

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	3
2. Literaturübersicht.....	5
2.1. Grundlagen und Theorie der photodynamischen Therapie.....	5
2.1.1. Physikalische Grundlagen	5
2.1.2. Photochemische Wechselwirkung mit Gewebe	6
2.1.3. Photosensibilisatoren	7
2.2. Die antibakterielle photodynamische Therapie in der Endodontie	9
2.2.1. <i>in vivo</i> Studien zur aPDT in der Endodontie.....	9
2.2.2. <i>in vitro</i> Studien zur aPDT in der Endodontie.....	11
2.2.3. Einfluss des Photosensibilisators auf die Wirkung der aPDT.....	14
2.3. Die photodynamische Therapie in anderen medizinischen Bereichen.....	16
2.4. <i>Enterococcus faecalis</i>	17
2.4.1. Allgemeines zum Bakterium <i>Enterococcus faecalis</i>	17
2.4.2. <i>in vivo</i> Studien zum <i>Enterococcus faecalis</i> in der Endodontie.....	18
2.4.3. <i>in vitro</i> Studien zum <i>Enterococcus faecalis</i> in der Endodontie.....	19
2.5. <i>Bacillus subtilis</i>	20
3. Fragestellung	22
4. Material und Methode	23
4.1. Eingesetzter Mikroorganismus.....	23
4.2. Testgerät.....	23
4.3. Nährmedien	24
4.4. Inkubation der <i>Enterococcus faecalis</i> Arbeitskultur.....	25
4.5. Sicherheitsvorkehrungen.....	25
4.6. Herstellung einer Gefrierkultur	25
4.7. Vorbereitung einer Arbeitskultur	26
4.8. Herstellung der Wurzelstücke	27
4.8.1. Gewinnung der Rinderzähne	27
4.8.2. Aufbereitung der Rinderzähne	27
4.9. Versuchsablauf	29
4.9.1. Versuchstag 1.....	30
4.9.2. Versuchstag 2	32
4.9.3. Versuchstag 3	33
4.9.4. Versuchstag 4	33

4.9.5. Versuchstag 5	33
4.9.6. Versuchstag 6	33
4.10. Versuchstag 7, Versuchsende	33
4.10.1. Desinfektion	34
4.10.2. Herstellung der Zahnstückhälften	35
4.10.3. Probengewinnung	36
4.10.4. Wachstumskulturen	41
4.10.5. Kolonien	41
4.11. Datenerhebung und statistische Analyse	42
4.11.1. Auszählen der koloniebildenden Einheiten	42
4.11.2. Statistische Auswertung	42
4.12. Einfluss des Photosensitzers auf das Bakterium <i>Enterococcus faecalis</i>	43
4.13. Vorbereitung der Proben für die rasterelektronenmikroskopische Visualisierung	43
4.14. Testung der Kanamycin-Äsculin-Azid-Selektivnährböden	44
5. Ergebnisse	45
5.1. Absolute Kolonienzahlen	45
5.1.1. Sterilkontrollen	45
5.1.2. Infektionskontrollen	45
5.2. Relative Kolonienzahlen	46
5.3. Einfluss des Photosensitzers auf das Bakterium <i>Enterococcus faecalis</i>	47
5.4. Rasterelektronenmikroskopische Bilder	48
5.5. Ergebnis der Kanamycin-Äsculin-Azid-Selektivnährböden-Testung	51
6. Diskussion	52
6.1. Das Testmodell und seine Durchführung	52
6.2. Antibakterielle Wirkung der aPDT	54
6.3. Vergleich der beiden Parallelprojekte	56
6.4. Unterbindung der <i>Bacillus subtilis</i> Kontamination der Agarplatten	57
7. Zusammenfassung	59
8. Anhang	61
8.1. Labormaterialien und Reagenzien	61
8.2. Abbildungsverzeichnis	66
8.3. Abkürzungsverzeichnis	67
9. Literaturverzeichnis	69
10. Lebenslauf	76
11. Danksagung	77

1. Einleitung

In den unterschiedlichsten medizinischen Fachdisziplinen werden heutzutage moderne Lasersysteme sowohl für diagnostische als auch therapeutische Zwecke eingesetzt. Eine der vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten des Lasers (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) beruht auf photochemischen Wechselwirkungen, die bei Bestrahlung von Gewebe mit einer Lichtquelle niedriger Intensität in Verbindung mit Sauerstoff und einem sogenannten Photosensitizer entstehen. Diese Effekte macht man sich in der photodynamischen Therapie zu Nutze. Sie eignet sich sowohl für die Hemmung von neoplastischen, proliferierenden Zellen, als auch für die Inaktivierung von diversen pathogenen Erregern.

Die Erkenntnis, dass durch photooxidative Interaktionen bakterizide Wirkungen entstehen, wurde bereits Anfang des 20. Jahrhunderts gewonnen. Durch die erfolgreiche Weiterentwicklung von Antibiotika trat die antibakterielle photodynamische Therapie (aPDT) jedoch zunächst in den Hintergrund [63]. Das stetige Neuaufkommen Antibiotika-resistenter Keime aber stellt die medizinische Wissenschaft zunehmend vor neue Herausforderungen und verlangt nach effizienten Desinfektionsmethoden. Seit den 1990er Jahren befindet sich die aPDT in der Zahnheilkunde auf dem Vormarsch: Insbesondere in der Parodontologie kommt sie unterstützend zur mechanischen Reinigung parodontaler Taschen [21; 64; 82] und zur Therapie von Weichgewebeinfektionen an dentalen Implantaten [101] zum Einsatz. Als weitere Indikationen der aPDT werden u.a. die Kavitätendesinfektion nach der Präparation, die Desinfektion kariösen Dentins [109] und die Behandlung oraler Stomatitiden und der oralen Candidiasis [13; 19] angegeben. Die Behandlungsmöglichkeiten mit der aPDT sind vielfältig und scheinen erfolgversprechend [13; 21; 64; 109].

Auch in der Endodontie scheint die aPDT zufriedenstellende Ergebnisse bei der Abtötung problematischer Keime zu liefern. Die in infizierten Wurzelkanälen vorherrschende Flora wird vor allem durch grampositive und gramnegative Anaerobier dominiert [31]. Eine gründliche Bearbeitung der Wurzelkanalwände mit endodontischen Feilen und die adäquate Desinfektion des Wurzeldentins mit Spülösungen sind daher grundlegend für eine erfolgreiche Wurzelbehandlung. Trotz akkuratester Vorgehensweise bei der chemisch-mechanischen Reinigung von Wurzelkanälen ist es oftmals nicht möglich, alle vorhandenen

Mikroorganismen abzutöten [72; 92]. Eine residuale bakterielle Besiedelung in Nischen und Seitenkanälchen der Wurzelkanäle bleibt bestehen und ist häufig ursächlich für endodontisches Versagen [72]. Eine besondere Rolle bei persistierender, therapieresistenter Parodontitis apicalis spielt der fakultative Anaerobier *Enterococcus faecalis* [31; 54; 112], der mit vielen der herkömmlichen Desinfektionsmaßnahmen nicht ausreichend bekämpft werden kann [24; 91]. In zahlreichen *in vitro* Studien dient er zur artifiziellen Infizierung von Prüfkörpern und sein Wachstums- und Resistenzverhalten wird nach wie vor mit regem Interesse untersucht [1; 24]. Es stellt sich die Frage, ob die antibakterielle photodynamische Therapie eine angemessene Wirksamkeit gegen solche Keime besitzt und als moderne Alternative oder auch als ergänzende Maßnahme zu bislang altbewährten und oftmals vergleichsweise kostengünstigeren Spülösungen, wie z.B. Natriumhypochlorit (NaOCl), Chlorhexidin (CHX), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Zitronensäure oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gelten kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine *in vitro* Methode [49] weiterentwickelt, welche eine Untersuchung von Desinfektionsagentien anhand artifiziell infizierter Rinderzahnwurzeln (hier mit *Enterococcus faecalis*) ermöglicht. Sie ist Teil eines Parallelprojekts, in welchem zwei unterschiedliche endodontische Desinfektionsmethoden getestet wurden. Diese Arbeit bezieht ihren Schwerpunkt auf die Untersuchung der antibakteriellen photodynamischen Therapie. In der anderen Arbeit [60] wurde anhand desselben Modells die Wirksamkeit von Natriumhypochlorit als Desinfektionsagens getestet.

2. Literaturübersicht

2.1. Grundlagen und Theorie der photodynamischen Therapie

2.1.1. Physikalische Grundlagen

Licht ist elektromagnetische Strahlung. Die Lichtwellen einer Wellenlänge λ schwingen mit einer Frequenz v und stehen in folgender Beziehung zur Energie eines Photons:

$$E_{\text{Photon}} = h \cdot v = \frac{h \cdot c}{\lambda}; h \text{ entspricht dem Planck'schen Wirkungsquantum } h (6,6261 \cdot 10^{-34} \text{ Js})$$

und c ist die Lichtgeschwindigkeit ($299\,790 \frac{\text{km}}{\text{s}}$) [57].

Aus obiger Gleichung ergibt sich, dass Licht mit größerer Wellenlänge energieärmer ist als Licht mit einer kleineren Wellenlänge. Elektromagnetische Strahlung umfasst einen großen Bereich von Wellenlängen und dient in der Medizin zu unterschiedlichen diagnostischen und therapeutischen Zwecken. Wie in Abbildung 1 dargestellt, ist nur elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich von 400 - 700 nm für das menschliche Auge sichtbar. Laserwellen medizinischer Systeme befinden sich in diesem Spektrum in einem Wellenlängenbereich zwischen 10^{-7} und 10^{-5} m [10].

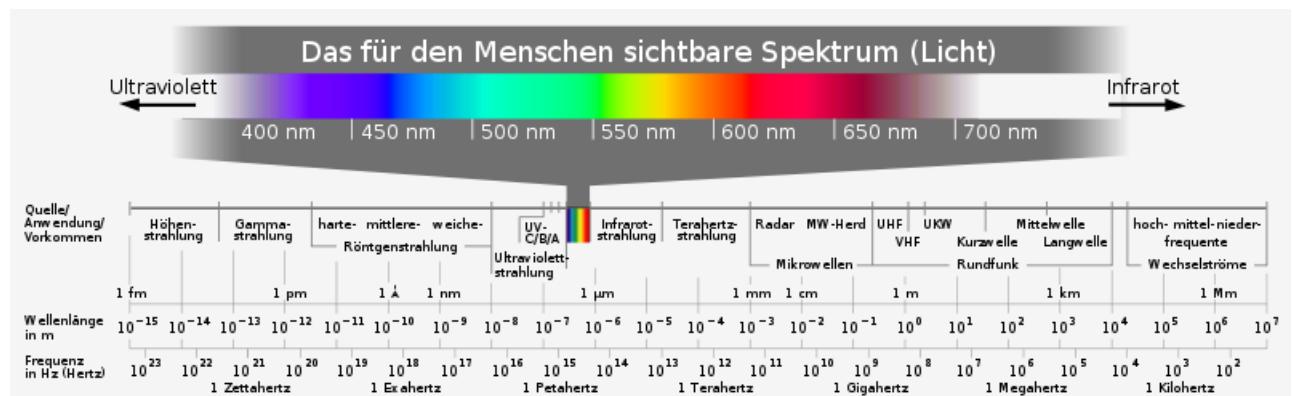


Abbildung 1: Das elektromagnetische Wellenspektrum [35]

Der Unterschied zwischen Laserlicht und konventionellen Lichtquellen besteht darin, dass ein Laser kohärentes Licht erzeugt, d.h. die Wellen weisen über einen zeitlichen und räumlichen Bereich hinweg eine definierte Phasenbeziehung auf. Die elektromagnetischen Wellen besitzen somit die gleiche Frequenz und die gleiche Wellenlänge.

Bei der Anwendung von Laserlicht in der Zahnheilkunde werden Hardlaser-Systeme von Softlasern unterschieden. Hardlaser eignen sich für invasive Eingriffe, z.B. zum Abtrag von Zahnhartsubstanz oder aber auch für chirurgische Anwendungen im Weichgewebe. Die

photodynamische Therapie wird mit Dioden-Softlasern durchgeführt, die durch eine geringere Energie und Leistung bei größerer Wellenlänge des Laserlichts charakterisiert sind. Ihr Leistungsbereich liegt in der Regel zwischen 30 und 100 mW. Die Wellenlänge ist abhängig vom Halbleitermaterial der emittierenden Leuchtdiode. Durch das Anlegen einer Spannung an den Halbleiterstab entsteht eine monochromatische Lichtquelle [10].

2.1.2. Photochemische Wechselwirkung mit Gewebe

Der Wirkmechanismus der antimikrobiellen photodynamischen Therapie beruht auf photochemischen Wechselwirkungen, d.h. der Anregung von Molekülen durch Licht. Es handelt sich um eine Reaktion, bei der Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge einen Photosensitizer in der Anwesenheit von Sauerstoff aktiviert [104]. Die vom Laser emittierten Photonen werden vom Photosensibilisator, der sich nach einer definierten Einwirkzeit im Gewebe angereichert hat, absorbiert. Aus Sauerstoff entstehen durch Energieübertragung reaktive, zytotoxische Sauerstoffspezies (ROS), wie z.B. Singuletsauerstoff oder freie Radikale, welche in der Lage sind, Biomoleküle zu oxidieren und dadurch Proteine, Lipide, Nukleinsäuren und andere Zellkomponenten zu zerstören [17; 56]. Bakterien im Gewebe können durch Permeabilitätsveränderungen der Membran irreversibel geschädigt werden, ohne dass dabei gentoxische oder mutagene Wirkungen auf gesundes Gewebe entstehen [47; 110]. Im Detail werden dabei zunächst Moleküle des Photosensitzers in den angeregten Singuletzustand versetzt. Von diesem Zustand aus können sie bei langwelligem Licht entweder unter Emission von Fluoreszenz oder durch Wärmeabgabe in den Grundzustand zurück fallen, oder durch Interkombination in den stabileren, angeregten Tripletzustand übergehen [104]. Aus diesem energiereichereren Zustand ist durch Elektronentransfer eine Energieübertragung auf molekularen Sauerstoff möglich, der im Grundzustand ebenfalls im Tripletzustand als ${}^3\text{O}_2$ vorliegt. Es resultiert die Entstehung von energiereichem, hochreaktivem Singuletsauerstoff ${}^1\text{O}_2$ (Typ II Reaktion). Die Energieübertragung durch Oxidation kann aber auch direkt auf umliegendes Gewebe erfolgen, wodurch Hydroperoxide, Peroxide oder Hydroxylradikale entstehen (Typ I Reaktion) [51; 52; 53; 56; 104]. Die beiden Reaktionstypen laufen parallel zueinander ab, wobei das Verhältnis dieser Reaktionen vom Redoxpotential des Photosensibilisators und der zu oxidierenden Zielstruktur, vom Sauerstoffpartialdruck und von der Konzentration der photoaktiven Substanz abhängt [61]. Einen Überblick über den Reaktionsablauf verschafft Abbildung 2. Es wird davon

ausgegangen, dass die Produktion von Singulett-Sauerstoff im Zuge der Typ II Reaktion hauptverantwortlich für die Zytotoxizität der aPDT ist [67; 105]. Insbesondere pathogene Anaerobier können sehr gut durch Singuletsauerstoff inaktiviert werden [64].

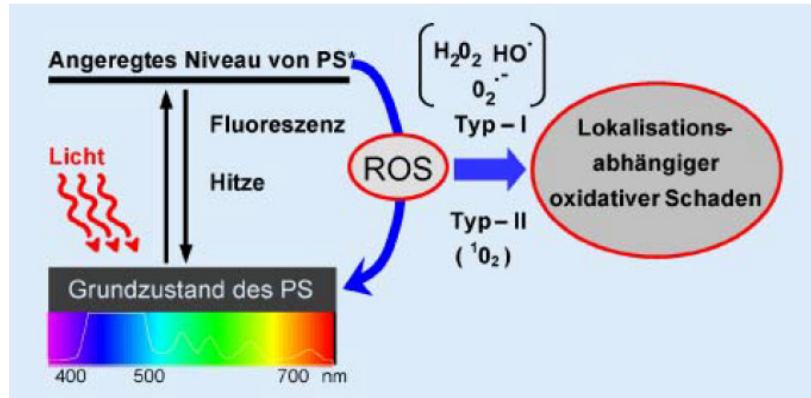


Abbildung 2: Reaktionsmechanismen der Photosensibilisatormoleküle: Durch Lichtenergie wird das Photosensibilisatormolekül aus seinem Grundzustand auf ein höheres Energieniveau angehoben, von dem aus es in den langlebigeren Tripletzustand übergeht. Die Energie des angeregten Photosensibilisatormoleküls kann als Fluoreszenz oder Wärme abgegeben werden, oder zur Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies verwendet werden. Bei der Typ-I-Reaktion werden Elektronen auf umliegendes Gewebe übertragen, wodurch Radikale und deren Reaktionsprodukte mit Sauerstoff entstehen. Bei der Typ-II-Reaktion erfolgt die Energieübertragung direkt vom Tripletzustand des Photosensibilisators auf molekularen Sauerstoff, wodurch hochreaktiver Singuletsauerstoff ($^1\text{O}_2$) entsteht [63]

2.1.3. Photosensibilisatoren

Für den oben beschriebenen Mechanismus wurden in den letzten Jahrzehnten unterschiedliche Stoffe als Photosensibilisatoren entwickelt, die gewissen klinischen Anforderungen Rechnung tragen müssen. Porphyrine und deren Derivate (Photofrin®, Photosan®, 5-Aminolävulinsäure) und Chlorine (Foscan®) haben sich vor allem in der Krebstherapie durchgesetzt, da sie sich selektiv in Tumorgewebe einlagern [4]. In der antibakteriellen photodynamischen Therapie kommen hauptsächlich Phenothiazinderivate und Phthalocyanine, gelegentlich auch Chlorine und Porphyrine zum Einsatz [56; 107].

Die toxische Wirkung eines Photosensibilisators darf sich erst durch die Aktivierung mit Licht entfalten. Nach der Anwendung soll er wieder reversibel aus gesundem Gewebe und Epithelzellen eliminierbar sein. Abhängig vom medizinischen Anwendungsgebiet, kann der Farbstoff intravenös, oral oder topisch verabreicht werden. Für Lösungen und intravenöse Injektionen muss er ausreichend wasserlöslich sein [10; 56]. Um einen keimtötenden Effekt erzielen zu können, ist ein Licht definierter Wellenlänge und Intensität erforderlich, das der

Farbstoff absorbieren kann [56]. Das Absorptionsmaximum des Photosensitzers sollte im roten oder nahen infraroten Spektralbereich liegen, da dort die Eindringtiefe des Lichtes in biologisches Gewebe am größten ist [8]. Je höher die Wellenlänge, desto stärker ist die Wirkung in tiefer liegendem Gewebe [10; 67]. So haben die gebräuchlichsten Farbstoffe in der Zahnmedizin ihr Absorptionsmaximum zwischen 630 und 700 nm [56]. Der Photosensibilisator muss in ausreichender Konzentration im Gewebe vorhanden sein und sich zudem an die Zellmembran der Zielzellen binden können. Dies geschieht beispielsweise über Ionenbindung, Antikörperbindung oder membranaktive Substanzen, über die sich der Farbstoff an die Mureinhülle von Bakterien anlagert [56; 64]. Durch den lipophilen Charakter der meisten Photosensibilisatoren lagern sie sich vorzugsweise der Lipiddoppelschicht in Membranen an [104]. Aufgrund unterschiedlicher Zellmembranbestandteile und -dicken von grampositiven und gramnegativen Bakterien resultieren unterschiedliche phototoxische Wirkungen der Photosensibilisatoren auf verschiedenartige Bakterienstämme [5; 25]. Neutrale und anionische Photosensitizer binden sehr gut an die Membran grampositiver Bakterien und führen bei Aktivierung zu deren Abtötung, wohingegen bei gramnegativen Bakterien eine höhere Überlebensfähigkeit nachgewiesen wurde. Die asymmetrische Anordnung von Lipiden in der äußersten Zellwand gramnegativer Bakterien dient als natürliche Schutzbarriere und verhindert eine Diffusion zellschädigender Stoffe, wodurch z.B. auch eine größere Resistenz gegenüber der aPDT resultiert [25; 61]. Durch die Zugabe von Detergenzien wie EDTA, die die Zellwand gramnegativer Bakterien für Photosensitizer zugänglich machen, entsteht auch an gramnegativen Mikroorganismen, wie z.B. *Escherichia coli* eine tödliche Wirkung [62; 66].

Die gängigsten Systeme aus Photosensitizer und Laser in der Zahnmedizin sind derzeit Toluidinblau/Toloniumchlorid (635 nm) und Methylenblau (670 nm) mit Diodenlaser als Lichtquelle. Bei den Farbstoffen Toloniumchlorid und Methylenblau handelt es sich um Phenothiazin-Derivate, trizyklische Verbindungen positiver Ladung, deren mittlerer Ring ein Schwefel- und ein Stickstoff-Atom trägt (Abb. 3) [56; 106]. In Anwesenheit von Licht und Sauerstoff zersetzt sich die oxidationsempfindliche Substanz. Durch funktionelle Gruppen lässt sich der hydrophile Charakter des Stoffes verändern [105]. Abhängig vom weiteren chemischen Aufbau, entfaltet das Phenothiazin unterschiedliche Wirkungen. So werden seine nicht-oxidierten Derivate z.B. in der Pharmakologie als Ausgangsstoff für eine Reihe von Neuroleptika und Sedativa verwendet [76; 105].

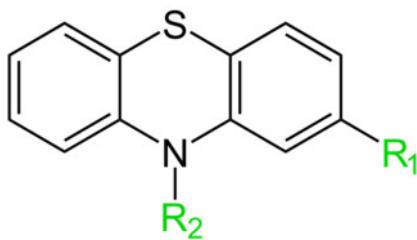


Abbildung 3: Phenothiazin-Grundgerüst [79]

2.2. Die antibakterielle photodynamische Therapie in der Endodontie

2.2.1. *in vivo* Studien zur aPDT in der Endodontie

Klinische Untersuchungen zur antimikrobiellen photodynamische Therapie in der Endodontie sind bisher in relativ geringem Umfang verfügbar. Häufig wird sie in klinischen Studien als Zusatzmaßnahme zu altbewährten Spülösungen eingesetzt, da ihre alleinige Anwendung nur beschränkt einen Abtransport von Dentinspänen aus dem Wurzelkanallumen gewährt [36; 38; 39].

In einer Studie von GARCEZ *et al.* [38] wurden Wurzelkanalfüllungen aufgrund von persistierenden, symptomatischen apikalen Parodontitiden revidiert und mit der aPDT in Kombination mit konventioneller Wurzelkanalbehandlung aufbereitet und desinfiziert. Die Säuberung der Wurzelkanäle erfolgte unter Spülung mit 2,5%igem NaOCl und 3%igem H₂O₂. Zur Schmierschichtentfernung wurden 17%iges EDTA und phosphatgepufferte Salzlösung (PBS-Pufferlösung) verwendet. Vor dem Trocknen der Kanäle wurde ein letztes Mal mit steriler NaCl-Lösung gespült. Als Photosensibilisator wurde eine Lösung aus Polyethylenimin und Chlorin in die Wurzelkanäle eingebracht. Der Photosensitizer wirkte für 2 min im Wurzelkanal ein, bevor für 240 sec mit einem 40 mW - Diodenlaser belichtet wurde. Mit sterilen Papierspitzen wurden Proben vor der Aufbereitung, nach der Aufbereitung unter Spülung und nach der Belichtung mit der aPDT für mikrobiologische Untersuchungen entnommen. Diese ergaben, dass jeder Zahn vor der Behandlung mit mindestens einem Antibiotika-resistenten Keim infiziert war und dass nach der Aufbereitung vor Anwendung der aPDT die Infektion zwar deutlich reduziert werden konnte, aber immer noch Bakterien in den Kanälen nachzuweisen waren. Ein Antibiogramm ergab, dass es sich bei der resistenten Mikroflora u.a. um *Enterococcus spp.*, *Prevotella spp.*, *Actinomyces spp.*, *Streptococcus spp.*, *Porphyromonas spp.* und *Enterobacter spp.* handelte, die auf mehrere verschiedene Breitband-Antibiotika nicht ansprachen. Durch die Kombination der konventionellen

Wurzelkanalaufbereitung mit der antibakteriellen photodynamischen Therapie waren nach Angabe der Autoren jedoch alle Wurzelkanäle frei von Bakterien.

