzähne wurden bis zur Weiterverarbeitung höchstens drei Monate lang in destilliertem Aqua (Laborbedarf) gelagert.

### 2.4 Dentinscheibenherstellung

Die gereinigten Rinderzähne wurden mit PalaDur Autopolimerisat (PalaDur Lot 015809-Pulver; Lot 022389-Flüssigkeit; Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) auf dafür speziell vorgesehenen Objektträgern befestigt (Abb. 3) und die Sockel mit den Zähnen in destilliertem Aqua aufbewahrt.

Abb. 3:

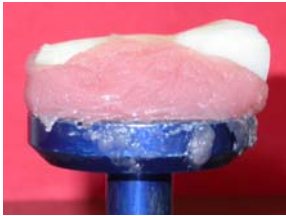


Abb. 3: Gesockelter Rinderzahn

An einem Innenloch-Sägemikrotom (Typ 025-097.25, Leitz; Wetzlar, Deutschland) wurden unter Wasserkühlung in sagittaler Richtung 200µm dicke Dentinscheiben geschnitten. Pro Zahn wurden 2 bis 4 Scheiben am nächsten der Pulpa verwendet. Ihre Dicke wurde mit einer Mikrometerschraube (Bügelmessschraube, Mitutoyo Deutschland, Neuss, Deutschland) kontrolliert, der Toleranzbereich betrug 190µm bis 210µm. Die pulpanahe Seite jeder Scheibe wurde mit einem Bleistift markiert (Abb. 4). Alle Scheiben wurden beidseitig 30sec lang mit 50%iger Zitronensäure geätzt, in 20ml steriler 0,9%iger NaCl Lösung gespült und bis zur weiteren Verwendung, max. 30min, in sterilem 0,9%igem NaCl aufbewahrt. Sowohl die 50%ige Zitronensäure als auch die 0,9%ige Natriumchloridlösung wurden im Labor, durch Lösen der entsprechenden Mengen Zitronensäure (Chemikalienausgabe der Universität Regensburg, Deutschland) bzw. NaCl (Artikelnummer 1.06404, Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland) in 18 Ω-Millipore-Wasser, hergestellt. Die Dentinscheiben wurden immer am Tag des Versuchsansatzes frisch geschnitten und nicht autoklaviert, um die Struktur des Dentins vor der Infektion mit *Enterococcus faecalis* so wenig wie möglich zu verändern. Es wurden stichweiße Sterilproben durchgeführt.

Abb. 4:



Abb. 4: 200µm dicke Dentinscheibe auf der pulpanahen Seite beschriftet

## 2.5 Versuchsaufbau und -ablauf

Ein 5 Werkstage dauernder Versuchsansatz beinhaltete 4 Dentinscheiben in zwei Bottle Top Filtern. Es wurden insgesamt 10 Versuchsansätze mit 40 infizierten Dentinscheiben ausgeführt (Tab.1).

Tab. 1:

TAG 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inkulturnahme von <i>Enterococcus faecalis</i></li> </ul>
TAG 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ansetzen des Versuchsansatzes. Ein Versuchsansatz beinhaltet 4 Dentinscheiben (200µm) in zwei Bottle Top Filtern</li> <li>• Durchziehzeit: 4 Stunden</li> <li>• Inkubation der Dentinplättchen (ausgeschnittener Durchziehbereich) in TSB</li> </ul>
TAG 3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Medienwechsel nach 24h Inkubation</li> <li>• Inkubation für weitere 24h</li> </ul>
TAG 4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Halbieren der Plättchen</li> <li>• Auftragen und Einwirken der Testmaterialien (NaOCl 0,5%, 1,0%, 3,0%; CHX 0,2%) und des Kontrollmaterials (NaCl 0,9%); Einwirkzeiten 30sec und 10min</li> <li>• Beginn der Trübungsmessungen zur Stunde 0 über einen Zeitraum von 26h am Spectrophotometer</li> </ul>
TAG 5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Letzte Messung nach 26h</li> <li>• Auswertung der Ergebnisse</li> </ul>

Tab. 1: Schematische Darstellung des Ablaufes eines Versuchsansatzes über 5 Tage

### Tag 1-Inkulturnahme von *Enterococcus faecalis*

Eine 500µl Gefrierkultur *Enterococcus faecalis* in einem Eppendorfcup (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurde aus dem -86°C ULT-Tiefkühlschrank entnommen und für 30min bei Raumtemperatur in der Sterilbank aufgetaut. Zwei sterile Erlenmeyerkolben mit Glaskügelchen wurden mit je 50ml TBS gefüllt. Als nächstes wurden mit sterilen,

automatischen Pipetten je 200µl der aufgetauten Bakteriensuspension entnommen und in die Kolben mit dem Medium pipettiert. Die Erlenmeyerkolben wurden mit den dazugehörigen Deckeln verschlossen und für 24h bei 37°C inkubiert.

#### Tag 2-Artifizielle Infektion des Dentins

Gewinnen der 200µm Dentinscheiben: Es wurden vier Scheiben pro Ansatz eingesetzt. In der Sterilbank wurde der Bottle Top Filter vorbereitet, die Silikonmatte flüssigkeitsdicht eingeklemmt und der Schlauch der Pumpe an das Bottle Top angeschlossen. Die Bakterienkulturen wurden aus dem Inkubator entnommen, in die Sterilbank gestellt und zwei Dentinscheiben so auf jeder Silikonmatte platziert, dass die zuvor geschnittenen Rechtecke ganz vom Dentin bedeckt waren (Abb.2).

Als nächstes wurden die Dentinscheiben leicht mit Pinzetten an die Silikonmatte fixiert. Danach wurde der Anschaltknopf der Pumpe betätigt und 20ml Bakteriensuspension über die Dentinscheiben gegossen. Nach einer Minute wurde mit Pinzetten kontrolliert, ob die Dentinscheiben durch den Unterdruck sicher fixiert waren. War dies der Fall, so wurde der sichtbare Durchziehbereich des Dentins mit Bleistift nachgezeichnet (Abb.5). Löste sich jedoch eine der Dentinscheiben während der Kontrolle, so musste der Ansatz abgebrochen und ein neuer mit zwei anderen Dentinscheiben durchgeführt werden. Diese Kontrollprozedur wurde während der vierstündigen Durchziehdauer jede halbe Stunde wiederholt.

Weiterhin wurde eine visuelle Kontrolle der Auffangflasche vorgenommen. Trat ein kontinuierlicher, sichtbarer Fluss der Bakteriensuspension aus dem Filter in die Auffangflasche auf, musste der Versuch abgebrochen werden, da dies auf eine undichte Stelle in der Konstruktion hinwies.

Nach 4 Stunden wurde die Membran-Vakuumpumpe abgeschaltet. Nachdem sich die Dentinscheiben durch langsamen Abbau des Unterdrucks gelöst hatten, wurden sie mit Pinzetten herausgenommen und auf einer autoklavierten Serviette abgelegt. Mit einem Skalpell wurde der vorher markierte Durchziehbereich des Dentins ausgeschnitten (Abb.6). Die vier 2mm x 8mm messenden Dentinplättchen wurden jeweils in einen Elmeierkolben mit 25ml TBS eingelegt und bei 37°C für 24h inkubiert.

Abb. 5:



Abb. 5: Dentinscheibe mit markiertem Durchziehbereich

Abb.6:



Abb.6: Detail aus Abb. 5: Ausgeschnittener Durchziehbereich

#### Tag 3-Medienwechsel und Zugabe frischer Bakteriensuspension

Nach 24h wurden die Plättchen den Kolben entnommen, oberflächlich mit sterilen Wattepad (Lot 3901, Lagerhaltung Klinikum der Universität Regensburg, Deutschland) abgewischt und dann jeweils in einem eigenen Kolben für weitere 24h in frischem, mit 100µl Bakterienkultur, beimpften TBS inkubiert.

#### Tag 4-Desinfektion des artifiziell infizierten Dentins und Beginn der Trübungsmessung

Nach Ablauf von weiteren 24 h wurden die Elmeierkolben wieder aus dem Inkubator entnommen. Die Testsubstanzen und die Kontrollsubstanz (0,9% NaCl) wurden aus dem Kühlschrank entnommen und in der Sterilbank bereitgestellt. Für jedes Dentinplättchen war eine Testsubstanz vorgesehen: 0,5%, 1,0%, 3,0%NaOCl oder 0,2%CHX. Die Dentinplättchen wurden aus den Kolben entnommen und gründlich an beiden Seiten mit sterilen Wattepad gesäubert. Mit einem Skalpell wurde jedes der 4 Dentinplättchen halbiert (Abb. 7). Auf diese Weise erhielt jedes Testplättchen seine eigene Kontrolle, die bisher mit den gleichen Mitteln und unter den selben Voraussetzungen behandelt wurde. Die 8 Hälften wurden mit Pinzetten in 6-Well-Platten gelegt. Mit automatischen Pipetten (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurden jeweils 5ml der Testsubstanzen auf jeweils eine der Hälften der Plättchen aufgetragen und auf die jeweils zugehörige andere Hälfte 5ml der Kontrollsubstanz. Es wurden zwei Einwirkzeiten für Test und Kontrolle gewählt. Nach Beendigung der Einwirkdauer wurden die halben Plättchen in 20ml NaCl ausgespült und in vorher vorbereitete und beschriftete Elmeierkolben mit je 60ml TBS Medium eingelegt.



Abb. 7:



Abb. 7: Mit *Enterococcus faecalis* infiziertes Dentinplättchen vor (links) und nach Halbierung (rechts).

Unmittelbar nach Einlegen der halben Plättchen in je einen Kolben wurde die erste Trübungsmessung (Stunde 0) durchgeführt. Während der folgenden Inkubation für 26 Stunden wurden nach 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 24, 26 Stunden Trübungsmessungen durchgeführt. Für die Trübungsmessungen wurden mit automatischen Pipetten (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) jeweils 100µl der Suspension aus jedem Kolben entnommen und in vorher sterilisierte und beschriftete Glasküvetten eingespritzt.

### 3 Datenerfassung und statistische Auswertung

Es wurden jeweils 5 Stichproben pro Testmaterial und Einwirkzeit durchgeführt. Bei 4 Testmaterialien und zwei verschiedenen Einwirkzeiten ergeben sich 40 Stichproben in 8 Untersuchungsgruppen. Jede Stichprobe wurde nach Infektion mit *Enterococcus faecalis* halbiert, so erhielt jedes Testmaterial seine bisher gleichbehandelte Kontrolle.

Über einen Zeitraum von 26 Stunden wurden nephellometrischen Messung zu den Stunden 0, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 durchgeführt. Die so erhaltenen OD-Daten (y-Achse) mit den zugehörigen Messzeiten (x-Achse) wurden an einer 4-Parameter-Logistischen-Dosis-Reaktionskurve gefittet (Tablecurve 2D Version 5.01, SPSS Inc., Chigago, USA). Aus den so ermittelten Kurven wurden folgende Parameter mit Hilfe der verwendeten Software bestimmt (Abb.8).

- Die optische Dichte in der Lag- und der Plateau-Phase
- Die Zeitpunkte des Beginns und des Endes der Log-Phase
- Den Zeitpunkt und die OD im Wendepunkt (Zeitpunkt des maximalen Wachstums der Bakterienkultur)

Aus diesen mit der Software bestimmten Parametern wurde folgender Hauptparameter berechnet und zur weiteren Analyse herangezogen:

- Differenz des Zeitpunktes des maximalen Wachstums zwischen Test und zugehöriger Kontrollkultur (Abb.9)

Die deskriptive Darstellung erfolgte als Mediane mit zugehörigen 25-75% Quantilen. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde der Mann-Whitney-Test und die Error-Rates-Methode (ERM) auf dem Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  angewandt.

Abb. 8:

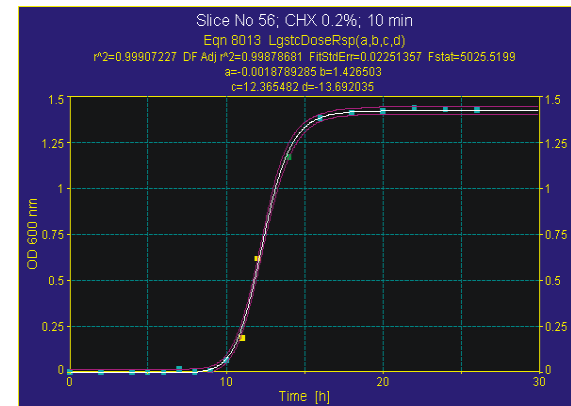


Abb. 8: Die im Photometer gemessenen OD-Daten (y-Achse) wurden gegen die zugehörigen Messzeiten (x-Achse) aufgetragen (Rechtecke) und anschließend an einer 4-Parameter-Logistischen-Dosis-Reaktionskurve gefittet. Dargestellt sind der Fit (weiße Kurve) und das 95% Konfidenzintervall (lila Kurven). Das Beispiel zeigt die Daten der Scheibe Nr 56, die für 10 min mit CHX 0,2% desinfiziert wurde.

Abb. 9

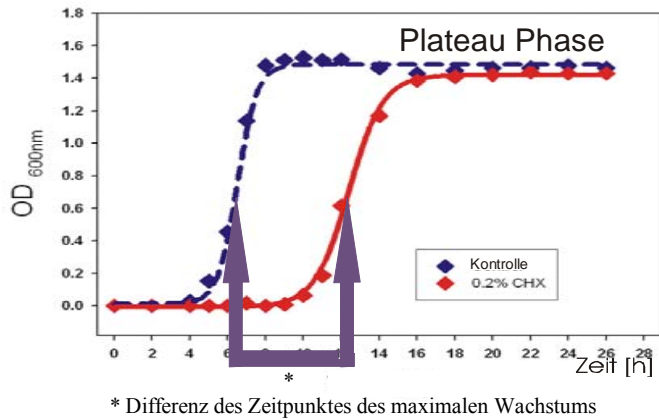


Abb. 9 Veranschaulichung der Differenz des Zeitpunktes des maximalen Wachstums zwischen Test und zugehöriger Kontrollkultur in einer Grafik (Beispiel wie in Abb. 8).

