

**Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

**Modifikation eines hydraulischen Silikatzements (MTA)
durch Zusatz von Gentamicin – Freisetzung und
antimikrobielle Wirkung auf Biofilme zweier
endodontologisch pathogener Bakterienspezies *in vitro***

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Marisa Isabelle Berkesch

aus

München

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. dent.
Karin Christine Huth MME

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med Sören Schubert

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.10.2023

1	Einleitung	5
1.1	Endodontische Grundlagen	6
1.1.1	Epidemiologische Grundlagen	6
1.1.2	Erfolgs- und Überlebensraten endodontisch behandelter Zähne	7
1.2	Ätiologie und Pathogenese der endodontischen Erkrankung	9
1.2.1	Bakterielle Infektion des Pulpengewebes infolge kariöser Läsionen	9
1.2.2	Apikale Parodontitis	10
1.2.2.1	Apikale Parodontitis nach endodontischer Primärtherapie	11
1.2.3	Mikrobiologie des Wurzelkanalsystems	11
1.2.3.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	13
1.2.3.2	<i>Parvimonas micra</i>	14
1.3	Die endodontische Therapie, Materialien und Behandlungskonzepte	16
1.3.1	Vergleiche und Diskrepanzen der Behandlungskonzepte und Methoden in der Wissenschaft	16
1.3.2	Aufbereitung des Wurzelkanalsystems	18
1.3.2.1	Spüllösungen	19
1.3.2.2	Medikamentöse Einlagen	24
1.3.3	Obturation des Wurzelkanalsystems	26
1.3.4	Möglichkeiten der sekundären endodontischen Behandlung	27
1.3.5	Verwendete Materialien	29
1.3.5.1	MTA – Mineral Trioxide Aggregate	29
1.3.5.2	Gentamicin	31
1.4	Gründe für Misserfolg der endodontischen Behandlung	33
1.4.1	Fehlerquellen aus Behandlungsabläufen	33
1.4.2	Undichtigkeiten	35
1.4.3	Mikrobielle Ursachen und Persistenz der Bakterien	36
2	Ziel der Studie	38
3	Material und Methode	39
3.1	Gentamicin-Freisetzung aus Zementproben	40
3.1.1	Versuchsaufbau und Probenentnahmen	40
3.1.2	Assay und Auswertungsmethode	42
3.2	Grundlagen der Bakterienanzucht	45
3.2.1	Nährmedien, Erstanzucht und Stammerhaltung	45
3.2.2	Inkubation und Wachstum	46
3.3	Gentamicin-Etest	48
3.4	Rinderzahnextraktion und -aufbereitung	51
3.5	Biofilmanzucht	53

3.5.1	<i>Enterococcus faecalis</i> -Biofilmanzucht	53
3.5.2	<i>Parvimonas micra</i> -Biofilmanzucht.....	54
3.6	Zementprobenherstellung	56
3.7	Kontaktversuch zwischen gentamicinhaltiger Zementprobe und biofilmbewachsenen Dentinplättchen	57
3.8	Der Effekt der Zementproben auf den Biofilm	59
3.8.1	Verdünnungsreihe und Koloniedarstellung	59
3.8.2	Auswertungsmethode des Biofilmversuchs	61
3.8.3	Statistische Auswertung.....	62
4	Ergebnisse.....	64
4.1	Gentamicinfreisetzung aus MTA	64
4.2	Minimum Inhibitory Concentration (MIC)	66
4.3	Bakterienreduktion im Dentinbiofilm durch gentamicinhaltiges MTA	67
4.3.1	Auswertung der Bakterienreduktion im <i>E. faecalis</i> -Biofilm	67
4.3.2	Auswertung der Bakterienreduktion im <i>P. micra</i> -Biofilm.....	68
5	Diskussion	71
6	Zusammenfassung.....	77
7	Literaturverzeichnis	80
8	Abbildungsverzeichnis	108
9	Tabellenverzeichnis	109
10	Verzeichnis der verwendeten Materialien und Rezepte.....	110
11	Danksagung	112
12	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung

Vor allem in der Endodontie als Teilbereich der Zahnmedizin erscheint es sehr schwierig, den Erfolg einer Therapie zu definieren. Der Therapieerfolg ist multifaktoriell und unter anderem abhängig von angewandten Methoden (Card, Sigurdsson *et al.* 2002, Chugal, Clive *et al.* 2003), dem Geschick des Behandlers (Sipaviciute und Maneliene 2014, Pedro, Marques *et al.* 2016), der Qualität der Wurzelkanalfüllung (Siqueira, Rocas *et al.* 2005), dem Verschluss des Zahnes nach endodontischer Behandlung (Ray und Trope 1995, Pedro, Marques *et al.* 2016) oder der Keimelimination im Wurzelkanalsystem (Schirrmeyer, Liebenow *et al.* 2007, Zhang, Hou *et al.* 2012). Zudem ist die Bestimmung der eigentlichen Definition des „Erfolgs“ unklar und variiert in den wissenschaftlichen Studien. Die Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK) veröffentlichte im Jahr 2000 eine Stellungnahme, in der eine Kategorisierung für die Einordnung eines Erfolgs oder Misserfolgs einer Wurzelkanalbehandlung aufgestellt wurde. Daraus können numerische Erfolgsraten ermittelt, aber auch Prognosen über den endodontisch behandelten Zahn gestellt werden (Weiger, Geurtsen *et al.* 2000). Bei Misserfolg der initialen Behandlung ist die Revision, also die erneute Eröffnung, Desinfektion und Füllung des Wurzelkanalsystems, die routinemäßige Vorgehensweise (He, White *et al.* 2017). Der Erfolg der Revision korreliert maßgeblich mit der bakteriellen Persistenz (Nair, Sjogren *et al.* 1990, Lin, Skribner *et al.* 1992, Sjogren, Figdor *et al.* 1997), wobei das Bakterium *Enterococcus faecalis* eine entscheidende Rolle bei reinfizierten Zähnen aufweist (Rocas, Siqueira *et al.* 2004) sowie der Anaerobier *Parvimonas micra* wesentlich an der primären Entstehung beteiligt ist (Ji, Li *et al.* 2014). Es stellt sich die Frage, ob eine gezielte Elimination dieser beiden Keime zu höheren Erfolgsquoten der endodontischen Behandlung führen könnte. In dieser Studie sollen die Grundlagen zu dieser Fragestellung ermittelt werden.