Bereits in früheren *in vivo* Untersuchungen von GARCEZ *et al.* [36; 39] konnte nachgewiesen werden, dass eine zusätzliche Anwendung der aPDT (unter denselben Bedingungen wie in der oben beschriebenen Studie) im Vergleich zur alleinigen konventionellen endodontischen Behandlung eine deutliche Herabsetzung der bakteriellen Kontamination bewirkt. Die Autoren beschrieben nach einer einwöchigen medikamentösen Einlage mit einem Calciumhydroxid-Präparat und einer Wiederholung des Desinfektionsvorgangs eine nochmalige Bakterienreduktion von 92% auf 97%. Sie vermuten, dass die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies im alkalischen Milieu begünstigt wird.

BONSOR *et al.* [14] führten ebenfalls eine *in vivo* Studie über die photodynamische Inaktivierung von Bakterien in Kombination mit NaOCl und Zitronensäure an Wurzelkanälen durch. Sie verwendeten als Photosensitizer Toloniumchlorid in der Konzentration 12,7 µg/ml, welcher nach einer Einwirkzeit von 60 sec mit einem 100 mW-Diodenlaser für 2 min belichtet wurde. Die Proben wurden in zwei Gruppen eingeteilt. In der ersten Gruppe wurde nach initialer Aufbereitung unter Spülung mit Zitronensäure die aPDT angewendet. Danach konnten mit Hilfe einer sterilen Handfeile Dentinspäne zur mikrobiologischen Diagnostik aus dem Kanallumen isoliert werden. Im Anschluss erfolgte die weitere Aufbereitung des Kanals unter Spülung mit 2,25%igem NaOCl und 20%iger Zitronensäure. Nach diesem Vorgang wurde erneut eine Probe aus dem Wurzelkanal entnommen und untersucht. In der zweiten Gruppe wurde im Vergleich zur ersten die Reihenfolge der Desinfektionsmethoden vertauscht. In der ersten Gruppe konnte nach der ersten Desinfektion mit Zitronensäure/aPDT nur noch in 2 von 23 Kanälen eine bakterielle Kontamination nachgewiesen werden, in der zweiten Gruppe waren nach Spülung mit Zitronensäure/NaOCl noch 4 von 23 Kanälen mit Bakterien besiedelt. Die Anwendung von NaOCl und Zitronensäure ergab also ein etwas schlechteres Ergebnis, als die Anwendung der aPDT mit Zitronensäure. Sie kamen zu dem Schluss, dass die aPDT in Kombination mit 20%iger Zitronensäure auch ohne NaOCl-Spülung die Wurzelkanäle adäquat desinfizieren kann. Nach der zweiten Desinfektion war in beiden Gruppen jedoch nur noch jeweils ein Wurzelkanal kontaminiert. In beiden Versuchsgruppen konnte durch die Kombination von NaOCl und der aPDT eine Bakterienreduktion von insgesamt 96% erreicht werden; die Reihenfolge der Anwendung war hierbei nicht von Bedeutung.

In einer ähnlichen Studie von BONSOR *et al.* [15], bei der Wurzelkanäle von Patienten auf die gleiche Weise behandelt wurden, wie in obigem Versuch die zweite Gruppe, konnte ebenfalls festgestellt werden, dass eine Desinfektion mit der aPDT im Anschluss an die Spülung mit NaOCl und Zitronensäure nochmals eine Bakterienreduktion im Wurzeldentin bewirken kann.

PINHEIRO *et al.* [80] wendeten die aPDT an zehn Milchmolaren von Kindern im Alter von 4 bis 7 Jahren an. Die Pulpen der Milchzähne waren alle nekrotisch. Die Zähne wurden trepaniert und die Wurzelkanäle unter Kofferdam manuell aufbereitet. Als Spüllösung kam 0,5%iges NaOCl zum Einsatz. Nach der Aufbereitung wurde der Photosensibilisator Toluidinblau mit Papierspitzen in die Kanäle eingebracht und dort für 3 min belassen, bevor für 40 sec mit einem 100 mW - Laser bei einer Wellenlänge von 660 nm belichtet wurde. Zur Probenentnahme, die jeweils vor der Aufbereitung, nach der Aufbereitung und nach Anwendung der aPDT erfolgte, wurden ebenfalls sterile Papierspitzen verwendet. Nach der Aufbereitung der Wurzelkanäle waren 82,59% der Bakterien eliminiert worden, die aPDT jedoch konnte eine weitere Bakterienreduktion um 15,78% erreichen. Die Wurzelkanäle waren letztendlich zu 98,37% frei von Mikroorganismen. Die endodontische Behandlung bei Kindern und die besondere Anatomie von Milchzähnen bereiten oftmals zusätzliche Schwierigkeiten. Die Autoren beschreiben die antimikrobielle photodynamische Therapie als eine atraumatische und kostengünstige Methode, die Desinfektion von Wurzelkanälen in der Kinderzahnheilkunde zu optimieren.

2.2.2. *in vitro* Studien zur aPDT in der Endodontie

BERGMANS *et al.* [11] testeten die Wirksamkeit der aPDT an drei unterschiedlichen endodontischen Leitkeimen, dem *Enterococcus faecalis*, dem *Streptococcus anginosus* und dem *Fusobacterium nucleatum*. Infiziert wurden bei diesem *in vitro* Modell extrahierte und autoklavierte humane Zähne mit je einem der genannten Mikroorganismen. Die Probenentnahme erfolgte mit Hilfe steriler Papierspitzen, nachdem die Kanalwände nach der Desinfektion nochmals mit einer Handfeile für 20 sec bearbeitet wurden. Untersucht wurden die Effektivität des Photosensitzers Toluidinblau mit einer Konzentration von 12,7 mg/ml nach einer Einwirkzeit von 60 sec und einer Belichtungszeit von 150 sec mit einem 100 mW - Diodenlaser bei einer Wellenlänge von 635 nm sowie die Auswirkungen des Farbstoffs und der Lichtquelle getrennt voneinander. Mit Farbstoff und Licht konnten 88,4% der *E. faecalis*-,

93,8% der *S. anginosus*- und 98,5% der *F. nucleatum*- Stämme abgetötet werden. Farbstoff oder Licht alleine hatten keinen Einfluss auf die Infektion der Proben. Eine ähnliche Untersuchung machten FIMPLE *et al.* [32]: Sie kultivierten einen Biofilm aus *Actinomyces israelii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* und *Prevotella intermedia* in Wurzelkanälen extrahierter, autoklavierter humaner Zähne. Die Präsenz des Biofilms wurde chemisch und rasterelektronenmikroskopisch nachgewiesen. Im Anschluss erfolgte die Behandlung mit der aPDT. Methylenblau in der Konzentration 25 µg/ml in Kombination mit Licht einer Wellenlänge von 665 nm und einer Leistung von 100 mW führte nach 5 min Belichtungszeit zu einer Reduktion von bis zu 80% der bakteriellen Besiedelung. Durch den Diodenlaser alleine konnte kein abtötender Effekt auf die Mikroorganismen erzielt werden, der Farbstoff alleine reduzierte die Kontamination um bis zu 34%. WILLIAMS *et al.* [108] untersuchten die Wirksamkeit der aPDT mit dem Farbstoff Methylenblau (Konzentration 10 µg/ml) bei einer Wellenlänge von 633 nm einerseits an Bakteriensuspensionen aus *Fusobacterium nucleatum* (gram-), *Peptostreptococcus micros* (gram+), *Prevotella intermedia* (gram-) und *Streptococcus intermedius* (gram+) und andererseits an künstlichen und humanen Wurzelkanälen, die mit *Streptococcus intermedius* infiziert wurden. Eine Reduktion der bakteriellen Infektion konnte in allen Fällen erzielt werden, bei den Bakteriensuspensionen gelang dies jedoch besser als bei den künstlichen Wurzelkanälen. Die schlechteste Wirkung zeigte die Desinfektion an den humanen Wurzelkanälen. Hier wurde eine Reduktion der Infektion um 2 log₁₀ Stufen erreicht, in der Bakteriensuspension waren es für den gleichen Mikroorganismus 6,7 log₁₀ Stufen. Die Autoren vermuten, dass Wurzeldentin den Mikroorganismen ein günstigeres Milieu zum Überleben bietet. Die gramnegativen Keime *F. nucleatum* und *P. intermedia* waren der aPDT gegenüber weniger empfindlich. In älteren Studien wurde bereits beobachtet, dass gramnegative Mikroorganismen im Vergleich zu grampositiven Bakterien resistenter gegen Singulettsauerstoff sind [23; 102]. MEIRE *et al.* [65] verwendeten in einer ihrer Studien ebenfalls eine Bakteriensuspension und extrahierte humane Zähne zur Testung von unterschiedlichen Lasersystemen im Vergleich zu 2,5%igem NaOCl. Als Testkeim wurde *E. faecalis* gewählt. Unter anderem kamen hochenergetische Laser-Systeme, wie etwa Nd:YAG- (1064 nm) und KTP-Laser (532 nm) zum Einsatz, deren antimikrobieller Effekt auf einer lokalen Hitzeentwicklung beruht. Zum anderen wurden auch niedrigenergetische Softlaser wie z.B. die aPDT (Licht mit einer Wellenlänge von 635 nm bei 100 mW in

Kombination mit dem Farbstoff Toluidinblau in der Konzentration 12,7 µg/ml) getestet. Die hochenergetischen Laser zeigten keinen Effekt auf die Bakteriensuspension; bei der Anwendung in den infizierten Wurzelkanälen konnte eine leichte, aber nicht signifikante Herabsetzung der bakteriellen Kontamination erzielt werden. Allerdings konnten ELDENIZ *et al.* [28] mit dieser Art von Lasern eine Desinfektion von bis zu 96% erzielen. Für die aPDT beobachteten MEIRE *et al.* folgendes: In der Suspension konnte eine Bakterienreduktion um $2,7 \log_{10}$ Stufen erzielt werden, im Zahnmodell waren es $1,42 \log_{10}$ Stufen. Sie gehen davon aus, dass sich im Wurzelkanal ein Biofilm aus *E. faecalis* organisiert hat, der sich hinsichtlich seiner Zellwandkomponenten, metabolischen Aktivität, Genexpression und der Fähigkeit, eine extrazelluläre Matrix bilden zu können, von der *E. faecalis* Kultur in der Suspension unterscheidet und sich dadurch bessere Überlebensbedingungen für den Mikroorganismus bieten [22; 43]. NaOCl lieferte das beste Desinfektionsergebnis: in der Suspension wurden 100% der Mikroorganismen eliminiert, im Zahnmodell wurde ihr Anfangsbestand nur um $2 \log_{10}$ Stufen reduziert. Zur Desinfektion des Wurzelkanals wurde aber nur ein sehr geringes Volumen der NaOCl-Lösung von 100 µl verwendet, was zu diesem unbefriedigenden Ergebnis geführt haben könnte. GARCEZ *et al.* [36; 38; 39; 40] konnten durch die Kombination von NaOCl mit der aPDT sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gute Desinfektionsergebnisse dokumentieren. Dies bestätigen die Ergebnisse von NG *et al.* [75], die durch die aPDT ebenfalls eine signifikante Verbesserung der Desinfektion nach chemomechanischer Wurzelkanalreinigung mit NaOCl und endodontischen Feilen erreichen konnten. Sie verwendeten in ihrer Studie den Photosensitizer Methylenblau in der Konzentration 50 µg/ml, der für 5 min mit einem 1 W-Laser bei 665 nm belichtet wurde. Über mögliche zytotoxische Effekte der aPDT auf Osteoblasten und gingivale Fibroblasten berichteten XU *et al.* [110]. Wie bei anderen endodontischen Spülösungen auch, besteht bei der Injektion des Farbstoffs in den Wurzelkanal die Gefahr, dass die Lösung über das Foramen apicale in das periapikale Gewebe eindringt. In Anlehnung an die Dosierungsvorgaben der aPDT in der Endodontie, wurden die Zellen Energiedosen von 10, 20 und 40 mW/cm² für 5 min und dem Farbstoff Methylenblau in einer Konzentration von 50 µg/ml ausgesetzt. Osteoblasten reagierten etwas empfindlicher auf die aPDT als Fibroblasten, was sich durch eine verminderte Mitochondrienaktivität um 34% und durch eine Herabsetzung der Zellproliferation um 38-59% bemerkbar machte. Gegenüber Fibroblasten konnten keine cytotoxischen Effekte aufgezeigt werden. Vergleichsweise wurde

der Test auch mit NaOCl durchgeführt, was zu einer verminderten Mitochondrienaktivität und Proliferation der Zellen um 97-100% führte. Diesbezüglich besitzt die aPDT eine größere therapeutische Breite als NaOCl. Ähnliche Ergebnisse haben GEORGE und KISHEN [42] in einer Untersuchung an Fibroblasten und *E. faecalis* beschrieben: *E. faecalis* wurde durch die aPDT schneller inaktiviert, als ein irreversibler Zellschaden an den Fibroblasten entstehen konnte. Im Vergleich zu NaOCl war auch hier die aPDT weniger zytotoxisch. ZEINA *et al.* [111] konnten keine relevante Zytotoxizität der aPDT auf Keratinozyten feststellen.

Die Mehrheit der Autoren empfiehlt die aPDT als ergänzende Maßnahme bei der endodontischen Behandlung [11; 32; 39; 59; 108]. Insbesondere NaOCl gilt nach wie vor als Goldstandard zur Desinfektion und Spülung von Wurzelkanälen. Um die antimikrobielle photodynamische Therapie als einzige Desinfektionsmethode bei der Wurzelbehandlung anzuwenden und eine suffiziente Keimfreiheit gewährleisten zu können, sind die bisher gemachten Erkenntnisse zu uneinheitlich. Um eine annähernd 100%ige Desinfektion von Wurzelkanälen erreichen zu können, bedarf es immer noch der Weiterentwicklung der antibakteriellen photodynamischen Therapie bzw. bis dahin der weiteren Anwendung von altbewährten Spülösungen [11; 38; 65; 75].

2.2.3. Einfluss des Photosensibilisators auf die Wirkung der aPDT

Es wäre möglich, dass die Effektivität der aPDT von unterschiedlichen Parametern des verwendeten Farbstoffs abhängig ist [56]. Eine Variable ist z.B. die Konzentration des Farbstoffs. Zur Desinfektion von Wurzelkanälen wird Methylenblau meist in Konzentrationen zwischen 6,25 µg/ml und 25 µg/ml verwendet [32; 34; 96], für Toluidinblau werden häufig Konzentrationen zwischen 10 µg/ml und 100 µg/ml angegeben [11; 15; 65; 108]. FOSCHI *et al.* [34] verwendeten zur photodynamischen Inaktivierung von Bakterien den Farbstoff Methylenblau in der Konzentration 6,25 µg/ml, um eine bakterizide Wirkung auf den *Enterococcus faecalis* zu testen. Die bakterielle Kontamination der Proben konnte um 77,5% reduziert werden. In einer früheren Untersuchung der Autoren [96] wurde der gleiche Farbstoff in der vierfachen Konzentration (25 µg/ml) eingesetzt: 97% der Mikroorganismen wurden eliminiert, also rund 20% mehr. Sie konnten auch feststellen, dass der Farbstoff in höherer Konzentration bereits ohne Belichtung Bakterien abgetötet hat. Allerdings konnten WILLIAMS *et al.* [108] bei Anwendung einer doppelten Farbstoffkonzentration von Toluidinblau keine Wirkungsverbesserung dokumentieren, hingegen aber bei einer

Verdoppelung der Lichtenergie. BERGMANS *et al.* [11] untersuchten den Einfluss des Photosensitzers Toluidinblau auf das Bakterienwachstum von *E. faecalis*, *S. anginosus* und *F. nucleatum*. Sie konnten keine bakterizide Wirkung feststellen. Eine Studie von FIMPLE *et al.* [32] bestätigt dieses Ergebnis nicht. Bei ihnen wurde ein antibakterieller Effekt des Farbstoffs auf unterschiedliche Testbakterien beobachtet. Eine einheitliche Aussage darüber, ob der Farbstoff alleine bakterizide Wirkungen besitzt, lässt sich bisher nicht machen, zumal in den verschiedenen Studien auch unterschiedliche Farbstoffe in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet wurden.

Ob zwischen den erhältlichen Farbstoffen Unterschiede in der Effektivität bei Belichtung bestehen, testeten SOUZA *et al.* [98]. Anhand eines *in vitro* Models mit extrahierten, einwurzeligen humanen Zähnen wurden die beiden gängigsten Sensitizer Toluidinblau und Methylenblau in Konzentrationen von jeweils 15 µg/ml miteinander verglichen. Die Zähne wurden vor der Anwendung der aPDT aufbereitet und entweder mit 2,5%igem NaOCl oder mit 0,85%igem NaCl gespült. Als Testbakterium verwendeten die Autoren *E. faecalis*. Wie in diversen anderen Studien konnte durch die aPDT eine Reduktion der Bakterienkolonien beobachtet werden, statistisch relevant war die Absenkung aber nur bei der Belichtung von Toluidinblau nach der Spülung mit NaCl. Zwischen den beiden Farbstoffen wurde in der Wirksamkeit kein signifikanter Unterschied festgestellt. Dies bestätigt sich in einer weiteren Studie von SOUZA *et al.* [99], bei der sie einen fungiziden Effekt der aPDT mit den Photosensitzern Methylenblau, Toluidinblau und Malachitgrün, jeweils in einer Konzentration von 0,1 mg/ml an dem Erreger *Candida albicans* testeten. Zwischen den unterschiedlichen Farbstoffen ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Die bakterielle Reduktion lag in einem Bereich zwischen 0,54 und 3,07 log₁₀ Stufen und war abhängig von der applizierten Energiedosis. GEORGE und KISHEN [41] untersuchten die Wirkung des Photosensibilisators Methylenblau in einer polaren und in einer unpolaren (Glycerol-Ethanol-Wasser) Lösung am Mikroorganismus *E. faecalis*. Die Autoren beschrieben anhand einer Grafik eine signifikant höhere log₁₀-Stufen Reduktion der Bakterienkolonien bei der unpolaren Lösung. Genaue Werte der log₁₀-Stufen Reduktion konnten dem Text nicht entnommen werden. Die Verfasser der Studie vermuten, dass durch Glycerol und Ethanol die bakterielle Membran durchlässiger gemacht oder sogar geschädigt wird, sodass der Sensitizer auch an intrazellulären Bestandteilen, wie z.B. der DNA binden und diese zerstören kann. Auch HAIDEKKER *et al.* [46] stellten fest, dass die photooxidativen

Eigenschaften von Photosensibilisatoren durch Polarität und Viskosität des Lösungsmittels beeinflusst werden können. GARCEZ *et al.* [37] fanden in ihrer Studie, dass die Anreicherung des Farbstoffs Methylenblau mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) die antibakterielle Wirkung der aPDT verstärkt. Dies zeigte sich für das grampositive Testbakterium *Staphylococcus aureus* genauso wie für den gramnegativen Testkeim *Escherichia coli* und den mykotischen Erreger *Candida albicans*.

2.3. Die photodynamische Therapie in anderen medizinischen Bereichen

Auch in anderen medizinischen Fachdisziplinen bietet die photodynamische Therapie ein breites Indikationsspektrum [56]. Die Eigenschaft einiger Photosensibilisatoren, sich selektiv in Tumorgewebe anzureichern, hat sich insbesondere in der Onkologie als nützlich erwiesen [56]. In der Dermatologie lassen sich mit der photodynamischen Therapie bei der Behandlung nicht-melanozytärer Hautveränderungen gute medizinische und auch ästhetisch zufriedenstellende Ergebnisse erzielen [57]. Häufig zur Anwendung kommt sie in Verbindung mit dem Photosensitizer 5-Aminolävulinsäure (5-ALA), einer Vorstufe des Protoporphyrins IX, bei der Therapie von präkanzerösen Läsionen der Haut wie z.B. der akтинischen Keratose oder Cheilitis, dem Morbus Bowen oder dem bereits invasiven, oberflächlich wachsenden Basalzellkarzinom [4; 9; 57]. Als nicht onkologische Indikationen für die PDT in der Dermatologie werden auch entzündliche Hauterkrankungen wie etwa Acne vulgaris, Lichen ruber, Impetigo contagiosa oder Psoriasis vulgaris beschrieben [9; 57; 61]. In den unterschiedlichsten Fachbereichen wird im Rahmen eines Tumorstagings oftmals die photodynamische Diagnostik zur Detektion maligner Neoplasien, wie z.B. von Blasenkrebs oder Gehirntumoren angewandt [70; 113]. Die Behandlung mit dem Laser ist sowohl als palliativer als auch kurativer Therapieansatz in der Krebsbekämpfung vertreten. Hierbei zeichnet sie sich gegenüber der konventionellen Chirurgie durch die Möglichkeit eines minimal-invasiven Vorgehens bei der Behandlung von flächig-wachsenden oder sich im Anfangsstadium befindlichen Tumoren aus [20; 50]. In der Augenheilkunde hat sich die photodynamische Therapie als ein mögliches Standardverfahren zur Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration etabliert. Neovaskularisationen und vasoproliferative Tumoren der Netzhaut, wie etwa Hämangiome, werden inaktiviert und somit das Eintreten von Flüssigkeit in die Netzhaut verhindert [7].

2.4. *Enterococcus faecalis*

2.4.1. Allgemeines zum Bakterium *Enterococcus faecalis*

Enterokokken sind grampositive, paarig oder als kurze Ketten angeordnete, kugelförmige Bakterien, die lange Zeit zu den Streptokokken der Serogruppe D gezählt wurden; nach dem neuesten Klassifikationsschema werden sie aber der Familie der Enterococcaceae zugerechnet [73]. Als die wichtigsten humanpathogenen Spezies gelten der häufig vorkommende *Enterococcus faecalis* und der etwas seltener *Enterococcus faecium* [73], die zur physiologischen Darmflora von Menschen und Tieren gehören [54; 71; 103]. Erstmals beschrieben wurde der Name „entérocoque“, der den intestinalen Ursprung dieser grampositiven Diplokokken hervorhebt, bereits im Jahre 1899 von Thiercelin in seinem Artikel „Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogène“. Der *E. faecalis* besitzt einen fakultativ anaeroben Stoffwechsel, aber keine Katalase-Aktivität und kann auch bei extremen, wechselnden Bedingungen überleben [54]; er ist hitzestabil bei bis zu 60 °C für 30 min und wachstumsfähig in 6,5%iger NaCl-Lösung oder bei einem pH von 9,6, wie SHERMAN bereits 1938 in seinem Review-Artikel „The Enterococci and related Streptococci“ erklärte [71; 89].

Im Rahmen nosokomialer Infektionen zählt der *E. faecalis* zu den drei häufigsten ursächlichen Keimen [6; 58; 71]. Endokarditis, Atemwegs- und Harnwegsinfekte sowie Infekte des zentralen Nervensystems sind die am häufigsten auftretenden Krankheitsfälle [103]. Insbesondere der vermehrte Einsatz von Antibiotika mit fehlender Wirksamkeit gegen Enterokokken, der sogenannten „Enterokokkenlücke“, begünstigt dieses Phänomen. Immunsupprimierte, schwer erkrankte oder neutropenische Patienten sind besonders empfänglich für eine Infektion mit opportunistischen Erregern [73]. Das stetige Aufkommen neuer multiresistenter Enterokokken-Stämme, wie z.B. Aminopenicillin-, Gentamicin- und Vancomycin-resistenter Enterokokken [103], stellt die Wissenschaft in der Entwicklung neuer, wirksamer antimikrobieller Strategien vor eine enorme Herausforderung und bereitet bei der Behandlung infizierter Patienten Schwierigkeiten [6; 54; 58].

In der Zahnheilkunde tritt der *Enterococcus faecalis* ebenfalls im Zusammenhang infektiöser Geschehen auf: Er wird vor allem in der Endodontie mit fehlgeschlagenen Wurzelbehandlungen und persistierenden Infektionen der Periapikalregion in Verbindung gebracht [1; 31; 54; 69; 112]. Problematisch ist seine Unempfindlichkeit gegenüber vielen, in

endodontischen Behandlungen gebräuchlichen, antibakteriellen Spülösungen und Medikamenten [24; 54; 81; 91]. Es ist keine Seltenheit, dass er auch in abgefüllten Wurzelkanälen noch nachgewiesen wird [24; 30; 31]. Gelegentlich kommt er in anaeroben Mischinfektionen akuter odontogener Abszesse vor [97], auch im Speichel und in Plaque wird der *E. faecalis* gefunden [3; 24; 112].