\* Differenz des Zeitpunktes des maximalen Wachstums

#### 4 Rasterelektronenmikroskopische Bilder

Zur exemplarischen Visualisierung der Besiedlung der Dentinkanälchen mit *Enterococcus faecalis* wurden von einigen Dentinscheiben Bilder im Rasterelektronenmikroskop (FEI Quanta 400 FEG, FEI Europe B.V., Eindhoven, Holland) erstellt. Die 200µm dicken Dentinscheiben wurden längs gebrochen und mit Leit-C-Plast auf einem Stub fixiert. Die Proben wurden im feuchten Zustand im low-vacuum Modus untersucht. Die Aufnahmen zeigen jeweils die entstandene Bruchkante und den Verlauf der Dentinkanälchen.

#### V Ergebnisse

##### 1 Die optische Dichte in der Lag- und Plateau-Phase

Die Werte der optischen Dichte (OD) in der Lag-Phase war in allen Fällen kleiner oder gleich 0,01. Die OD Werte in der Plateau-Phase lagen für beide Einwirkzeiten (30sec und 10min) alle über dem Wert von 1,3 mit der Ausnahme von NaOCl 3,0% nach 10min Einwirkzeit, wo die OD konstant gleich Null war (Abb. 10, 11). Für 10min Einwirkzeit waren die OD Werte in der Plateau-Phase für NaOCl 3,0% signifikant unterschiedlich zu allen anderen Materialien (Tab. 2). Die OD Werte für die Einwirkzeiten unterschieden sich für das Testmaterial NaOCl 3,0% (Tab. 3). OD Werte von Test- und Kontrollmaterial unterschieden sich signifikant für NaOCl 1,0% und 3,0% (Tab. 4). ERM ergab einen signifikanten Einfluss der Materialien.

Abb. 10:

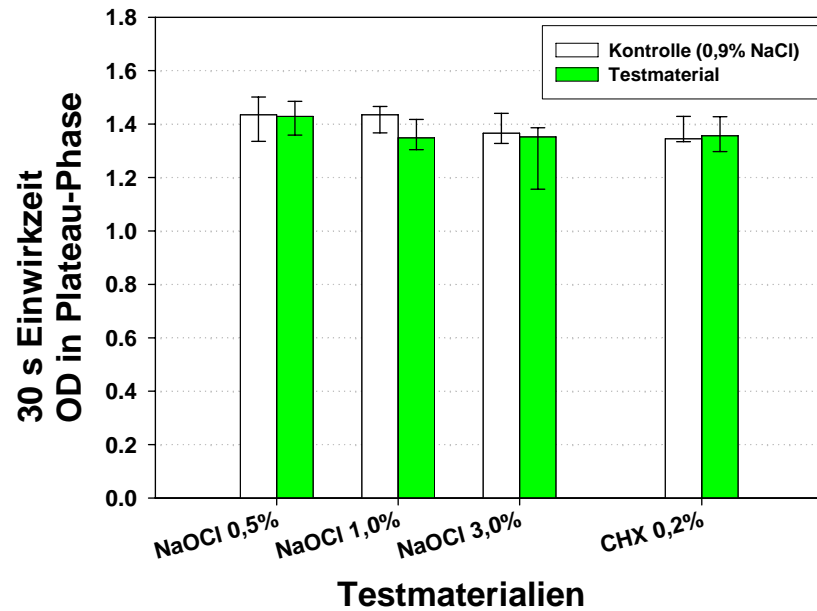


Abb. 10: OD in der Plateau-Phase bei 30s Einwirkzeit für alle Kontrollen und Testmaterialien. Dargestellt sind Mediane und 25-75% Perzentile aus 5 Stichproben.

Abb. 11:

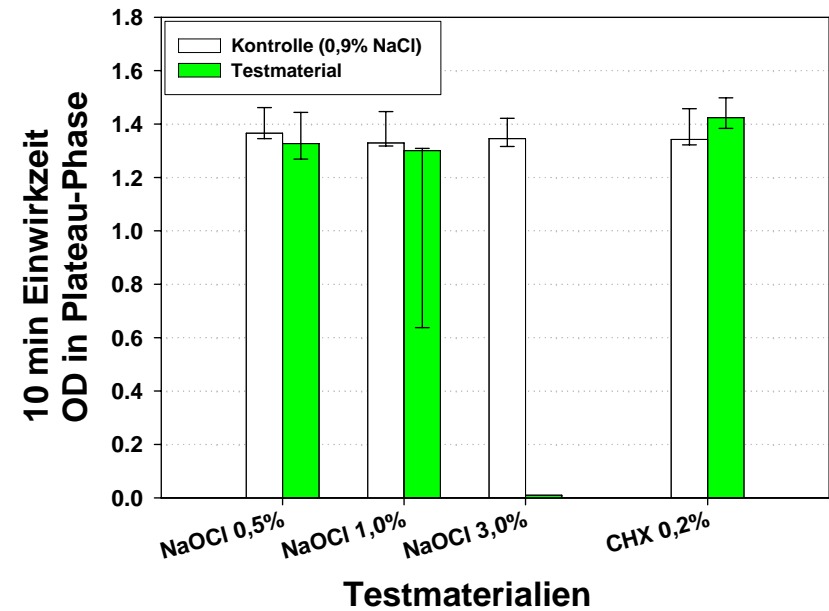


Abb. 11: OD in der Plateau-Phase bei 10min Einwirkzeit für alle Kontrollen und Testmaterialien. Dargestellt sind Mediane und 25-75% Perzentile aus 5 Stichproben.

## 2. Die Zeitpunkte des Beginns und des Endes der Log-Phase

Die Zeitpunkte des Beginns der Log-Phase lagen bei den Kontrollmaterialien bei beiden Einwirkzeiten zwischen 4,8 und 5,7 Stunden (Abb. 12, 13). Die paarweisen Tests sowohl der Materialien gegeneinander für jede der beiden Einwirkzeiten, als auch der Einwirkzeiten gegeneinander für jedes der vier Materialien ergaben keinen signifikanten Unterschied (Tab. 2, 3). Die Zeitpunkte des Beginns der Log-Phase der Testmaterialien nach 30sec Einwirkzeit stieg mit der NaOCl Konzentration signifikant von 8,6h auf 15,1h an. ERM ergab einen signifikanten Einfluss der Materialien (Tab. 2). CHX 0,2% unterschied sich mit einem Wert von 8,6h signifikant von NaOCl 3,0%. Der Beginn der Log-Phase nach 10 min Einwirkzeit lag für die NaOCl Konzentrationen 0,5% und 1,0% bei 13,0-13,6h. Bei NaOCl

3,0% konnte kein Bakterienwachstum mehr nachgewiesen werden, somit konnte theoretisch auch rechnerisch kein Beginn der Log-Phase ermittelt werden. Der Wert von 10,4h für CHX 0,2% unterschied sich signifikant von 13,6h für NaOCl 1,0% (Tab.2). ERM ergab einen signifikanten Einfluss von Testmaterial, Einwirkzeit und Test gegen Kontrolle (Tab. 2-4).

Abb. 12:

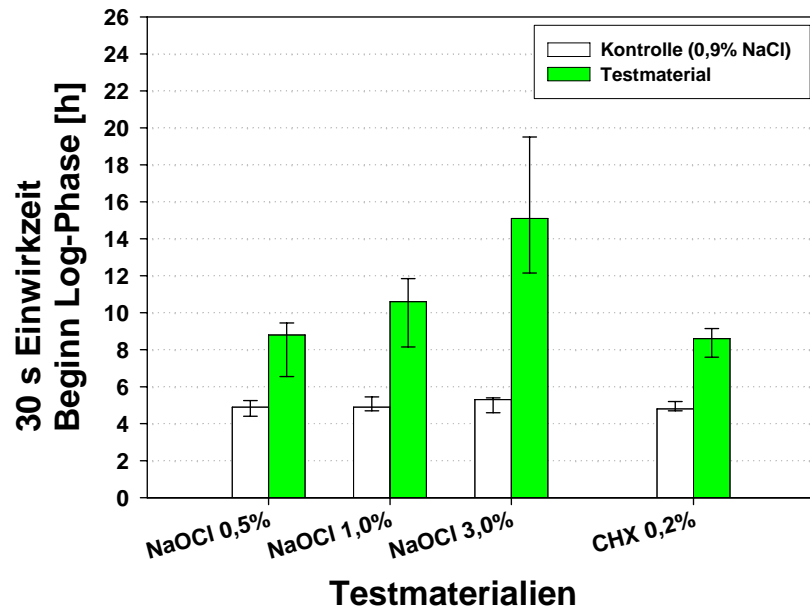


Abb.12: Beginn der Log-Phase in h bei 30s Einwirkzeit für alle Kontrollen und Testmaterialien. Dargestellt sind Mediane und 25-75% Perzentile aus 5 Stichproben.

Abb. 13:

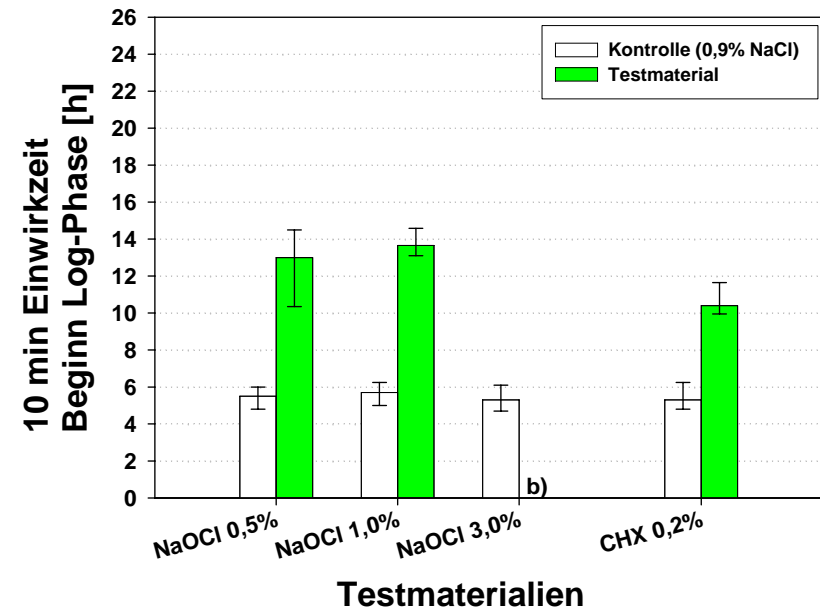


Abb.13: Beginn der Log-Phase in h bei 10min Einwirkzeit für alle Kontrollen und Testmaterialien. Dargestellt sind Mediane und 25-75% Perzentile aus 5 Stichproben.

b) Bei NaOCl 3,0% fand in den Testkulturen kein Bakterienwachstum statt. Daher war eine Log-Phase nicht vorhanden, somit konnte kein Beginn der Log-Phase berechnet werden.

Die Zeitpunkte des Endes der Log-Phase lagen bei den Kontrollmaterialien bei beiden Einwirkzeiten zwischen 8,7h und 10,1h (Abb. 14, 15). Die paarweisen Tests sowohl der Materialien gegeneinander für jede der beiden Einwirkzeiten, als auch der Einwirkzeiten gegeneinander für jedes der vier Materialien ergaben keinen signifikanten Unterschied (Tab. 2, 3). Die Zeitpunkte des Endes der Log-Phase der Testmaterialien nach 30sec Einwirkzeit stieg mit der NaOCl Konzentration signifikant von 12,9h auf 25,7h an. ERM

ergab einen signifikanten Einfluss der Materialien (Tab. 2). CHX 0,2% unterschied sich mit einem Wert von 12,9h signifikant von NaOCl 3,0%. Das Ende der Log-Phase nach 10min Einwirkzeit lag für die NaOCl Konzentrationen 0,5% und 1,0% bei 16,4-22,7h. Bei NaOCl 3,0% konnte kein Bakterienwachstum mehr nachgewiesen werden, somit konnte theoretisch auch rechnerisch kein Ende der Log-Phase ermittelt werden. Der Wert von 15,7h für CHX 0,2% unterschied sich gerade nicht mehr signifikant ( $p=0.063$ ) von 22,7h für NaOCl 1,0% (Tab. 2). ERM ergab einen signifikanten Einfluss von Testmaterial, Einwirkzeit und Test gegen Kontrolle (Tab. 2-4).

Abb. 14:

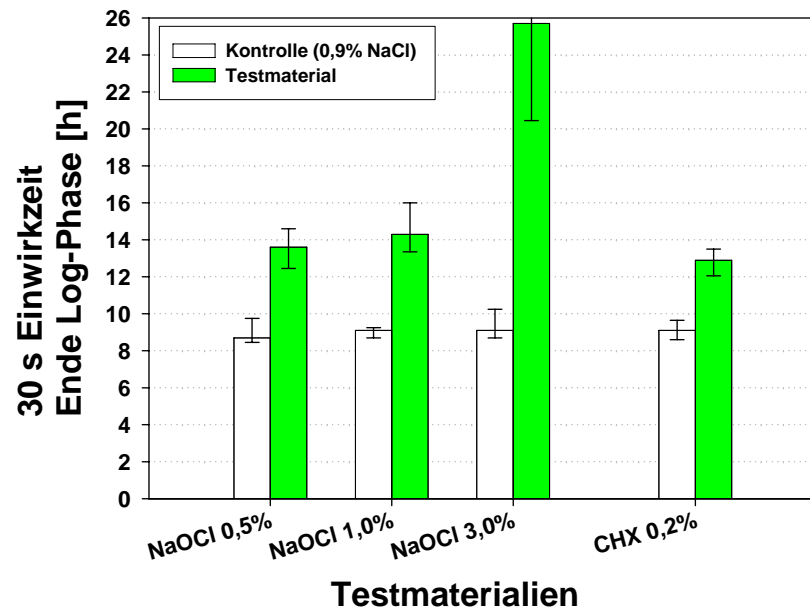


Abb. 14: Ende der Log-Phase in h bei 30s Einwirkzeit für alle Kontrollen und Testmaterialien. Dargestellt sind Mediane und 25-75% Perzentile aus 5 Stichproben.