1.1 Endodontische Grundlagen

In der Zahnheilkunde liegt der Fokus auf zahlreichen Aspekten der oralen Gesundheit, wobei der Schwerpunkt der konservierenden Zahnmedizin der Erhalt der natürlichen Zähne ist (DeVan 1952). Hierbei ist die Wurzelkanalbehandlung die Standardbehandlung für den Versuch des Zahnerhalts (Doyle, Hodges *et al.* 2006). Die endodontische Behandlung umfasst die chemomechanische Bearbeitung des Wurzelkanalsystems mit dem Ziel der Säuberung und Desinfektion (Sipaviciute und Maneliene 2014) und einem keimarmen Kanal als erwünschtes Endergebnis. Dieses Endergebnis ist abhängig von einigen Faktoren, die letztlich den Erfolg der Therapie bestimmen. Allerdings herrscht Einigkeit in wissenschaftlichen Studien, dass der Bakterienbefall sowohl für eine primäre als auch eine Reinfektion der entscheidende Faktor ist (Kakehashi, Stanley *et al.* 1965, Nair, Sjogren *et al.* 1990, Lin, Skribner *et al.* 1992, Siqueira 2001).

1.1.1 Epidemiologische Grundlagen

Während die wissenschaftliche Literatur im endodontischen Bereich eine große Auswahl an experimentellen, technischen und klinischen Studien aufweist, besteht ein vergleichbar minimaler Teil aus epidemiologischen Daten (Eriksen, Kirkevang *et al.* 2002). Eriksen und Mitarbeiter stellten dies im Jahr 2002 numerisch dar. Während im Zeitraum zwischen 1991 und 2000 in drei der wichtigsten endodontischen Fachzeitschriften in den Bereichen experimentell, technisch und klinisch insgesamt 2246 Studien veröffentlicht wurden, gab es im Bereich der Epidemiologie 25 Publikationen (Eriksen, Kirkevang *et al.* 2002). In mancher Literatur wird die endodontische Behandlung als die klinische Prozedur zur Behandlung und Prävention von apikaler Parodontitis definiert (Tronstad 1992, Chugal, Mallya *et al.* 2017). Epidemiologisch ergibt sich dadurch eine Prävalenz von apikaler Parodontitis nach endodontischer Behandlung von 30% bis zu 65% (Ray und Trope 1995, Weiger, Hitzler *et al.* 1997, De Moor, Hommez *et al.* 2000, Tronstad, Asbjornsen *et al.* 2000, Segura-Egea, Jimenez-Pinzon *et al.* 2004, Siqueira, Rocas *et al.* 2005, Kirkevang, Vaeth *et al.* 2006, Stassen, Hommez *et al.* 2006, Sunay, Tanalp *et al.* 2007, Georgopoulou, Spanaki-Voreadi *et al.* 2008, Tavares, Bonte *et al.* 2009, Siqueira 2010), wobei die Tendenz zu den höheren Prozentsätzen geht, wie in einer Querschnittstudie aus verschiedenen Ländern ermittelt wurde. Die Spannweite

dieser Zahlen könnte einen kulturellen Hintergrund suggerieren (Kamberi, Hoxha *et al.* 2011), möglicherweise aufgrund des technischen Standards (Eckerbom, Andersson *et al.* 1989) oder der Qualität der zahnmedizinischen Ausbildung (De Moor, Hommez *et al.* 2000). In einer 1997 veröffentlichten deutschen Studie von Weiger und Mitarbeiter wurde röntgenologisch eine Prävalenz von prätherapeutischer apikaler Parodontitis von 88% festgestellt. Dieselbe Studie ergab, dass bei 56% der untersuchten Menschen jeder Patient mindestens einen Zahn mit Wurzelkanalfüllung, Pulpanekrose oder irreversibler Pulpitis aufwies (Weiger, Hitzler *et al.* 1997).

1.1.2 Erfolgs- und Überlebensraten endodontisch behandelter Zähne

Innerhalb der publizierten Erfolgsraten besteht eine noch höhere Schwankung. Einerseits kann die oben genannte Prävalenz von apikaler Parodontitis umgekehrt und daraus die Erfolgsrate entnommen werden, die demzufolge bei 35-70% läge. Andererseits werden Zahlen von bis zu 95% genannt (Kerekes und Tronstad 1979, Sjögren, Hägglund *et al.* 1990, Imura, Pinheiro *et al.* 2007, Siqueira, Rocas *et al.* 2008), diese stammen allerdings zumeist von endodontischen Spezialisten oder aus Lehrinstitutionen. Um aus diesen Zahlen eine Aussage treffen zu können, müssen die vielen unterschiedlichen Kriterien, die in wissenschaftlichen Studien angewandt werden, in Betracht gezogen werden. Es wird zwischen „success rate“, also die Erfolgsrate, und „survival rate“, also die Überlebensrate, unterschieden (Pak, Fayazi *et al.* 2012). Es stellt sich die Frage, ob ein „überlebender“ Zahn mit behandlungswürdiger apikaler Erkrankung als Erfolg gewertet werden kann (Siqueira 2010). Dazu hat Siqueira klar Stellung bezogen und stellt fest, dass eine apikale Radioluzenz als Versagen der Behandlung zu werten ist (Siqueira, Rocas *et al.* 2005). Häufig werden die Kriterien kaum spezifiziert oder beschrieben. Zum Teil wird nach „geheilt“, „heilend“ und „nicht heilend“ unterschieden (Doyle, Hodges *et al.* 2006), wobei verschiedene Gruppierungen von „geheilt“ und „heilend“ zu verschiedenen Erfolgsraten führen.

Zumeist wird die röntgenologische Diagnostik zur Beurteilung verwendet (Frisk und Hakeberg 2005). Häufig wurde das Orthopantomogramm (OPG) gewählt, um daraus die Anzahl an wurzelkanalgefüllten Zähnen sowie periapikalen Radioluzenzen zu ermitteln (Eriksen und Bjertness 1991, Frisk und Hakeberg 2005). De Moor kombinierte Röntgen mit der Betrachtung der koronalen Restauration (De Moor,

Hommez *et al.* 2000), generell ein häufig betrachtetes Kriterium (Ray und Trope 1995, Tronstad, Asbjornsen *et al.* 2000, Siqueira, Rocas *et al.* 2005, Georgopoulou, Spanaki-Voreadi *et al.* 2008, Pedro, Marques *et al.* 2016). Eine weitere Methode ist die Ermittlung des periapikalen Index (PAI) zur weiterführenden Beurteilung der periapikalen Radioluzenz (Eriksen und Bjertness 1991, Kirkevang, Vaeth *et al.* 2006). Kist und Mitarbeiter kombinierten röntgenologische und klinische Kriterien für die Bewertung (Kist, Kollmuss *et al.* 2017).

Die studienübergreifende Interpretation und Beurteilung des Erfolgs und der Heilung nach endodontischer Behandlung ist nicht eindeutig. Doyle und Mitarbeiter stellten in der 2006 veröffentlichten Querschnittstudie die Frage, ob die Notwendigkeit der Durchführung einer „erfolgreichen“ Revision mit Heilung als initialer Misserfolg oder als gelungener, erkrankungsfreier Erhalt eines Zahnes und dadurch als „erfolgreiche“ Wurzelkanalbehandlung zu bewerten ist (Doyle, Hodges *et al.* 2006). Auch fällt auf, dass Ergebnisse aus Querschnittstudien aus verschiedenen epidemiologischen Populationen sich zum Teil erheblich von Ergebnissen aus Langzeitstudien aus einer Population unterscheiden (Thoden van Velzen 2005, Siqueira 2010, Pak, Fayazi *et al.* 2012), was jedoch lange Zeit wenig beachtet wurde. Die umfangreiche Kritik an endodontischen Studien wird nun seit einigen Jahren in verschiedenen Reviews thematisiert (Ng, Mann *et al.* 2007, Siqueira 2010, Pak, Fayazi *et al.* 2012).