2.4.2. *in vivo* Studien zum *Enterococcus faecalis* in der Endodontie

ZHU *et al.* [112] stellten mittels der Polymerase Kettenreaktion (PCR) fest, dass die meisten revisionsbedürftigen, wurzelbehandelten Zähne mit bestehender Parodontitis apicalis mit dem *Enterococcus faecalis* besiedelt waren. Teilweise war der Keim auch im Speichel der Patienten nachzuweisen. Ähnliche Ergebnisse lieferte eine Studie von GOMES *et al.* [45], bei der ebenfalls Proben aus zuvor wurzelgefüllten Zähnen mit röntgenologischer apikaler Aufhellung isoliert und anhand PCR untersucht wurden: Bei der mikrobiologischen Auswertung wurde auch hier am häufigsten den *Enterococcus faecalis* in den Proben identifiziert, gefolgt von *Peptostreptococcus micros*. Bei den anderen Mikroorganismen handelte es sich u.a. um *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* und *Prevotella intermedia*. Auch DAHLEN *et al.* [24] wiesen in allen Fällen von 29 wurzelgefüllten Zähnen mit persistierender apikaler Parodontitis *Enterococcus spp.* mit der PCR nach, die zusätzlich einer Antibiotika-Resistenzbestimmung unterzogen wurden. Es handelte es sich in 26 Fällen um den *Enterococcus faecalis* und in drei Fällen um den *Enterococcus faecium*. Alle Keime konnten hierbei mit Vancomycin und Erythromycin erfolgreich behandelt werden, die meisten hielten auch dem Tetracyclin-HCl Präparat nicht stand. Eine Resistenz bestand hauptsächlich gegenüber Clindamycin und Metronidazol. Bei Ampicillin und Bencylpenicillin war die minimale Hemmkonzentration im Vergleich zu Streptokokken um das 10 - 100 fache erhöht. In einer Untersuchung von ROCAS *et al.* [83] wurde festgestellt, dass der *Enterococcus faecalis* bei Zähnen mit chronischer oder persistierender Infektion öfter nachgewiesen wurde, als bei Zähnen mit akuter Entzündung. Ein signifikanter Zusammenhang des *Enterococcus faecalis* bestehe vor allem mit fehlgeschlagenen Wurzelbehandlungen. Des Weiteren komme Selbiger häufiger bei asymptomatischer apikaler Parodontitis vor als bei symptomatischer. Eine Untersuchung von OZBEK *et al.* [78] bestätigt diese Ergebnisse: Auch hier besteht eine weitgehende Assoziation des Mikroorganismus mit fehlgeschlagenen Wurzelbehandlungen. In einer Studie von GOMES *et*

al. [44] wurden Proben aus bisher unbehandelten und aus revisionsbedürftigen Wurzelkanälen mit apikaler Parodontitis entnommen. Die mikrobiologische Diagnostik erfolgte einerseits mit Kulturen und andererseits mittels PCR. Dabei war der Nachweis des *E. faecalis* mittels PCR empfindlicher als der Kulturnachweis. Mit ihr konnte der Mikroorganismus weitaus sensitiver detektiert werden. Einen Hinweis darauf, wie stark ein Wurzelkanal mit dem Bakterium kontaminiert war, konnte sie jedoch nicht geben. Im Gegensatz zu der Untersuchung von ROCAS *et al.* [83], wurden durch die PCR in den erstmals wurzelbehandelten Zähnen genauso oft Enterokokken nachgewiesen, wie in den revidierten Wurzelkanälen. Die Kulturen hingegen zeigten des Öfteren kein Wachstum, wo die PCR einen DNA-Nachweis des *E. faecalis* lieferte. Hierbei muss allerdings bedacht werden, dass bei der PCR auch tote Bakterien angezeigt werden. Mit Hilfe des Kulturnachweises sind im Gegensatz dazu nur lebende Mikroorganismen zu detektieren.

2.4.3. *in vitro* Studien zum *Enterococcus faecalis* in der Endodontie

Aufgrund seines anspruchslosen, umweltresistenten Wachstums [54; 71; 89] und seiner großen Bedeutung im Hinblick auf fehlgeschlagene Wurzelbehandlungen [45; 112] wird der *Enterococcus faecalis* sehr häufig bei *in vitro* Untersuchungen benutzt, um die Wirksamkeit von Desinfektionsagentien zu testen. So wurde er auch von ABDULLAH *et al.* [1] in ihrer Studie eingesetzt: Anhand drei unterschiedlicher Kulturaufbereitungen des *Enterococcus faecalis* - nämlich einer Suspension, eines Biofilms, der auf einem Zellulose-Nitrat-Membranfilter herangezüchtet wurde, und eines Pellets - untersuchten sie die Wirksamkeit verschiedener Desinfektionsagenzien, u.a. von Calciumhydroxid (pH=12,3), 0,2%igem CHX, 17%igem EDTA und 3%igem NaOCl, für unterschiedliche Einwirkzeiten. NaOCl war hierbei am effektivsten und tötete alle Mikroorganismen binnen 2 min irreversibel ab. CHX und Ca(OH)₂ konnten keine 100%ige Desinfektion gewährleisten, EDTA lieferte insgesamt die unzureichendsten Ergebnisse. Es wurde gezeigt, dass sich *in vitro* die Inaktivierung des *Enterococcus faecalis* in einem Biofilm schwieriger gestaltet als in einer Suspension, falls das Desinfektionsagens keine gewebeauflösenden Eigenschaften besitzt. EVANS *et al.* [30] stellten fest, dass der *Enterococcus faecalis* trotz der Anwendung von Ca(OH)₂ überleben kann, wenn der erreichte pH-Wert im Wurzeldentin $\leq 11,1$ ist. Bei höherem pH-Wert sinkt seine Überlebenswahrscheinlichkeit. Die Ergebnisse von ABDULLAH *et al.* [1] decken sich weitgehend mit denen von DUNAVANT *et al.* [27], die ebenfalls unterschiedliche Agenzien in

ihrer Wirksamkeit gegenüber einem *E. faecalis* Biofilm testeten: Auch sie fanden heraus, dass CHX in 2%iger Lösung weniger effektiv desinfiziert als NaOCl in 1%iger und 6%iger Lösung. Auch die relativ neu entwickelte Spülösung BioPure MTAD (Dentsply Tulsa Dental, Johnson City, TN, USA), die aus einer Mischung aus Zitronensäure, Doxycyclin und einem Detergenten besteht, konnte keine zufriedenstellenden Ergebnisse liefern: Nur 16% der Bakterien konnten irreversibel inaktiviert werden. 17%iges EDTA schnitt hinsichtlich der Desinfektion wieder insuffizient ab. Es eignet sich jedoch sehr gut zur Schmierschichtentfernung: Durch die Eröffnung der Dentintubuli wird für andere Desinfektionsagenzien ein Zugang zu den Mikroorganismen geschaffen [31]. NEWBERRY *et al.* [74] verwendeten MTAD als finale Spülösung von Wurzelkanälen extrahierter Zähne. Die Kanäle wurden zunächst aufbereitet und mit 1,3%igem NaOCl und 17%igem EDTA gespült. Anschließend wurden sie in 8 Gruppen unterteilt und mit je einem von 8 unterschiedlichen *E. faecalis* Stämmen infiziert. Es erfolgte eine letzte Spülung mit NaOCl, bevor MTAD für 5 min in die Kanäle gegeben wurde. Eine effektive Desinfektion durch die Kombination von NaOCl und MTAD wurde in 7 von 8 Gruppen erreicht. Lediglich bei dem *E. faecalis* Stamm ATCC 19433 konnte noch ein Wachstum nach der Behandlung beobachtet werden.

Um eine suffiziente Desinfektion des *Enterococcus faecalis* gewährleisten zu können, wird heutzutage von einigen Autoren empfohlen, mehrere Spülösungen in der Wurzelbehandlung zu verwenden, da oftmals eine einzige Desinfektionsmethode nicht wirksam gegen alle vorhandenen Arten an Mikroorganismen ist [74]. In diesem Zusammenhang hat sich vor allem die kombinierte Anwendung von NaOCl, EDTA, CHX und Ca(OH)₂ bewährt [86]. Um aseptische Bedingungen zu schaffen, ist das Anlegen eines Kofferdams unerlässlich [31].

2.5. *Bacillus subtilis*

Für den experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit wurden als Proben Zahnwurzeln frisch geschlachteter Rinder verwendet. In diesem Kapitel wird deshalb auf den aerob wachsenden Sporenbildner *Bacillus subtilis* eingegangen, da die Rinderzähne natürlicherweise, bedingt durch die Nahrung der Tiere, mit diesem Keim besiedelt waren.

Der *Bacillus subtilis*, auch gemeiner Heubazillus genannt, ist ein grampositives, stäbchenförmiges, begeißeltes Bakterium und gehört wie alle Bakterien der Gattung *Bacillus*

taxonomisch zu den Eubakterien (Bacteria). Er ist ein aerob wachsender Endosporenbildner, der ubiquitär verbreitet ist. So kann er in Wasser, Luft und Boden (besonders Komposterde) nachgewiesen werden und ist im Heuaufguss leicht anzureichern. Bedingt durch seinen natürlichen Lebensraum ist der Mikroorganismus wechselnden Umwelteinflüssen wie etwa Temperaturschwankungen und unbeständiger Luftfeuchtigkeit relativ ungeschützt ausgeliefert [12]. Er hat daher im Laufe der Evolution eine Reihe von Strategien entwickelt, die sein Überleben auch unter widrigsten Umständen sichern. So ist er zur Ausbildung von Sporen befähigt, die gegen Austrocknung, Bestrahlung und Hitze resistent sind [26; 90]. Daher kann mit gängigen Desinfektionsmethoden wie etwa hochprozentigem Ethanol keine vollständige Eliminierung dieses Mikroorganismus erreicht werden [29]. Auch klassische Sterilisationsverfahren wie z.B. die Dampfdrucksterilisation bei 121 °C bzw. 134 °C sind nicht in der Lage, die Sporen zu inaktivieren [68]. Wegen dieser Eigenschaft wird *B. subtilis* heute als Indikator bei der Testung von Sterilisationsprozessen und Desinfektionsmethoden in Pharmazie, Medizin und Lebensmittelindustrie verwendet [2; 84; 90].

Des Weiteren findet das Bakterium als Pharmakon in der Humanmedizin Anwendung. So sind Medikamente wie etwa Utilin®, Utilin N®, Bactisubtil® u.a. zur Behandlung von chronischen Dermatosen bzw. von Durchfall, Enteritis, Enterocolitis oder von intestinalen Störungen chemo- oder strahlentherapierter Krebspatienten in der Roten Liste sowie in zahlreichen Studien beschrieben [12; 55; 94; 95]. Seine antimikrobielle Wirkung gegen einige Fäulnisreger, darunter auch *Candida albicans*, wird medikamentös genutzt [100]. Auch in der Landwirtschaft dient das Bakterium als natürliches Fungizid beim Anbau von Baumwolle, Gemüse, Erdnüssen und Sojabohnen [12].

Für molekularbiologische und genetische Untersuchungen ist der Mikroorganismus von besonderem Interesse auf Grund seiner phylogenetischen Nähe zu Pathogenen wie Staphylokokken, Listerien, Mykobakterien und Mykoplasmen sowie wegen der beschriebenen Endosporenbildung. Er ist daher eines der am besten erforschten gram-positiven Bakterien überhaupt [12; 26]. Ferner spielt *Bacillus subtilis* wegen seiner Fähigkeit, extrazelluläre Enzyme zu sezernieren, bei der industriellen Herstellung von Waschmittelenzymen sowie bei der Synthese von Riboflavin (Vitamin B 12) eine Rolle [12].

3. Fragestellung

Die Zielsetzung dieser Arbeit liegt darin, ein bereits bestehendes *in vitro* Modell zur Testung endodontischer Desinfektionsmethoden anhand artifiziell infizierter, boviner Wurzelkanäle weiterzuentwickeln. In Anlehnung an die im Literaturverzeichnis beschriebenen Punkte sollen in dieser Arbeit folgende Aufgaben abgehandelt werden:

1. Es soll ein vollständig autoklavierbarer Bohrständer entwickelt, angefertigt und verwendet werden, der Präzisionsbohrungen ins Dentin im Mikrometerbereich erlaubt.
2. Durch Modifizierungen des Bohrvorgangs soll versucht werden, ein Tiefenprofil der mit Mikroorganismen besiedelten Dentintubuli darzustellen. Es soll untersucht werden, wie weit die Bakterien in die Dentinkanälchen vordringen konnten und ob es mit der Desinfektionsmethode gelang, auch Mikroorganismen in tieferen Dentinschichten irreversibel zu eliminieren.
3. Die antibakterielle Wirkung der photodynamischen Therapie soll für unterschiedliche Belichtungszeiten mit dem Diodenlaser anhand dieses verbesserten Modells untersucht werden, wobei die Behandlung mit und ohne Photosensitizer durchgeführt wird. Für die Testung soll ein am Markt erhältliches und für die klinische Anwendung zugelassenes Gerät verwendet werden.

4. Material und Methode

4.1. Eingesetzter Mikroorganismus

Die für den Test benötigten Bakterien wurden vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Universität Regensburg bezogen. Für die Versuche wurde verwendet:

Enterococcus faecalis GC ATCC 29212

4.2. Testgerät

Als Belichtungsquelle wurde das Lasersystem PACT¹ mit entsprechendem Zubehör verwendet (Abb. 4). Als Photosensitizer wurde steriles Toluidinblau² (Toloniumchlorid) eingesetzt. Das Absorptionsmaximum des Photosensibilisators liegt im Bereich von 635 nm, der Diodenlaser belichtet mit einer Leistung von 100 mW. Die Konzentration des Photosensitzers war aus den allgemein erhältlichen Produktbeschreibungen nicht ersichtlich. Auf direkte Anfrage beim Hersteller konnte sie ebenfalls nicht eruiert werden. Die Lagerung des Farbstofffluids erfolgte kühl, trocken und lichtgeschützt in 1 ml Dosierspritzen, wobei eine Portion jeweils nur für eine Versuchsgruppe von fünf Rinderzähnen verwendet wurde, um eine Kontamination des Farbstoffs mit dem *E. faecalis* zu vermeiden. Die PACT Light Guide Endo Ansätze³ wurden ebenso nach jedem Versuchsdurchlauf verworfen.

¹ PACT, cumdente (Tübingen)

² cumdente (Tübingen)

³ cumdente (Tübingen)



Abbildung 4: Das verwendete Diodenlaser-Handstück mit zugehörigem Endo-Aufsatz und einer Farbstoff-Dosierspritze

4.3. Nährmedien

Zur Herstellung einer für Enterokokken geeigneten Nährbouillon wurden eine Einwaage von 30 g Trypticase-Soy-Broth⁴ und 3 g Hefeextrakt⁵ in 1 l 18 Ω - Millipore Wasser aus dem Millipore-Gerät⁶ gelöst. Die Flüssigkeit wurde anschließend für 20 min bei 121 °C und einem Druck von 3 bar im Autoklaven⁷ dampfsterilisiert.

Zur Koloniezahlbestimmung am Versuchsende wurden die Proben auf 94 mm Kanamycin-Äsculin-Azid-Selektivnährböden (= Enterokokken-Platten) ausgestrichen, welche vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Universität Regensburg hergestellt wurden. Die Platten wurden bis zu ihrer Verwendung im Kühlschrank⁸ bei 7,5 °C aufbewahrt. Die Lagerdauer hat einen Zeitraum von 3 Wochen nie überschritten.

⁴ Becton & Dickinson (Sparks, USA)

⁵ Bacto Yeast Extract, Becton & Dickinson (Sparks, USA)

⁶ MilliQUFplus, Millipore (Molsheim, Frankreich)

⁷ Fedegari Autoclavi (Albuzzano, Italien)

⁸ FKS 5002, Liebherr (Bulle, Schweiz)

4.4. Inkubation der *Enterococcus faecalis* Arbeitskultur

Die Temperatur für die Inkubation der *E. faecalis* Arbeitskultur lag bei 37 °C, die CO₂-Konzentration, der Luftdruck und die Luftfeuchtigkeit in der Inkubationskammer⁹ wurden durch die Umgebungsatmosphäre bestimmt. Bei geschlossenem Inkubator herrschte in der Inkubationskammer Dunkelheit.

4.5. Sicherheitsvorkehrungen

Die Durchführung der Versuche erfolgte unter sterilen Laborbedingungen unter einer sterilen Werkbank¹⁰. Lediglich das Spalten der Zahnstücke und das Ausplattieren der Bohrspansuspensionen auf den Nährböden erfolgten aus technischen Gründen außerhalb der Werkbank. Der Arbeitstisch wurde dafür vor und nach den Arbeiten gründlich gereinigt und desinfiziert. Zur Desinfektion von nicht sterilisierbaren Arbeitsgeräten und -flächen wurde Ethanol in einer 70%igen Lösung verwendet. Diese wurde im Labor durch Verdünnung von Ethanol absolut¹¹ mit voll entsalzenem Wasser aus dem Laborwasserhahn selbst hergestellt. Bei allen Laborarbeiten wurden von der Doktorandin Schutzbrille, Schutzkittel, sterile Handschuhe¹² und Mundschutz¹³ getragen. Zur Händedesinfektion vor, während und nach den verschiedenen Arbeiten wurde Sterillium¹⁴ verwendet.

4.6. Herstellung einer Gefrierkultur

Zur Herstellung einer frischen *E. faecalis*¹⁵ Gefrierkultur wurde ein *E. faecalis* Gefriercryo aufgetaut, das in einem Gefrierschrank¹⁶ bei -80 °C vorrätig gelagert war. Je 400 µl der Suspension wurden zu zwei 40 ml Portionen steriles Nährmedium gegeben, welches zuvor in 50 ml Falcon-Röhrchen¹⁷ pipettiert worden war. Anschließend wurden die Lösungen für

⁹ B5060, Heraeus (Hanau)

¹⁰ HF 48, GelaireFlow Laboratories (Opera, Italien)

¹¹ Chemikalienausgabe, Universität Regensburg

¹² Sempermed, Semperit Technische Produkte (Wien, Österreich)

¹³ Sentinex Lite El, Lohmann & Rauscher (Neuwied)

¹⁴ Sterillium, Bode Chemie (Hamburg)

¹⁵ Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Universität Regensburg

¹⁶ Forma -86 Freezer, Thermo Electron Corp. (Marietta, USA)

¹⁷ Cellstar Greiner bio-one (Poitiers, Frankreich)

24 h bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Falcons in der Zentrifuge¹⁸ für 7 min bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert, der flüssige Überstand konnte verworfen werden. Zu den am Boden des Röhrchens verbliebenen Pellets kamen je 5 ml frisches, steriles Nährmedium und mit dem Vortex¹⁹ wurden diese wieder in Lösung gebracht. Dazu wurden nun 5 ml 87%iges Glycerin²⁰ steril pipettiert und die Lösung mit dem Vortex erneut aufgeschüttelt. Unter der sterilen Werkbank wurden je 250 µl der Suspension in Gefrier-Cryos²¹ pipettiert, die dann gut verschlossen bei -80 °C bis zu ihrer Verwendung gelagert wurden. Am darauffolgenden Tag wurden je 100 µl einer wieder aufgetauten Probe der neu hergestellten Kulturen auf einer selektiven Enterokokken-Platte sowie auf einer universellen Caso-Platte²² ausgestrichen und für 24 h im Inkubator bebrütet. Dies diente dazu, um einerseits das Wachstum der neuen *E. faecalis* Kulturen auf den im Versuch verwendeten Platten zu überprüfen und um andererseits eine Fremdkontamination mit anderen Organismen ausschließen zu können.

4.7. Vorbereitung einer Arbeitskultur

Um eine Arbeitskultur vorzubereiten, wurde ein bei -80 °C gelagertes *E. faecalis* Gefriercryo aufgetaut. 100 µl wurden daraus entnommen und in einen mit Glasperlen gefüllten Erlenmayer-Kolben²³ gegeben, der bereits 25 ml steriles Trypticase-Soy-Broth Medium enthielt. Dieser Kolben wurde bei 37 °C für 24 h inkubiert. Vor der Verwendung der Suspension erfolgte das Vermessen bei 600 nm Wellenlänge gegen ein steriles Medium. Dazu wurden jeweils 1 ml der beiden Flüssigkeiten in Küvetten²⁴ gegeben und diese mit Parafilm²⁵ verschlossen, um ein Auslaufen der Küvetten beim Messvorgang zu verhindern. Wurde für einen Arbeitstag eine Bakteriensuspension benötigt, ist diese stets am Vortag frisch vorbereitet worden.

¹⁸ Universal 320, Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)

¹⁹ REAX2000, Heidolph (Schwabach)

²⁰ Artikelnummer 1.04094, Merck (Darmstadt)

²¹ Cellstar Greiner bio-one (Poitiers, Frankreich)

²² Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Universität Regensburg

²³ Schott (Mainz)

²⁴ 1,5 halbmikro Küvetten, Brand (Wertheim)

²⁵ Pechiney (Düsseldorf)

4.8. Herstellung der Wurzelstücke

Für die durchgeführten Versuche wurden zahlreiche Wurzelstücke von Rinderzähnen mit 4 mm und 6 mm Dicke benötigt. Deren technische Herstellung wird im Folgenden beschrieben.

4.8.1. Gewinnung der Rinderzähne

Die Grundlage bildeten Rinderzähne, die aus den Unterkiefern frisch geschlachteter Rinder extrahiert wurden. Das Alter der Rinder lag zwischen 1,5 und 4,5 Jahren. Es wurden lediglich voll entwickelte, bleibende Frontzähne verwendet. Diese wurden unmittelbar nach der Extraktion zur Konservierung in 250 ml Schott-Gläser²⁶ gegeben, die 0,5%ige Chloramin T Lösung²⁷ enthielten, und vom Schlachthof²⁸ ins Labor gebracht.

4.8.2. Aufbereitung der Rinderzähne

Im Labor wurden die Zähne in frische 0,5%ige Chloramin T Lösung und in neue Gläser überführt. Mit einem Skalpell²⁹ wurden Reste des parodontalen Gewebes entfernt und die Rinderinzisivi erneut in frische Chloramin T Lösung und neue Gläser gegeben. Nach einer einwöchigen Lagerung bei 7,5 °C im Kühlschrank wurden die Zähne schließlich in voll entsalzenes Wasser überführt. Die Zähne wurden bis zu ihrer Verwendung gekühlt aufbewahrt, die Flüssigkeit wurde wöchentlich gewechselt.

Bevor mit einem Innenloch-Sägemikrotom³⁰ (Abb. 5) einzelne Wurzelstücke aus einem Zahn geschnitten werden konnten, mussten zunächst zwei Drittel der Zahnrone mit Handstück³¹ und Trennscheibe³² abgetrennt werden. Anschließend wurde der Zahn mit PalaDur Autopolymerisat³³ auf einem zum Mikrotom gehörenden Objektträger fixiert, wobei die Wurzelspitze senkrecht nach oben stand und nur der Rest der verbliebenen Zahnrone im Kunststoff steckte (Abb. 6). Damit die Zähne aufgrund der Wärmeentwicklung beim

²⁶ Schott (Mainz)

²⁷ Artikelnummer 1.02426, Merck (Darmstadt)

²⁸ Schlachthof Vion (Furth im Wald)

²⁹ Feather Safety Razor Co. (Osaka, Japan)

³⁰ 1600 Leitz (Wetzlar)

³¹ Mikromotor: K9, KAVO, Handstück: 10A, KAVO (Biberach/Riß)

³² Nr. 196 090, Komet (Lemgo)

³³ Heraeus Kulzer (Hanau)

Abbinden des Kunststoffs keinen Schaden erlitten, wurden sie, nachdem der Kunststoff formstabil war, bis zu dessen vollständiger Aushärtung in kaltes Wasser aus dem Wasserhahn gelegt.



Abbildung 5: Das Sägemikrotom zum Schneiden der Zahnstücke

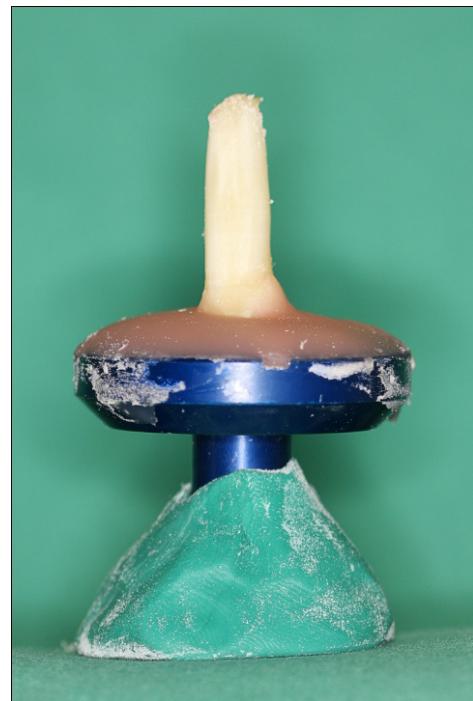


Abbildung 6: Mit Kunststoff gesockelter Rinderzahn

Nach Anbringen eines gesockelten Zahnes in die Innenlochsäge wurde mit dem Schneiden der Zähne begonnen (vgl. Zahnschema Abb. 7). Zunächst wurde die Wurzel spitze unter ständiger Wasserkühlung abgetrennt, sodass die Pulpa mit einer Exstirpationsnadel³⁴ (ISO-Größe 35) aus dem eröffneten Wurzelkanal entfernt werden konnte. Dieses ca. 1-2 mm dicke Zahnstückchen wurde verworfen.