Abb. 15:

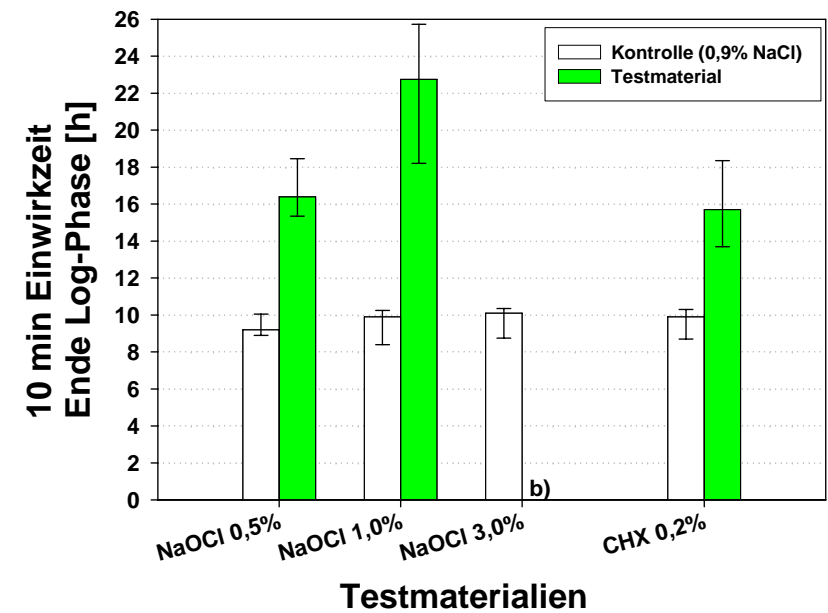


Abb. 15: Ende der Log-Phase in h bei 10min Einwirkzeit für alle Kontrollen und Testmaterialien. Dargestellt sind Mediane und 25-75% Perzentile aus 5 Stichproben.

b) Bei NaOCl 3,0% fand in den Testkulturen kein Bakterienwachstum statt. Daher war eine Log-Phase nicht vorhanden, somit konnte kein Ende der Log-Phase berechnet werden.

### 3. Zeitpunkt und OD im Wendepunkt

Die Zeitpunkte im Wendepunkt der Kurve, d.h. die Zeitpunkte des maximalen Wachstums der Bakterienkulturen lagen bei den Kontrollmaterialien bei beiden Einwirkzeiten zwischen 6,4 und 7,5h (Abb. 16, 17). Die paarweisen Tests sowohl der Materialien gegeneinander für jede der beiden Einwirkzeiten als auch der Einwirkzeiten gegeneinander für jedes der vier Materialien ergaben keinen signifikanten Unterschied (Tab. 2, 3). Die Zeitpunkte maximalen

Wachstums der Testmaterialien nach 30sec Einwirkzeit stieg mit der NaOCl Konzentration signifikant von 10,4h auf 20,0h an. ERM ergab einen signifikanten Einfluss der Materialien (Tab. 2). CHX 0,2% unterschied sich mit einem Wert von 10,5h signifikant von NaOCl 3,0%. Die Zeitpunkte maximalen Wachstums nach 10min Einwirkzeit lag für die NaOCl Konzentrationen 0,5% und 1,0% bei 14,0 bis 17,0h. Bei NaOCl 3,0% konnte kein Bakterienwachstum mehr nachgewiesen werden, somit konnte theoretisch auch rechnerisch kein Zeitpunkt maximalen Wachstums ermittelt werden. Der Wert von 12,5h für CHX 0,2% unterschied sich signifikant von 17,0h für NaOCl 1,0% (Tab. 2). ERM ergab einen signifikanten Einfluss von Testmaterial, Einwirkzeit und Test gegen Kontrolle (Tab. 2-4).

Abb. 16:

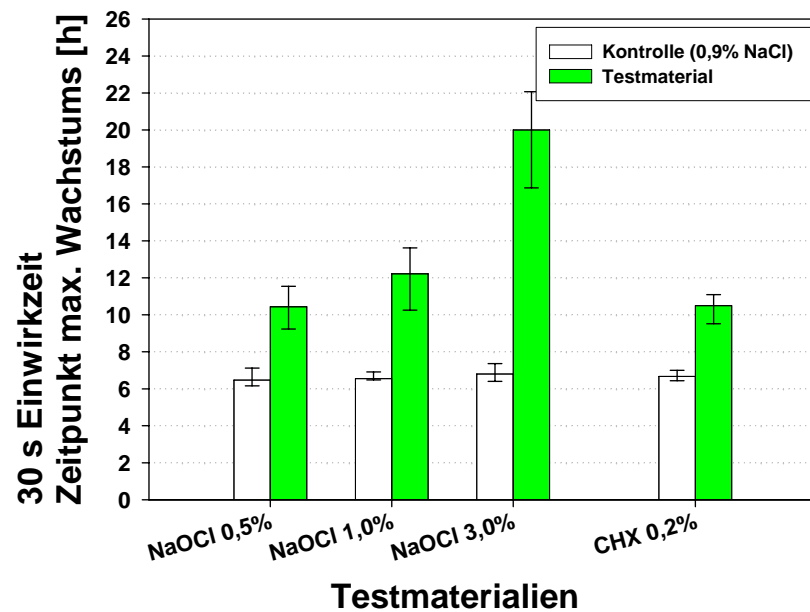


Abb. 16: Zeitpunkt maximalen Wachstums in h bei 30sec Einwirkzeit für alle Kontrollen und Testmaterialien. Dargestellt sind Mediane und 25-75% Perzentile aus 5 Stichproben.

Abb. 17:

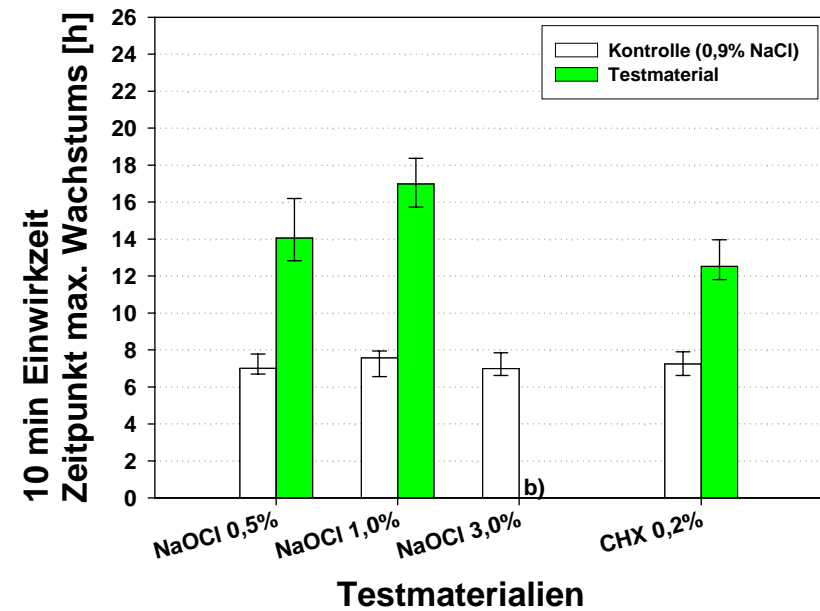


Abb. 17: Zeitpunkt maximalen Wachstums in h bei 10min Einwirkzeit für alle Kontrollen und Testmaterialien. Dargestellt sind Mediane und 25-75% Perzentile aus 5 Stichproben.

b) Bei NaOCl 3,0% fand in den Testkulturen kein Bakterienwachstum statt. Daher war eine Log-Phase nicht vorhanden, somit konnte kein Zeitpunkt maximalen Wachstums berechnet werden.

Die OD im Wendepunkt der Kurven, d.h. die OD zur Zeit des maximalen Wachstums der Bakterienkulturen lagen bei den Kontroll- und Testmaterialien bei beiden Einwirkzeiten zwischen 0,625 und 0,687 (Abb. 18, 19), mit der Ausnahme, dass bei NaOCl 3,0% die OD konstant gleich Null war. Für die Kontrollen ergaben sich für beide Einwirkzeiten keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen (Tab. 2, 3). ERM ergab keinen signifikanten Einfluss von Testmaterial, Einwirkzeit und Test gegen Kontrolle (Tab. 2-4).

Abb. 18:

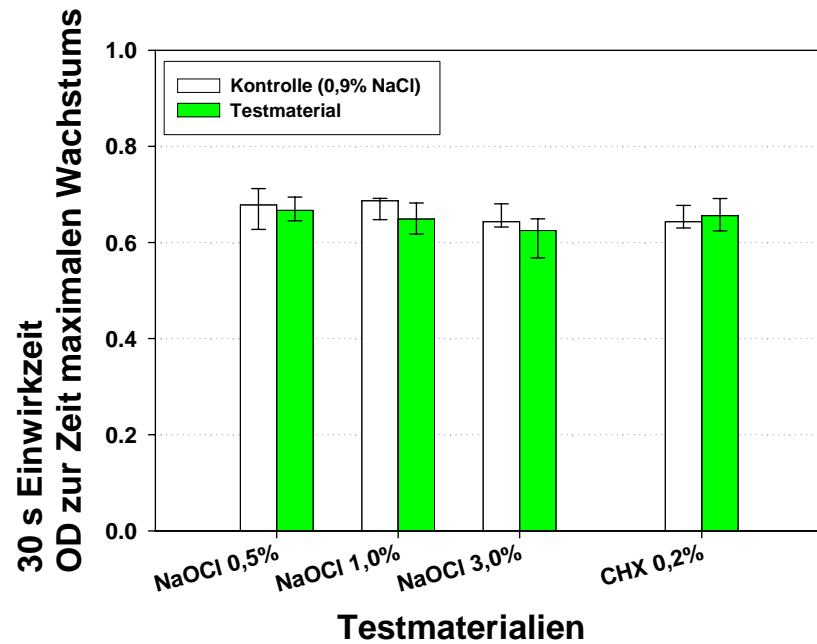


Abb. 18: OD zur Zeit maximalen Wachstums bei 30s Einwirkzeit für alle Kontrollen und Testmaterialien. Dargestellt sind Mediane und 25-75% Perzentile aus 5 Stichproben.

Abb. 19:

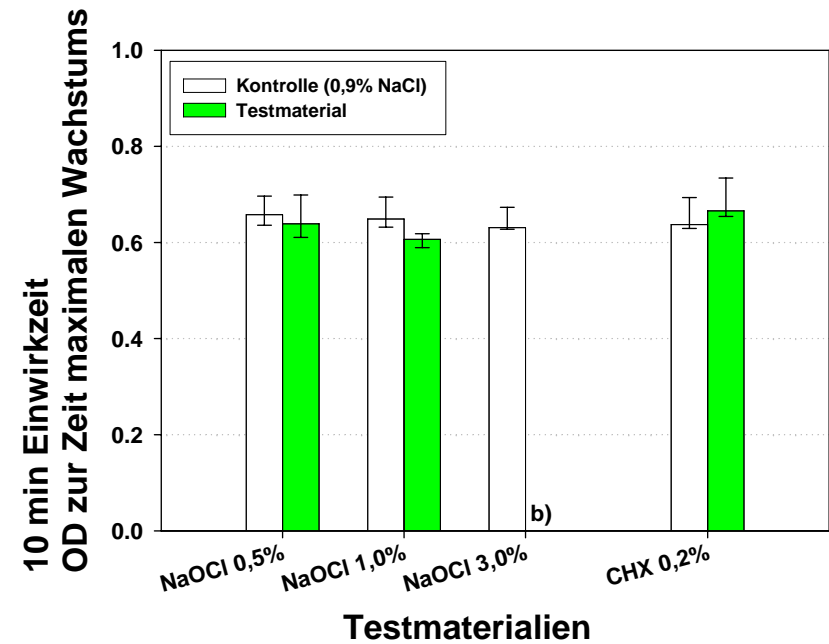


Abb. 19: OD zur Zeit maximalen Wachstums bei 10min Einwirkzeit für alle Kontrollen und Testmaterialien. Dargestellt sind Mediane und 25-75% Perzentile aus 5 Stichproben.

b) Bei NaOCl 3,0% fand in den Testkulturen kein Bakterienwachstum statt. Daher war eine Log-Phase nicht vorhanden, somit konnte kein Zeitpunkt maximalen Wachstums berechnet werden.

4. Differenz des Zeitpunktes des maximalen Wachstums zwischen Test und zugehöriger Kontrollkultur

Bei 30sec Einwirkzeit war die Zeitdifferenz maximalen Wachstums zwischen Test- und Kontrollkulturen für NaOCl 3,0% mit 13,2h signifikant höher als mit 4,0h und 5,2h für NaOCl 0,5% und 1,0% (Abb. 20, Tab. 2). CHX 0,2% war mit 3,8h signifikant unterschiedlich zu NaOCl 3,0%. ERM zeigte einen Einfluss der Materialien.

Bei 10min Einwirkzeit war die Zeitdifferenz maximalen Wachstums zwischen Test- und Kontrollkulturen für NaOCl 1,0% mit 10,8h signifikant höher als mit 6,4h für NaOCl 0,5% (Abb. 20, Tab. 2). Nach der Einwirkung von NaOCl 3,0% konnte kein Bakterienwachstum festgestellt werden und somit konnte formal kein Zeitpunkt maximalen Wachstums bestimmt werden. Zur grafischen Darstellung in Abb. 18 wurde zur Veranschaulichung ein Balken mit „unendlich“ scheinender Zeitdifferenz dargestellt. CHX 0,2% war mit 5,6h signifikant unterschiedlich zu NaOCl 1,0% und 3,0%. ERM zeigte einen Einfluss der Materialien für 10min Einwirkzeit und für die Einwirkzeiten gegeneinander (Abb. 20, Tab. 2, 3).