Es ergeben sich zwei wesentliche Schlussfolgerungen. Zum einen wird das Bewusstsein erhöht, dass Studien im Bereich der endodontischen Epidemiologie und deren Hintergründe in essentiellen Aspekten kritisch zu betrachten sind. Zum anderen wird festgestellt, dass endodontische Behandlungen generell drastisch verbesserungswürdig sind.

1.2 Ätiologie und Pathogenese der endodontischen Erkrankung

Die Ätiologie einer endodontischen Erkrankung ist multifaktoriell, sie basiert jedoch letztendlich auf Entzündungsprozessen im Pulpengewebe (Kim 1985, Siqueira 2011). Es muss zwischen infizierten und nicht infizierten Entzündungsprozessen unterschieden werden, da eine bakterielle Infektion einen maßgeblichen Effekt auf den Erfolg einer endodontischen Behandlung aufweist (Bystrom, Happonen *et al.* 1987, Sjögren, Hägglund *et al.* 1990, Siqueira 2005). Es ist erwiesen, dass in einem bakteriell nicht infizierten Wurzelkanal keine apikale Parodontitis entsteht (Moller, Fabricius *et al.* 2004). Ursachen für nicht infizierte Entzündungen sind beispielsweise Pulpitiden aufgrund traumatischer Zahnpräparation, die plötzliche und drastische Veränderungen der Pulpa zur Folge haben (Kim 1985). Ebenfalls können iatrogen hervorgerufene Eröffnungen der Pulpa eine Ursache für eine notwendige endodontische Behandlung sein (Langeland 1987). Darüber hinaus sind kombinierte Läsionen des Parodonts und des Endodonts zu nennen, die beispielsweise durch geschlossenes Zahntrauma (Wittgow und Sabiston 1975) aber auch infektiös durch Eindringen von Erreger über Strukturen des Parodonts zur endodontischen Erkrankung führen (Hiatt 1977, Kipioti, Nakou *et al.* 1984, Adriaens, De Boever *et al.* 1988).

1.2.1 Bakterielle Infektion des Pulpengewebes infolge kariöser Läsionen

Die Ursachen endodontischer Erkrankungen sind überwiegend mit bakterieller Infektion assoziiert (Kakehashi, Stanley *et al.* 1965, Moller, Fabricius *et al.* 2004, Athanassiadis, Abbott *et al.* 2007). Karies zählt nach wie vor zu den häufigsten Erkrankungen des Menschen (Langeland 1987). Kariöse Läsionen sind die Hauptursache für infizierte entzündliche Prozesse der Pulpa, da sie untherapiert eine beständige, kontinuierliche Quelle für Bakterien, deren Virulenzfaktoren und Toxine darstellen (Siqueira 2011). Das Keimspektrum der caries profunda und die klinische Relevanz werden immer weiter erforscht (Rocas, Lima *et al.* 2015). Generell ist der Entzündungsverlauf in den meisten Fällen langsam und schrittweise (Cvek, Cleaton-Jones *et al.* 1982, Kim 1985, Langeland 1987). Sukzessive erfolgt ein Übergang von einer irreversiblen Pulpitis zur Nekrose. Teilnekrosen von koronal nach apikal führen letztendlich zur vollständigen Nekrose der Pulpa (Kim 1985, Yu und Abbott 2007, Siqueira 2011). Es sind verschiedene Stadien zu beobachten, da eine bakterielle Infektion oder Teilnekrose der koronalen Pulpa noch nicht zwingend eine

Entzündung des radikulären Teils der Pulpa bedeuten muss (Langeland 1987, Siqueira 2011). Unbehandelt führt eine vollständige Nekrose infolge caries profunda zur apikalen Parodontitis (Siqueira 2011).

1.2.2 Apikale Parodontitis

Eine nach apikal vollständig nekrotisierte und infizierte Pulpa bildet eine apikale Parodontitis aus (Langeland 1987, Yu und Abbott 2007, Siqueira 2011). Diese ist üblicherweise zunächst symptomatisch und akut, wobei die Ausprägung der Symptomatik variieren kann und wiederum bakteriell bedingt ist. Einige Studien zeigen deutliche Zusammenhänge zwischen gewissen Bakterienstämmen und klinischen Symptomen und Schmerzarten (Gomes, Drucker *et al.* 1994, Gomes, Lilley *et al.* 1996, Gomes, Pinheiro *et al.* 2004, Qi, Cao *et al.* 2016). In manchen Fällen kann es zur Ausbildung eines akuten apikalen Abszesses mit den charakteristischen Symptomen Schmerz, Schwellung oder einer Kombination daraus kommen (Siqueira, Rocas *et al.* 2001). Der akute apikale Abszess hat das Potential, sich in die Logen des Hals-Kopf-Bereichs oder in andere fasziale Bereiche des Gesichtes auszubreiten und kann dadurch gefährlich oder gar lebensbedrohlich werden (Williams, McCann *et al.* 1983, Siqueira, Rocas *et al.* 2001, de Sousa, Ferraz *et al.* 2003). Meistens jedoch führt eine unbehandelte symptomatische apikale Parodontitis zur chronischen, asymptomatischen apikalen Parodontitis. Siqueira stellt dies in seinem 2011 veröffentlichten Buch klar. Für ihn gilt als Fazit, dass unbehandelte Karies zur apikalen Parodontitis führt (Siqueira 2011), also der beschriebene ätiologische Verlauf der Häufigste ist.

Es ist bewiesen, dass eine apikale Erkrankung nicht selbstständig und ohne Intervention heilt (Kakehashi, Stanley *et al.* 1965, Kirkevang, Vaeth *et al.* 2006) und somit eine Therapie klar indiziert ist. Die chemomechanische endodontische Therapie (Sipaviciute und Maneliene 2014) umfasst die Erweiterung des Kanals über einen koronalen Zugang mit mechanischer Entfernung von Debris und infiziertem Gewebe sowie die chemische Desinfektion des Kanals im Sinne der Aufbereitung des Wurzelkanalsystems (Bystrom, Happonen *et al.* 1987). Der aufbereitete Kanal wird verschlossen, indem das gesamte Wurzelkanalsystem ordnungsgemäß und dreidimensional unter Beachtung der Länge und Dichtigkeit mit gängigen Fülltechniken obturiert wird (Reader, Himel *et al.* 1993, Yucel, Guler *et al.* 2006).