Anschließend wurde das nächste Stück mit einer Dicke von 4 mm abgetrennt. Dieses apikale Stückchen diente als Sterilkontrolle und wurde ebenfalls unter ständiger Wasserkühlung vom Rest der Wurzel getrennt. Die Außenfläche des Stückes war mit Bleistift mit seiner entsprechenden Zahnnnummer und dem Buchstaben a versehen worden, bevor es in ca. 60 ml frisch hergestelltes, noch nicht autoklaviertes Medium gegeben wurde. Dieses befand sich in einer 100 ml Schottflasche³⁵, welche ebenfalls mit der Zahnnnummer beschriftet war,

³⁴ ISO-Größe 35, VDW-Dental GmbH (München)

³⁵ Schott (Mainz)

um die einzelnen Stücke stets identifizieren zu können. Ebenso wurde mit den nächsten beiden, 6 mm dicken Zahnstückchen b und c verfahren, welche später als Infektionskontrolle bzw. Desinfektionsprüfkörper verwendet werden sollten. Der mediane Anteil b diente dabei stets als Infektionsstück, der koronale Anteil c als Desinfektionsstück. So befanden sich in jedem Gläschen schließlich drei Zahnstücke (Abb. 8), jeweils einem Rinderzahn entstammend, die anschließend bei 121 °C und einem Druck von 1,96 bar für 20 min autoklaviert wurden. Die auf Raumtemperatur abgekühlten, sterilen Flaschen wurden bis zum Versuchsstart im Kühlschrank bei 7,5 °C aufbewahrt. Die Dauer dieser Zwischenlagerung hat zwei Tage nie überschritten. Pro Versuchsdurchlauf wurden jeweils fünf Zähne auf diese Weise vorbereitet.

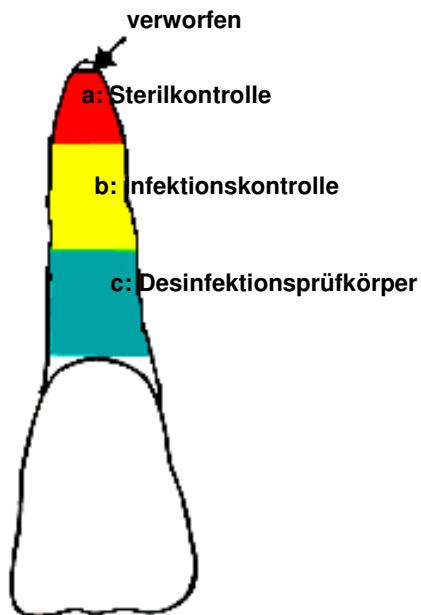


Abbildung 7: Zahnschema zum Schneiden der Stücke a, b und c



Abbildung 8: Die drei Zahnstücke des Zahnes 767 nach der Autoklavierung in sterilem Medium

4.9. Versuchsablauf

Alle nun beschriebenen Schritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt, um eine Kontamination der sterilen Wurzelstücke mit Umgebungskeimen zu verhindern. Jeder in die sterile Werkbank eingebrachte Gegenstand wurde vorher gründlich mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Lediglich das Spalten der Zahnstücke und das Ausplattieren der Bohrspansuspension fanden aus technischen Gründen auf dem Labortisch statt. Einen schematischen Überblick über den Versuchsablauf verschafft Tabelle 1.

Versuchstag	Zeitansatz	Arbeitsschritte
1	0 h	Kleben der Zahnstücke; a mit Medium, b und c mit Bakteriensuspension gefüllt; Inkubation
2	Nach 24 h	Mediumwechsel bei a, Wechsel der Bakteriensuspension bei b und c
3	Nach 48 h	Keine Veränderungen (Ruhetag)
4	Nach 72 h	Mediumwechsel bei a, Austausch der Bakteriensuspension gegen Medium bei b und c
5	Nach 96 h	Keine Veränderungen (Ruhetag)
6	Nach 120 h	Mediumwechsel bei a, b und c
7	Nach 144 h	a und b aus den Petrischalen gelöst; c desinfiziert und aus der Petrischale gelöst; Spalten der Zahnstücke; Probenentnahme in 0,5 mm, 1,0 mm und 1,5 mm Tiefe; Aufbewahrung der Bohrspäne in Medium; Ausplattieren von 100 µl Bohrspansuspension auf Enterokokken-Platten
8	Nach 168 h	Auszählen der Kolonien

Tabelle 1: Zeitschema

4.9.1. Versuchstag 1

Zunächst wurden alle Zahnstücke in Petrischalen³⁶ geklebt, wobei die Sterilkontrollen a jeweils eine separate Schale erhielten, um eine Kontamination durch die Infektionskontrolle b und den Desinfektionsprüfkörper c zu vermeiden. Zahnstück b und c wurden nebeneinander in einem Abstand von ca. 4 cm in einer weiteren Petrischale befestigt. Die Zahnstückchen wurden mit einer sterilen Pinzette aus der Schottfasche entnommen und vor dem Kleben behutsam mit einem sterilen Zellstofftuch³⁷ abgetupft, um eine trockene Oberfläche für den Befestigungszement zu schaffen. Es wurde der dualhärtende Composite-Befestigungszement RelyX Unicem³⁸ verwendet, welcher vor Applikation aktiviert und für 15 sec im Kapselmischgerät³⁹ gerüttelt wurde. Das Material wurde direkt von der Aplicap-

³⁶ Größe 94/16, Cellstar greiner bio-one (Frickenhausen)

³⁷ Novotex (Krefeld)

³⁸ 3M ESPE (Neuss)

³⁹ Silamat S3, Vivadent (Schaan, Fürstentum Liechtenstein)

Kapsel auf die Ränder der Unterseite des Zahnstückes gegeben, sodass das Kanallumen beim Andrücken des Wurzelstückchens in die Petrischale frei von Material blieb und gleichzeitig das Kanallumen von außen gegen andere Flüssigkeiten abgedichtet war. Es erfolgte die Polymerisation von unten und von oben für jeweils 40 sec mit einer Polymerisationslampe⁴⁰. Die Proben wurden anschließend für 10 min bis zur vollständigen Aushärtung des Composites stehen gelassen.

Zur Schaffung eines feuchten Milieus in der Petrischale wurde eine Schicht aus zwei autoklavierten Zellstofftüchern, in Form und Größe der Schale, hineingelegt. An der Stelle, an der das Zahnstück in der Schale klebte, wurde aus den Tüchern ein Loch geschnitten, sodass das Zahnstück von den Tüchern nicht berührt wurde. Die angepassten Zellstofftücher wurden mit 5 ml sterilem 18 Ω - Millipore Wasser befeuchtet. Die Wurzelkanäle der Proben wurden mit unterschiedlichen Flüssigkeiten gefüllt und sodann mit einem runden Deckgläschen⁴¹ abgedeckt (Abb. 9).

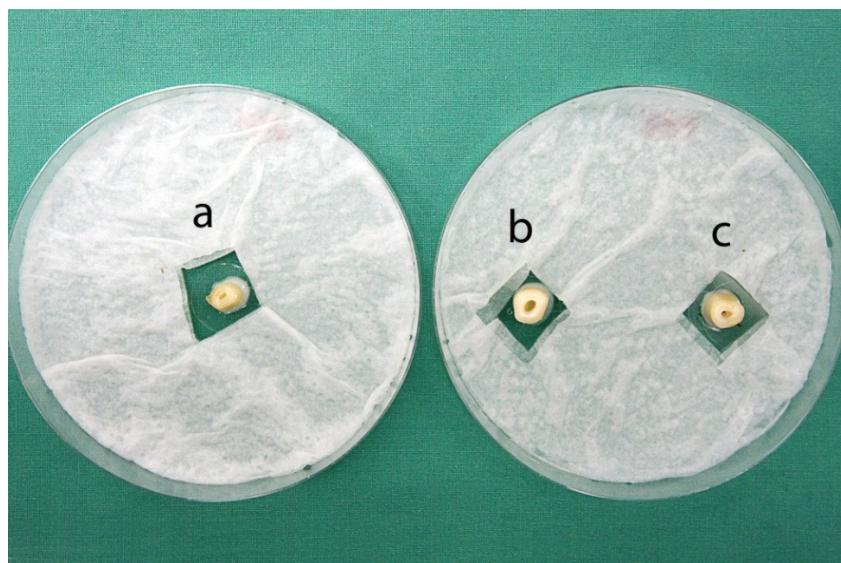


Abbildung 9: Drei Zahnstücke eines Rinderzahnes in Petrischalen geklebt: Sterilkontrolle a (linke Petrischale), Infektions- b (rechte Petrischale, linkes Stück) und Desinfektionsprüfkörper c (rechte Petrischale, rechtes Stück)

Hierbei befand sich nun im Lumen aller Sterilkontrollen a ausschließlich steriles Medium, in den Infektionskontrollen b und Desinfektionsprüfkörpern c die am Vortag vorbereitete *E. faecalis* Bakteriensuspension. Diese wurde vor Gebrauch bei 600 nm Wellenlänge mit

⁴⁰ Optilux 400, Demetron (Danbury, USA)

⁴¹ 15x15 superior, Marienfeld (Königshofen)

sterilem Medium als Referenzwert in Einmalküvetten im Photometer⁴² optisch vermessen. Substanzen, deren Extinktion einen Wert von 1,100 unterschritten, wurden im Versuch nicht verwendet. Um eine Kontamination der Sterilkontrollen mit dem *E. faecalis* auszuschließen, wurden diese als erstes mit Medium befüllt und die Petrischalen wieder verschlossen, bevor die zu infizierenden Proben mit Bakteriensuspension beimpft wurden. Grundsätzlich wurden bei jedem Arbeitsschritt die Sterilkontrollen vor den Infektions- und Desinfektionsprüförpern behandelt. Die Petrischalen wurden stets einzeln und nacheinander bearbeitet, wobei für jeden Arbeitsvorgang neue Pipettenspitzen⁴³ und Stripetten⁴⁴ verwendet wurden. Um die Sterilität des Mediums zu gewährleisten, wurde dieses in kleinen Portionen gelagert und die Reste nach Gebrauch verworfen. Dieses Vorgehen gilt für den ganzen Versuch.

Alle fertig vorbereiteten Petrischalen wurden im Inkubator bei 37 °C bebrütet. Bei der Inkubation herrschten dieselben Bedingungen, bei denen die Arbeitskulturen für 24 h heranwuchsen. Eine solche musste am ersten Versuchstag, wie unter 4.7. beschrieben, nochmals für den folgenden Arbeitstag angelegt werden.

4.9.2. Versuchstag 2

Nach 24 - stündiger Inkubation der Proben, wurde zunächst bei den Sterilkontrollen a das Medium gewechselt. Dazu wurden die Deckgläschchen mit einer sterilen Pinzette von den Wurzelstücken abgenommen und verworfen. Der Inhalt der Kanallumina wurde abpipettiert, frisches steriles Medium in den Kanal gefüllt und das Zahnstück wieder mit einem neuen Deckgläschchen versehen. Anschließend wurden noch 4 ml steriles 18 Ω - Millipore Wasser auf die Zellstofftücher gegeben, um das feuchte Milieu in der Kammer zu erhalten und somit ein Austrocknen der Zahstückchen zu vermeiden. Waren die Petrischalen der Sterilkontrollen wieder verschlossen, erfolgte dieselbe Behandlung mit den infizierten Proben b und c. Hierbei wurde die Bakteriensuspension gegen die am Vortag angeimpfte Arbeitskultur ausgetauscht, welche vorher wiederum bei 600 nm optisch vermessen wurde. Es folgte analog zu den Sterilkontrollen die Zugabe von je 4 ml sterilem 18 Ω - Millipore Wasser.

⁴² Ultrospec 3300 pro, Amersham Biosciences (Little Chalfont, Großbritannien)

⁴³ Sarstedt (Nümbrecht)

⁴⁴ Cellstar greiner bio-one (Frickenhausen)

Schließlich wurden die Petrischalen für weitere 48 h unter den oben beschriebenen Bedingungen im Brutschrank inkubiert.

4.9.3. Versuchstag 3

An diesem Tag wurden keine Veränderungen an den Proben vorgenommen.

4.9.4. Versuchstag 4

Nach 48 h wurde zunächst wie unter 4.9.2. beschrieben ein Mediumwechsel in den Sterilkontrollen a durchgeführt. Zum Erhalt der feuchten Kammer kamen dieses Mal je 3 ml steriles 18 Ω - Millipore Wasser auf die Zellstofftücher. Im Unterschied zu Versuchstag 2 wurden die Infektions- und Desinfektionsprüfkörper b und c nach dem Abpipettieren des Kanalinhalts nicht mehr mit einer frischen Bakteriensuspension beimpft, sondern wie die Sterilkontrollen a mit sterilem Medium, da nach drei Tagen davon ausgegangen werden konnte, dass genügend Bakterien in die Dentintubuli eines Zahnstückes eingedrungen waren und an der Kanalwand hafteten. Das Nährmedium im Kanallumen diente nun dazu, die sich im Wurzelstück befindlichen Bakterien zu erhalten und ihre Vermehrung zu begünstigen. Für weitere 48 h wurden die Proben im Inkubator aufbewahrt.

4.9.5. Versuchstag 5

An diesem Tag wurden keine Veränderungen an den Proben vorgenommen.

4.9.6. Versuchstag 6

Nach weiteren 48 h wurde in allen Zahnstücken ein Mediumwechsel durchgeführt und nochmals 2 ml steriles Wasser zur Befeuchtung der Kammer hinzugegeben. Für weitere 24 h wurden die Petrischalen inkubiert.

4.10. Versuchstag 7, Versuchsende

Am siebten Tag erfolgte schließlich die Probenentnahme aus den für sechs Tage bebrüteten Zahnstücken. Auch hier wurden die Sterilkontrollen vor den infizierten Kontrollstücken

bearbeitet, um eine Kontamination mit Keimen zu verhindern. Zunächst wurden zwei 24-Well-Platten⁴⁵ vorbereitet, indem jede Kammer mit 2 ml sterilem 0,9%igem NaCl gefüllt wurde. Durch das Lösen der entsprechenden Menge NaCl⁴⁶ in 18 Ω - Millipore Wasser und die anschließende Autoklavierung wurde die Lösung idealerweise am Vortag selbst hergestellt. Die Deckgläschchen auf den Sterilkontrollen wurden verworfen, der Kanalinhalt wurde abpipettiert und das Zahnstückchen mit einer sterilen Pinzette aus der Petrischale herausgelöst. Bis zum Spaltvorgang lagerten die entnommenen Stücke in je einer Kammer der mit 0,9%igem NaCl gefüllten 24-Well-Platte. Ebenso wurde mit den Infektionskontrollen b verfahren. Lediglich die Desinfektionsprüfkörper c verblieben noch bis zur Desinfektion in ihrer Schale.

4.10.1. Desinfektion

Die c-Stücke wurden je nach Versuch mit oder ohne Farbstoff für unterschiedliche Zeiten mit dem Diodenlaser belichtet. Einen Überblick über die Desinfektionsbedingungen verschafft Tabelle 2. Pro Untersuchungsgruppe wurden zehn Zähne untersucht. Die vom Hersteller empfohlene Belichtungszeit von 120 - 180 sec wurde im Versuch verdoppelt, da der Radius des Wurzelkanals eines bovinen Frontzahnes größer ist, als der eines humanen Frontzahnes. Die Leistung des Lasergerätes liegt im Bereich von 100 mW.

Farbstoff	Belichtungszeit
Ja	0 sec
	240 sec
	360 sec
Nein	240 sec
	360 sec

Tabelle 2: Desinfektionsschema

Bei den Versuchen mit Farbstoff wurde dieser zu Anfang aus den gelieferten 1 ml Spritzen (Abb. 10) in ein steriles Eppendorf-Cup⁴⁷ gegeben, um ihn von dort besser entnehmen zu

⁴⁵ Tissue Culture Cluster 4, Costar (Cambridge, USA)

⁴⁶ Artikelnummer 1.06406, Merck (Darmstadt)

⁴⁷ Eppendorf (Hamburg)

können. War das Deckgläschen vom Zahnstück entfernt und die Flüssigkeit im Kanal verworfen, wurde der Farbstoff mit einer Pipette in das Zahnstück hineingegeben und dort für die empfohlene Einwirkzeit von 60 sec ohne Belichtung belassen. In der Zwischenzeit wurde die Spitze des PACT Light Guide Endo Ansatzes um ca. 7 mm gekürzt, um ein dickeres Endstück zu erhalten, das dem Wurzelkanaldurchmesser eines Rinderfrontzahnes besser angepasst war. Anschließend erfolgte nun für unterschiedliche Zeiten die Belichtung des Wurzelkanals mit dem Laser. Das Laserhandstück wurde dabei von Hand gehalten und die Zeit mit einer Stoppuhr abgemessen (Abb. 11). Nach der Desinfektion wurde der Farbstoff aus dem Kanallumen abpipettiert, das Zahnstück nun ebenfalls mit einer sterilen Pinzette aus der Petrischale gelöst und in eine Kammer der mit 0,9% NaCl befüllten 24-Well-Platte überführt. So wurde nacheinander mit den fünf zu desinfizierenden Wurzelstücken vorgegangen.

Wurde ein Versuch ohne Farbstoff durchgeführt, konnte sofort nach der Entfernung des Mediums aus dem Kanal mit der Laserbelichtung begonnen werden. Wurde lediglich der Farbstoff ohne Laser getestet, wirkte dieser für die vom Hersteller empfohlene Zeit von 60 sec im Wurzelkanal ein und wurde, ohne belichtet worden zu sein, wieder abpipettiert.



Abbildung 10: Das steril verpackte Farbstofffluid vor der Verwendung

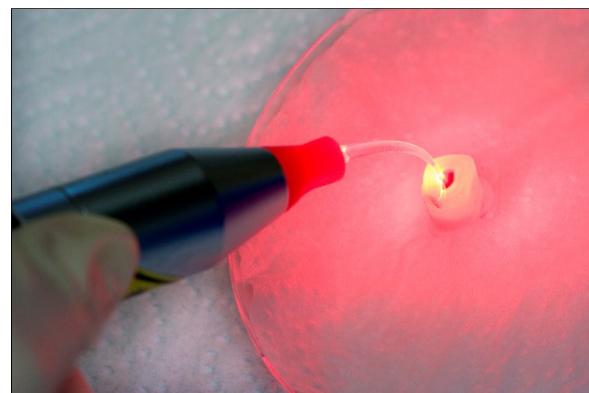


Abbildung 11: Der Belichtungsvorgang mit dem Laserhandstück; im Wurzelkanallumen befindet sich der Photosensitizer

4.10.2. Herstellung der Zahnstückhälften

Nachdem alle c-Stücke desinfiziert worden sind, erfolgte nun das Spalten der Zahnstücke, um Proben von der Wurzelkanaloberfläche ausgehend entnehmen zu können. Der Spaltvorgang erfolgte aus technischen Gründen außerhalb der Sterilbank. Zunächst wurde

die Arbeitsfläche mit 70%igem Ethanol gründlich desinfiziert und mit autoklavierten Zellstofftüchern ausgelegt. Es wurde ein Zahnstück mit dem Kanallumen nach oben zeigend auf das Tuch gelegt, an seiner Mitte mit einem sterilen, nicht zu stumpfen Wachsmesser⁴⁸ fixiert und mit einem weiteren autoklavierten Tuch bedeckt. Das obere Tuch diente hierbei als Schutz, damit die entstandenen Zahnteile beim Spalten nicht wegsprangen. Mit einem desinfizierten Hammer wurde das Zahnstück in zwei Hälften getrennt (vgl. auch Abb. 13 auf S. 37). Diese kamen unmittelbar nach dem Spalten in frische, sterile 0,9%iger NaCl-Lösung in der zweiten vorbereiteten Well-Platte, in der sie bis zum Bohrvorgang verblieben. Um eine Kontamination von einem Zahnstück auf ein anderes zu vermeiden, wurden wiederum als erstes die Sterilkontrollen, nachfolgend die Desinfektionsprüfkörper und zuletzt die Infektionskontrollen behandelt; es kamen stets frische Tücher zum Einsatz und die Instrumente wurden nach jedem Spaltvorgang desinfiziert bzw. mit dem Bunsenbrenner abgeflammt.

4.10.3. Probengewinnung

Die Proben aus den Zahntückenhälften wurden mit Hilfe von sterilen Rosenbohrern⁴⁹ (Durchmesser: 0,8 mm) gewonnen. Dazu wurde ein inklusive Zubehör vollständig autoklavierbaren Bohrständen⁵⁰ verwendet, der es ermöglichte, Präzisionsbohrungen in 10 µm Genauigkeit durchzuführen (Abb. 12). Dieser war kompatibel mit dem zahnärztlichen Handstück und dessen Motor⁵¹.

⁴⁸ Artikel-Nr.: 9001650, Henry Schein Dental Depot (Langen)

⁴⁹ 0,8mm Rosenbohrer, Komet (Lemgo)

⁵⁰ Mechanikwerkstatt Physik der Universität Regensburg

⁵¹ Siehe auch 4.8.2: Aufbereitung der Zahntücke



Abbildung 12: Der selbst entwickelte, vollständig autoklavierbare Bohrständer

Die Zahnhälften wurden jeweils, mit der Wurzelaußenwand nach unten zeigend, am Boden einer kleinen, sterilen Petrischale⁵² mit Heißkleber⁵³ befestigt, damit diese beim Bohren an derselben Stelle blieben (Abb. 13). Dazu mussten die Zahnstücke vor dem Kleben mit einem sterilen Zellstofftuch abgetupft und getrocknet werden. Wichtig war, dass die Zahnstücke erst unmittelbar vor der Bohrung aus der Well-Platte entnommen und auf ihren Trägern fixiert wurden, da sonst die Gefahr der Austrocknung bestand.

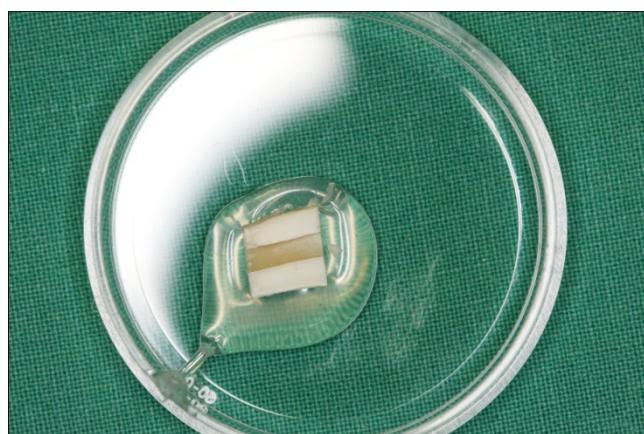


Abbildung 13: Eine mit Heißkleber in der Petrischale befestigte Zahnstückshälfte kurz vor dem Bohrvorgang

⁵² Größe 60/15, Cellstar Greiner bio-one (Poitiers, Frankreich)

⁵³ HKP220, Proxxon (Niersbach)

Die im Schälchen befestigten Zahnstückhälften wurden vor dem Bohren noch einmal abgespült, um einen Überschuss an Bakterien, der sich an der Wurzelkanaloberfläche befand, zu entfernen. Das Abspülen erfolgte mit 5 - 10 ml sterilem 0,9%igem NaCl, das mit einer 10 ml Spritze⁵⁴ und stumpfem Kanülenaufsatz⁵⁵ einem sterilen Becherglas⁵⁶ entnommen wurde. Schließlich waren nur die Bakterien, die in die Dentintubuli eingewandert waren, für den Versuch relevant. Nun schloss sich der Bohrvorgang an, der nach folgendem Schema durchgeführt wurde:

Sterilkontrollen a: 2 Hälften, pro Hälfte 1 Bohrschicht: 0,0 mm – 1,0 mm

Infektionskontrollen b und Desinfektionsprüfkörper c:

2 Hälften, pro Hälfte 2 Bohrspanentnahmestellen (Bohrloch),
pro Bohrloch 3 Bohrschichten:

0 mm – 0,5 mm; 0,5 mm – 1,0 mm; 1,0 mm – 1,5 mm

Hierbei wurde der Bohrer immer senkrecht zur Wurzelkanaloberfläche angesetzt. Zur Illustration des Bohrvorgangs bei den Infektions- und Desinfektionsprüfkörpern dient Abbildung 14.