Abb. 20:

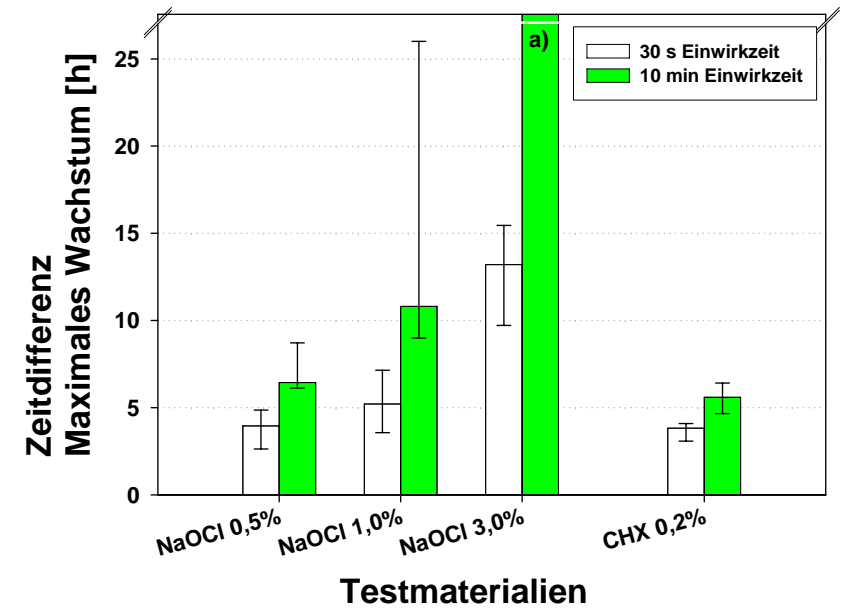


Abb. 20: Differenz der Zeitpunkte in h maximalen Bakterienwachstums zwischen Test- und Kontrollkulturen für beide Einwirkzeiten und alle Testmaterialien. Dargestellt sind Mediane und 25-75% Perzentile aus 5 Stichproben.

a) Bei NaOCl 3,0% fand in den Testkulturen kein Bakterienwachstum statt. Daher war eine Log-Phase nicht vorhanden, somit konnte keine Zeitdifferenz maximalen Wachstums berechnet werden. Zur Veranschaulichung wurde graphisch ein Balken mit „unendlich“ scheinender Zeitdifferenz dargestellt.

##### 5. Rasterelektronenmikroskopische Bilder

Zur exemplarischen Visualisierung wurden von einigen Dentinscheiben Bilder im Rasterelektronenmikroskop erstellt. Durch die beidseitige Behandlung jeder Scheibe mit 50%iger Zitronensäure sind die Dentinkanälchen geöffnet und somit frei zugänglich für Bakterien.



Abbildung 21 zeigt ein rasterelektronenmikroskopisches Bild der längs gebrochenen 200µm dicken Dentinscheibe 28 in der Mitte der Scheibe. Die Bakterien lagern sich an den Wänden der Kanälchen an (Pfeile). Um zu sehen, ob die Bakterien wirklich als „Ketten“ in die Dentintubuli hineinragen, wurden Aufnahmen von den Bruchkanten gemacht, da hier die Kanäle ihrer Länge nach beim Spalten gebrochen wurden. Abbildung 22 zeigt, dass die Bakterien in einige der Dentinkanälchen hineinragen (Pfeile). Andere wiederum bleiben unbewachsen. Abbildung 23 zeigt, dass das Bakterienwachstum bis zum unteren Ende der Bruchstelle der 200 µm dicken Dentinscheiben reicht (Pfeile). Wiederum sind einige Kanälchen dicht besiedelt, andere bleiben leer.

Abb. 21:

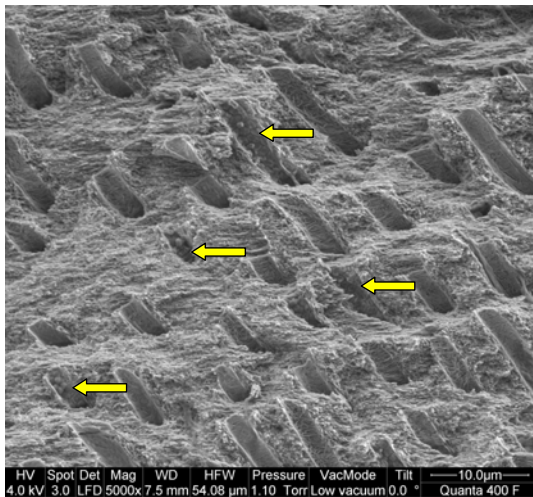


Abb. 21: Dentinscheibe 28, *Enterococcus faecalis* lagert sich an die Wände der Dentinkanälchen an (Pfeile).

Abb. 22:

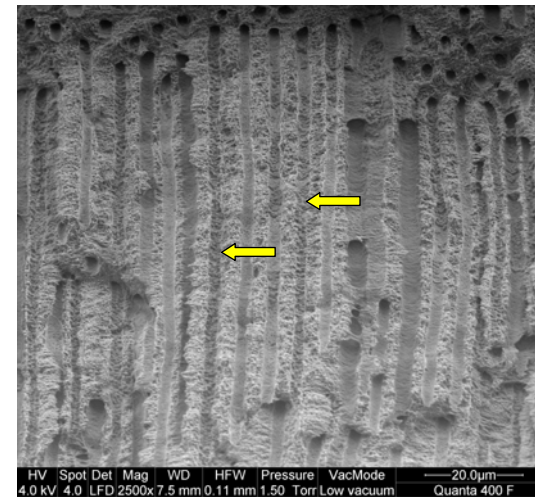


Abb. 22: Dentinscheibe 35, Dentinkanälchen bewachsen (Pfeile) mit *Enterococcus faecalis*, nahe an der Bruchkante (oben)

Abb. 23:

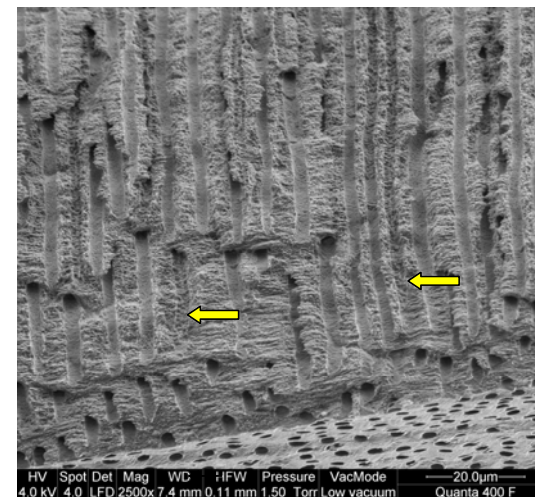


Abb. 23: Dentinscheibe 35, Dentinkanälchen am unteren Ende der Bruchstelle der 200µm dicken Dentinscheibe bewachsen (Pfeile) mit *Enterococcus faecalis*

## VI Diskussion

### 1 Rinderdentin

In dieser Arbeit wurden extrahierte bovine Zähne zur Herstellung der Probekörper ausgewählt, so wie auch in vielen Untersuchungen Rinderzähne zur artifiziellen Infizierung von Dentin verwendet wurden (57;116;134;162). Rinderzähne sind leicht und in großen Mengen erhältlich. Sie sind menschlichen Zähnen in ihrer Struktur ähnlich (64), jedoch sind Dentinkanälchen von Rinderzähnen im Durchmesser größer (131) und die Zahl quer angeschnittener Dentinkanälchen pro mm<sup>2</sup> im Wurzelndentin von Rinderzähnen ist im Vergleich höher. Im Kronenteil sind Querschnitt und Anzahl von Dentinkanälchen bei Menschen- und Rinderzähnen fast gleich (150). Schmalz et al. (152) untersuchten Wasserdiffusionsrate und hydraulische Leitfähigkeit von Rinder- und Menschendentin im Vergleich. Die Variabilität von Proben menschlichen Dentins erwies sich als doppelt so groß wie bei Rinderdentinproben. Menschliches Dentin wird in der Literatur mit der Begründung verwendet, dass der Größenunterschied zwischen Rinder- und Menschenzähnen bedeutend sei, und somit auch der Unterschied in der Menge der verwendeten antibakteriellen Mittel (9).

### 2 Bakterienauswahl

*Enterococcus faecalis* wird in der zahnmedizinischen Forschung häufig als Zielkeim ausgewählt. *In vivo* gilt er als Mitverursacher endodontischer Mißerfolge (108;165;166;174) und konnte aus ca. 23-70% Zähnen mit gefüllten Wurzelkanälen und chronischer apikaler Parodontitis isoliert werden (83;108;174). Weiterhin lässt sich *Enterococcus faecalis* nur schwer wieder aus infizierten Wurzelkanälen entfernen. *In vitro* ist *Enterococcus faecalis* ein fakultativ anaerobes Bakterium, das nicht anspruchsvoll ist, unter einfachen Bedingungen wächst und erfolgreich und schnell Dentinkanälchen besiedelt (101). So beschrieben Saleh et al. (148), dass *Enterococcus faecalis* nach drei Wochen Inkubationszeit die Dentinkanälchen auf einer Länge von 300-400µm besiedelten. Nach 14 Tagen Inkubationszeit wurde das Bakterium von Orstavik und Haapasalo (116) und Heling et al. (71) in einer Tiefe von über 500µm nachgewiesen. In einer anderen Studie konnte schon nach drei Tagen Inkubation eine Infektion der gesamten Weite des circumpulalen Dentins erzielt werden (116).

## 3 Methode

Eine notwendige Voraussetzung, um die *in vitro* Wirkung antibakterieller Mittel auf Bakterien im Dentin zu testen, ist die artifizielle, gezielte und kontrollierte Infektion des Dentins. Vorreiter auf diesem Gebiet sind Haapasalo und Orstavik, deren Methode zur künstlichen Infizierung des Dentins in vielen Studien wirklichkeitsgetreu oder mit Veränderungen der Versuchsparameter (Bakterienart, Medikamente und deren Konzentrationen) nachgeahmt wurde (49;101;132;180). Diese Methode beruht auf der Herstellung von zylinderförmigen Dentinblöcken, 4mm hoch und 6mm breit, mit einem zentralen Pulpalumen von 2,3mm Durchmesser. Diese Dentinblöcke wurden in Bakteriensuspension inkubiert, die Inkubationszeiten variieren zwischen 3 Tagen und 6 Wochen. Dann wurden je nach Versuchsansatz entweder direkt die antibakteriellen Substanzen getestet (117), oder zuerst mit Rosenbohren Dentinspäneproben entnommen (116) und diese dann auf Bakterienanwesenheit getestet. Erst nachdem die Bakterien bis zur gewünschten Tiefe penetriert waren, wurde das Kanallumen mit Antiseptika gefüllt (116). Jede neue Studie der Autoren beruhte auf der gleichen Methode der artifiziellen Infektion, mit Veränderungen einiger Versuchsparameter, wie zum Beispiel die Testart der Medikamente oder Medikamentart. Nur einmal, in Zusammenarbeit mit Waltimo, versuchten Orstavik und Haapasalo eine andere Art der artifiziellen Infektion von Dentin (182). Hierzu wurden ca. 2mm dicke Dentinscheiben zwischen zwei Plastikküvetten fixiert. Beide Küvetten besaßen eine runde Öffnung zur Dentinscheibe hin. Die Küvette der pulpanahen Seite der Dentinscheibe wurde mit 2,5ml Medium (TSB) gefüllt und die Konstruktion für 24h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit waren beide Küvetten mit TSB gefüllt. Mit einer 0,1ml Injektionsnadel wurde der Küvette auf der pulpanahen Seite Bakteriensuspension (*Enterococcus faecalis*) hinzugefügt, die Konstruktion wieder bei 37°C inkubiert, bis Bakterienwachstum sichtbar wurde, aber maximal bis zu dreißig Tagen. Nach der Inkubation wurde jeweils 0,1ml TSB aus jeder der beiden Küvetten entnommen und kultiviert, um das Bakterienwachstum und die Reinheit der Kultur zu kontrollieren.

Aus der Literatur konnte man entnehmen, dass eine schnelle Infektion des Dentins nur durch Inkubation nicht erreicht werden konnte. Die Infektionszeiten betragen 3 Tage bis 4 Wochen (57) und mit wenigen Ausnahmen wurden in dieser Zeitspanne Infektionstiefen von ca. 300µm bis 400µm erreicht.

In der vorliegenden Studie wurde zunächst eine Methode entwickelt, um eine künstliche Infizierung von 200µm dünnen Rinderdentinscheiben zu erhalten. Das Konzept des

Versuchaufbaus sollte dabei so wenig kompliziert wie möglich sein und zu einer weitflächigen Infektion der Dentinkanälchen bei verkürzter Inkubationszeit führen. Aus der Literatur konnte entnommen werden, dass bei erfolgreicher Infektion eine Besiedlung des Dentins bis in eine Tiefe um 300µm auftrat (148;180). In der vorliegenden Studie wurden Dentinscheiben mit einer Dicke von 200µm gewählt, um so eine durchgehende Infektion der Kanälchen dieser Dentinscheiben zu ermöglichen. Als nächstes wurden die Dentinscheiben beidseitig geätzt, um so die Dentinkanälchen möglichst weit zu öffnen und die Schmierschicht zu entfernen, da dies zu besseren Ergebnissen während der Kontaminierung führte (134).