1.2.2.1 Apikale Parodontitis nach endodontischer Primärtherapie

Besonderes Augenmerk ist auf die apikale Parodontitis zu legen, die nach abgeschlossener Primärbehandlung entsteht. Wie bereits genannt, ist deren Prävalenz unumstritten hoch und ätiologisch durch Präsenz von Bakterien begründbar. Wissenschaftliche Studien geben hier zwei grundsätzliche Hypothesen an, wie diese Präsenz genau zu erklären ist. Eine Theorie beruht auf der Annahme, dass bestehende Bakterien bei endodontischer Therapie nicht vollständig oder ausreichend entfernt werden (Rôças, Hülsmann *et al.* 2008). Die andere Theorie besagt, dass Bakterien in das Wurzelkanalsystem während oder nach der Behandlung eindringen oder iatrogen eingebracht werden (Sundqvist, Figdor *et al.* 1998, Gomes, Berber *et al.* 2015, Estrela, Pécora *et al.* 2017). Beide Theorien führen schließlich zu Bakterien im Wurzelkanalsystem, dem entscheidendsten Faktor für Misserfolg.

1.2.3 Mikrobiologie des Wurzelkanalsystems

Eine apikale Parodontitis kann zum einen nicht ohne Bakterien entstehen und zum anderen wird darüber meist der Erfolg der Behandlung definiert. Ein erheblicher Teil endodontischer Studien wurden in Bereichen der Mikrobiologie durchgeführt. Überdeutlich ist die häufig zitierte, entscheidende Studie von Kakehashi und Mitarbeiter, die bereits 1965 im Tierversuch mit Ratten mit komplett exponierter Pulpa darstellen konnten, dass steriles, bakterienfreies Umfeld weder Schaden an der Pulpa noch Abszedierung oder apikale Entzündung hervorgerufen hat. Dies steht im klaren Gegensatz zu den konventionell, nicht steril gehaltenen Ratten mit komplett eröffneter Pulpa, bei denen Schäden an der Pulpa klar ersichtlich waren (Kakehashi, Stanley *et al.* 1965). Auch die aktuellere Forschung bestätigt, dass ohne Bakterienpräsenz keine Infektion und keine apikale Parodontitis entsteht (Moller, Fabricius *et al.* 2004). Die Geschichte der mühsamen Entwicklung der endodontischen Behandlung wurde 1997 von Spangberg vorgetragen, auch wie das Verständnis über die visuell „gut“ ausgeführte Wurzelbehandlung hinaus in Richtung Verständnis für die Rolle des Mikrobioms wuchs (Spangberg 1998). Eine röntgenologisch gute Wurzelfüllung steht nicht für gute Endodontie (Ricucci und Langeland 1998). In der Forschung ist man sich einig, dass der periapikale Zustand vor der Therapie direkt mit dem Erfolg der Behandlung korreliert (Sjögren, Hägglund *et al.* 1990). Auch ist mehrfach nachgewiesen, dass persistierende Bakterien

maßgeblich verantwortlich für periapikale Entzündungen sind (Nair, Sjogren *et al.* 1990, Lin, Skribner *et al.* 1992, Ricucci und Siqueira 2010), während die Länge der Wurzelfüllung nicht immer ausschlaggebend ist (Lin, Skribner *et al.* 1992). Ebenfalls soll der Fokus auf mikrobielle Ursachenfindung gelegt werden, wenn apikale Läsionen bestehen beziehungsweise nicht heilen (Bystrom, Happonen *et al.* 1987). Somit wird die Prognose und die Heilung deutlich verbessert, wenn der Fokus auf maximale Bakterienentfernung vor der Obturation gelegt wird (Sjogren, Figdor *et al.* 1997). Die genannten Studien behandeln verschiedene Aspekte der Aussage, dass der Erfolg der endodontischen Behandlung mit der Keimelimination steht und fällt. Gleichzeitig ist erforscht, dass es nicht möglich ist, hundertprozentige Keimfreiheit zu erlangen, da nicht hundert Prozent des Kanalsystems gesäubert werden können (Siqueira, Araujo *et al.* 1997, Ricucci und Langeland 1998, Mancini, Armellini *et al.* 2009). Daher muss die Notwendigkeit der Einhaltung der Behandlungsschritte und -konzepte betont werden, durch die alle Möglichkeiten der Keimelimination ausgeschöpft werden sollen.

Es wurde festgestellt, dass bakterielle Infektion im Wurzelkanal in Form eines komplexen Biofilms vorkommt (Carr, Schwartz *et al.* 2009). In diesem Biofilm sind grampositive und gramnegative Spezies, Kokken, Stäbchen und andere Formen mikroskopisch erkennbar (Nair 1987, Nair, Sjogren *et al.* 1990, Carr, Schwartz *et al.* 2009). Bakterien als Biofilmkomplex sind aus einer Vielzahl von Gründen viel schwieriger zu entfernen (Kishen 2010, Siqueira, Rôças *et al.* 2010). Beispielsweise ist die Wirkung von Antibiotika signifikant vermindert, wobei die Gründe wahrscheinlich auf zellulären Widerstand durch den Aufbau des Biofilms zurückzuführen sind (Nichols, Evans *et al.* 1989, Vraný, Stewart *et al.* 1997, Anderl, Franklin *et al.* 2000). Auch die Wirkung von in der Endodontie verwendeten antimikrobiellen Lösungen ist verändert, wobei Natriumhypochlorit gegen *E. faecalis*-Biofilm wirksam war (Chávez de Paz, Bergenholtz *et al.* 2010), in einer anderen Studie aber keine vollständige Keimelimination erzeugen konnte (Tagelsir, Yassen *et al.* 2016). Huth und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass Natriumhypochlorit und CHX sowohl gegen *P. micra* als auch *E. faecalis* als Biofilmkomplex wirksam waren, gleichzeitig geht aus der 2011 durchgeführten Studie die Divergenz zwischen Keimelimination einiger Reinkulturen gegen Elimination derselben Bakterien als Biofilmkomplex hervor (Huth, Quirling *et al.* 2009, Huth, Quirling *et al.* 2011). Ein gut erforschtes Spülprotokoll, wie die Kombination aus Natriumhypochlorit und EDTA,

kann jedoch signifikant Biofilm im Wurzelkanal vermindern (Ozdemir, Buzoglu *et al.* 2010).

Verschiedene Krankheitsstadien eines Wurzelkanals weisen unterschiedliche Mikroorganismen auf. So zeigten primär infizierte, also unbehandelte Zähne mit nekrotischer Pulpa eine Vielfalt von Keimen, grampositive und gramnegative, jedoch größtenteils anaerobe Bakterien (Gomes, Pinheiro *et al.* 2004, Sassone, Fidel *et al.* 2008, Gomes, Sarkis-Onofre *et al.* 2013). Sekundär infizierte Zähne, also endodontisch behandelte Zähne mit apikaler Infektion, zeigten häufig grampositive, fakultative Anaerobier (Molander, Reit *et al.* 1998, Sundqvist, Figdor *et al.* 1998, Gomes, Pinheiro *et al.* 2004). Als diagnostisch zu beachtender Fall werden durch Trauma nekrotisierte Zähne genannt, da in der Studie im Großteil der Wurzelkanäle Infektionen bestanden und häufig opportunistische Keime aus der physiologischen Mundflora vorkamen (Wittgow und Sabiston 1975). Dies erfordert wiederum Bewusstsein für die Therapie bei Diagnose mit Bakterienbefall.