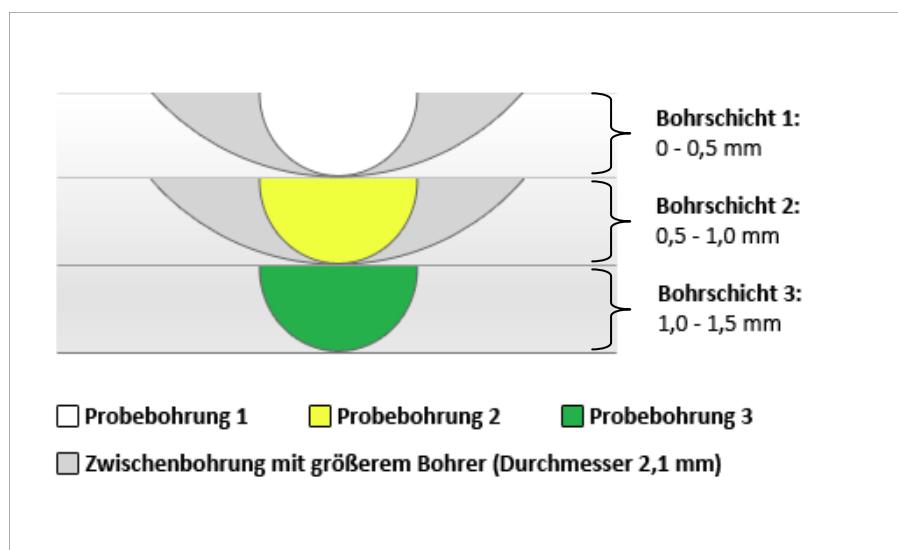


Abbildung 14: Illustrierter Bohrvorgang: Die drei kleinen Halbkreise (weiß, gelb und grün) stellen die Probenbohrungen (Durchmesser 0,8 mm) in den unterschiedlichen Bohrschichten dar. Die beiden großen Halbkreise (grau) stehen für die Zwischenbohrungen mit einem größeren Rosenbohrer (Durchmesser 2,1 mm), welche nach der ersten und zweiten Probenbohrung durchgeführt wurden. Rechts neben der Illustration sind die drei Bohrschichten angegeben

⁵⁴ BD 10ml Syringe, BD (Franklin Lakes, USA)

⁵⁵ Miraject PL Super, Hager & Werken (Duisburg)

⁵⁶ Schott Duran, Schott (Mainz)

Die Reihenfolge, die beim Spalten der Zahnstücke vorgenommen wurde, wurde auch bei der Gewinnung der Proben beibehalten, d.h. es wurden zunächst die Zahnstücke a gebohrt, dann die desinfizierten Stücke c und zuletzt die Infektionskontrollen b. Zwischen den Kontrollgruppen c und b wurden die sterile Werkbank und der Bohrständler zusätzlich mit 70%igem Ethanol desinfiziert.

Waren die Zahnhälften in die kleinen Petrischalen geklebt und nochmal gründlich abgespült worden, konnte mit der ersten Bohrung (Rosenbohrer mit Durchmesser 0,8 mm) begonnen werden (Abb. 15). Bei den Sterilkontrollen wurde aus den Hälften nur jeweils eine Probe bis 1,0 mm Tiefe entnommen, da dies ausreichte, um eine Sterilität der Probe festzustellen. Die entstandenen Bohrspäne wurden mit 1 ml steriles Medium umspült (Abb. 16), mit einer 1 ml-Stripette aufgesaugt und in einem 15 ml-Falcon⁵⁷ aufgefangen, in dem sich nochmals 1 ml Medium befand. Um diesen Arbeitsschritt zu vereinfachen, wurden am Vortag mit einer Multi-Pipette⁵⁸ jeweils 2 ml steriles Medium in 15 ml-Falcons gefüllt, von dem die Hälfte entnommen und zum Auffangen der Bohrspäne verwendet werden konnte. Der benutzte Bohrer wurde ebenfalls immer in das zugehörige Falcon-Röhrchen gegeben, um einen Verlust an Bohrspänen zu vermeiden (Abb. 17). Die gebohrten Zahnstücke wurden sodann mitsamt der Petrischale entsorgt.

⁵⁷ 15ml PP-Test tubes, Cellstar Greiner bio-one (Poitiers, Frankreich)

⁵⁸ Eppendorff (Hamburg)



Abbildung 15: Der Bohrvorgang



Abbildung 16: Abspülen der Bohrspäne vom Zahnstück in die Petrischale; anschließend wurden sie mit der Stripette aufgesaugt und in ein Falcon-Röhrchen überführt

Waren alle Sterilkontrollen bearbeitet, erfolgte für die Desinfektions- und Infektionsprüfkörper ein ähnliches Verfahren. Pro Zahnhälften entstanden zwei Bohrlöcher, aus denen jeweils eine Probe in Bohrschichten von 0 – 0,5 mm, 0,5 mm – 1,0 mm und 1,0 mm – 1,5 mm entnommen wurde. Es wurde mit der 0,5 mm - Bohrung begonnen und die Bohrspäne wie beschrieben in ein Falcon-Röhrchen gespült. Das entstandene Bohrloch wurde mit einem größeren Rosenbohrer⁵⁹ (Durchmesser 2,1 mm) erweitert, um die zweite Tiefenbohrung zu erleichtern und für diese die gleiche Menge an Bohrspäne zu erhalten. Die dabei entstandenen Späne wurden mit 5-10 ml sterilem 0,9%igem NaCl gründlich abgespült und verworfen, die Petrischale wurde zusätzlich mit einem sterilen Zellstofftuch ausgetupft. Nun konnte mit der zweiten Bohrung an derselben Stelle in weiteren 0,5 mm Tiefe fortgefahrene werden. Analog wurde auch bei der dritten Tiefenbohrung vorgegangen. War der Bohrvorgang an einer Stelle beendet, wurde das Bohrloch mit einer geringen Menge Heißkleber verschlossen, bevor die erste Bohrung am zweiten Bohrloch des Zahnsstückes erfolgen konnte. Auf diese Weise entstanden für jedes b und c - Stück pro Bohrschicht vier Proben.

⁵⁹ 2,1 mm Rosenbohrer, Komet (Lemgo)

Da dieser Arbeitsschritt einige Stunden Zeit in Anspruch nahm, wurden die Proben bis zum Ausplattieren im Kühlschrank bei 7,5 °C zwischengelagert.



Abbildung 17: Drei Bohrspanproben eines Bohrlochs aus den unterschiedlichen Bohrschichten in steriles Medium

4.10.4. Wachstumskulturen

Die Falconröhrchen mit den gewonnenen Bohrspänen und den Bohrern wurden für 5 sec mit einem Vortex aufgeschüttelt und 100 µl davon auf Kanamycin-Äsculin-Azid-Selektivnährböden mit einem sterilen Drigalski⁶⁰ Spatel ausgestrichen. Von den Infektions- und Desinfektionsprüfkörpern wurde zusätzlich für jede Probe eine 1:100 Verdünnung hergestellt und ausplattiert. Aus Platzgründen konnten diese Arbeitsschritte nicht unter der Sterilbank durchgeführt werden. Alle Platten wurden im Anschluss für 24 h bei 37 °C inkubiert.

4.10.5. Kolonien

Nach 24 h Inkubationszeit wurden die Kanamycin-Äsculin-Azid-Selektivnährböden aus dem Brutschrank entnommen und die auf ihnen gewachsenen Kolonien gezählt. Die Ergebnisse wurden festgehalten und später ausgewertet.

⁶⁰ Drigalski-Spatel, Edelstahl rostfrei, Lieferant VWR-Versand

4.11. Datenerhebung und statistische Analyse

4.11.1. Auszählen der koloniebildenden Einheiten

Wie unter 4.10.5. beschrieben wurden nach einer Inkubationszeit von 24 h die koloniebildenden Einheiten auf allen Enterokokken-Platten gezählt. Eine Leuchtplatte verschaffte beim Auszählen eine bessere Übersicht, da die Enterokokken-Kolonien um sich herum einen schwarzen Vorhof aus Stoffwechselprodukten bildeten. War ein Wert der Desinfektions- bzw. Infektionsergebnisse auf den Platten unzählbar, wurde der Wert der entsprechenden 1:100 Verdünnung mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und zur Auswertung herangezogen. Ansonsten fiel die Entscheidung, welcher Wert verwendet wurde, automatisch auf den unverdünnten Wert, da dieser genauer bestimmt werden konnte.

4.11.2. Statistische Auswertung

Die erfassten Daten wurden in eine computerlesbare Form überführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SPSS 18.0⁶¹ für Windows. Die grafische Darstellung der Ergebnisse wurde mit SPSS SigmaPlot 8.0⁶² durchgeführt.

Pro Untersuchungsgruppe wurden zehn Stichproben untersucht, für die pro Bohrschicht jeweils vier Werte erhoben werden konnten. Für die vier Werte einer Stichprobe wurde der Median als repräsentativer Wert herangezogen. Daraus wurden wiederum der Median und das 25%- bzw. 75%-Quartil für alle Proben berechnet und grafisch dargestellt. Als Testparameter wurde die relative Anzahl der verbliebenen Kolonien nach Desinfektion bezogen auf die aus demselben Zahn gewonnene Infektionsprobe verwendet, d.h. jeder Zahn war seine eigene Kontrolle. Niemals wurde das Desinfektionsergebnis eines Zahnes zur Infektionskontrolle eines anderen Zahnes in Relation gestellt. Die relative Anzahl der verbliebenen Kolonien nach Desinfektion wurde logarithmisch dargestellt. Die Desinfektion galt als biologisch relevant, wenn eine Reduktion von mindestens 3 log₁₀-Stufen erreicht wurde, was bedeutet, dass der mediane Wert im Falle einer erfolgreichen Desinfektion bei ≤ 0,1% zu liegen hatte [16].

⁶¹ SPSS Inc., Chicago (USA)

⁶² Sigma Plot Version 8.0, Chicago (USA)

4.12. Einfluss des Photosensitzers auf das Bakterium *Enterococcus faecalis*

Zusätzlich wurde getestet, ob der Farbstoff Toluidinblau einen Einfluss auf das Wachstum der Enterokokken in einer Suspension hat. Eine *E. faecalis* Kultur wurde am Vortag, wie unter 4.7. beschrieben, vorbereitet und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden unterschiedliche Mengen (25 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl und 400 µl) von dem im Versuch verwendeten Farbstoff-Fluid je zwei Mal in Eppendorf-Cups gegeben und mit 0,9%igem NaCl steril auf ein Gesamtvolumen von 400 µl aufgefüllt. In zwei separate Eppendorf-Cups kamen als Kontrollen nochmal jeweils 400 µl steriles 0,9%iges NaCl. Die *E. faecalis* Suspension wurde vor Gebrauch im Photometer optisch vermessen und im Anschluss eine 1:100.000 und eine 1:200.000 Verdünnung hergestellt. Je 100 µl der Verdünnungen wurden nun zu den vorbereiteten Farbstofflösungen und zu den Kontrolllösungen pipettiert und mit dem Vortex gut durchmischt (Tabelle 3). Von jeder Probe wurden 100 µl auf Enterokokken-Platten ausplattiert und für 24 h im Inkubator bebrütet.

Konz. der Bakteriensuspension	Farbstoff in µl					
1:100.000	0	25	50	100	200	400
1:200.000	0	25	50	100	200	400

Tabelle 3: Pipettierschema des Farbstoffversuchs

4.13. Vorbereitung der Proben für die rasterelektronenmikroskopische Visualisierung

Zur Darstellung der Kontamination der Dentintubuli mit Mikroorganismen wurden exemplarisch einige Bilder von Zahnstückhälften angefertigt. Bevor die Proben mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops⁶³ untersucht werden konnten, mussten sie vorbehandelt werden.

Zunächst wurden die noch ungespaltenen Zahstücke drei Mal mit sterilem 0,9%igem NaCl gewaschen, um auf der Oberfläche des Wurzelkanals haftende Proteine des Nährmediums abzuspülen. Es erfolgte nochmals ein Waschvorgang in 0,1 M Sørensen-Phosphat-Puffer⁶⁴.

⁶³ FEI Quanta 400 FEG, FEI Deutschland GmbH (Frankfurt/Main)

⁶⁴ Hergestellt aus KH₂PO₄ und Na₂HPO₄, gelöst in Aqua bidest.; Zusammensetzung siehe Anhang

Anschließend wurden die Zahnstücke fixiert, indem sie für 2 h in eine Mischung⁶⁵ aus 2,5%igem Glutaraldehyd⁶⁶ und 0,1 M Sørensen-Phosphat-Puffer gelegt wurden. Danach wurden die Proben noch drei Mal in 0,1 M Sørensen-Phosphat-Puffer für je 30 min gewaschen. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Zahnstücke in 0,1 M Sørensen-Phosphat-Pufferlösung im Kühlschrank bei 7,5 °C gelagert. Vor der Aufnahme der elektronenmikroskopischen Bilder wurden die Zahnstücke gespalten (siehe auch 4.10.2.) und ein letztes Mal mit Aqua bidest. gewaschen, um Puffersalze von der Zahnoberfläche zu spülen. Andernfalls würden die Salze bei Austrocknung ausfällen. Zur Untersuchung mit dem Rasterelektronenmikroskop wurden die Zahnstückshälften mit Leit-C-Plast⁶⁷ auf je einem Stub⁶⁸ befestigt. Im unbeschichteten, feuchten Zustand wurden die Proben im low-vacuum-Modus untersucht.

4.14. Testung der Kanamycin-Äsculin-Azid-Selektivnährböden

Da während der Vorversuche in Anlehnung an vorhergehende Arbeiten die Keimzahlbestimmung der Bohrspansuspensionen mittels Typticase-Soy-Broth-Agarplatten⁶⁹ (= Casoplatten) erfolgte, wurden die Kanamycin-Äsculin-Azid-Selektivnährböden (= Enterokokkenplatten) auf simultanes Bakterienwachstum überprüft. Hierfür wurde zunächst wie im Kapitel 4.7. beschrieben eine *E. faecalis* Arbeitskultur hergestellt. Aus dieser Kultur wurden Verdünnungen mit sterilem Typticase-Soy-Broth-Medium im Verhältnis 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 und 1:100000 hergestellt und jeweils 100 µl auf die beiden Nährböden ausplattiert. Es folgte die Inkubation der Proben für 24 h bei 37 °C und die anschließende Auszählung der koloniebildenden Einheiten auf allen Platten. Die Ergebnisse wurden vermerkt und später ausgewertet.

⁶⁵ Zusammensetzung der Fixierlösung: siehe Anhang unter 8.1.

⁶⁶ Glutaraldehyd für Elektronenmikroskopie, Nr. 23114, Serva (Heidelberg)

⁶⁷ Leit-C-Plast, Provac (Oestrich-Winkel)

⁶⁸ Aluminium Stub, Provac (Oestrich-Winkel)

⁶⁹ 94 mm Agarplatten, Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Universität Regensburg

5. Ergebnisse

5.1. Absolute Kolonienzahlen

5.1.1. Sterilkontrollen

Die Sterilkontrollen waren in keinem der durchgeführten Versuche mit dem *E. faecalis* infiziert. Die ausgestrichenen Bohrspanproben aus der Bohrschicht 0 – 1,0 mm zeigten kein Wachstum des Mikroorganismus auf den Enterokokkenplatten.

5.1.2. Infektionskontrollen

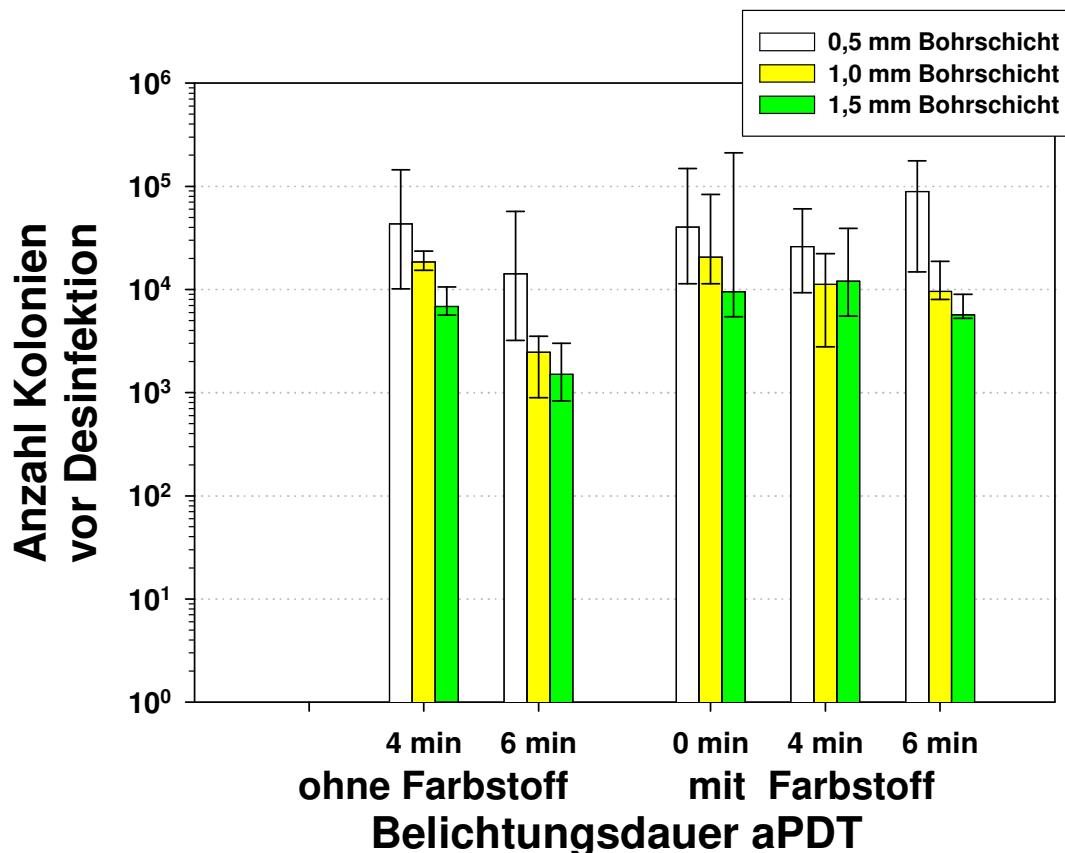


Abbildung 18: Anzahl der *E. faecalis* Kolonien in den zu den Desinfektionsprüfkörpern gehörigen Infektionskontrollen; Mediane mit 25%- und 75%- Quartilen

Die Anzahl der Kolonien lag bei den Infektionskontrollen b in der Bohrschicht 1 (0 – 0,5 mm) zwischen $1,4 \cdot 10^4$ und $8,9 \cdot 10^4$, in der Bohrschicht 2 (0,5 – 1,0 mm) zwischen $2,4 \cdot 10^3$ und $2,1 \cdot 10^4$ Kolonien und in der Bohrschicht 3 (1,0 - 1,5 mm) zwischen $1,5 \cdot 10^3$ und $1,2 \cdot 10^4$ Kolonien. Tendenziell zeichnet sich hierbei ein fallendes Tiefenprofil ab, insofern in tiefere

Dentinschichten (ausgehend vom Wurzelkanallumen) weniger Bakterien eingedrungen waren bzw. sich dort vermehrt hatten, als in der obersten Dentinschicht. Die Unterschiede lagen innerhalb eines Bereichs von $1,7 \log_{10}$ Stufen. Zur graphischen Darstellung des Tiefenprofils dient Abbildung 18.

5.2. Relative Kolonienzahlen

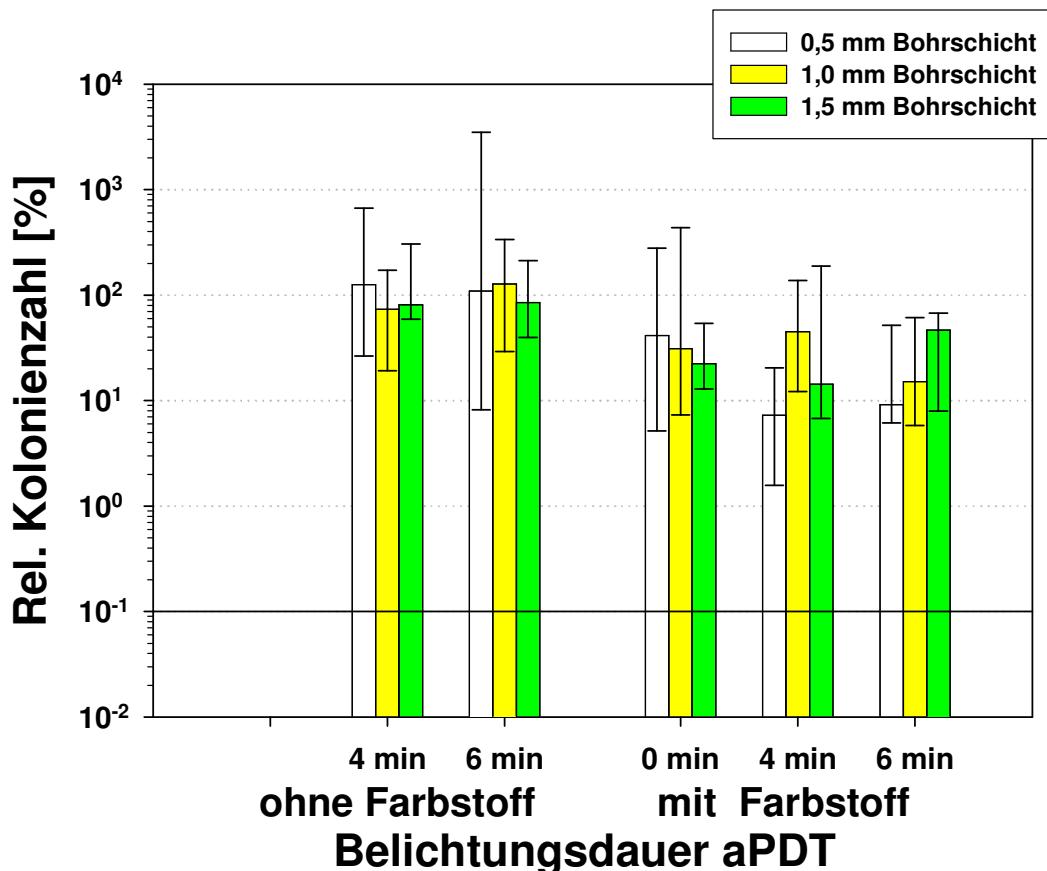


Abbildung 19: Relative Kolonienzahlen nach der Desinfektion ohne/mit Farbstoff; Mediane mit 25%- und 75%-Quartilen, 100% = Infektion der b-Stücke; die horizontale Linie bei $10^{-1}\%$ stellt die Schwelle für eine biologisch relevante Desinfektion von mindestens $3 \log_{10}$ Stufen dar

In Abbildung 19 werden die Desinfektionsergebnisse der unterschiedlichen Versuchsgruppen logarithmisch aufgezeichnet. Die horizontale Linie bei $10^{-1}\%$ stellt hierbei die Schwelle für eine biologisch relevante Desinfektion von mindestens $3 \log_{10}$ Stufen dar, gemäß den Empfehlungen des Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) und des HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force [16]. Diese Schwelle wird in jeder Versuchsgruppe überschritten, d.h. eine biologische relevante Desinfektion konnte nicht erreicht werden. Die relative Kolonienzahl lag bei einer Belichtungsdauer von 4 min ohne

Farbstoff in der ersten Bohrschicht (0 – 0,5 mm) bei 126% der Ausgangsinfektion. Bei einer Belichtungsdauer von 6 min ohne Farbstoff in der gleichen Bohrschicht ergab sich eine relative Kolonienzahl von 110%. Ähnlich verhielt es sich in der zweiten und dritten Bohrschicht, wenn die Belichtung mit dem Diodenlaser ohne Farbstoff durchgeführt wurde: Für die mittlere Schicht blieb eine relative Kolonienzahl von 74% bei 4 min Belichtungsdauer und von 127% bei 6 min, in der tiefsten Schicht waren 81% der Kolonien bei 4 min bzw. 85% bei 6 min im Vergleich zur Infektionskontrolle vorhanden.