Die Idee des Versuches war es, mit Unterdruck Bakterien in die Dentinkanälchen zu saugen. Hierzu wurden Bottle Top Filter verwendet, welche im Labor routinemäßig zum Filtern von verschiedenen Substanzen, wie z.B. Zellkulturmedien, dienen. Der Unterdruck wurde durch Einsatz einer Vakuum-Membranpumpe ausgeübt, die -wie vom Hersteller des Bottle Tops vorgesehen- an den Filter angeschlossen wurde. Um die Infizierung des Dentins zu beschleunigen wurde in diesem Versuch die Bakteriensuspension mit Unterdruck durch die Dentinscheiben gesogen. Durch Einsetzen der Pumpe konnte in kürzerer Zeit eine zu anderen Studien ähnliche Infektionstiefe erreicht werden (180). Die im Bottle Top standardmäßig vorhandene Filtermembran wurde durch eine 1mm dicke Silikonmatte ersetzt. Diese sollte einen flüssigkeitsdichten Verschluss garantieren. Die einzige Abfließmöglichkeit der nach Einschalten der Pumpe hineingegossenen Bakteriensuspension stellten die beiden in die Matte geschnittenen Rechtecke dar, auf welchen sofort nach Einschalten der Pumpe zwei Dentinscheiben festgesaugt und somit fixiert wurden. Die beiden letzten Tätigkeiten (Fixieren der Dentinscheiben und Zuschütten der Bakteriensuspension) mussten fast zeitgleich, jedoch sicher sehr rasch aufeinander folgen, um zu verhindern, dass der Unterdruck nur auf das Dentin ausgeübt wurde und es so zum Austrocknen der Scheiben kam. Weiterhin war aber auch wichtig, dass das Anschalten der Pumpe mit einigen Sekunden Vorsprung ausgeführt wurde, da sich nur so unter der Wirkung des Unterdrucks die Scheiben und das Bottle Top Filter mit der Silikonmatte gut und dicht verbinden konnten. Nach genau vier Stunden wurde die Pumpe ausgeschaltet und gewartet, bis sich die Dentinscheiben selbstständig von der Silikonmatte gelöst hatten (ca. 15 bis 30min). Auf diese Weise sollte die durch eine abrupte Unterbrechung des Unterdrucks mögliche Beschädigung der Bakterien verhindert werden. Aus den Dentinscheiben wurde der vorher nachgezeichnete Durchziehbereich ausgeschnitten. Auf diese Weise wurde nur der konzentriert infizierte Bereich weiter verarbeitet. Die so erhaltenen Dentinplättchen wurden für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf von 24 Stunden wurde ein Medienwechsel vorgenommen. Dieser sollte den Bakterien die Zufuhr von

frischem Nährmittel garantieren. Nach der Inkubation wurden die Plättchen in der Mitte geteilt. Auf die eine Hälfte wirkte eine Testsubstanz ein, auf die andere Hälfte die Kontrollsubstanz. Somit war jeder Testkörper gleichzeitig auch seine eigene Kontrolle, die bis zum Moment der Teilung der Plättchen kurz vor Auftragen der Materialien in identischer Weise behandelt wurde. Die Einwirkzeiten der Materialien betragen 30sec und 10min. Die Messungen der Kontamination der Plättchen (Kontrollmaterial) und der Desinfektion der Plättchen (Testmaterialien) wurde über einen Zeitraum von 26 Stunden am Photospektrometer durchgeführt.

Der hauptsächliche Unterschied zu allen anderen Studien mit dem Ziel der artifiziiellen Infektion des Dentins ist die Verwendung von Dentinscheiben anstatt Dentinblöcken und die Verkürzung der Infektionszeit durch Einsetzen der Vakuum-Membran-Pumpe.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Infektionsdauer

Die artifiziielle Infektion des Dentins gelingt in fast allen Studien, unabhängig von der verwendeten Methode. Unterschiedlich ist die Dauer der Inkubation. Haapasalo und Orstavik (116) geben in ihren zahlreichen Studien Inkubationszeiten von 3 Tagen bis zu 6 Wochen an, aber auch 24 Stunden (135) und 48 Stunden (56). Wie auch in dem vorliegenden Versuch wurde während der meisten Studien die optimale Inkubationszeit in Vorversuchen ermittelt oder von Vorreitern auf diesem Gebiet mit der Begründung übernommen, dass dies sich bewährt habe.

Vahadaty et al. (180) erreichten nach 6 Tagen Inkubation des Dentins in Medium eine Besiedelung von 300µm. Waltimo et al.(182) gaben eine tiefe Penetration des *Enterococcus faecalis* an, bei einer Dentinscheibendicke von 2mm, bei einer Inkubationszeit von 30 Tagen. Orstavik und Haapasalo (116) beschrieben, dass bei Inkubationszeiten von 3 Tagen bis 6 Wochen *Enterococcus faecalis* nach zwei Tagen die gesamte Weite des circumpulpalen Dentins penetriert hatte. Lynne et al (101) gaben an, dass *Enterococcus faecalis* schon nach 24 Stunden auf der ganzen Breite der Dentinproben vorhanden waren, jedoch die Anzahl der Bakterien rapide abnahm, je weiter die Entfernung zum Lumen war. In der vorliegenden Studie wurde nach mehreren Wochen Vorversuchen 48 Stunden als die optimale Inkubationszeit bestimmt, mit einem Medienwechsel nach 24 Stunden. *Enterococcus faecalis*

penetrierte die gesamte Weite der 200µm dicken Dentinscheiben. Wie auch Waltimo et al. (197) konnten wir feststellen, dass *Enterococcus faecalis* einige Kanälchen sehr dicht und auf der ganzen Länge besiedelte, mehrere Kanälchen jedoch völlig leer blieben (siehe Abb. 22).

#### 4.2 Wirkung der antibakteriellen Mittel

Kalziumhydroxid galt dank seiner bakteriziden Eigenschaften sehr lange als führende medikamentöse Wurzelkanaleinlage. Sjögren et al. (167) und Byström et al. (23) berichteten, dass eine Applikation von Kalziumhydroxid über einen Zeitraum von 7 Tagen und 30 Tagen erfolgreich Bakterien eliminiert hat, welche eine Wurzelkanalbehandlung und -füllung überlebt haben. Jedoch schon 1987 beschrieben Haapasalo und Orstavik (57), dass Kalziumhydroxid gegen Infektion der Dentinkanälchen mit *Enterococcus faecalis*, eines Bakteriums, das aus nicht erfolgreich behandelten und gefüllten Wurzelkanälen isoliert wurde, ineffektiv sei.

Weiterhin ergab sich, dass nur die mechanische Bearbeitung des Wurzelkanals und eine medikamentöse Einlage nicht ausreichend waren, um alle Mikroorganismen zu eliminieren, da es Unregelmäßigkeiten in Wurzelkanälen gibt (114), die auf diese Weise nicht erreicht werden können. Der Erfolg einer Wurzelkanalbehandlung ist abhängig von der mechanischen Aufbereitung, Spülung mit Antiseptika und einer dichten Füllung des Wurzelkanals (180).

In der vorliegenden Studie wurde die antibakterielle Wirksamkeit von 0,5%, 1,0% und 3,0% NaOCl im Vergleich zu 0,2% CHX untersucht. Die Einwirkzeiten der Flüssigkeiten auf das infizierte Dentin betragen 30sec und 10min. Die Ergebnisse zeigen, dass nur NaOCl mit einer Konzentration von 3,0% und einer Einwirkzeit von 10min das Bakterienwachstum stoppen konnten. NaOCl 0,5% und 1,0% und CHX 0,2% bewirkten bei beiden Einwirkzeiten im Vergleich zu den Kontrollkulturen zwar eine zeitliche Verzögerung des Bakterienwachstums, jedoch erreichte das Bakterienwachstum letztendlich die gleiche optische Dichte wie die Kontrollen. Hierbei war der Zeitraum der Verzögerung des bakteriellen Wachstums, und somit die Desinfektionskraft von NaOCl 0,5%, geringer als von NaOCl 1,0% und CHX 0,2%. Diese Ergebnisse stimmen nicht mit denen von Vahadaty et al.(180) überein. Die Autoren testeten in ihrer Studie 0,2% und 2,0% CHX gegen 0,2% und 2,0% NaOCl. Dabei basierten sie auf der Methode von Haapasalo und Orstavik (57) Die Materialien erzielten ähnliche Ergebnisse unabhängig von ihrer Konzentration. In der vorliegenden Studie entsprach die Wirkung von 0,2% CHX der Wirkung von dem 5 mal höher konzentrierten NaOCl (1,0%). Eine ähnliche Erfahrung machten auch Ringel und Patterson (140). Sie verglichen *in vivo*

0,2% CHX und 2,5% NaOCl als Spüllösungen. Bei jedem Behandlungstermin wurden vor Beginn und nach Beendigung der Sitzung aus dem Wurzelkanal Proben entnommen und auf Bakterienkulturen hin untersucht. Auf den ersten Blick wirkte 2,5% NaOCl effektiver als 0,2% CHX. Doch bei genauerer Untersuchung erreichte NaOCl erst am Ende der zweiten Sitzung bessere Werte und erst bei der dritten Sitzung war dieser Unterschied signifikant. Dies lässt sich jedoch nach den Autoren darauf zurückführen, dass mit jeder Sitzung das Kanallumen erweitert wurde, was wiederum die geweblösende Wirkung von NaOCl vergrößerte. In einem ähnlichen Experiment, jedoch mit anderem Keimspektrum, konnten Ayhan et al. (7) diese Beobachtung bestätigen.

In ihrer *in vivo* Studie stellten Byström et al. (23) fest, dass nach Instrumentierung von Zähnen mit apikaler Parodontitis kein statistisch signifikanter Unterschied in der Reduktion der Bakterienzahl erhalten werden konnte, wenn eine 0,5%ige und eine 5%ige NaOCl-Lösung eingesetzt wurde. In der vorliegenden *in vitro* Studie war jedoch der Unterschied zwischen den geringeren Konzentrationen von NaOCl (0,5% und 1,0%) im Vergleich zu dem höher konzentrierten NaOCl (3,0%) signifikant.

Im Gegensatz zu der vorliegenden Studie, in welcher ein signifikanter Unterschied in der antimikrobiellen Wirksamkeit zwischen CHX 0,2% und NaOCl 3,0% auftrat, konnten White et al. (189), Seichter et al. (153) und Jeansonne et al. (77) in ihren Untersuchungen keine Unterschiede zwischen diesen beiden antiseptischen Mitteln feststellen. Auch Orstavik und Haapasalo (116) erhielten beim Vergleich zwischen 0,2%igem CHX und 5,25%igem NaOCl keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Tiefe der Desinfektion in den Dentintubuli .

#### 4.3 Visualisierung der Infektion der Dentinscheiben am Rasterelektronenmikroskop

Eine Tendenz für die unterschiedlichen Infektionsgrade der gebrochenen Dentinscheiben wurde in der Untersuchung unter dem Rasterelektronenmikroskop gefunden. Hier zeigte sich eine unterschiedliche Verteilung der Dentinkanälchen innerhalb eines Zahnes. Die sichtbaren Dentinkanälchen waren darüber hinaus nicht gleichmäßig mit *Enterococcus faecalis* infiziert. Wie auch Waltimo et al. (197) konnten wir feststellen, dass *Enterococcus faecalis* einige Kanälchen sehr dicht und auf der ganzen Länge besiedelte, mehrere Kanälchen jedoch völlig leer blieben.

## VII Zusammenfassung

Die Infektion und die darauffolgende Desinfektion von Dentin *in vitro* ist die Voraussetzung für *in vitro* Prüfung von antibakteriell wirkenden Substanzen. Die dazu in der Literatur beschriebenen Verfahren weisen einige Nachteile auf, zum Beispiel, dass es sich bei der *in vitro* Infektion von Dentin um einen langwierigen Prozess von oft von mehreren Wochen handelt. Außerdem eignet sich nicht jede Bakterie für diese Versuche, die Infektionen gelingen nur im geringen Maße und sehr langsam. *Enterococcus faecalis* ist ein geeigneter Zielkeim, da er sich leicht identifizieren lässt. Er ist aerob und fakultativ anaerob, leicht zu kultivieren, nicht anspruchsvoll und von allen in den Versuchen verwendeten Bakterien bevölkert er die Dentinkanälchen am schnellsten.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode entwickelt, um die Infizierung von Dentin zu beschleunigen. 200µm dicke Dentinscheiben wurden in Bottle Top Filtern fixiert. Mit Unterdruck, ausgeübt durch eine Vakuum-Membran-Pumpe, wurde Bakteriensuspension über einen Zeitraum von 4 Stunden durchgesaugt wurde. 48h Stunden Inkubationszeit erschienen ausreichend um eine Infektion der Dentinscheiben zu erhalten. Auf den so infizierten Dentinscheiben wurde die Wirkung von NaOCl 0,5%, 1,0%, 3,0% und CHX 0,2%. NaCl 0,9% diente als Kontrolle. Die Einwirkzeiten der Materialien betragen 30sec und 10min. Die jeweilige Testsubstanz und die dazugehörige Kontrolle wurden immer auf der selben Dentinscheibe getestet. Auf diese Weise wurden Trägerobjekt für Test- und Kontrollsubstanz, bis zum Moment der Teilung in zwei Hälften und Auftragen der Substanzen, unter identischen Voraussetzungen behandelt, sie stellten eine Einheit dar. Alle Kontrollkulturen erreichten ungefähr eine optische Dichte von 1,200.

Die gewonnenen Ergebnisse zeigten, dass die Wirkung antibakterieller Substanzen sowohl von der Einwirkzeit, als auch von der Höhe der Konzentration abhängig sind. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien überein. Bei 30sec Einwirkzeit konnten die Testsubstanzen das Bakterienwachstum verlangsamen, jedoch nicht aufhalten. Das Bakterienwachstum erreichte letztendlich ähnliche OD-Werte wie die Kontrollkulturen, jedoch mit einer zeitlichen Verzögerung. Nach 10min Einwirkzeit der Testsubstanzen 0,5% NaOCl, 1,0% NaOCl und 0,2% CHX wurde das Bakterienwachstum im Vergleich zu den Ergebnissen nach 30sec Einwirkzeit zeitlich noch mehr verlangsamt. Doch auch nach 10min Desinfektion erreichten die Testkulturen letztendlich eine ähnliche optische Dichte wie die dazugehörigen Kontrollen. Nur die Testkulturen, deren Dentinplättchen mit 3,0% NaOCl über einen Zeitraum von 10 min behandelt wurden, wiesen keinerlei Bakterienwachstum auf.

In kurzer Zeit kann eine dichte bakterielle Infektion von Rinderdentin erreicht werden, das mit in der täglichen Praxis verwendeten Agenzien wieder desinfiziert werden kann. Daraus kann geschlossen werden, dass sich die von uns erarbeitete Methode als ein geeignetes System zur artifizialen Infektion des Dentins erwiesen hat.