Die meisten Studien nennen entsprechend der Diagnose dieselben isolierten Bakterienspezies. Vielfach wurde belegt, dass *E. faecalis* bei misslungener endodontischer Behandlung der prädominante Keim ist, mit Prävalenzen bis zu 78% (Molander, Reit *et al.* 1998, Sundqvist, Figdor *et al.* 1998, Siqueira und Rocas 2004). Als häufigster Anaerobier wurde *Parvimonas micra* isoliert, vor allem aus primären Infektionen (Bystrom und Sundqvist 1981, Gomes, Pinheiro *et al.* 2004, Gajan, Aghazadeh *et al.* 2009). Im Folgenden wird speziell auf diese beiden für die Forschungsarbeit relevanten Keime eingegangen.

1.2.3.1 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis gehört zu den fakultativ anaeroben, grampositiven Kokken (Molander, Reit *et al.* 1998, Gomes, Pinheiro *et al.* 2004). Die Tatsache, dass diese Spezies bei apikaler Parodontitis besteht, aber sehr selten bis nicht in primären Infektionen, suggeriert ein Eindringen in das Kanalsystem während endodontischer Behandlung (Sundqvist, Figdor *et al.* 1998, Kist, Kollmuss *et al.* 2017). Der Keim ist vor allem mit asymptomatischen apikalen Infektionen assoziiert (Rocas, Siqueira *et al.* 2004). *E. faecalis* ist habituell ein Gastrointestinalkeim und ist vorwiegend in humanem Stuhl zu finden (Noble 1978, Benno, Suzuki *et al.* 1986). Enterokokken konnten oral sowohl in Speichel (McCrary, Streckfuss *et al.* 1989) als auch in Plaque (Smyth, Halpenny *et al.* 1987) nachgewiesen werden. Die hohe Prävalenz in

sekundären Infektionen suggeriert Schwierigkeiten bei der Elimination. Fakultative Anaerobier sind schwieriger zu eliminieren als Anaerobier (Moller, Fabricius *et al.* 2004). *E. faecalis* ist sehr widerstandsfähig gegen den antimikrobiellen Effekt von Calciumhydroxid (Bystrom, Claesson *et al.* 1985, Haapasalo und Orstavik 1987). Auch das für *E. faecalis* nachgewiesene tiefe Eindringen in die Dentintubuli erschwert die Elimination (Siqueira, De Uzeda *et al.* 1996). Ferner sind Resistenzen gegen einige Antibiotika erwiesen, auch außerhalb des Biofilms (Dahlen, Samuelsson *et al.* 2000). *E. faecalis* hat eine hohe Infektionsgeschwindigkeit (Haapasalo und Orstavik 1987) und kann lange ohne Nährstoffe bestehen (Orstavik und Haapasalo 1990). Eine detaillierte Studie von Figdor und Mitarbeiter hat erwiesen, dass *E. faecalis* in kleinsten Mengen ohne Nährstoffe und unter schwierigsten Bedingungen über Monate nicht nur überlebte, sondern sich durch Zugang zu Nährstoffen sogar erholen und vermehren konnte (Figdor, Davies *et al.* 2003). Selbst ausgehungerte Zellen können nachweislich einen Biofilm bilden (Liu, Wei *et al.* 2010). Mit diesem Mechanismus kann eine apikale Infektion eintreten und bestehen, auch nach langer Zeit (Figdor, Davies *et al.* 2003). Zugleich kann der Keim als Monokultur im Wurzelkanal bestehen, im Gegensatz zu anderen endodontischen Keimen (Fabricius, Dahlen *et al.* 1982) Der Erfolg einer Revisionstherapie kann durch Vorhandensein von *E. faecalis* negativ beeinflusst werden (Sundqvist, Figdor *et al.* 1998), möglicherweise aufgrund dieser Widerstandsfähigkeit. Die Kombination aus Prävalenz, Persistenz und Resistenz macht *E. faecalis* zum wesentlichen Keim und wird daher in dieser Forschungsarbeit verwendet.

1.2.3.2 *Parvimonas micra*

Parvimonas micra gehört zu den obligat anaeroben, grampositiven Kokken (Molander, Reit *et al.* 1998). In früherer Forschung war er unter dem Namen *Peptostreptococcus micros* bekannt (Bystrom, Claesson *et al.* 1985, Molander, Reit *et al.* 1998). Heutzutage ist mehrfach erforscht, dass *P. micra* vor allem mit primär infizierten Wurzelkanälen mit nekrotischer Pulpa assoziiert ist, mit hohen oder höchsten Prävalenzen unter den Anaerobiern (Gomes, Pinheiro *et al.* 2004, Gajan, Aghazadeh *et al.* 2009, Qi, Cao *et al.* 2016, Kist, Kollmuss *et al.* 2017). Es wurde herausgefunden, dass gewisse Keime in primären Infektionen mit bestimmten Symptomen verknüpft waren. Dementsprechend ging der Nachweis von *P. micra* signifikant mit Perkussionsschmerz einher, während andere Kombinationen von

Anaerobiern, auch mit *P. micra*, bei Symptomen wie Schwellung, Exsudation, vorangegangenem Schmerz oder putridem Geruch nachgewiesen werden konnten (Hashioka, Yamasaki *et al.* 1992, Gomes, Lilley *et al.* 1996, Gomes, Pinheiro *et al.* 2004). Es gilt dies bei der Aufbereitung zu bedenken, da die Überpressung virulenter Keime die Chancen des Aufkommens eines Flare-ups erhöht (Wittgow und Sabiston 1975, Siqueira 2003). *P. micra* zeigt vermehrte Penetration in Dentintubuli (Matsuo, Shirakami *et al.* 2003) und wurde außerdem aus unterschiedlichen orofazialen odontogenen Infektionen isoliert (Kuriyama, Karasawa *et al.* 2002). Als wahrscheinliche Eintrittspforte abgesehen vom Ablauf über Karies und die irreversible Pulpitis (Rocas, Lima *et al.* 2015) wird der pathologische Parodontalspalt bei Zähnen mit Parodontitisbefall diskutiert (Kipiotti, Nakou *et al.* 1984) sowie der bereits erwähnte mögliche Verlauf über den verletzten Sulkus bei traumatisch nekrotisierten Zähnen (Wittgow und Sabiston 1975). Die niedrige Prävalenz in sekundären Infektionen (Gomes, Pinheiro *et al.* 2004) sowie die Entfernbarkeit durch korrekte Spülung bei der Aufbereitung (Spratt, Pratten *et al.* 2001) und wenig Resistenzen gegen viele Antibiotika (Kuriyama, Karasawa *et al.* 2002) macht das Bakterium zwar weniger problematisch bei Misserfolgen als den resistenten *E. faecalis*, es muss aber durch die hohe Assoziation mit Primärinfektion gezielt eliminiert werden.