Die Bohrspanproben aus den Zahnhälften, die mit dem Photosensitizer Toluidinblau behandelt wurden, zeigten ebenfalls für alle Belichtungszeiten in allen Bohrschichten noch Wachstum. Wirkte der Farbstoff für 60 sec ohne anschließende Belichtung ein, betrug die relative Kolonienzahl in der ersten Bohrschicht 42%, in der zweiten 31% und in der dritten 22% der Ausgangsinfektion. Wurde die aPDT mit Farbstoff angewendet, d.h. der Farbstoff wirkte für 60 sec im Wurzelkanallumen ein, bevor mit der Belichtung begonnen wurde, ergaben sich folgende Ergebnisse: In der obersten Bohrschicht verblieben nach 4 min Belichtungszeit 7,3% bzw. nach 6 min 9,1% der anfänglichen Anzahl an Kolonien. In der mittleren Schicht konnten nach 4 min noch 45% und nach 6 min noch 15% der Bakterien nachgewiesen werden. In der tiefsten Bohrschicht überlebten nach 4 min Belichtung 14% und nach 6 min 47% der Mikroorganismen.

5.3. Einfluss des Photosensitzers auf das Bakterium *Enterococcus faecalis*

Da sich in dem Versuch mit Farbstoff/ohne Belichtung eine Reduktion der bakteriellen Kontamination auf Werte zwischen 22% und 42% in den unterschiedlichen Bohrschichten ergab, wurde in einem separat durchgeführten Versuch, wie unter 4.12. beschrieben, nochmals die Wirkung des Farbstoffs auf das Wachstum einer *E. faecalis* Flüssigkeitskultur untersucht. Im Gegensatz zum Zahnmodell, in dem sich die Bakterien auf der Wurzelkanaloberfläche zusammenlagerten, wurde der Einfluss des Photosensitzers hier an einer Suspension getestet.

Auf den Enterokokkenplatten konnte für alle Proben ein simultanes Wachstum beobachtet werden, unabhängig von der Menge an Farbstoff, die sich in der Probe befand (Abb. 20). Eine antimikrobielle Wirkung des Photosensibilisators Toluidinblau auf *E. faecalis* wurde nicht bestätigt.



Abbildung 20: Vergleich des *E. faecalis* Wachstums in der Suspension ohne und mit Farbstoff

5.4. Rasterelektronenmikroskopische Bilder

Zur exemplarischen Visualisierung der Versuchsergebnisse wurden einige Zähne mit dem Rasterelektronenmikroskop untersucht.

Abbildung 21 zeigt die Wurzelkanaloberfläche des Zahnstücks 764 b, das einen einwöchigen Infektionszyklus mit Bakteriensuspension durchlaufen hat. Die Probe ist an der Oberfläche dicht mit Mikroorganismen besiedelt, die Infektion ist gelungen. In Abbildung 22 werden die Dentintubuli im Längsschnitt dargestellt: Die Aufnahme erfolgte an den Bruchkanten, die beim Spalten des Zahnstücks entstanden sind. Die Bakterien haften nicht nur an der Wurzelkanaloberfläche, sondern sind auch in tiefer liegende Dentinbereiche eingewandert. Sie sind kettenartig entlang der Dentintubuli angeordnet.

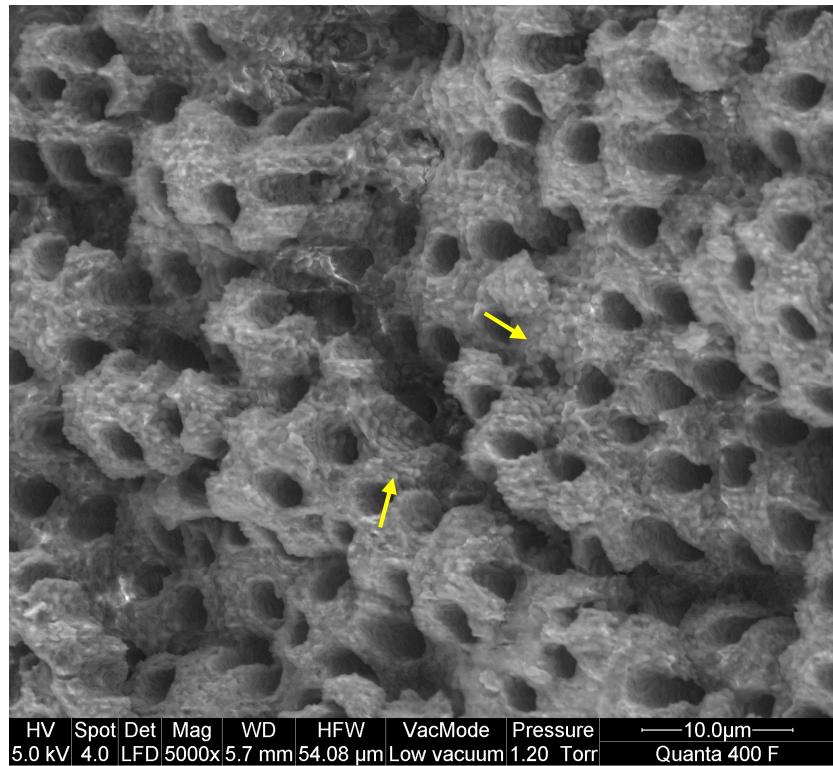


Abbildung 21: Zahn 764 nach Durchlaufen eines einwöchigen Versuchszyklus mit Bakteriensuspension (Infektionskontrolle); die Kanaloberfläche ist dicht mit Mikroorganismen (→) besiedelt

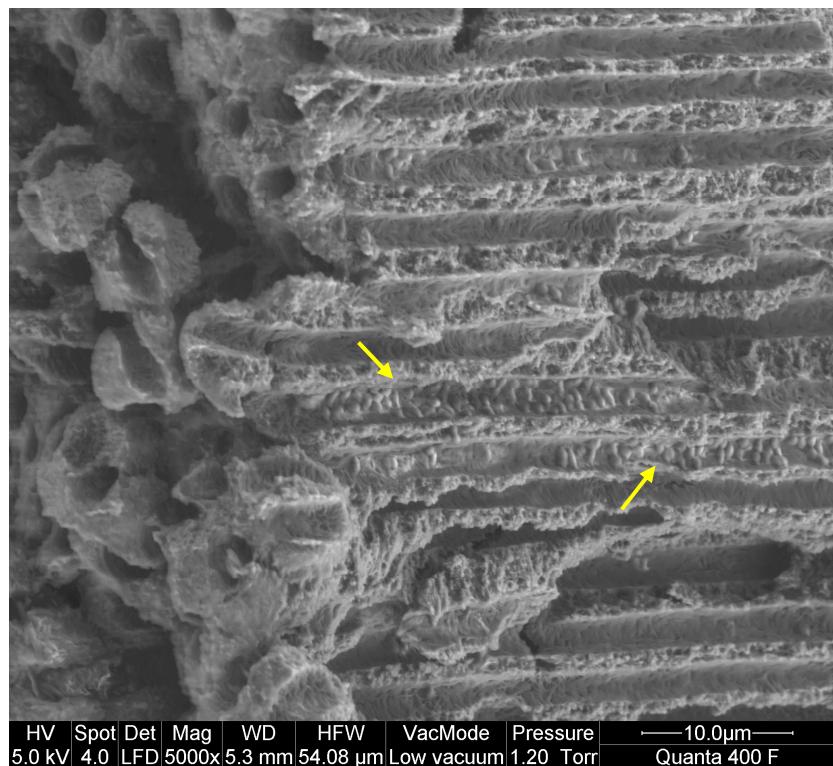


Abbildung 22: Zahnstück 764 b im Längsschnitt; die Bakterien (→) sind in die Dentintubuli eingewandert

Abbildung 23 und Abbildung 24 zeigen Aufnahmen des Zahnstückes 764 c, das nach der einwöchigen Infektion mit dem Bakterium *Enterococcus faecalis* mit Farbstoff und 6 min Laserbelichtung behandelt wurde. Die Dentinoberfläche und die Dentintubuli sind größtenteils immer noch mit dem Mikroorganismus besiedelt.

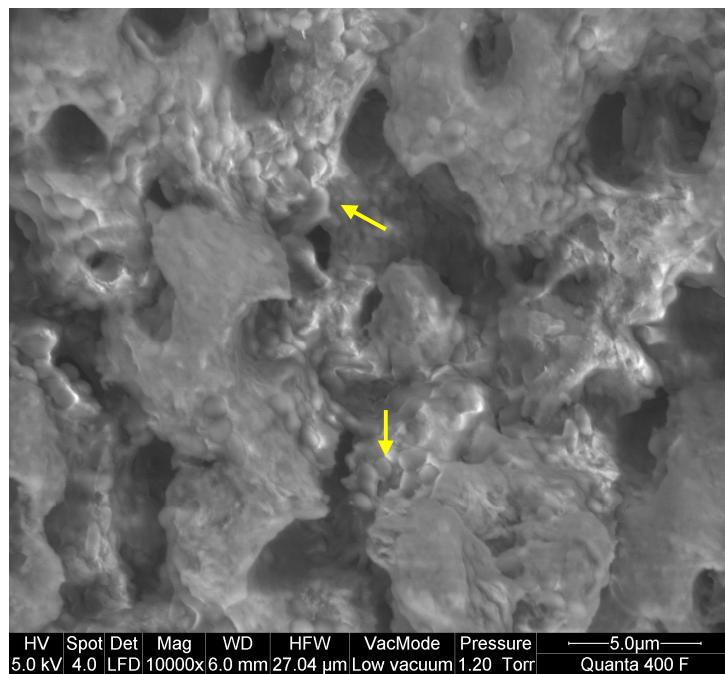


Abbildung 23: Zahnstück 764 c nach Desinfektion (1 min Einwirkzeit des Farbstoffs, 6 min belichtet); Bakterien (→) auf der Dentinoberfläche

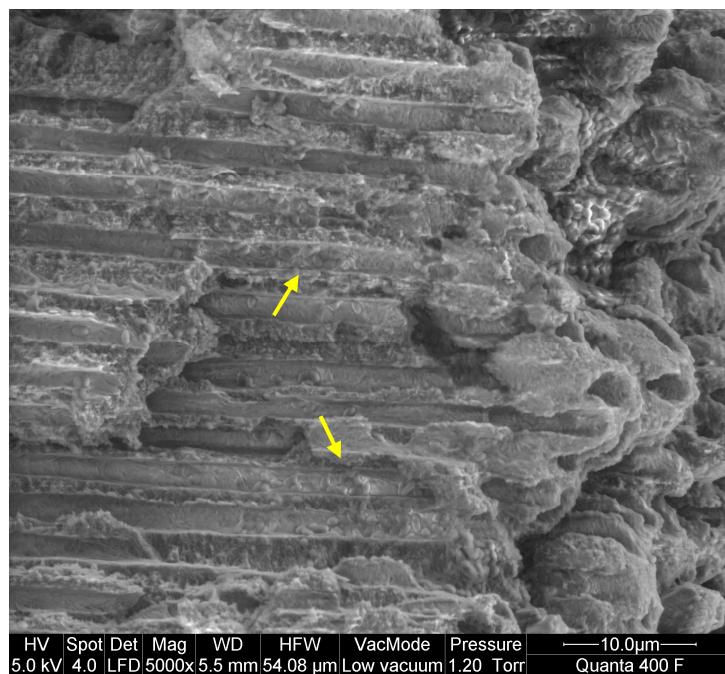


Abbildung 24: Zahnstück 764 c im Längsschnitt; Bakterien (→) in den Dentintubuli

In Abbildung 25 ist das Zahnstück 770 c zu sehen, das nach der Infektion mit dem *Enterococcus faecalis* für 1 min mit dem Farbstoff Toluidinblau behandelt wurde, ohne anschließend mit dem Laserhandstück zu belichten. Die Dentinoberfläche ist wie bei der Infektionskontrolle mit einem dichten Bakterienwuchs übersät.

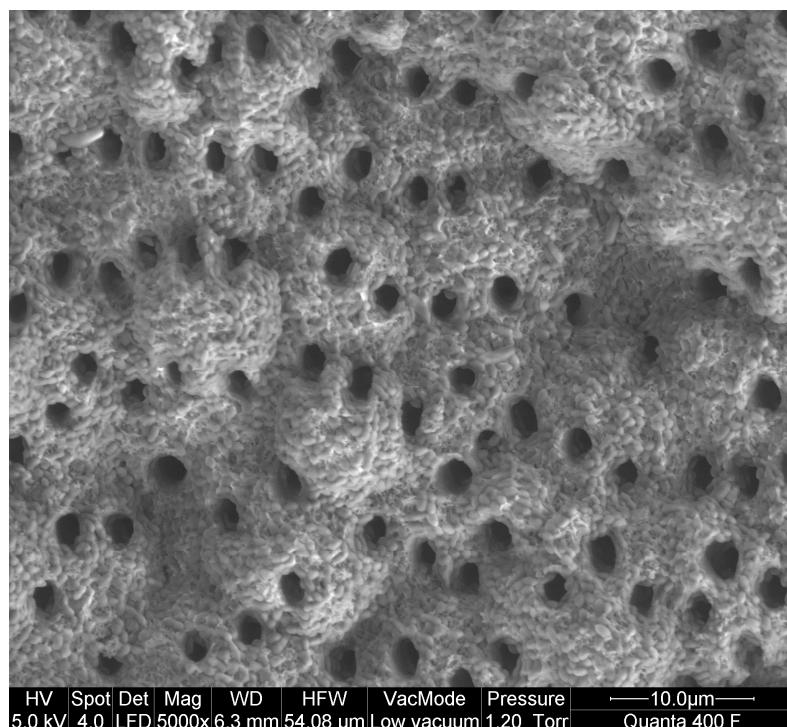


Abbildung 25: Zahnstück 770 c nach Behandlung mit dem Farbstoff für 60 sec ohne Belichtung; ein dichter Bakterienrasen belegt die Dentinoberfläche

5.5. Ergebnis der Kanamycin-Äsculin-Azid-Selektivnährböden-Testung

Es zeigte sich sowohl auf den Trypticase-Soy-Broth-Agarplatten als auch auf den Kanamycin-Äsculin-Azid-Selektivnährböden für alle Verdünnungen ein identisches Wachstum von *E. faecalis*. So ergab beispielsweise die Zählung der koloniebildenden Einheiten bei der 1:100000-Verdünnung auf den Casoplatten 644 Kolonien, auf den Enterokokkenplatten wurden 622 Kolonien vermerkt. Gemäß der Beschreibung des Selektivnährbodens hatten sich bei den Enterokokkenplatten um die Bakterienkolonien herum schwarze Höfe gebildet (siehe auch Abb. 26 auf Seite 59).

6. Diskussion

6.1. Das Testmodell und seine Durchführung

In Anlehnung an die vorangegangene Studie [49] wurden auch bei der vorliegenden Weiterentwicklung des Testmodells bovine Zähne verwendet. Der Einsatz von Rinderzähnen bewährte sich auch in anderen *in vitro* Modellen, in denen ein Ersatz für humane Zahnhartsubstanzen benötigt wurde, da sie in ihren morphologischen Eigenschaften menschlichen Zähnen sehr ähnlich sind und darüber hinaus leicht und in großer Zahl beschafft werden können [18; 33; 85; 87]. Es wurde der *Enterococcus faecalis* als Testbakterium verwendet, da er eine wesentliche Rolle bei fehlgeschlagenen Wurzelbehandlungen spielt [1; 31; 54; 69; 112] und seine Kultivierung und Handhabung im Labor durch seine umwelttoleranten Eigenschaften relativ einfach ist. Die Infektionszeit der Zahnstücke mit dem Mikroorganismus lag in unserem Versuchsaufbau bei sieben Tagen. In anderen Studien infizierte man die Prüfkörper mit unter deutlich länger [48; 93], teilweise bis zu vier Wochen [48]. Im Anbetracht der Ergebnisse der Infektionskontrollen in der vorliegenden Studie (vgl. Kapitel 5.1.2.), kann von einer effektiven Infektion ausgegangen werden. Eine ausreichende Kontamination der zu desinfizierenden Proben mit dem Testbakterium war zu jeder Zeit gewährleistet. Dies verdeutlichte auch die elektronenmikroskopische Darstellung.

Ziel dieser Arbeit war, ein bereits bestehendes *in vitro* Modell zur Testung von endodontischen Desinfektionsmethoden [49] weiterzuentwickeln. Mit Hilfe des autoklavierbaren, im Mikrometerbereich justierbaren Bohrständers konnten exakt gleiche Volumina an Bohrspanproben aus den Wurzelkanälen der Rinderinzisivi entnommen werden. Zusätzlich erlaubte die Bohrmethode auch eine Untersuchung tieferer Dentinschichten auf Kontamination mit dem verwendeten Mikroorganismus. In den Infektionskontrollen war dadurch zu beobachten, dass die Wurzelkanaloberfläche tendenziell etwas dichter mit Bakterien besiedelt war als die tieferen Schichten des Dentins; die Unterschiede bewegten sich innerhalb eines Bereichs von ein bis zwei \log_{10} Stufen. Normalerweise wäre zu erwarten, dass in tieferen Schichten deutlich weniger Bakterien vorhanden sind, da laut SEN *et al.* [88] die Eindringtiefe von Kokken und Stäbchen in die Dentintubuli auf 150 µm limitiert ist. Dieser Diskussionspunkt war bereits aus der

Vorgängerarbeit [49] bekannt, weshalb der Bohrvorgang deutlich modifiziert wurde. So sollte eine Zwischenbohrung mit einem größeren Rosenbohrer verhindern, dass durch stetiges Tiefergehen ein Bohrkanal entsteht, in welchem sich Späne sammeln können. Dies würde beim Abspülen der Wurzelstücke zu verfälschten Ergebnissen führen. Der größere Rosenbohrer (Durchmesser: 2,1 mm) wurde daher nach der Probenentnahme mit Hilfe des kleineren Bohrers (Durchmesser: 0,8 mm) verwendet, um eine Art Plateau zu schaffen, damit nicht aufgesammelte Späne mit Kochsalzlösung weggespült und somit verworfen werden konnten. Trotz dieses Vorgehens war ein statistisch signifikantes Tiefenprofil nicht erkennbar. Der Abspülvorgang könnte hierbei einen kritischen Arbeitsschritt im Versuch darstellen. Auch bei sorgfältigster Arbeitsweise können nie alle in Lösung gegangenen Späne aufgesammelt werden, da sowohl am Zahnstück als auch in der Petrischale selbst immer kleine Mengen zurück bleiben.

Es werden in zahlreichen anderen Studien, insbesondere bei *in vivo* Untersuchungen, lediglich Proben von der Wurzelkanaloberfläche genommen. Die Ermittlung der bakteriellen Kontamination erfolgt häufig durch einfache Abstriche mittels steriler Papierspitzen; auch der Einsatz endodontischer Feilen zur Abtragung infizierten Dentins wird beschrieben [14; 15; 38; 39; 36; 80]. Eine mögliche bakterielle Kontamination tiefliegender Dentinschichten kann jedoch auf diese Weise nicht festgestellt werden.

Zur statistischen Auswertung der Desinfektionsergebnisse wurden stets das c-Stück (Desinfektionsprüfkörper) eines Zahnes und das b-Stück (Infektionskontrolle) desselben Zahnes miteinander verglichen, d.h. jeder Zahn war seine eigene Kontrolle. Niemals wurde ein Desinfektionsergebnis mit einer Infektionskontrolle eines anderen Zahnes verglichen. Es wurde davon ausgegangen, dass die Anfangsinfektion der c-Stücke vor der Desinfektion in dem Bereich der zugehörigen Infektionskontrolle liegt. In den Versuchen ohne Farbstoff und mit Licht wiesen jedoch die Desinfektionsprüfkörper nach der Desinfektion eine höhere Kontamination mit *E. faecalis* auf, als die entsprechenden Infektionskontrollen; die Werte der relativen Kolonienzahlen nach der Behandlung lagen teilweise bei über 100%. Es wurde festgestellt, dass - abgesehen davon, dass die Desinfektion ohne Farbstoff nicht gelang - obwohl die Zahnstücke aus ein und demselben Zahn stammten, die Anfangsinfektion unterschiedlich stattgefunden haben könnte. Fraglich wäre, ob die Problematik umgangen werden könnte, indem die Methode so weiterentwickelt wird, dass aus demselben

Zahnstück, das desinfiziert werden soll, vorab eine Probe zur Kontrolle der Infektion entnommen wird, um einen noch direkteren Vergleich zu erhalten. Aus technischen Gründen war es jedoch nicht möglich, diese Überlegung umzusetzen, da die Prüfkörper erst nach der Behandlung für die Probenentnahme in ihrer Mitte gespalten wurden.

6.2. Antibakterielle Wirkung der aPDT

Eine Reduktion der bakteriellen Infektion um $3 \log_{10}$ Stufen im Sinne einer biologisch relevanten Desinfektion gemäß den Empfehlungen des Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) und des HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force [16] konnte in dieser Studie mit der Desinfektionsmethode aPDT nicht erreicht werden. Hierzu hätten letztendlich nur noch maximal 0,1% der anfänglichen bakteriellen Kontamination nachweisbar sein dürfen.

Die durch den mehrstufigen Bohrvorgang entstandene Tendenz des Tiefenprofils bei den Infektionskontrollen stellte sich im Anbetracht der Desinfektionsergebnisse genau anders herum dar: In der obersten Bohrschicht war nach Anwendung der aPDT mit Toluidinblau eine geringere bakterielle Kontamination vorhanden, als in den beiden tieferen Bohrschichten. Die Restinfektion der Wurzelkanaloberfläche betrug nach 4 min Belichtungszeit 7% bzw. nach 6 min 9%. Ähnliche Werte beschrieben BERGMANS *et al.* [11] in ihrer an humanen Zähnen durchgeführten *in vitro* Studie für den *Enterococcus faecalis* nach Desinfektion mit der aPDT: Bei ihnen verblieben noch 11,6% der Bakterien an der Wurzelkanaloberfläche. Zu einigen weiteren Studien lassen sich hinsichtlich der Desinfektionsergebnisse ebenfalls Parallelen erkennen: Es konnte durch die alleinige Anwendung der aPDT in den häufigsten Fällen keine 99,9%ige Desinfektion gewährleistet werden, insbesondere wenn die Kontamination der Proben anhand von Zahnmodellen erfolgte [32; 108].

Im Hinblick auf die antibakterielle Wirkung der aPDT in den tieferen Schichten des Wurzeldentins war eine noch höhere Kontamination mit Bakterien nachzuweisen. *In vivo* Studien erlauben keine Probenentnahme aus tieferen Dentinschichten nach der Desinfektion, da diese lediglich mit Handfeilen oder Papierspitzen möglich ist. Im Rahmen der im Literaturverzeichnis angegebenen *in vitro* Studien zur aPDT in der Endodontie wurde bisher noch nicht über ihre Wirkung in der Tiefe berichtet. Mit dem vorliegenden *in vitro*

Testmodell jedoch wurde eine schlechtere Desinfektion in tieferen Dentinschichten von bis zu 1,5 mm beobachtet. Ein möglicher Grund für geringere photodynamische Inaktivierung von Bakterien in der Tiefe könnte sein, dass durch die Unregelmäßigkeiten und Nischen im Dentin eine ungenügende Konzentration an Sauerstoff für die Reaktion vorhanden war. Das Vorhandensein von ausreichend Ausgangsmolekülen an Sauerstoff ist voraussetzend für die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies [104]. Die bakterielle Flora in infizierten Wurzelkanälen besteht hauptsächlich aus anaeroben Mikroorganismen, die sich in einem Biofilm organisieren [31]. Anzunehmen wäre, dass das Wurzeldentin ein sauerstoffarmes Milieu bietet, das das Wachstum dieser Spezies begünstigt. Unter derartigen Bedingungen könnte insbesondere die Entstehung von Singulett-Sauerstoff vermindert sein, der maßgeblich für die Zytotoxizität der aPDT verantwortlich ist [105]. Es wäre möglich, dass die unregelmäßige Morphologie der Dentinkanälchen das Eindringen des Farbstoffs oder des Lichtstrahls in die tieferen Bereiche zusätzlich behindert hat und stellenweise eine bakterielle Kontamination bestehen blieb. Sollte diese Vermutung stimmen, bleibt fraglich, ob die vorherige Verwendung gewebeauflösender, Schmierschicht-entfernender Detergenzien eine erhöhte Sauerstoffkonzentration und auch eine bessere Penetration des Farbstoffs in die Dentinkanälchen ermöglicht hätte.

In diesem *in vitro* Modell wurden die Kanalwände, im Gegensatz zur üblichen Handhabung in der Praxis, nicht mechanisch bearbeitet. Einige *in vivo* Studien zeigten, dass eine Kombinationstherapie der aPDT mit einer NaOCl-Spülung während der Aufbereitung des Kanals mit Feilen durchaus zu guten Desinfektionsergebnissen führen kann [14; 15; 36; 38; 39]. Oftmals wird die aPDT als zusätzliche Desinfektionsmaßnahme nach der Standardbehandlung empfohlen, um eine vorhandene Restinfektion im Wurzelkanal zu beseitigen [11; 32; 39; 59; 108]. Durch die Vorbehandlung des Wurzeldentins mit einem gewebeauflösenden Desinfektionsagens, wie z.B. NaOCl, können organische Bestandteile von der Wurzelkanaloberfläche entfernt werden, was die alleinige Anwendung der aPDT nicht erlaubt.