IX Anhang

1 Tabellarischer Anhang

	NaOCl			CHX 0,2% gegen NaOCl		
	0,5% : 1%	0,5% : 3%	1% : 3%	0,5%	1,0%	3,0%
OD im Wdpkt. Ktr.	30s ns	ns	ns	ns	ns	ns
600s	ns	ns	ns	ns	ns	ns
OD im Wdpkt Test	30s ns	0,032	ns	ns	ns	ns
600s	ns	/*	/	ns	0,016	/
OD in Plat.-Ph. Ktr.	30s ns	ns	ns	ns	ns	ns
600s	ns	ns	ns	ns	ns	ns
OD in Plat.-Ph. Test	30s ns	(0,056)	ns	ns	ns	ns
600s	ns	0,008	ns	ns	0,008	0,008
BeginnLog-Ph.Ktr.	30s ns	ns	ns	ns	ns	ns
600s	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BeginnLog-Ph. Test	30s ns	0,008	0,016	ns	ns	0,008
600s	ns	/	/	ns	0,016	/
Zeitpkt.max.Wachs.Ktr.	30s ns	ns	ns	ns	ns	ns
600s	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Zeitpkt.max.Wachs.Test	30s ns	0,008	0,016	ns	ns	0,008
600s	ns	/	/	ns	0,016	/
Ende Log-Ph. Ktr.	30s ns	ns	ns	ns	ns	ns
600s	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Ende Log-Ph. Test	30s ns	0,008	0,008	ns	(0,056)	0,008
600s	0,032	/	/	ns	(0,063)	/

Tab. 2: p-Werte der paarweisen Tests (Mann-Whitney-Test) der untersuchten Testsubstanzen gegeneinander für die verwendeten Parameter und für beide Einwirkzeiten (ns = nicht signifikant, d.h.:  $p > 0,05$ ).  
\*Bei NaOCl 3,0% fand in den Testkulturen kein Bakterienwachstum statt. Daher war eine Log-Phase nicht vorhanden, somit konnte keine Zeitdifferenz maximalen Wachstums berechnet werden.

	NaOCl			CHX 0,2%
	0,5%	1,0%	3,0%	
OD im Wendepkt. Ktr.	ns	ns	ns	ns
OD im Wendepkt. Test	ns	ns	/*	ns
OD in Plateau-Phase Ktr.	ns	ns	ns	ns
OD in Plateau-Phase Test	ns	(0,056)	0,008	ns
Beginn Log-Phase Ktr.	ns	ns	ns	ns
Beginn Log-Phase Test	0,008	0,016	/	0,016
Zeitpkt. max. Wachs. Ktr.	ns	ns	ns	ns
Zeitpkt. max. Wachs. Test	0,008	0,016	/	0,016
Ende Log-Phase Ktr.	ns	ns	ns	ns
Ende Log-Phase Test	0,008	0,016	/	(0,056)

Tab. 3: p-Werte der paarweisen Tests (Mann-Whitney-Test) der untersuchten Einwirkzeiten (30 sec und 10 min) gegeneinander für die verwendeten Parameter und für alle Testsubstanzen (ns = nicht signifikant, d.h.:  $p > 0,05$ ).  
\*Bei NaOCl 3,0% fand in den Testkulturen kein Bakterienwachstum statt. Daher war eine Log-Phase nicht vorhanden, somit konnte keine Zeitdifferenz maximalen Wachstums berechnet werden.

	30 sec Einwirkzeit				10 min Einwirkzeit			
	NaOCl			CHX	NaOCl			CHX
	0,5%	1,0%	3,0%	0,2%	0,5%	1,0%	3,0%	0,2%
OD im Wendepunkt	ns	ns	ns	ns	ns	(0,069)	/*	ns
OD in der Plateau-Ph.	ns	ns	ns	ns	ns	0,043	0,043	ns
Beginn Log-Phase	0,042	0,043	0,043	0,042	0,043	(0,068)	/	0,042
Zeitpkt.max.Wachstums	0,043	0,043	0,043	0,043	0,043	(0,068)	/	0,043
Ende Log-Phase	0,042	0,043	0,043	0,043	0,043	(0,068)	/	0,043

Tab. 4: p-Werte der paarweisen Tests (Mann-Whitney-Test) der Test- gegen die Kontrollplättchen gegeneinander für die verwendeten Parameter für beide Einwirkzeiten (30 sec und 10 min) und für alle Testsubstanzen (ns = nicht signifikant, d.h.:  $p > 0,05$ ).  
\*Bei NaOCl 3,0% fand in den Testkulturen kein Bakterienwachstum statt. Daher war eine Log-Phase nicht vorhanden, somit konnte keine Zeitdifferenz maximalen Wachstums berechnet werden.

## 2 Verwendete Materialien und Geräte

### 2.1 Nährmedien und Standardlösungen

Dynexan proaktive Mundspüllösung:	Wirkstoff Chlorhexidindigluconat 0,2%; Kreussler Pharma, Deutschland
Hypochlorit-Speiko,	Wirkstoff Natriumhypochlorit 5,25%; Speiko, Münster, Deutschland
NaCl	Artikelnummer 1.06404, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypticase-Soy-Broth Pulver	TSB-Beckton Dickinson, USA
Zitronensäure	Chemikalienausgabe der Universität Regensburg, Deutschland
0,5%-ige Chloramin-T-Lösung	Artikelnummer 1.02426, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol abs.	Chemikalienausgabe, Universität Regensburg, Deutschland
Mucasept Händedesinfektion	Merz; Frankfurt am Main, Deutschland

### 2.2 Verbrauchsmaterialien

Nitril-Handschuhe	Sempercare, Semperit Technische Produkte, Wien, Österreich
Mundschutz	Sentinex, Lite El, Lohmann&Rauscher; Neuwied, Deutschland
Eppendorfcup	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Erlenmeierkolben	Weithals, 100ml; Schott Instruments, Mainz, Deutschland
Glasküvetten	104-OS, Hellma; Müllheim, Deutschland
Parafilm	Pechiney plastic packaging; Menasha, USA

## Bottle Top Filter

Bottle Top-Filter 150ml, Falcon 35, 7105  
Becton Dickson Labware, Becton Dickinson  
and Company, Franklin Lakes, N.J., USA;  
(Abb.1)

## Sterile Wattepad

Lot 3901, Lagerhaltung Klinikum der  
Universität Regensburg, Deutschland

## CASO-Platten

hergestellt im Institut für medizinische  
Mikrobiologie und Hygiene, Universität  
Regensburg, Deutschland, Leiter Prof. Dr. H.  
Wolf

## PalaDur Autopolimerisat

PalaDur Lot 015809-Pulver; Lot 022389-  
Flüssigkeit; Heraeus Kulzer, Hanau,  
Deutschland

## 2.3 Gerätschaften

### Millipore-Apparat

MilliQUFplus, Millipore; Molsheim, Frankreich

### Laborkühlschrank

Privileg de luxe, Typ 2647

### Inkubator

T 5050E; Heraeus; Hanau, Deutschland

### Werkbank

HF48, GelaireFlow Laboratoires; Opera, Italien

### Photometer

Ultrospec 3300 pro,UV/Visible  
Spectrophotometer, Amersham Biosciences, UK

### ULT-Tiefkühlschrank

Forma-86 Freezer, Thermo Electron  
Corporation; Marietta, USA

### Autoklav

Fedegari Autoclavi; Albuzzano, Italien

### Membran-Vakuumpumpe

Membranpumpe einstufig, ME4, Vacuubrand  
GmbH, Wertheim, Deutschland

### Innenloch-Sägemikrotom

Typ 025-097.25, Leitz; Wetzlar, Deutschland

### Mikrometerschraube

Bügelmessschraube, Mitutoyo Deutschland,  
Neuss, Deutschland

### automatischen Pipetten

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

IX Literaturverzeichnis

- (1) Ahlquist M, Franzen O, Coffey J, Pashley D. Dental pain evoked by hydrostatic pressures applied to exposed dentin in man: a test of the hydrodynamic theory of dentin sensitivity. *J Endod* 1994 Mar;20(3):130-4.
- (2) Ahmad M, Pitt Ford TR, Crum LA, Walton AJ. Ultrasonic debridement of root canals: acoustic cavitation and its relevance. *J Endod* 1988 Oct;14(10):486-93.
- (3) Aibel K, Stevens R. Effect of chlorhexidine on IL-6 induction by LPS. *J Endod* 1999;(25):282 (Spec. Iss.Abstr. OR1).
- (4) Andersen M, Lund A, Andreasen JO, Andreasen FM. In vitro solubility of human pulp tissue in calcium hydroxide and sodium hypochlorite. *Endod Dent Traumatol* 1992 Jun;8(3):104-8.
- (5) Ando N, Hoshino E. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentin. *Int Endod J* 1990 Jan;23(1):20-7.
- (6) Andrews F, Horder J. A study of the *streptococci* pathogenic for man. *Lancet* 2 1906;708-13.
- (7) Ayhan H, Sultan N, Cirak M, Ruhi MZ, Bodur H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *Int Endod J* 1999 Mar;32(2):99-102.
- (8) Barbosa CA, Goncalves RB, Siqueira JF, Jr., de UM. Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. A clinical and laboratory study. *J Endod* 1997 May;23(5):297-300.
- (9) Basrani B, Tjaderhane L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP, et al. Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003 Nov;96(5):618-24.
- (10) Bassetti C, Kallenberger A. Influence of chlorhexidine rinsing on the healing of oral mucosa and osseous lesions. *J Clin Periodontol* 1980 Dec;7(6):443-56.
- (11) Bergenholtz G. Effect of bacterial products on inflammatory reactions in the dental pulp. *Scand J Dent Res* 1977 Jan;85(2):122-9.
- (12) Berkiten M, Okar I, Berkiten R. In vitro study of the penetration of *Streptococcus sanguis* and *Prevotella intermedia* strains into human dentinal tubules. *J Endod* 2000 Apr;26(4):236-9.
- (13) Boyce JM, Pittet D. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HIPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *Am J Infect Control* 2002 Dec;30(8):S1-46.
- (14) Brannstrom M. Dentin sensitivity and aspiration of odontoblasts. *J Am Dent Assoc* 1963 Mar;66:366-70.
- (15) Brannstrom M. Smear layer: pathological and treatment considerations. *Oper Dent Suppl* 1984;3:35-42.
- (16) Brannstrom M, Garberoglio R. The dentinal tubules and the odontoblast processes. A scanning electron microscopic study. *Acta Odontol Scand* 1972 Sep;30(3):291-311.
- (17) Brennan SS, Foster ME, Leaper DJ. Antiseptic toxicity in wounds healing by secondary intention. *J Hosp Infect* 1986 Nov;8(3):263-7.
- (18) Butler WT. Dentin collagen: chemical structure and role in mineralization; In Linde, A.(ed): *Dentin and Dentinogenesis*. Boca Raton: CRC Press Inc.; 1984.
- (19) Buttler TK, Crawford JJ. The detoxifying effect of varying concentrations of sodium hypochlorite on endotoxins. *J Endod* 1982 Feb;8(2):59-66.
- (20) Byers MR, Sugaya A. Odontoblast processes in dentin revealed by fluorescent Di-I. *J Histochem Cytochem* 1995 Feb;43(2):159-68.
- (21) Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1985 Oct;1(5):170-5.
- (22) Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983 Mar;55(3):307-12.
- (23) Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 1985 Jan;18(1):35-40.
- (24) Calas P, Rochd T, Druilhet P, Azais JM. In vitro adhesion of two strains of *Prevotella nigrescens* to the dentin of the root canal: the part played by different irrigation solutions. *J Endod* 1998 Feb;24(2):112-5.
- (25) Carrigan PJ, Morse DR, Furst ML, Sinai IH. A scanning electron microscopic evaluation of human dentinal tubules according to age and location. *J Endod* 1984 Aug;10(8):359-63.
- (26) Cuenin MF, Scheidt MJ, O'Neal RB, Strong SL, Pashley DH, Horner JA, et al. An in vivo study of dentin sensitivity: the relation of dentin sensitivity and the patency of dentin tubules. *J Periodontol* 1991 Nov;62(11):668-73.
- (27) Cunningham WT, Joseph SW. Effect of temperature on the bactericidal action of sodium hypochlorite endodontic irrigant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980 Dec;50(6):569-71.
- (28) D'Arcangelo C, Varvara G, De FP. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic, and microaerophilic bacteria. *J Endod* 1999 May;25(5):351-3.



- (29) Dahlen G, Magnusson BC, Moller A. Histological and histochemical study of the influence of lipopolysaccharide extracted from *Fusobacterium nucleatum* on the periapical tissues in the monkey *Macaca fascicularis*. Arch Oral Biol 1981;26(7):591-8.
- (30) Dahlen G, Samuelsson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of *enterococci* isolated from the root canal. Oral Microbiol Immunol 2000 Oct;15(5):309-12.
- (31) Dai XF, Ten Cate AR, Limeback H. The extent and distribution of intratubular collagen fibrils in human dentine. Arch Oral Biol 1991;36(10):775-8.
- (32) Dakin HD. On the use of certain antiseptic substances in Treatment of infected wounds. Brit Med J 1915;(2):318-20.
- (33) Dalton BC, Orstavik D, Phillips C, Pettiette M, Trope M. Bacterial reduction with nickel-titanium rotary instrumentation. J Endod 1998 Nov;24(11):763-7.
- (34) Davies RM, Hull PS. Plaque inhibition and distribution of chlorhexidine in beagle dogs. J Periodontal Res Suppl 1973;12:22-7.
- (35) Eick JD. Smear layer--materials surface. Proc Finn Dent Soc 1992;88 Suppl 1:225-42.
- (36) Eick JD, Cobb CM, Chappell RP, Spencer P, Robinson SJ. The dentinal surface: its influence on dentinal adhesion. Part I. Quintessence Int 1991 Dec;22(12):967-77.
- (37) Eick JD, Wilko RA, Anderson CH, Sorensen SE. Scanning electron microscopy of cut tooth surfaces and identification of debris by use of the electron microprobe. J Dent Res 1970 Nov;49(6):Suppl-68.
- (38) Eliades G, Palaghias G, Vougiouklakis G. Surface reactions of adhesives on dentin. Dent Mater 1990 Jul;6(3):208-16.
- (39) Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. Scand J Dent Res 1977 May;85(4):255-65.
- (40) Emilson CG, Ericson T, Heyden G, Magnusson BC. Uptake of chlorhexidine to hydroxyapatite. J Periodontal Res Suppl 1973;12:17-21.
- (41) Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. Int Endod J 2002 Mar;35(3):221-8.
- (42) Facklam RR, Moody MD. Presumptive identification of group D *streptococci*: the bile-esculin test. Appl Microbiol 1970 Aug;20(2):245-50.
- (43) Farrow JAE, Jones D, Phillips BA, Collins MD. Taxonomic studies on some group D *streptococci*. Journal of Genetic Microbiology 1983;(129):1423-32.
- (44) Ferguson J, Hatton J, Gillespie M. Efficacy of common intracanal medicaments against *candida albicans*. J Dent Res 2000;(79):568 (Spec.Iss.Abstr.3400).
- (45) Fogel HM, Marshall FJ, Pashley DH. Effects of distance from the pulp and thickness on the hydraulic conductance of human radicular dentin. J Dent Res 1988 Nov;67(11):1381-5.
- (46) Foulkes DM. Some toxicological observations on chlorhexidine. J Periodontal Res Suppl 1973;12:55-60.
- (47) Frank RM, Steuer P. Transmission electron microscopy of the human odontoblast process in peripheral root dentine. Arch Oral Biol 1988;33(2):91-8.
- (48) Furseth R. The fine structure of the odontoblast-predentin area in the root. Scand J Dent Res 1971;79(3):141-50.
- (49) Fuss Z, Mizrahi A, Lin S, Cherniak O, Weiss EI. A laboratory study of the effect of calcium hydroxide mixed with iodine or electrophoretically activated copper on bacterial viability in dentinal tubules. Int Endod J 2002 Jun;35(6):522-6.
- (50) Garberoglio R, Brannstrom M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. Arch Oral Biol 1976;21(6):355-62.
- (51) Gjermo P. Chlorhexidine and related compounds. J Dent Res 1989;( 68 (Spec. Iss)):1602-8.
- (52) Goldberg M, Molon NM, Septier D. [Effect of 2 methods of demineralization on the on the preservation of glycoproteins and proteoglycans in the intertubular and peritubular dentin in the horse]. J Biol Buccale 1980 Dec;8(4):315-30.
- (53) Goracci G, Mori G, Marci F, Baldi M. Extent of the odontoblastic process. Analysis by SEM and confocal microscopy. Minerva Stomatol 1999 Jan;48(1-2):1-8.
- (54) Greenhill JD, Pashley DH. The effects of desensitizing agents on the hydraulic conductance of human dentin in vitro. J Dent Res 1981 Mar;60(3):686-98.
- (55) Gwinnett AJ. Smear layer: morphological considerations. Oper Dent Suppl 1984;3:2-12.
- (56) Haapasalo HK, Siren EK, Waltimo TM, Orstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. Int Endod J 2000 Mar;33(2):126-31.
- (57) Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. J Dent Res 1987 Aug;66(8):1375-9.
- (58) Hahn CL, Overton B. The effects of immunoglobulins on the convective permeability of human dentine in vitro. Arch Oral Biol 1997 Dec;42(12):835-43.
- (59) Haight-Ponce E, Endo H, Horiuchi H. Endotoxin activity measured by limulus assay. Endod Dent Traumatol 1999 Jun;15(3):109-12.
- (60) Haikel Y, Gorce F, Allemann C, Voegel JC. In vitro efficiency of endodontic irrigation solutions on protein desorption. Int Endod J 1994 Jan;27(1):16-20.