1.3 Die endodontische Therapie, Materialien und Behandlungskonzepte

Die grundsätzliche Prozedur der endodontischen Therapie wurde bereits 1979 von Kerekes und Tronstad beschrieben (Kerekes und Tronstad 1979) und bleibt in ihrem Kern bis heute unverändert. Die Therapie besteht aus der Aufbereitung und der Obturation des Wurzelkanalsystems (Kerekes und Tronstad 1979, Bystrom, Happonen *et al.* 1987, Haapasalo, Udnæs *et al.* 2003).

1.3.1 Vergleiche und Diskrepanzen der Behandlungskonzepte und Methoden in der Wissenschaft

Aus der Vielzahl an Forschungsarbeiten ergeben sich einige Unterschiede und Abweichungen in erforschten Kriterien. Manche Studien richteten sich nach der Diagnose und untersuchten nekrotische, periapikal erkrankte Zähne (Trope, Delano *et al.* 1999, Akbar, Iqbal *et al.* 2013, Dorasani, Madhusudhana *et al.* 2013) oder vitale Zähne mit endodontischem Therapiebedarf (Gesi, Hakeberg *et al.* 2006, Wang, Xu *et al.* 2010). Andere Studien bezogen beide Diagnosen mit ein (Albashaireh und Alnegrish 1998, Ince, Ercan *et al.* 2009, Singh und Garg 2012, Wong, Tsang *et al.* 2015). Auch die Abläufe der Behandlung wurden untersucht und unterschieden. Wenn ein- und mehrzeitige Verfahren untersucht wurden, war der Vergleich zumeist zwischen ein- und zweizeitiger Prozedur (Gesi, Hakeberg *et al.* 2006, Ince, Ercan *et al.* 2009, Wang, Xu *et al.* 2010, Akbar, Iqbal *et al.* 2013, Dorasani, Madhusudhana *et al.* 2013, Manfredi, Figini *et al.* 2016, Patil, Joshi *et al.* 2016). In der Studie von Wong aus dem Jahr 2015 richtete sich die Anzahl der Termine nach der Komplexität der Behandlung (Wong, Tsang *et al.* 2015), während andere Studien die Anzahl der Termine nicht spezifizierten (Oginni und Udoe 2004). Auch für die einzelnen Schritte während der Therapie gibt es umfangreiche Variationen. Bei mehrzeitigen Verfahren wurde als medikamentöse Einlage zwischen den Terminen zumeist Calciumhydroxid verwendet (Gesi, Hakeberg *et al.* 2006, Ghodduji, Javidi *et al.* 2006, Wang, Xu *et al.* 2010, Akbar, Iqbal *et al.* 2013, Dorasani, Madhusudhana *et al.* 2013, Wong, Tsang *et al.* 2015). Andererseits gab es Studien, bei denen die medikamentöse Einlage nicht genannt wurde (Oginni und Udoe 2004) und einige Studien, in denen gar keine medikamentöse Einlage zwischen Terminen verwendet wurde (Albashaireh und Alnegrish 1998, Ince, Ercan *et al.* 2009, Patil, Joshi *et al.* 2016). Trope stellte bereits 1999 die Bedeutung der medikamentösen Einlage fest und unterschied zwischen zweizeitig behandelten Gruppen mit und ohne Calciumhydroxid (Trope, Delano *et al.*

1999). Beschriebene Methoden der Aufbereitung der Kanäle waren die konventionelle Technik mittels Handfeilen (Gesi, Hakeberg *et al.* 2006, Ince, Ercan *et al.* 2009), maschinelle Aufbereitung mittels rotierender Nickel-Titan-Feilen (Wong, Tsang *et al.* 2015) und beide Feilenarten kombiniert (Wang, Xu *et al.* 2010, Rao, Kandaswamy *et al.* 2014). Vereinzelte Studien machten keine genaue Angaben zur Art der instrumentellen Aufbereitung (Albashaireh und Alnegrish 1998). Die verwendete Spüllösung war zumeist Natriumhypochlorit (Albashaireh und Alnegrish 1998, Trope, Delano *et al.* 1999, Ince, Ercan *et al.* 2009, Wang, Xu *et al.* 2010, Rao, Kandaswamy *et al.* 2014, Wong, Tsang *et al.* 2015), wobei die Konzentration zwischen 2,5% (Rao, Kandaswamy *et al.* 2014) und 5,25% (Wong, Tsang *et al.* 2015) variierte, während eine ältere Studie Spülung nur mit steriler Kochsalzlösung beschrieb (Soltanoff 1978). Wiederum gab es eine Studie, in der die Spüllösung nicht spezifiziert wurde (Oginni und Udoye 2004). Um die Arbeitslänge der Aufbereitung zu bestimmen, wurde sich entweder auf Röntgenmessaufnahmen bezogen (Gesi, Hakeberg *et al.* 2006, Ince, Ercan *et al.* 2009) oder elektronische Apexlokatoren verwendet (Wang, Xu *et al.* 2010). Oft wurde die Nutzung beider Techniken beschrieben (Risso, Cunha *et al.* 2008, Rao, Kandaswamy *et al.* 2014, Patil, Joshi *et al.* 2016) oder wiederum keine Technik genannt (Oginni und Udoye 2004, Wong, Tsang *et al.* 2015). In nahezu allen in diesem Abschnitt spezifizierten Studien erfolgte die Obturation oder Füllung der präparierten Kanäle mit der Technik der lateralen Kondensation mittels Guttaperchastiften und einem Sealer, wobei Wong die Methode der warmen, trägerbasierten Obturation beschrieb (Wong, Tsang *et al.* 2015). Generell werden sehr heterogene Methoden beschrieben und teilweise nicht näher spezifiziert.

Nicht nur die verwendeten Materialien und Techniken wurden verglichen, auch menschliche Komponenten wurden in Betracht gezogen. In mehreren Studien wurde die Ausführung von einem Behandler (Trope, Delano *et al.* 1999, Patil, Joshi *et al.* 2016) durchgeführt, in anderen zwei oder mehr (Ince, Ercan *et al.* 2009, Wong, Tsang *et al.* 2015). Hierbei wurde in manchen dieser Studien zumindest eine Abstimmung der Behandler erwähnt (Ince, Ercan *et al.* 2009, Wong, Tsang *et al.* 2015). Beispielsweise wurde versucht, menschliche Diskrepanzen zu minimieren, indem die Behandlung zwar von zwei, die Auswertung jedoch von einem Behandler durchgeführt wurde und zufällig in die Behandlungsgruppe eingeteilt wurde (Ince, Ercan *et al.* 2009). Wong gab an, im Vorfeld mit beiden Behandlern einen

„Kalibrierungs-Workshop“ durchgeführt zu haben (Wong, Tsang *et al.* 2015). Weiterhin gab es Studien aus studentischer Behandlung (Risso, Cunha *et al.* 2008) sowie Studien, in denen die Behandler als professioneller oder erfahrener bezeichnet wurden (Ince, Ercan *et al.* 2009, Wang, Xu *et al.* 2010). Einige Studien wiederum machten keine Angaben zum Behandler (Rao, Kandaswamy *et al.* 2014).