Ein Einfluss des Laserlichts ohne Farbstoff auf *E. faecalis* konnte in dieser Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Durch die alleinige Anwendung des Photosensitzers Toluidinblau konnte eine Reduktion der bakteriellen Infektion auf Werte zwischen 22% und 42% festgestellt werden. Eine antimikrobielle Wirkung des Farbstoffs wurde teilweise auch in anderen Studien beschrieben [32; 34; 96]; manche Autoren berichten über gegenteilige

Ergebnisse [11; 40]. Eine einheitliche Feststellung diesbezüglich wurde bisher noch nicht getroffen.

Im Gegensatz zu der Bestrahlung von planen Flächen, wie z.B. bei der Anwendung der aPDT auf oraler Mukosa zur Behandlung oraler Stomatitiden oder auf Hautoberflächen, wie sie in der Dermatologie angewandt wird, erfolgte hier die Belichtung von Dentin im dreidimensionalen und überdies schwer zugänglichen Bereich. Die Wurzelkanaloberfläche der Rinderzahnstücke wurde mit Hilfe eines speziellen Endo-Ansatzes für den Diodenlaser belichtet. Der für den Gebrauch an menschlichen Wurzelkanälen zugelassen Ansatz wurde an Rinderzähnen angewendet, deren Wurzelkanal einen größeren Radius besitzt. Dem wurde Rechnung getragen, indem die Ansatzspitze um einige Millimeter gekürzt wurde, um ein dickeres, dem Wurzelradius des Rinderzahnes besser angepasstes Endstück zu erhalten.

Eine suffiziente Desinfektion der Wurzelkanäle konnte nicht erreicht werden. Ob es teilweise an dem Laseransatz gelegen haben könnte, ist fraglich. Die Strahlungsintensität einer Lichtquelle nimmt laut dem Abstandsgesetz mit dem Quadrat des Abstands ab (Strahlungsintensität $I \sim \frac{1}{r^2}$). Es wäre möglich, dass die auf dem Wurzeldentin des Rinderzahnes aufgetroffene Energie geringer gewesen ist, als sie auf einer Wurzelkanaloberfläche eines humanen Zahnes gewesen wäre und dadurch nicht genug Energieübertragung von Photosensibilisatormolekülen auf Sauerstoff und somit auf Bakterien stattgefunden hat. Laut Hersteller ist der angewendete Leistungsbereich des Laserhandstücks von 100 mW aber für humane Zähne mehr als ausreichend bemessen und hätte somit auch für die Anwendung an Rinderzähnen genug Energie liefern müssen.

6.3. Vergleich der beiden Parallelprojekte

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die vorliegende Arbeit Teil eines Parallelprojekts [60]. Es wurde am gleichen *in vitro* Modell neben der antibakteriellen photodynamischen Therapie auch die Wirkung von Natriumhypochlorit auf *E. faecalis* untersucht. Es kamen unterschiedliche Konzentrationen der Lösung von 0,5%, 1,0% und 3,0% zum Einsatz, die für 30 bzw. 60 sec im Wurzelkanal belassen wurden. Die Wirkung des NaOCl wurde nach der angegebenen Einwirkzeit mit dem Reduktionsmittel Natriumthiosulfat gestoppt.

Auch in der parallel durchgeführten Arbeit [60] zeichnete sich in den Infektionskontrollen die Tendenz zum fallenden Tiefenprofil ab, die oberflächlichste Dentinschicht war etwas stärker

mit Mikroorganismen besiedelt, als die beiden tieferen Dentinschichten. In Hinblick auf die Desinfektion konnte auch mit NaOCl für die angegebenen Konzentrationen und Einwirkzeiten keine biologisch relevante Desinfektion von mindestens $3 \log_{10}$ Stufen erreicht werden. Das Desinfektionsagens hatte durch die Inaktivierung mit der Stopplösung keine Möglichkeit, in den Dentinkanälchen nachzuwirken. Die besten Ergebnisse für die kurzen Einwirkzeiten von 30 und 60 sec konnten mit 3,0%igem NaOCl erzielt werden: Hier lagen die relativen Kolonienzahlen nach Desinfektion für alle Bohrschichten bei unter 4%. In der obersten Bohrschicht verblieben nach 60 sec sogar nur noch 0,7% der ursprünglichen bakteriellen Kontamination, was einer biologisch relevanten Desinfektion am nächsten kam. Verglichen mit den Ergebnissen der aPDT, bei denen die Proben mit Farbstoff und mit Licht behandelt wurden, konnte - auch für die tieferen Bohrschichten - mit 3,0%igem NaOCl innerhalb einer kürzeren Behandlungsdauer ein besseres Desinfektionsergebnis erreicht werden.

6.4. Unterbindung der *Bacillus subtilis* Kontamination der Agarplatten

Während der Vorversuche konnte auf den Casoplatten, auf denen die Bohrspansuspensionen anfangs ausplattiert wurden, neben dem *E. faecalis* das Wachstum eines weiteren Mikroorganismus beobachtet werden. Dies führte dazu, dass die gewonnenen Proben nicht mehr ausgewertet werden konnten. Zu Bestimmungszwecken wurde daher eine der kontaminierten Platten im Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Universität Regensburg untersucht. Die Keimbestimmung ergab neben den verwendeten Enterokokken die Anwesenheit des aerob wachsenden Sporenbildners *Bacillus subtilis*. Dieses Bakterium ist in der Lage, gegenüber Umwelteinflüssen sehr robuste Endosporen zu bilden, weshalb mit gängigen Desinfektions- und Sterilisationsverfahren eine Inaktivierung des Bakteriums nicht gelingt [26; 29; 68; 90].

Die im Versuch verwendeten Rinderzähne waren von Natur aus, bedingt durch die Nahrung der Rinder, mit *Bacillus subtilis* kontaminiert. Dies stellte sich in der mikrobiologischen Untersuchung heraus. In Zusammenhang mit der beschriebenen Sporenbildung des Mikroorganismus erklärt sich sein Vorhandensein trotz der Autoklavierung der Zahnstücke. Um dieser Tatsache Rechnung zu tragen, wurden in den Versuchen Kanamycin-Äsculin-Azid-Selektivnährböden verwendet. Diese sind gemäß ihrer Beschreibung [77] für den Nachweis

von Enterokokken geeignet, wobei sie durch die Substanzen Kanamycin und Natriumazid das Wachstum von *Bacillus subtilis* ATCC 6633 sowie *Escherichia coli* ATCC 25922 unterbinden (= Negativkontrolle). Durch ein doppeltes Indikatorsystem wird das Wachstum von Äsculin-hydrolysierenden Streptokokken angezeigt, wobei sich Höfe aus schwarzen Eisen-Phenol-Komponenten bilden. So konnte das Wachstum des Endosporenbildners vollständig unterbunden werden, ein Auszählen der Kolonien war uneingeschränkt möglich. Durch die unter 4.14. beschriebenen Versuche konnte von einem gleichen Wachstum des *E. faecalis* auf beiden Plattenarten ausgegangen werden. Überlegungen, eine antibiotische Vorbehandlung der Rinderzähne durchzuführen oder das verwendete Nährmedium mit Kanamycin anzureichern, wurden daher als nicht notwendig erachtet und verworfen. Zur Dokumentation wurden Fotos der Infektionskontrolle b des Zahnstückes 763 erstellt, um das *E. faecalis* Wachstum auf den Enterokokkenplatten einerseits und das *B. subtilis* Wachstum auf den Caso-Platten andererseits zu veranschaulichen (Abb. 26).

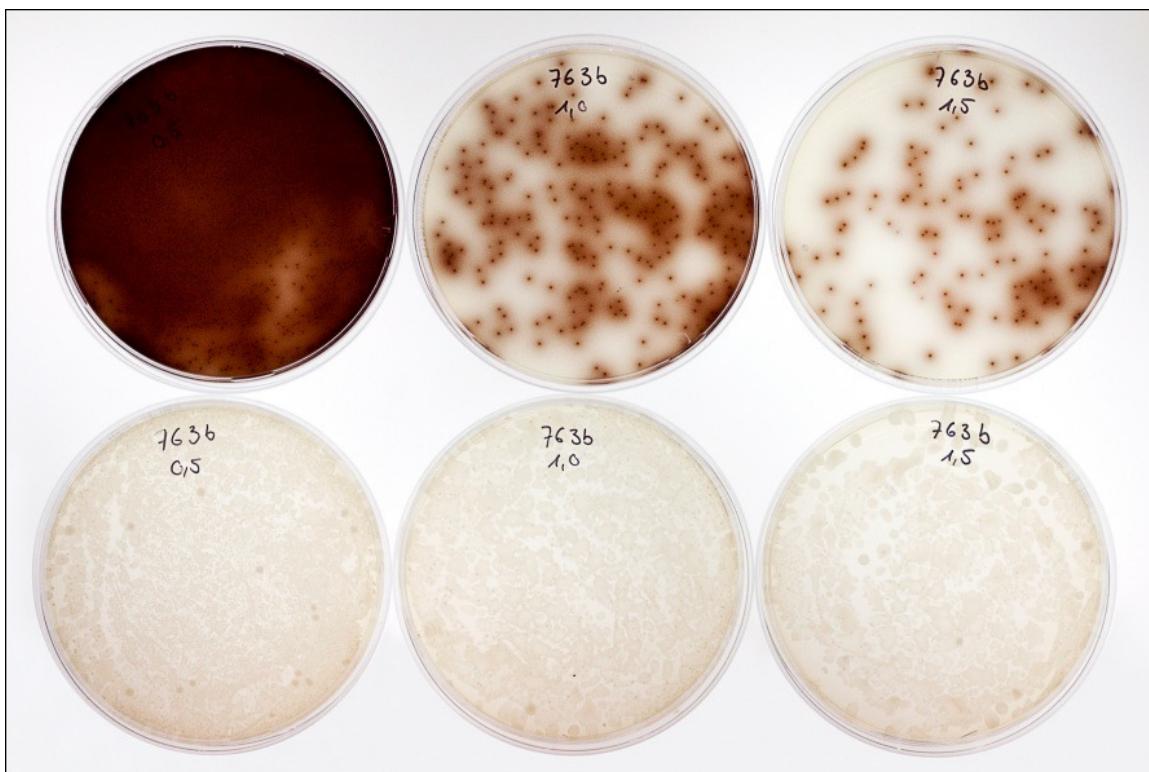


Abbildung 26: Vergleich der Enterokokken-Platten (Reihe oben) mit den in früheren Versuchen verwendeten Caso-Platten (Reihe unten); ausplattiert wurden Proben einer Infektionskontrolle: Auf den Enterokokken-Platten wächst lediglich der *E. faecalis*, seine Stoffwechselprodukte zeichnen sich als braune Höfe um die Kolonien ab; auf den Caso-Platten ist das Wachstum des *E. faecalis* durch die starke *B. subtilis* Kontamination nicht mehr zu erkennen
Auf den Enterokokken-Platten ist in diesem Beispiel auch das fallende Tiefenprofil der unterschiedlichen Bohrschichten angedeutet: Oben links stellt das Ausmaß der Infektion der obersten Bohrschicht, oben rechts das der tiefsten Bohrschicht dar

7. Zusammenfassung

Es wurde ein bereits bestehendes *in vitro* Modell [49] weiterentwickelt, mit dem die Wirksamkeit unterschiedlicher endodontischer Desinfektionsmethoden an künstlich infizierten Rinderzahnwurzeln getestet werden kann. Die Proben wurden für eine Woche mit dem Bakterium *Enterococcus faecalis* infiziert. Als Desinfektionsmethode kam die antibakterielle photodynamische Therapie zum Einsatz, wobei unterschiedliche Belichtungszeiten von 4 und 6 min mit dem Diodenlaser und die Anwendung mit und ohne Farbstoff untersucht wurden. Die Einwirkzeit des Photosensibilisators Toluidinblau lag bei 60 sec.

Anhand des optimierten Modells sollte versucht werden, ein Tiefenprofil der mit dem Testmikroorganismus besiedelten Dentintubuli darzustellen. Mit einem selbst entwickelten, vollständig autoklavierbaren Bohrständern gelang es, Bohrspanproben definierter Volumina aus drei unterschiedlich tiefen Schichten des Wurzeldentins zu entnehmen. Die Bohrschichten besaßen jeweils eine Dicke von 0,5 mm und lagen im Wurzeldentin in den Intervallen]0; 0,5] mm,]0,5; 1,0] mm und]1,0; 1,5] mm. Die aus dem Wurzeldentin isolierten Bohrspäne wurden in je 2 ml sterilem Medium aufgefangen und anschließend 100 µl der gewonnenen Bohrspansuspension auf Enterokokkenplatten ausplattiert. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die Auswertung anhand der gezählten koloniebildenden Einheiten. Die Auswertung erfolgte für die Infektionskontrollen durch Darstellung der absoluten Kolonienzahlen und für die Desinfektionsprüfkörper durch Angabe der verbliebenen Bakterien nach Desinfektion in Prozent. Hierbei war jeder Zahn seine eigene Kontrolle.

Mit Hilfe des so durchgeföhrten Bohrvorgangs war es möglich, ein Tiefenprofil mit fallender Tendenz in den Infektionskontrollen darzustellen. Es wurde festgehalten, dass sich in oberflächlichen Dentinschichten mehr Bakterien befanden, als in den tieferen Dentinschichten. Die Unterschiede bewegten sich innerhalb einer bis zwei \log_{10} Stufen.

Eine biologisch relevante Desinfektion durch die Herabsetzung der anfänglichen Bakterienkontamination um $3 \log_{10}$ Stufen konnte in keinem Versuch erzielt werden. Die Versuche, bei denen ohne Farbstoff belichtet wurde, ergaben, dass das Licht des Diodenlasers keinen negativen Einfluss auf das Überleben des Bakteriums *E. faecalis* nimmt.

Durch die Wirkung des Photosensitzers Toluidinblau auf den Testmikroorganismus ohne Belichtung wurde die bakterielle Anfangsinfektion auf Werte zwischen 22% und 42% reduziert. Der separat durchgeführte Versuch, bei dem der Einfluss verschiedener Farbstoffmengen auf *E. faecalis*-Suspensionen unterschiedlicher Konzentrationen getestet wurde, konnte jedoch eine antimikrobielle Wirkung nicht bestätigen. Bei den Proben, die mit Farbstoff und Licht behandelt wurden, konnte in der oberflächlichsten Dentinschicht eine Reduktion der anfänglichen Infektion auf 7% bzw. 9% beobachtet werden. In den beiden tieferen Bohrschichten konnte eine höhere bakterielle Kontamination beobachtet werden. Zu vermuten wäre, dass in der Tiefe des Dentins zu wenig Sauerstoff für die Reaktion der aPDT vorhanden war und damit kein suffizienter antimikrobieller Effekt durch reaktive Sauerstoffspezies auf den Mikroorganismus *Enterococcus faecalis* entstehen konnte.

Um eine Kontamination der Agarplatten mit *Bacillus subtilis*, ein natürlicherweise im Rinderzahn vorkommender, aerob wachsender Sporenbildner, zu vermeiden, entschied man sich für die Verwendung von speziellen Enterokokkenplatten. Der anfänglich verwendete Trypticase-Soy-Broth-Agar erlaubte das Wachstum des sterilisationsunempfindlichen Sporenbildners auf den Platten, wodurch die Ergebnisse unbrauchbar wurden. Durch die Verwendung von selektiven Enterokokken-Platten konnte eine problemlose Auswertung des *E. faecalis* Wachstums stattfinden.

8. Anhang

8.1. Labormaterialien und Reagenzien

Bakterien

Enterococcus faecalis ATCC 29212, bezogen vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Universität Regensburg

Agar

Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar (KAA-Agar), bezogen vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Klinikums der Universität Regensburg

42,7 g werden in 1 Liter Aqua dest. suspendiert, bis zum vollständigen Lösen erhitzt und 15 min bei 121 °C autoklaviert.

Typische Zusammensetzung in g pro 1 Liter Nährmedium:

- Caseinpepton 20,0 g
- Hefeextrakt 5,0 g
- Natriumchlorid 5,0 g
- Äsculin 1,0 g
- Natriumcitrat 1,0 g
- Ammoniumeisen(III)-citrat 0,5 g
- Natriumazid 0,15 g
- Kanamycinsulfat 0,02 g
- Agar 10,0 g

Gesamtmenge 42,7 g

Arbeitsschutz

Handschuhe: Sempermed, Semperit Technische Produkte (Wien, Österreich)

Mundschutz: Sentinex Lite El, Lohmann & Rauscher (Neuwied)

Handdesinfektion: Sterillium, Bode Chemie (Hamburg)

Flächendesinfektion: Ethanol 70%, Chemikalienausgabe Universität Regensburg

Aufbewahrung

Bechergläser: Schott Duran, Schott (Mainz)

Laborkühlschrank: FKS5002, Liebherr (Bulle, Schweiz)

Tiefkühlschrank: Forma -86 Freezer, Thermo Electron Corp. (Marietta, USA)

Messgeräte

Photometer: Ultrospec 3300 pro, Amersham Biosciences (Little Chalfont, GB)

Küvetten: 1,5 halbmikro Küvetten, 12,5 mm x 12,5 mm x 45 mm, Brand (Wertheim)

Messpipetten: Eppendorf (Hamburg)

Multi-Pipette: Eppendorf (Hamburg)

Analysenwaage: Sartorius (Göttingen)

Accu-Jet® pro: Brand (Wertheim)

Zahnstückherstellung

Schlachthof: Schlachthof Vion (Furth im Wald)

Sägemikrotom: 1600 Leitz (Wetzlar)

Mikromotor: K9, KAVO (Biberach/Riß)

Handstück: 10A KAVO Handstück 180C (Biberach/Riß)

Trennscheibe: Artikelnummer 196 090, Komet (Lemgo)

Wachsmesser: Artikelnummer 9001650, Henry Schein Dental Depot (Langen)

Chemikalien

Natriumchlorid: Artikelnummer 1.06406.1000, Merck (Darmstadt)

Trypticase-Soy-Broth: Becton & Dickinson (Sparks, USA)

Hefeextrakt: Bacto Yeast Extract, Becton & Dickinson (Sparks, USA)

Chloramin T Lösung: Artikelnummer 1.02426, Merck (Darmstadt)

Glycerin 87%: Artikelnummer 1.04094, Merck (Darmstadt)

Farbstofffluid: PACT Fluid Endo, cumdente (Tübingen)

Glutaraldehyd für Elektronenmikroskopie 2,5%, Nr. 23114, Serva (Heidelberg)

Sørensen-Phosphat-Puffer 0,1 M: aus Sørensen-Phosphat-Puffer 0,2 M mit Aqua bidest. 1:1 mischen

Herstellung des Sørensen-Phosphat-Puffer 0,2M

für 500 ml:

- 150 ml aus Lösung A:
13,61 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) in 500 ml Aqua bidest. lösen
- 850 ml aus Lösung B:
14,19 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) in 500 ml Aqua bidest. lösen

KH_2PO_4 : Artikelnummer 4873, Merck (Darmstadt)

Na_2HPO_4 : Artikelnummer 6586, Merck (Darmstadt)

Herstellung der Fixierung für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

für 50 ml:

- 25 ml 0,2 M Sørensen-Phosphat-Puffer
- 20 ml Aqua Millipore
- 5 ml 2,5% Glutaraldehyd

Verbrauchsmaterialien

PACT Light Guide Endo Ansätze: cumdente (Tübingen)

PalaDur Autopolymerisat: Heraeus-Kulzer (Hanau)

RelyX Unicem: 3M ESPE (Neuss)

Exstirpationsnadeln: ISO Gr. 35, VDW-Dental GmbH (München)

Zellstofftücher: Mehrzwecktücher, Novotex (Krefeld)

Petrischalen: Gr. 94/16 und Gr. 60/15 steril, Cellstar Greiner bio-one (Frickenhausen)

Eppendorfcups: Eppendorf (Hamburg)

Falcon tubes: 15 ml PP-Test tubes, 50 ml tubes, Cellstar Greiner bio-one (Poitiers, Frankreich)

Cryos: Cellstar Greiner bio-one (Poitiers, Frankreich)

Deckgläser: 15x15 Superior, Marienfeld (Königshofen)

Bohrer: 0,8 mm & 2,1 mm Rosenbohrer, Komet (Lemgo)

Wellplatten: Tissue Culture Cluster 12, Costar (Cambridge, USA)

Pipettenspitzen: 30 µl, 200 µl, 1000 µl, Sarstedt (Nümbrecht)

Stripetten: Cellstar greiner bio-one (Frickenhausen)

Skalpell: Feather Safety Razor Co. (Osaka, Japan)

Heißklebesticks: NO28194, Proxxon (Niersbach)

Parafilm: Pechiney (Düsseldorf)

10 ml-Spritzen: BD 10 ml Syringe, BD (Franklin Lakes, USA)

Kanülenaufsätze: Miraject PL Super, Hager & Werken (Duisburg)

Aluminium Stub: Provac (Oestrich-Winkel)

Leit-C-Plast: Provac (Oestrich-Winkel)

Sonstige Geräte

PACT-Laserhandstück: cumdente (Tübingen)

MilliQUFplus: Millipore (Molsheim, Frankreich)

Sterile Werkbank HF48: GelaireFlow Laboratories (Opera, Italien)

Zentrifuge: Universal 320, Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)

Polymerisationslampe: Optilux 400, Demetron (Danbury, USA)

Bohrständer: Mechanikwerkstatt Physik der Universität Regensburg

Heißklebepistole: HKP220, Proxxon (Niersbach)

Autoklav: Fedegari Autoclavi (Albuzzano, Italien)

Drigalski-Spatel Edelstahl rostfrei, Liferant VWR-Versand

Rüttler: IKA-Vibaax-VXR, Janke & Kunkel GmbH (Staufen)

Kapselanmischgerät: Silamat S3, Vivadent (Schaan, Fürstentum Liechtenstein)

Inkubator: B5060, Heraeus (Hanau)

Vortex: REAX2000, Heidolph (Schwabach)

Rasterelektronenmikroskop: FEI Quanta 400 FEG, FEI Deutschland GmbH (Frankfurt/Main)

Graphische Darstellung und statistische Auswertung

Sigma Plot Version 8.0, SPSS Inc. (Chicago, USA)

SPSS Version 18.0, SPSS Inc. (Chicago, USA)

8.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das elektromagnetische Wellenspektrum	5
Abbildung 2: Reaktionsmechanismen der Photosensibilisatormoleküle.....	7
Abbildung 3: Phenothiazin-Grundgerüst	9
Abbildung 4: Das verwendete Diodenlaser-Handstück mit Zubehör.....	24
Abbildung 5: Das Sägemikrotom zum Schneiden der Zahnstücke.....	28
Abbildung 6: Mit Kunststoff gesockelter Rinderzahn.....	28
Abbildung 7: Zahnschema zum Schneiden der Stücke a, b und c	29
Abbildung 8: Die drei Zahnstücke des Zahnes 767 nach der Autoklavierung in steriles Medium	29
Abbildung 9: Drei Zahnstücke eines Rinderzahnes in Petrischalen geklebt.....	31
Abbildung 10: Das steril verpackte Farbstofffluid vor der Verwendung.....	35
Abbildung 11: Der Belichtungsvorgang mit dem Laserhandstück	35
Abbildung 12: Der selbst entwickelte, vollständig autoklavierbare Bohrständer.....	37
Abbildung 13: Eine in der Petrischale befestigte Zahnstückhälfte kurz vor dem Bohrvorgang.....	37
Abbildung 14: Illustrierter Bohrvorgang	38
Abbildung 15: Der Bohrvorgang	40
Abbildung 16: Abspülen der Bohrspäne vom Zahnstück in die Petrischale.....	40
Abbildung 17: Drei Bohrspanproben aus den unterschiedlichen Bohrschichten in steriles Medium.	41
Abbildung 18: Anzahl der <i>E. faecalis</i> Kolonien in den Infektionskontrollen	45
Abbildung 19: Relative Kolonienzahlen nach der Desinfektion ohne/mit Farbstoff.....	46
Abbildung 20: Vergleich des <i>E. faecalis</i> Wachstums in der Suspension ohne und mit Farbstoff	48
Abbildung 21: Zahn 764 nach Durchlaufen eines Versuchszyklus mit Bakteriensuspension	49
Abbildung 22: Zahnstück 764 b im Längsschnitt	49
Abbildung 23: Zahnstück 764 c nach Desinfektion (1min Einwirkzeit des Farbstoffs, 6min belichtet)	50
Abbildung 24: Zahnstück 764 c im Längsschnitt	50
Abbildung 25: Zahnstück 770 c nach Behandlung mit dem Farbstoff für 60 sec ohne Belichtung.....	51
Abbildung 26: Vergleich der Enterokokken-Platten mit Caso-Platten	58