- (61) Haller B. Mechanismus und Wirksamkeit von Dentinhaftvermittlern. Dtsch Zahnarztl Z 1994;(49):750-9.
- (62) Haller B, Klaiber B, Dürner U, Hofmann N. Dentinpermeabilität nach Behandlung mit Cleanern und Primern. Dtsch Zahnarztl Z 1992;(47):171-5.
- (63) Haller B. Untersuchung zum Mechanismus und zur Wirksamkeit von Komposit-Dentinhaftmitteln. Würzburg: 1992.
- (64) Hals E, Olsen H.C. Scanning electron and incident light microscopy of giant tubules in red deer dentin. Scand J Dent Res 1984 Aug;92(4):269-74.
- (65) Hancock HHI, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001 May;91(5):579-86.
- (66) Hand RE, Smith ML, Harrison JW. Analysis of the effect of dilution on the necrotic tissue dissolution property of sodium hypochlorite. J Endod 1978 Feb;4(2):60-4.
- (67) Harrison JW, Svec TA, Baumgartner JC. Analysis of clinical toxicity of endodontic irrigants. J Endod 1978 Jan;4(1):6-11.
- (68) Harty FJ. Endodontics in clinical practice. London: Wright; 1980.
- (69) Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. J Endod 1988 Mar;14(3):125-7.
- (70) Heling I, Chandler NP. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. Int Endod J 1998 Jan;31(1):8-14.
- (71) Heling I, Steinberg D, Kenig S, Gavrilovich I, Sela MN, Friedman M. Efficacy of a sustained-release device containing chlorhexidine and Ca(OH)<sub>2</sub> in preventing secondary infection of dentinal tubules. Int Endod J 1992 Jan;25(1):20-4.
- (72) Hennessy TD. Some antibacterial properties of chlorhexidine. J Periodontol Res 1973;(8 (Suppl12)):61-7.
- (73) Hirst RC, Egelberg J, Hornbuckle GC, Oliver RC, Rathbun WE. Microscopic evaluation of topically applied chlorhexidine gluconate on gingival wound healing in dogs. J South Calif Dent Assoc 1973 Apr;41(4):311-7.
- (74) Höhling HJ, Fromme HG. Cellular transport and accumulation of calcium and phosphate during dentinogenesis. In Linde,A.(ed): Dentin and Dentinogenesis. Boca Raton: CRC Press Inc.; 1984.
- (75) Ingle JI, Bakland LK, Peters DZ, Buchanan S, Mullaney TP. Endodontic cavity preparation. In: Ingle JI, Bakland LK, editors. Endodontics. Baltimore: Williams and Wilkins; 1994. p. 92-228.
- (76) Isokawa S, Toda Y, Kubota K. A scanning electron microscopic observation of etched human peritubular dentine. Arch Oral Biol 1970 Dec;15(12):1303-6.
- (77) Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. J Endod 1994 Jun;20(6):276-8.
- (78) Johnson BR, Remeikis NA. Effective shelf-life of prepared sodium hypochlorite solution. J Endod 1993 Jan;19(1):40-3.
- (79) Jones D. Composition and differentiation of the genus *Enterococcus*. London, UK: Academic Press; 1978.
- (80) Jones SJ, Boyde A. Ultrastructure of dentin and dentinogenesis. In Linde,A.(ed): Dentin and Dentinogenesis. Boca Raton: CRC Press Inc.; 1984.
- (81) Jung S, Savafi K, Spangberg L. The effectiveness of chlorhexidine in the prevention of root canal reinfection. J Endod 1999;(25):288(Abstr.OR26).
- (82) Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1965 Sep;20:340-9
- (83) Kayaoglu G, Erten H, Orstavik D. Growth at high pH increases *Enterococcus faecalis* adhesion to collagen. Int Endod J 2005 Jun;38(6):389-96.
- (84) Klimm W, Krause L, Krause P, Wenzel J. [Toxicity of different endodontic antiseptics]. Stomatol DDR 1989 Mar;39(3):153-5.
- (85) Klimm W, Zeumer H, Kloss HJ, Natusch I, Wildfuhr W. [Chlorhexidine in the treatment of root canal infection and its sequels]. Z Stomatol 1989 May;86(3):131-8.
- (86) Knutsson G, Jontell M, Bergenholtz G. Determination of plasma proteins in dentinal fluid from cavities prepared in healthy young human teeth. Arch Oral Biol 1994 Mar;39(3):185-90.
- (87) Kolb E. Lehrbuch der Physiologie der Haustiere, Kap. 6.7. 5. Auflage ed. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1989.
- (88) Komorowski R, Grad H, Wu XY, Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin. J Endod 2000 Jun;26(6):315-7.
- (89) Koskinen KP, Rahkamo A, Hakala PE. Antimicrobial effect of some endodontic medicaments in vitro. Proc Finn Dent Soc 1975 Aug;71(4):132-6.
- (90) Kühlfluck I. Untersuchungen zur Eignung von Peressigsäure zur Wurzelkanal desinfektion Universität Schwerin; 1978.
- (91) Kuruvilla JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. J Endod 1998 Jul;24(7):472-6.
- (92) Leonardo MR, Tanomaru FM, Silva LA, Nelson FP, Bonifacio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. J Endod 1999 Mar;25(3):167-71.

- (93) Lin CP, Douglas WH, Erlandsen SL. Scanning electron microscopy of type I collagen at the dentin-enamel junction of human teeth. *J Histochem Cytochem* 1993 Mar;41(3):381-8.
- (94) Lin LM, Pascon EA, Skribner J, Gangler P, Langeland K. Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991 May;71(5):603-11.
- (95) Linde A. Dentin mineralization and the role of odontoblasts in calcium transport. *Connect Tissue Res* 1995;33(1-3):163-70.
- (96) Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4(5):679-728.
- (97) Løe H, Rindom Schieth C. The effect of suppression of the microflora upon the development of dental plaque and gingivitis. In: McHugh WD, editor. *Dental Plaque*. Edinburgh: Livingstone; 1970. p. 247-55.
- (98) Love RM. *Enterococcus faecalis* -a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001 Jul;34(5):399-405.
- (99) Lukinmaa PL, Vaahtokari A, Vainio S, Sandberg M, Waltimo J, Thesleff I. Transient expression of type III collagen by odontoblasts: developmental changes in the distribution of pro-alpha 1(III) and pro-alpha 1(I) collagen mRNAs in dental tissues. *Matrix* 1993 Nov;13(6):503-15.
- (100) Lukinmaa PL, Waltimo J. Immunohistochemical localization of types I, V, and VI collagen in human permanent teeth and periodontal ligament. *J Dent Res* 1992 Feb;71(2):391-7.
- (101) Lynne RE, Liewehr FR, West LA, Patton WR, Buxton TB, McPherson JC. In vitro antimicrobial activity of various medication preparations on *E. faecalis* in root canal dentin. *J Endod* 2003 Mar;29(3):187-90.
- (102) Magnusson B, Heyden G. Autoradiographic studies of 14C-chlorhexidine given orally in mice. *J Periodontal Res Suppl* 1973;12:49-54.
- (103) Marshall GW, Jr., Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent* 1997 Nov;25(6):441-58.
- (104) Martinez-Murcia AJ, Collins MD. *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus species*. *FEMS Microbiol Lett* 1991 May 1;64(1):69-74.
- (105) Mattsby-Baltzer I, Lindgren K, Lindholm B, Edebo L. Endotoxin shedding by enterobacteria: free and cell-bound endotoxin differ in Limulus activity. *Infect Immun* 1991 Feb;59(2):689-95.
- (106) Mjör JA. *Histology of the human tooth*. 2nd Edition ed. Copenhagen: Munksgaard; 1979.
- (107) Mjör JA. The morphology of dentin and dentinogenesis. In Linde,A.(ed):*Dentin and Dentinogenesis*. Boca Raton: CRC Press Inc.; 1984.
- (108) Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998 Jan;31(1):1-7.
- (109) Muschol A, Speer U. *Medizinische Mikrobiologie*. München: Mediscript; 1981.
- (110) Nagaoka S, Miyazaki Y, Liu HJ, Iwamoto Y, Kitano M, Kawagoe M. Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth. *J Endod* 1995 Feb;21(2):70-3.
- (111) Nakabayashi N, Pashley DH. *Hybridization of dental hard tissues*. Tokyo: Quintessence; 1998.
- (112) Nallapareddy SR, Qin X, Weinstock GM, Hook M, Murray BE. Enterococcus faecalis adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect Immun* 2000 Sep;68(9):5218-24.
- (113) Nissan R, Segal H, Pashley D, Stevens R, Trowbridge H. Ability of bacterial endotoxin to diffuse through human dentin. *J Endod* 1995 Feb;21(2):62-4.
- (114) Nordbo H. The affinity of chlorhexidine for hydroxyapatite and tooth surfaces. *Scand J Dent Res* 1972;80(6):465-73.
- (115) Olsson S, Oilo G, Adamczak E. The structure of dentin surfaces exposed for bond strength measurements. *Scand J Dent Res* 1993 Jun;101(3):180-4.
- (116) Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990 Aug;6(4):142-9.
- (117) Orstavik D, Holland RI. [Prefabricated root canal posts]. *Tandlaegebladet* 1986 May;90(9):411-4.
- (118) Panighi M, G'Sell C. Effect of the tooth microstructure on the shear bond strength of a dental composite. *J Biomed Mater Res* 1993 Aug;27(8):975-81.
- (119) Pashley DH. Smear layer: physiological considerations. *Oper Dent Suppl* 1984;3:13-29.
- (120) Pashley DH. Dentin-predentin complex and its permeability: physiologic overview. *J Dent Res* 1985 Apr;64 Spec No:613-20.
- (121) Pashley DH. Dentin: a dynamic substrate--a review. *Scanning Microsc* 1989 Mar;3(1):161-74.
- (122) Pashley DH, Andringa HJ, Derkson GD, Derkson ME, Kalathoor SR. Regional variability in the permeability of human dentine. *Arch Oral Biol* 1987;32(7):519-23.
- (123) Pashley DH, Carvalho RM. Dentine permeability and dentine adhesion. *J Dent* 1997 Sep;25(5):355-72.
- (124) Pashley DH, Ciucchi B, Sano H, Horner JA. Permeability of dentin to adhesive agents. *Quintessence Int* 1993 Sep;24(9):618-31.