Ein Aspekt des therapeutischen Ablaufs, der nicht behandlerabhängig sein darf, ist die Nutzung von Kofferdam in der endodontischen Behandlung. Diese Art der Keimreduktion wurde in einigen Studien genutzt (Risso, Cunha *et al.* 2008, Ince, Ercan *et al.* 2009, Rao, Kandaswamy *et al.* 2014, Wong, Tsang *et al.* 2015), in anderen aber nicht erwähnt (Soltanoff 1978, Albashaireh und Alnegrish 1998, Oginni und Udoye 2004), wodurch die Verwendung ungewiss ist. Fehlende Nutzung von Kofferdam ist nicht die einzige Schwachstelle in der endodontischen Therapie, im ganzen genannten Verlauf besteht Raum für behandlerabhängige Fehler und dadurch verursachte Misserfolge.

Die Ziele der endodontischen Therapie sind unterschiedlich formuliert. Die chemomechanische Aufbereitung und der Verschluss des Wurzelkanalsystems soll möglichst schmerzfrei für den Patienten sein und die Heilung der periapikalen Strukturen ermöglichen (Udoye, Jafarzadeh *et al.* 2011, Sipaviciute und Maneliene 2014). Auch die Prävention wird angestrebt, was mit Verständnis der Ursachen der endodontischen Erkrankungen einhergeht (Haapasalo, Udnæs *et al.* 2003). Byström stellte bereits 1987 unmissverständlich fest, dass Keimelimination das oberste Ziel der Therapie ist und die Behandlung dementsprechend auf Erreichen dieses Ziels aufgebaut ist (Bystrom, Happonen *et al.* 1987). Diese Meinung ist nach heutigem Wissensstand fundamental, was im Laufe dieser Forschungsarbeit beschrieben wird und die Grundidee dieser Forschungsarbeit darstellt.

1.3.2 Aufbereitung des Wurzelkanalsystems

Die Aufbereitung des Wurzelkanals soll den Kanal instrumentell erweitern, sodass infiziertes Gewebe und Debris entfernt wird und ein Zugang zum apikalen Teil des Kanalsystems entsteht. Zum einen wird der Wurzelkanal auf die gesamte Länge mechanisch gesäubert, zum anderen wird ebenfalls auf die gesamte Länge eine chemische Desinfektion mit diversen flüssigen Lösungen angestrebt (Hand, Smith *et al.* 1978, Bystrom, Happonen *et al.* 1987). Dies wird als chemomechanische Aufbereitung bezeichnet (Hand, Smith *et al.* 1978, Sipaviciute und Maneliene 2014),

die bis heute gelehrt wird. In der darauffolgenden Obturation wird der gereinigte und desinfizierte Wurzelkanal gefüllt und verschlossen.

Das standardmäßige Protokoll vor der eigentlichen Aufbereitung des Wurzelkanalsystems umfasst nach Diagnostik gegebenenfalls eine Anästhesie, Isolierung des Zahnes mit Kofferdam, Eröffnung des Pulpenkavums und Präparation einer angemessenen Zugangskavität zum Wurzelkanalsystem (Ince, Ercan *et al.* 2009, Rao, Kandaswamy *et al.* 2014), um Zugang zu allen vorhandenen Kanälen zu ermöglichen und die Entfernung des koronalen Pulpengewebes zu gewährleisten.

1.3.2.1 Spüllösungen

Mit dem Zugang zum koronalen Anteil der Pulpa, der zumeist den Beginn der Infektion darstellt, beginnt die Notwendigkeit der Eliminierung der Infektionsquelle. Eine gemeinsame Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK) und der Deutschen Gesellschaft für Zahnerhaltung (DGZ) stellt klar, dass das sogenannte Spülprotokoll ein fundamentaler Teil der Behandlung ist (Barthel, Georgi *et al.* 2006). Die therapeutische Anforderung an die Spüllösung ist die Desinfektion und Keimelimination, sowie der Abtransport von Debris, Gewebe und Dentinspänen von apikal nach koronal. Somit ist die Spülung, deren Konzentration, Kontaktzeit, Menge, Temperatur und Kombinationen der verschiedenen Spüllösungen einer der entscheidendsten Schritte in der endodontischen Behandlung (Bystrom, Happonen *et al.* 1987, Barthel, Georgi *et al.* 2006, Diogenes, Ruparel *et al.* 2014, Tagelsir, Yassen *et al.* 2016).

Natriumhypochlorit (NaOCl) ist die wichtigste und wirksamste Spüllösung. Es wirkt sowohl desinfizierend als auch gewebeauflösend (Hand, Smith *et al.* 1978, Harrison 1984, Shabahang und Torabinejad 2003), beides unentbehrliche Eigenschaften in der Aufbereitung. Die Effektivität der Desinfektion wurde sowohl *in vitro* (Chávez de Paz, Bergenholtz *et al.* 2010, Soares, Roque de Carvalho *et al.* 2010, Tagelsir, Yassen *et al.* 2016) als auch *in vivo* erforscht (Bystrom, Happonen *et al.* 1987, Rocas, Provenzano *et al.* 2016), wobei Konzentrationen zwischen 0,5% (Bystrom, Happonen *et al.* 1987) und einmalig 6% (Morgental, Singh *et al.* 2013) vertreten sind, aber auch die heute vorwiegend verwendete Konzentration von 3% (Kist, Kollmuss *et al.* 2017). Sehr häufig wurde die bis vor einigen Jahren gebräuchliche Konzentration von 5,25% in den Studien verwendet (Soares, Roque de Carvalho *et al.* 2010). Ein ausgiebiger Gebrauch von Natriumhypochlorit sowohl im Sinne der Kontaktzeit und