8.3. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
λ	Wellenlänge
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
5-ALA	5-Aminolävulinsäure
a	Sterilkontrolle
aPDT	antibakterielle photodynamische Therapie
b	Infektionskontrolle
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
c	Desinfektionsprüfkörper
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
Ca(OH) ₂	Calciumhydroxid
cm	Zentimeter
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
et al.	und andere
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
g	Gramm
gram-	gramnegativ
gram+	grampositiv
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
l	Liter
m	Meter

M	molar
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mW	Milliwatt
MPa	Megapascal
MTAD	MT Initiale des Entwickleres, T Tetracylin; A acid; D Detergens
NaCl	Natriumchlorid
NaOCl	Natriumhypochlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
O ₂	molekularer Sauerstoff
<i>P. micros</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
ROS	engl. Reactive Oxygen Species, Reaktive Sauerstoffspezies
<i>S. anginosus</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
sec	Sekunde
spp.	species pluralis
u.a.	unter anderem

9. Literaturverzeichnis

1. Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA: Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod* 2005, 31: 30–36.
2. Aggarwal R, Goel N, Chaudhary U, Kumar V, Ranjan KP: Evaluation of microbiocidal activity of superoxidized water on hospital isolates. *Indian J Pathol Microbiol* 2010, 53: 757–759.
3. Al-Ahmad A, Müller N, Wiedmann-Al-Ahmad M, Sava I, Hübner J, Follo M, Schirrmeister J, Hellwig E: Endodontic and salivary isolates of *Enterococcus faecalis* integrate into biofilm from human salivary bacteria cultivated *in vitro*. *J Endod* 2009, 35: 986–991.
4. Alexiades-Armenakas M: Laser-mediated photodynamic therapy. *Clin. Dermatol* 2006, 24: 16–25.
5. Alves E, Costa L, Carvalho CM, Tomé JP, Faustino MA, Neves M, Tomé AC, Cavaleiro JA, Cunha A, Almeida A: Charge effect on the photoactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiol* 2009, 9: 70.
6. Arias CA, Contreras GA, Murray BE: Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clin. Microbiol. Infect* 2010, 16: 555–562.
7. Augustin AJ, Schmidt-Erfurth U: Verteporfin therapy combined with intravitreal triamcinolone in all types of choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2006, 113: 14–22.
8. Babilas P, Landthaler M, Szeimies RM: Photodynamic therapy in dermatology. *Eur J Dermatol* 2006, 16: 340–348.
9. Babilas P, Schreml S, Landthaler M, Szeimies RM: Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art. *Photodermat Photoimmunol Photomed* 2010, 26: 118–132.
10. Bach G: *Laserzahnheilkunde*. Spitta Verlag GmbH & Co. KG, Balingen 2007.
11. Bergmans L, Moisiadis P, Huybrechts B, van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P: Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens *ex vivo*. *Int Endod J* 2008, 41: 227–239.
12. Bernhardt J: *Bacillus subtilis - Beschreibung und Charakterisierung*.
<http://microbio1.biologie.uni-greifswald.de:8080/institute/85>. 2000.
13. Biel MA: Photodynamic therapy of bacterial and fungal biofilm infections. *Methods Mol. Biol* 2010, 635: 175–194.
14. Bonsor SJ, Nichol R, Reid TMS, Pearson GJ: An alternative regimen for root canal disinfection. *Br Dent J* 2006, 201: 101–105.
15. Bonsor SJ, Nichol R, Reid TMS, Pearson GJ: Microbiological evaluation of photo-activated disinfection in endodontics (an *in vivo* study). *Br Dent J* 2006, 200: 337–341.
16. Boyce JM, Pittet D: Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *Am J Infect Control* 2002, 30: 1-46.

17. Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R: Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007, 21: 293–302.
18. Camargo CHR, Siviero M, Camargo SEA, Oliveira SHG de, Carvalho CAT, Valera MC: Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. *J Endod* 2007, 33: 422–426.
19. Chabrier-Roselló Y, Giesselman BR, Jesús-Andino FJ de, Foster TH, Mitra S, Haidaris CG: Inhibition of electron transport chain assembly and function promotes photodynamic killing of *Candida*. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol* 2010, 99: 117–125.
20. Chen M, Pennathur A, Luketich JD: Role of photodynamic therapy in unresectable esophageal and lung cancer. *Lasers Surg Med* 2006, 38: 396–402.
21. Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rössler R, Gutknecht NSA: Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci* 2009, 24: 681–688.
22. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP: Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999, 284: 1318–1322.
23. Dahl TA, Midden WR, Hartman PE: Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *J. Bacteriol* 1989, 171: 2188–2194.
24. Dahlén G, Samuelsson W, Molander A, Reit C: Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiol. Immunol* 2000, 15: 309–312.
25. Dai T, Huang YY, Hamblin MR: Photodynamic therapy for localized infections--state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2009, 6: 170–188.
26. Driks A: The bacillus spore coat. *Phytopathology* 2004, 94: 1249–1251.
27. Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL: Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* 2006, 32: 527–531.
28. Eldeniz AU, Ozer F, Hadimli HH, Erganis O: Bactericidal efficacy of Er,Cr:YSGG laser irradiation against *Enterococcus faecalis* compared with NaOCl irrigation: an *ex vivo* pilot study. *Int Endod J* 2007, 40: 112–119.
29. Epstein AK, Pokroy B, Seminara A, Aizenberg J: Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2011, 108: 995–1000.
30. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D: Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002, 35: 221–228.
31. Figdor D, Sundqvist G: A big role for the very small - understanding the endodontic microbial flora. *Aust Dent J* 2007, 52: S38-51.
32. Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, Tanner AC, Kent R, Doukas AG, Stashenko PP, Soukos NS: Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection *in vitro*. *J Endod* 2008, 34: 728–734.
33. Fonseca RB, Haiter-Neto F, Carlo HL, Soares CJ, Sinhoreti MA, Puppin-Rontani RM, Correr-Sobrinho L: Radiodensity and hardness of enamel and dentin of human and bovine teeth, varying bovine teeth age. *Arch. Oral Biol* 2008, 53: 1023–1029.

34. Foschi F, Fontana CR, Ruggiero K, Riahi R, Vera A, Doukas AG, Pagonis TC, Kent R, Stashenko PP, Soukos NS: Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals *in vitro*. *Lasers Surg Med* 2007, 39: 782–787.
35. Frank H: Electromagnetic Wave Spectrum.
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/15/Electromagnetic_spectrum_c.svg [Stand: 14.05.2011].
36. Garcez AS, Nuñez SC, Hamblin MR, Ribeiro MS: Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *J Endod* 2008, 34: 138–142.
37. Garcez AS, Núñez SC, Baptista MS, Daghastanli NA, Itri R, Hamblin MR, Ribeiro MS: Antimicrobial mechanisms behind photodynamic effect in the presence of hydrogen peroxide. *Photochem. Photobiol. Sci* 2011, 10: 483-490.
38. Garcez AS, Nuñez SC, Hamblin MR, Suzuki H, Ribeiro MS: Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: a preliminary report. *J Endod* 2010, 36: 1463–1466.
39. Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Núñez SC, Jorge AO, Hamblin MR: Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med* 2007, 39: 59–66.
40. Garcez AS, Núñez SC, Lage-Marques JL, Jorge AO, Ribeiro MS: Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* *in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006, 102: 93–98.
41. George S, Kishen A: Influence of photosensitizer solvent on the mechanisms of photoactivated killing of *Enterococcus faecalis*. *Photochem. Photobiol* 2008, 84: 734–740.
42. George S, Kishen A: Advanced noninvasive light-activated disinfection: assessment of cytotoxicity on fibroblast versus antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2007, 33: 599–602.
43. George S, Kishen A, Song KP: The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2005, 31: 867–872.
44. Gomes B, Pinheiro ET, Sousa EL, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ de: *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006, 102: 247–253.
45. Gomes B, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ: Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod* 2008, 34: 537–540.
46. Haidekker MA, Brady TP, Lichlyter D, Theodorakis EA: Effects of solvent polarity and solvent viscosity on the fluorescent properties of molecular rotors and related probes. *Bioorg. Chem* 2005, 33: 415–425.
47. Halkiotis K, Yova D, Pantelias G: *In vitro* evaluation of the genotoxic and clastogenic potential of photodynamic therapy. *Mutagenesis* 1999, 14: 193–198.
48. Harrison AJ, Chivatxaranukul P, Parashos P, Messer HH: The effect of ultrasonically activated irrigation on reduction of *Enterococcus faecalis* in experimentally infected root canals. *Int Endod J* 2010, 43: 968–977.

49. Hecker S: Desinfektion artifiziell infizierter boviner Wurzelkanäle *in vitro*. Dissertation, Universität Regensburg 2008222, Lehrstuhl für Zahnerhaltung und Parodontologie.
50. Huang Z, Xu H, Meyers AD, Musani AI, Wang L, Tagg R, Barqawi AB, Chen YK: Photodynamic therapy for treatment of solid tumors--potential and technical challenges. *Technol. Cancer Res. Treat* 2008, 7: 309–320.
51. Kaschke M: Optische Systeme - Anwendungen in Medizintechnik/LifeSciences. Vorlesung 4 Optische Visualisierung und Bildgebung: Navigierte Chirurgie und Fluoreszenzmethoden.
http://www.lti.uni-karlsruhe.de/rd_download/Skript_4d.pdf. [Stand: 14.02.2011].
52. Kaschke M: Optische Systeme - Anwendungen in Medizintechnik/LifeSciences. Vorlesung 5 Laser in der Medizintechnik I.
http://www.lti.uni-karlsruhe.de/rd_download/Skript_5d.pdf. [Stand: 14.02.2011].
53. Kaschke M: Optische Systeme - Anwendungen in Medizintechnik/LifeSciences. Vorlesung 6 Laser in der Medizintechnik II.
http://www.lti.uni-karlsruhe.de/rd_download/Skript_6d.pdf. [Stand: 14.02.2011].
54. Kayaoglu G, Ørstavik D: Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med* 2004, 15: 308–320.
55. Kim YG, Moon JT, Lee KM, Chon NR, Park H: [The effects of probiotics on symptoms of irritable bowel syndrome]. *Korean J Gastroenterol* 2006, 47: 413–419.
56. Konopka K, Goslinski T: Photodynamic therapy in dentistry. *J. Dent. Res* 2007, 86: 694–707.
57. Landthaler M, Hohenleutner U: Lasertherapie in der Dermatologie. Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2006.
58. Leclercq R: Epidemiological and resistance issues in multidrug-resistant staphylococci and enterococci. *Clin. Microbiol. Infect* 2009, 15: 224–231.
59. Lim Z, Cheng JL, Lim TW, Teo EG, Wong J, George S, Kishen A: Light activated disinfection: an alternative endodontic disinfection strategy. *Aust Dent J* 2009, 54: 108–114.
60. Mader T: Desinfektion artifiziell infizierter boviner Wurzelkanäle *in vitro* mittels eines klinisch etablierten Wirkstoffes. Dissertation in Vorbereitung, Universität Regensburg 2011, Lehrstuhl für Zahnerhaltung und Parodontologie.
61. Maisch T, Szeimies R, Jori G, Abels C: Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochem. Photobiol. Sci* 2004, 3: 907–917.
62. Maisch T, Wagner J, Papastamou V, Nerl HJ, Hiller KA, Szeimies R, Schmalz G: Combination of 10% EDTA, Photosan, and a blue light hand-held photopolymerizer to inactivate leading oral bacteria in dentistry *in vitro*. *J. Appl. Microbiol* 2009, 107: 1569–1578.
63. Maisch T, Szeimies R, Lehn N, Abels C: Antibakterielle photodynamische Therapie. Ein neues Verfahren zur Behandlung von oberflächlichen bakteriellen Infektionen? *Hautarzt* 2005, 56: 1048–1055.
64. Malik R, Manocha A, Suresh DK: Photodynamic therapy - A strategic review. *Indian J Dent Res* 2010, 21: 285–291.

65. Meire MA, Prijck K de, Coenye T, Nelis HJ, Moor RJ de: Effectiveness of different laser systems to kill *Enterococcus faecalis* in aqueous suspension and in an infected tooth model. *Int Endod J* 2009, 42: 351–359.
66. Minnock A, Vernon DI, Schofield J, Griffiths J, Parish JH, Brown SB: Mechanism of uptake of a cationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother* 2000, 44: 522–527.
67. Moan J: Properties for optimal PDT sensitizers. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol* 1990, 5: 521–524.
68. Moesby L, Hansen EW, Christensen JD, Høyer CH, Juhl GL, Olsen HB: Dry and moist heat sterilisation cannot inactivate pyrogenicity of Gram positive microorganisms. *Eur J Pharm Sci* 2005, 26: 318–323.
69. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T: Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998, 31: 1–7.
70. Mowatt G, N'Dow J, Vale L, Nabi G, Boachie C, Cook JA, Fraser C, Griffiths TR: Photodynamic diagnosis of bladder cancer compared with white light cystoscopy: Systematic review and meta-analysis. *Int J Technol Assess Health Care* 2011, 27: 3–10.
71. Murray BE: The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev* 1990, 3: 46–65.
72. Nair PN: On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J* 2006, 39: 249–281.
73. Neumeister B, Geiss HK, Braun RW, Kimmig P, Burkhardt F (Hrsg): *Mikrobiologische Diagnostik. Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie*. Thieme Verlag KG, Stuttgart 2009.
74. Newberry BM, Shabahang S, Johnson N, Aprecio RM, Torabinejad M: The antimicrobial effect of biopure MTAD on eight strains of *Enterococcus faecalis*: an *in vitro* investigation. *J Endod* 2007, 33: 1352–1354.
75. Ng R, Singh F, Papamanou DA, Song X, Patel C, Holewa C, Patel N, Klepac-Ceraj V, Fontana CR, Kent R, Pagonis TC, Stashenko PP, Soukos NS: Endodontic photodynamic therapy *ex vivo*. *J Endod* 2011, 37: 217–222.
76. Ohlow MJ, Moosmann B: Phenothiazine: the seven lives of pharmacology's first lead structure. *Drug discovery today* 2011, 16: 119–131.
77. Oxoid-Nährmedien-Handbuch (Hrsg): Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar (KAA-Agar), TN1217. Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar (KAA-Agar), TN1217.
78. Ozbek SM, Ozbek A, Erdorgan AS: Analysis of *Enterococcus faecalis* in samples from Turkish patients with primary endodontic infections and failed endodontic treatment by real-time PCR SYBR green method. *J Appl Oral Sci* 2009, 17: 370–374.
79. Phenothiazin-Ringsystem.
http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Phenothiazin-Ringsystem_farb.svg&filetimestamp=20070330231913. [Stand: 17.02.2011].
80. Pinheiro SL, Schenka AA, Neto AA, Souza CP de, Rodriguez HM, Ribeiro MC: Photodynamic therapy in endodontic treatment of deciduous teeth. *Lasers Med Sci* 2009, 24: 521–526.
81. Portenier I, Waltimo TM, Haapasalo M: *Enterococcus faecalis* – the root canal survivor and ‘star’ in posttreatment disease. *Endodontic Topics* 2003, 6: 135–159.

82. Raghavendra M, Koregol A, Bhola S: Photodynamic therapy: a targeted therapy in periodontics. *Aust Dent J* 2009, 54: 102–109.
83. Rôças IN, Siqueira JF, Santos KR: Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004, 30: 315–320.
84. Roth S, Feichtinger J, Hertel C: Characterization of *Bacillus subtilis* spore inactivation in low-pressure, low-temperature gas plasma sterilization processes. *J. Appl. Microbiol* 2010, 108: 521–531.
85. Schilke R, Lisson JA, Bauss O, Geurtzen W: Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch. Oral Biol* 2000, 45: 355–361.
86. Schirrmeister JF, Liebenow A, Braun G, Wittmer A, Hellwig E, Al-Ahmad A: Detection and eradication of microorganisms in root-filled teeth associated with periradicular lesions: an *in vivo* study. *J Endod* 2007, 33: 536–540.
87. Schmalz G, Hiller KA, Nunez LJ, Stoll J, Weis K: Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. *J Endod* 2001, 27: 23–30.
88. Sen BH, Piskin B, Demirci T: Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endod Dent Traumatol* 1995, 11: 6–9.
89. Sherman JM: The Enterococci and Related Streptococci. *J. Bacteriol* 1938, 35: 81–93.
90. Shigemoto M, Nakagawa K, Sakamoto JJ, Tsuchidai T: Thermal death of *Bacillus subtilis* spores in oil-water systems. *Biocontrol Sci* 2010, 15: 27–31.
91. Siqueira JF: Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 2001, 34: 1–10.
92. Siqueira JF, Araújo 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, 23: 499–502.
93. Soares JA, Roque Carvalho MA de, Cunha Santos SM, Mendonça RM, Ribeiro-Sobrinho AP, Brito-Júnior M, Magalhães PP, Santos MH, Macêdo Farias L de: Effectiveness of chemomechanical preparation with alternating use of sodium hypochlorite and EDTA in eliminating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod* 2010, 36: 894–898.
94. Sorokulova IB, Kirik DL, Pinchuk IV: Probiotics against *Campylobacter* Pathogens. *J Travel Med* 1997, 4: 167–170.
95. Sorokulova IB, Pinchuk IV, Denayrolles M, Osipova IG, Huang JM, Cutting SM, Urdaci MC: The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use. *Dig. Dis. Sci* 2008, 53: 954–963.
96. Soukos NS, Chen PS, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, Foschi F, Doucette S, Bammann LL, Fontana CR, Doukas AG, Stashenko PP: Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod* 2006, 32: 979–984.
97. Sousa EL de, Ferraz CRC, Gomes B de, Pinheiro ET, Teixeira FB, Souza-Filho FJ de: Bacteriological study of root canals associated with periapical abscesses. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003, 96: 332–339.
98. Souza LC, Brito PRR, Oliveira JMC de, Alves FFR, Moreira ELJ, Sampaio-Filho HR, Rôças IN, Siqueira JF: Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2010, 36: 292–296.

99. Souza RC, Junqueira JC, Rossoni RD, Pereira CA, Munin E, Jorge ACO: Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Lasers Med Sci* 2010, 25: 385–389.
100. Tabbene O, Kalai L, Ben Slimene I, Karkouch I, Elkahoui S, Gharbi A, Cosette P, Mangoni ML, Jouenne T, Limam F: Anti-*Candida* effect of bacillomycin D-like lipopeptides from *Bacillus subtilis* B38. *FEMS microbiology letters* 2011, 316: 108-114.
101. Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K, Schwarz F, Sculean A, Wang CY, Romanos G, Ishikawa I, Izumi Y: Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Periodontol. 2000 2009*, 51: 109–140.
102. Valduga G, Bertoloni G, Reddi E, Jori G: Effect of extracellularly generated singlet oxygen on gram-positive and gram-negative bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol* 1993, 21: 81–86.
103. Vankerckhoven V, Huys G, Vancanneyt M, Snauwaert C, Swings J, Klare I, Witte W, van Autgaerden T, Chapelle S, Lammens C, Goossens H: Genotypic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of human isolates and probiotic cultures constituting two intraspecific groups of *Enterococcus faecium* isolates. *Appl. Environ. Microbiol* 2008, 74: 4247–4255.
104. Wainwright M: Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J. Antimicrob. Chemother* 1998, 42: 13–28.
105. Wainwright M: Methylene blue derivatives--suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? *Int. J. Antimicrob. Agents* 2000, 16: 381–394.
106. Wainwright M, Phoenix DA, Marland J, Wareing DR, Bolton FJ: A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. *FEMS Immunol. Med. Microbiol* 1997, 19: 75–80.
107. Wainwright M, Byrne MN, Gattrell MA: Phenothiazinium-based photobactericidal materials. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol* 2006, 84: 227–230.
108. Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ: Antibacterial action of photoactivated disinfection {PAD} used on endodontic bacteria in planktonic suspension and in artificial and human root canals. *J Dent* 2006, 34: 363–371.
109. Wilson M: Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem. Photobiol. Sci* 2004, 3: 412–418.
110. Xu Y, Young MJ, Battaglino RA, Morse LR, Fontana CR, Pagonis TC, Kent R, Soukos NS: Endodontic antimicrobial photodynamic therapy: safety assessment in mammalian cell cultures. *J Endod* 2009, 35: 1567–1572.
111. Zeina B, Greenman J, Corry D, Purcell WM: Antimicrobial photodynamic therapy: assessment of genotoxic effects on keratinocytes *in vitro*. *Br. J. Dermatol* 2003, 148: 229–232.
112. Zhu X, Wang Q, Zhang C, Cheung GSP, Shen Y: Prevalence, phenotype, and genotype of *Enterococcus faecalis* isolated from saliva and root canals in patients with persistent apical periodontitis. *J Endod* 2010, 36: 1950–1955.
113. Zimmermann A, Ritsch-Marte M, Kostron H: mTHPC-mediated photodynamic diagnosis of malignant brain tumors. *Photochem. Photobiol* 2001, 74: 611–616.

10. Lebenslauf

Zur Person Stephanie Erb

Geboren am 16.06.1986 in München



Schulbildung

Sep 1992 – Jul 1996 Grundschule Halfing

Sep 1996 – Jun 2005 Luitpold-Gymnasium Wasserburg am Inn

Abitur im Juni 2005

Studium

Okt 2005 – Nov 2010 Universität Regensburg, Studium der Zahnmedizin

Vorphysikum im September 2006

Physikum im März 2008

Staatsexamen im November 2010

Approbation als Zahnärztin im Dezember 2010

Beruflicher Werdegang

Seit März 2011 Vorbereitungsassistentin an der Zahnärztlichen Tagesklinik Regensburg

11. Danksagung

Mit der Fertigstellung der Dissertationsschrift möchte ich einige Dankesworte an die Menschen richten, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. Gottfried Schmalz für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas und seine freundliche Unterstützung während der wissenschaftlichen Arbeit bedanken.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Karl-Anton Hiller, der meinen Kollegen Thomas Mader und mich von Anfang an, sei es bei der Entwicklung des Themas, über die praktischen Versuche bis hin zur statistischen Auswertung und dem Korrekturlesen kompetent und engagiert betreute. Durch seinen Einsatz und seine guten Ideen hat er maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ohne seine Betreuung wäre die zügige Fertigstellung dieser Arbeit nicht vorstellbar gewesen.

Auch an Frau Dr. Stephanie Hecker möchte ich ein Wort des Dankes richten, die uns mit tatkräftiger Unterstützung in das Thema einarbeitete und auch fortwährend betreute. Sie hatte stets hilfreiche Tipps für uns übrig.

Bedanken möchte ich mich auch bei einigen Mitarbeitern des Labors, Frau Claudia Waha, Frau Claudia Seidenader, Frau Christine Petzl und Frau Carola Bolay für die großzügige Bereitstellung unzähliger Labormaterialien und natürlich auch für ihre wertvollen praktischen Tipps bei den Versuchen, die uns das Arbeiten erleichterten. Herrn Andreas Eidt möchte ich besonders für die freundliche Aufnahme in seine Laborräumlichkeiten, für sein Engagement und Interesse für unser Thema und seine Unterstützung während des praktischen Teils der Arbeit danken. Des Weiteren möchte ich mich noch recht herzlich bei Frau Brigitte Bey für die Ermöglichung der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung und bildlichen Darstellung von zahlreichen Proben bedanken.

Ferner gilt mein Dank meinem Kollegen Thomas Mader für die produktive Zusammenarbeit, nicht nur während der Doktorarbeit, sondern auch in den fünf klinischen Semestern des Studiums. Durch unseren starken Zusammenhalt war ein gutes Vorankommen stets garantiert.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Freund für ihre Unterstützung während des Studiums und der Doktorarbeit bedanken. Dafür, dass sie mich in Momenten des Zweifels und Misserfolges ermutigt haben, und dafür, dass sie sich in Zeiten des Glücks und Erfolges mit mir gefreut haben. Durch regelmäßige Besuche zuhause kam ich zu kurzweiligen Ablenkungen und der notwendigen Erholung von der Arbeit. Ohne meine Eltern wären mir das Studium der Zahnmedizin und die Promotion nicht ermöglicht gewesen. Dass sie für meine Geschwister und mich alles Erdenkliche bereit zu geben sind und uns zu jeder Zeit unterstützend und liebevoll zur Seite stehen, weiß ich sehr zu schätzen. Die vorliegende Arbeit sei ihnen von Herzen gewidmet.