- (125) Pashley DH, Horner JA, Brewer PD. Interactions of conditioners on the dentin surface. *Oper Dent* 1992;Suppl 5:137-50.
- (126) Pashley DH, Matthews WG. The effects of outward forced convective flow on inward diffusion in human dentine in vitro. *Arch Oral Biol* 1993 Jul;38(7):577-82.
- (127) Pashley DH, O'Meara JA, Kepler EE, Galloway SE, Thompson SM, Stewart FP. Dentin permeability. Effects of desensitizing dentifrices in vitro. *J Periodontol* 1984 Sep;55(9):522-5.
- (128) Pashley DH, Pashley EL. Dentin permeability and restorative dentistry: a status report for the American Journal of Dentistry. *Am J Dent* 1991 Feb;4(1):5-9.
- (129) Pashley DH, Tao L, Boyd L, King GE, Horner JA. Scanning electron microscopy of the substructure of smear layers in human dentine. *Arch Oral Biol* 1988;33(4):265-70.
- (130) Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod* 2000 Oct;26(10):593-5.
- (131) Perez F, Calas P, de FA, Maurette A. Migration of a *Streptococcus sanguis* strain through the root dentinal tubules. *J Endod* 1993 Jun;19(6):297-301.
- (132) Perez F, Calas P, Rochd T. Effect of dentin treatment on in vitro root tubule bacterial invasion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996 Oct;82(4):446-51.
- (133) Peters LB, Wesselink PR, Buijs JF, van Winkelhoff AJ. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2001 Feb;27(2):76-81.
- (134) Peters LB, Wesselink PR, Moorer WR. Penetration of bacteria in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J* 2000 Jan;33(1):28-36.
- (135) Portenier I, Haapasalo H, Orstavik D, Yamauchi M, Haapasalo M. Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against *Enterococcus faecalis* by dentin, dentin matrix, type-I collagen, and heat-killed microbial whole cells. *J Endod* 2002 Sep;28(9):634-7.
- (136) Posner AS, Tannenbaum PJ. The mineral phase of dentin. In Linde, A. (ed): *Dentin and Dentinogenesis*. Boca Raton: CRC Press Inc.; 1984.
- (137) Pschyrembel Willibald. *Psychrembel, Medizinisches Wörterbuch*. 260 ed. Walter de Gruyter; 2004.
- (138) Reeder OW, Jr., Walton RE, Livingston MJ, Pashley DH. Dentin permeability: determinants of hydraulic conductance. *J Dent Res* 1978 Feb;57(2):187-93.
- (139) Rich RL, Kreikemeyer B, Owens RT, LaBrenz S, Narayana SV, Weinstock GM, et al. Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *J Biol Chem* 1999 Sep 17;274(38):26939-45.
- (140) Ringel AM, Patterson SS, Newton CW, Miller CH, Mulhern JM. In vivo evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. *J Endod* 1982 May;8(5):200-4.
- (141) Ritchie HH, Ritchie DG, Wang LH. Six decades of dentinogenesis research. Historical and prospective views on phosphophoryn and dentin sialoprotein. *Eur J Oral Sci* 1998 Jan;106 Suppl 1:211-20.
- (142) Roach R, Distel J, Hatton J, Gillespie M. Intracanal medicament prevention of interappointment bacterial contamination. *J Dent Res* 2000;(79):569 (Spec.Iss.Abstr.3401).
- (143) Rocas IN, Siqueira JF, Jr., Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004 May;30(5):315-20.
- (144) Rolla G, Loe H, Schiott CR. Retention of chlorhexidine in the human oral cavity. *Arch Oral Biol* 1971 Sep;16(9):1109-16.
- (145) Ruch JV. Odontoblast commitment and differentiation. *Biochem Cell Biol* 1998;76(6):923-38.
- (146) Ruse ND, Smith DC. Adhesion to bovine dentin--surface characterization. *J Dent Res* 1991 Jun;70(6):1002-8.
- (147) Saatman RA, Carlton WW, Hubben K, Streett CS, Tuckosh JR, DeBaecke PJ. A wound healing study of chlorhexidine digluconate in guinea pigs. *Fundam Appl Toxicol* 1986 Jan;6(1):1-6.
- (148) Saleh IM, Ruyter IE, Haapasalo M, Orstavik D. Survival of *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers in vitro. *Int Endod J* 2004 Mar;37(3):193-8.
- (149) Schellenberg U, Krey G, Bosshardt D, Nair PNR. Numerical density of dentinal tubules at the pulpal wall of human permanent premolars and third molars. *J Endod* 1992;18:104-9.
- (150) Schilke R, Lisson JA, Bauss O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol* 2000 May;45(5):355-61.
- (151) Schleifer KH, Kilpper-Bälz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. Rev. as *Enterococcus faecalis* comb. Nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systemic Bacteriology* 1984;(34):31-4.
- (152) Schmalz G, Hiller KA, Nunez LJ, Stoll J, Weis K. Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. *J Endod* 2001 Jan;27(1):23-30.
- (153) Seichter U, van der Schelling D. [Bacteriological studies on the disinfecting effect of chlorhexidine as an irrigant in root canal treatment]. *Dtsch Zahnarzt Z* 1987 Aug;42(8):763-6.

- (154) Selbitz HJ. Lehrbuch der Veterinärmedizinischen Bakteriologie. Gustav-Fischer-Verlag; 1992. p. 171-2.
- (155) Sen BH, Safavi KE, Spangberg LS. Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals. *J Endod* 1999 Apr;25(4):235-8.
- (156) Sherman JM. The *Streptococci*. Bacteriological Reviews 1. Williams and Wilkins Company; 1937. p. 3-97.
- (157) Shuping GB, Orstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod* 2000 Dec;26(12):751-5.
- (158) Siqueira JF, Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 2001 Jan;34(1):1-10.
- (159) Siqueira JF, Jr., Araujo MC, Garcia PF, Fraga RC, Dantas CJ. Histological evaluation of the effectiveness of five instrumentation techniques for cleaning the apical third of root canals. *J Endod* 1997 Aug;23(8):499-502.
- (160) Siqueira JF, Jr., Batista MM, Fraga RC, de UM. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod* 1998 Jun;24(6):414-6.
- (161) Siqueira JF, Jr., de UM. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod* 1996 Dec;22(12):674-6.
- (162) Siqueira JF, Jr., de UM, Fonseca ME. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *J Endod* 1996 Jun;22(6):308-10.
- (163) Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod* 2000 Jun;26(6):331-4.
- (164) Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Souto R, de UM, Colombo AP. *Actinomyces* species, *streptococci*, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. *J Endod* 2002 Mar;28(3):168-72.
- (165) Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J* 1997 Mar;30(2):91-5.
- (166) Sjogren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1997 Sep;30(5):297-306.
- (167) Sjogren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J* 1991 May;24(3):119-25.
- (168) Sjogren U, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of ultrasonic root canal instrumentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1987 Mar;63(3):366-70.
- (169) Spangberg L. Intracanal Medications. In: Ingle JI, Bakland LK, editors. *Endodontics*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1994. p. 627-40.
- (170) Spangberg L, Engstrom B, Langeland K. Biologic effects of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1973 Dec;36(6):856-71.
- (171) Spencer P, Byerley TJ, Eick JD, Witt JD. Chemical characterization of the dentin/adhesive interface by Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. *Dent Mater* 1992 Jan;8(1):10-5.
- (172) Stewart G, Cobe H, Rappaport H. A study of a new medicament in the chemomechanical preparation of infected root canals. *J Am Dent Assoc* 1961;(63):33.
- (173) Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod* 1992 Sep;18(9):427-30.
- (174) Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998 Jan;85(1):86-93.
- (175) Svec TA, Harrison JW. Chemomechanical removal of pulpal and dentinal debris with sodium hypochlorite and hydrogen peroxide vs normal saline solution. *J Endod* 1977 Feb;3(2):49-53.
- (176) The SD. The solvent action of sodium hypochlorite on fixed and unfixed necrotic tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1979 Jun;47(6):558-61.
- (177) Thiercelin E, Jouhaud L. Reproduction de l'enterocoque; taches centrales; granulations peripheriques et microblastes. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie Paris* 1903;(55):686-8.
- (178) Thomas HF, Carella P. A scanning electron microscope study of dentinal tubules from un-erupted human teeth. *Arch Oral Biol* 1983;28(12):1125-30.
- (179) Turkun M, Cengiz T. The effects of sodium hypochlorite and calcium hydroxide on tissue dissolution and root canal cleanliness. *Int Endod J* 1997 Sep;30(5):335-42.
- (180) Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. *Endod Dent Traumatol* 1993 Dec;9(6):243-8.
- (181) Vongsavan N, Matthews B. The permeability of cat dentine in vivo and in vitro. *Arch Oral Biol* 1991;36(9):641-6.
- (182) Waltimo TM, Orstavik D, Siren EK, Haapasalo MP. In vitro yeast infection of human dentin. *J Endod* 2000 Apr;26(4):207-9.
- (183) Waltimo TM, Siren EK, Orstavik D, Haapasalo MP. Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide in vitro. *Int Endod J* 1999 Mar;32(2):94-8.
- (184) Watanabe I, Nakabayashi N, Pashley DH. Bonding to ground dentin by a phenyl-P self-etching primer. *J Dent Res* 1994 Jun;73(6):1212-20.

- (185) Weber DF, Zaki AE. Scanning and transmission electron microscopy of tubular structures presumed to be human odontoblast processes. J Dent Res 1986 Jul;65(7):982-6.
- (186) Weiger R, Axmann-Kremer D, Lost C. Prognosis of conventional root canal treatment reconsidered. Endod Dent Traumatol 1998 Feb;14(1):1-9.
- (187) Wennberg A. Biological evaluation of root canal sealers using in vitro and in vivo methods. J Endod 1980 Oct;6(10):784-7.
- (188) White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. J Endod 1997 Apr;23(4):229-31.
- (189) White RR, Janer LR, Hays GL. Residual antimicrobial activity associated with a chlorhexidine endodontic irrigant used with sodium hypochlorite. Am J Dent 1999 Jun;12(3):148-50.
- (190) Williams AM, Rodrigues UM, Collins MD. Intrageneric relationships of Enterococci as determined by reverse transcriptase sequencing of small-subunit rRNA. Res Microbiol 1991 Jan;142(1):67-74.
- (191) Winrow MJ. Metabolic studies with radiolabelled chlorhexidine in animals and man. J Periodontal Res Suppl 1973;12:45-8.
- (192) Witte W. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. Science 1998 Feb 13;279(5353):996-7.
- (193) Xiao J, Hook M, Weinstock GM, Murray BE. Conditional adherence of Enterococcus faecalis to extracellular matrix proteins. FEMS Immunol Med Microbiol 1998 Aug;21(4):287-95.
- (194) Yang SF, Rivera EM, Baumgardner KR, Walton RE, Stanford C. Anaerobic tissue-dissolving abilities of calcium hydroxide and sodium hypochlorite. J Endod 1995 Dec;21(12):613-6.
- (195) Yoshiyama M, Ozaki K, Ebisu S. Morphological characterization of hypersensitive human radicular dentin and the effect of a light-curing resin liner on tubular occlusion. Proc Finn Dent Soc 1992;88 Suppl 1:337-44.
- (196) Zareba TW, Pascu C, Hryniewicz W, Wadstrom T. Binding of enterococci to extracellular matrix proteins. Adv Exp Med Biol 1997;418:721-3.
- (197) Zehnder M, Grawehr M, Hasselgren G, Waltimo T. Tissue-dissolution capacity and dentin-disinfecting potential of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2003 Nov;96(5):608-13.

## X Lebenslauf

Name Elisabeth Tabenski-Bosakowski, geborene Tabenski  
 Adresse Feldstrasse 18  
 97688 Bad Kissingen  
 Geboren 26. September 1979 in Katowitz, Polen  
 Familienstand Seit März 2004 verheiratet, Ehemann Tomasz Bosakowski, Anwalt,  
 ein Kind, Alexander Bosakowski, geb. am 12.08.04  
 Staatsbürgerschaft deutsch  
 1982 Übersiedlung mit der Familie von Polen nach Deutschland

## Schulbildung

1986-1990 Besuch der Grundschule in Bad Kissingen  
 1990-1999 Humanistisches Gymnasium Münnertadt  
 Mai 1999 Allgemeine Hochschulreife, Gymnasium Münnertadt

## Hochschulbildung

1999-2001 Studium der Humanmedizin an der Jagiellonian University Krakow,  
 Medizin for english speaking foreigners (in englischer Sprache)  
 2001-2004 Studium der Zahnmedizin an der Schlesischen Medizinischen  
 Akademie, Katowitz  
 Juli 2004 Staatsexamen Zahnmedizin  
 Oktober 2004- Obligatorisches Assistenzjahr, absolviert an der  
 Oktober 2005 Schlesischen Medizinischen Akademie, Kattowitz  
 1. Oktober 2005 LEDP (Medizinisch-Zahnmedizinisches Staatsexamen in Krakau)  
 Nov. 2005- Promotionsstudentin und Gastärztin an der Medizinischen Fakultät  
 Nov. 2006 der Universität Regensburg,  
 Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie,  
 Direktor Prof. Dr. G. Schmalz  
 Thema: Antimikrobielle Wirkung verschiedener Substanzen auf  
 artifiziiell infiziertem Dentin  
 März 2006 Erhalt der Erlaubnis zur vorübergehenden Ausübung der  
 Zahnheilkunde in fachlich abhängiger Stellung im Freistaat Bayern  
 Seit September 2006 Assistenzärztin in Privatpraxis, Dr. Barbara Tabenski MSc., Untere  
 Marktstrasse 7, 97688 Bad Kissingen  
 Seit November 2006 Teilnahme am Studiengang Kieferorthopädie, Donau-Universität  
 Krems, Postgraduale Universitäts-Studien für Heilberufe  
 März 2007 Verlängerung der Erlaubnis zur vorübergehenden Ausübung der  
 Zahnheilkunde in fachlich abhängiger Stellung im Freistaat Bayern  
 Seit September 2007 Assistenz Zahnärztin an der Schlesischen Medizinischen Universität  
 Katowitz - Lehrstuhl für Craniomandibuläre Dysfunktionen

## XI Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlichst bei Herrn Professor Dr. G. Schmalz für die freundliche Überlassung des Themas, die Anleitung zu wissenschaftlichen Arbeiten und die großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche bedanken.

Herrn Dr. K.-A. Hiller gebührt mein ganz besonderer Dank für seine unermüdliche und überaus konstruktive Betreuung, Zusammenarbeit und die unermessliche Geduld bei der Erstellung, Durchführung und statistischen Auswertung der vorliegenden Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Claudia Waha für die geduldige Einweisung in die Labortechniken, die organisatorische Unterstützung und vor allem für das Ablösen morgens nach langen Messnächten im Labor.

Frau Brigitte Bey danke ich für die ausgezeichnete Arbeit und die immerwährend gute Laune während der langen Stunden am REM.

Weiterhin möchte ich mich herzlichst beim ganzen Laborteam der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, vor allem bei Herrn Prof. Dr. H. Schweikl dafür bedanken, dass es mich so freundlich aufgenommen hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Meinen wunderbaren Eltern danke ich vor allem dafür, dass Sie immer an mich glauben und mich in allem so selbstlos unterstützen. Ohne Euch wäre ich nicht wer ich bin und wo ich bin.

Großer Dank an meine Oma und meine beiden Schwestern, den besten „Kindermädchen“ der Welt.

Zuletzt gilt mein ganz spezieller Dank meinem verständnisvollen und geduldigen Ehemann und meinem kleinen Sohn, die in der letzten Zeit oft auf mich verzichten mussten und sich nie beschwert haben.