der Menge als auch der Konzentration ist notwendig (Hand, Smith *et al.* 1978, Siqueira, Rocas *et al.* 2000, Spratt, Pratten *et al.* 2001, Tagelsir, Yassen *et al.* 2016). Ein Nachteil des Natriumhypochlorits ist die Unfähigkeit, die sogenannte Schmierschicht (smear layer) zu entfernen (Baumgartner und Mader 1987). Eine konstante Zufuhr im Wurzelkanal wird benötigt, da Natriumhypochlorit chemisch selbstlimitierend ist (Zehnder, Schmidlin *et al.* 2005, Stojicic, Zivkovic *et al.* 2010). Auch muss durch seine potente Wirksamkeit auf besonders sorgfältige Handhabung am Patienten geachtet werden, sodass es ausschließlich in den Wurzelkanal gelangt und nicht in die Mundhöhle, in Augen, auf Kleidung oder aber über den Apex hinaus. Überpressung in den periapikalen Raum ist unbedingt zu vermeiden, da dieser sogenannte Spülunfall zu sofortigen erheblichen Schmerzen, Schwellung und weiteren Komplikationen führt (Becker, Cohen *et al.* 1974, Becking 1991, Hulsmann und Hahn 2000). In Studien über die Effektivität der verschiedenen Konzentrationen wird sich auch mit der Zytotoxizität des Natriumhypochlorits befasst, mit heterogenen Ergebnissen. Spangberg befand 1973 (Spangberg, Engstrom *et al.* 1973), dass die über lange Zeit gängige Konzentration von 5,25% unverhältnismäßig toxisch war im Vergleich zur antimikrobiellen Wirkung und somit nicht geeignet, um als standardmäßige Spüllösung verwendet zu werden. Gegenteilige Ergebnisse lieferten zwei andere Studien, in denen die erhöhte Zytotoxizität weder bei höheren Konzentrationen noch im Vergleich zu Chlorhexidingluconat (CHX) erwiesen wurde (The, Maltha *et al.* 1980, Yesilsoy, Whitaker *et al.* 1995). Bei Spülung mit niedrigeren Konzentrationen besteht die Möglichkeit, die Wirkung über erhöhtes Volumen und längere Einwirkzeit zu erhöhen (Siqueira, Rocas *et al.* 2000). Eine weitere Methode, um die Effektivität der Spülung zu erhöhen, ist die Schall- oder Ultraschallaktivierung (Mancini, Cerroni *et al.* 2013, Urban, Donnermeyer *et al.* 2017), wobei auch dies von den verwendeten Spüllösungen abhängig ist (Walker und del Rio 1991, Zeng, Willison *et al.* 2018).

Chlorhexidingluconat (CHX) gehört ebenfalls zu den gebräuchlichen Spüllösungen. Es weist eine starke antibakterielle Wirkung auf, selbst bei niedrigen Konzentrationen von 0,2% (Delany, Patterson *et al.* 1982) und erwiesenermaßen mit beachtlicher Wirkung gegen im Wurzelkanal vorhandenen Bakterien (Ohara, Torabinejad *et al.* 1993, Siqueira, Batista *et al.* 1998, Basrani, Tjaderhane *et al.* 2003). Vorteilhaft ist die unbedenkliche Handhabung trotz effektiver Wirkung durch die geringere Zytotoxizität (Loe 1973, Yesilsoy, Whitaker *et al.* 1995). Eine Desinfektion wird

ebenfalls beschrieben, wobei die desinfizierende Wirkung bei CHX mit 2% Konzentration vergleichbar mit Natriumhypochlorit ist (Jeansonne und White 1994, Rocas, Provenzano *et al.* 2016). Studien dazu beurteilen die Eignung als Spüllösung unterschiedlich, da manche die Wirkung des CHX im Vergleich zu Natriumhypochlorit als überlegen (Ohara, Torabinejad *et al.* 1993), als unterlegen (Siqueira, Batista *et al.* 1998) oder auch als vergleichbar (Jeansonne und White 1994) bewerten. Ein spezifischer, individueller Vorteil ist die sogenannte Substantivität, also Dentinadhäsion oder -anhaftung, wodurch die Wirkung und Desinfektion am Dentin deutlich verbessert beziehungsweise teilweise erheblich verlängert wird (Rosenthal, Spangberg *et al.* 2004, Souza, Menon *et al.* 2018). Allerdings weist CHX keine gewebssauflösenden Eigenschaften auf (Okino, Siqueira *et al.* 2004), wodurch es in der Endodontie nicht zum ausschließlichen Gebrauch geeignet ist. Es sei darauf hinzuweisen, dass chemische Wechselwirkungen zwischen Natriumhypochlorit und Chlorhexidingluconat zum Ausfall eines bräunlichen, unlöslichen Präzipitats führt (Basrani, Manek *et al.* 2007, Marchesan, Pasternak Junior *et al.* 2007, Krishnamurthy und Sudhakaran 2010). Analysen des Präzipitats ergaben ein neutrales Salz, aber auch die Entstehung des sogenannten Parachloroanilin (Krishnamurthy und Sudhakaran 2010). Die Karzinogenität und Toxizität des Parachloroanilin ist in Tierversuchen erforscht (Chhabra, Huff *et al.* 1991). Das Präzipitat lagert sich im Wurzelkanal ab und führt zu Verfärbung des Dentins, kann aber durch Zwischenspülungen mit Kochsalz oder destilliertem Wasser verringert oder durch Zwischenspülungen mit Alkohol vermieden werden (Krishnamurthy und Sudhakaran 2010.)

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sei der Vollständigkeit halber zu nennen, jedoch ist der alleinige Gebrauch wegen der geringen antimikrobiellen Wirkung (Shahriari, Mohammadi *et al.* 2010, Hasheminia, Farhad *et al.* 2013) und dank wesentlich effektiverer Spüllösungen in der Endodontie obsolet.

Die mechanische Bearbeitung und Instrumentierung des Kanalsystems hinterlässt eine schmierige Schicht an den Wänden des Wurzelkanals, die oftmals mit Debris und Dentinspänen festgesetzt ist und die Zugänge zu den Dentintubuli verblockt (McComb und Smith 1975). Diese 1-2 μm dicke Schicht (Mader, Baumgartner *et al.* 1984) ist der sogenannte „smear layer“ (Schmierschicht) und enthält sowohl organisches als auch anorganisches Material, unter anderem Gewebsreste, Bakterien und Dentinfragmente (McComb und Smith 1975, Mader, Baumgartner *et*

al. 1984, Torabinejad, Khademi *et al.* 2003). Der smear layer kann durch mechanische Instrumentation alleine nicht entfernt werden (Heard und Walton 1997). Auch die zur Desinfektion genutzten Spüllösungen sind nicht ausreichend, um einen Kanal ohne smear layer zu hinterlassen (McComb und Smith 1975). Die anfängliche Erforschung des smear layers ergab die Theorie, dass ein Belassen des smear layers erwünscht sein könnte, da er wie eine Schutzbarriere wirken und die bakterielle Penetration im Dentin durch die Dentintubuli möglicherweise verhindern könnte (Pashley, Michelich *et al.* 1981). Die andere Vermutung besagte, dass der smear layer zu viele Bakterien enthält oder bedeckt, um nicht entfernt zu werden (Baumgartner und Mader 1987.) Einerseits könnte eine Entfernung des smear layers eine tiefere Penetration von Bakterien und infiltrierendes Wachstum zulassen (Drake, Wiemann *et al.* 1994). Andererseits wäre ohne die Entfernung des smear layers ein Erreichen der Seitenkanälchen sowohl für die angewandten Spüllösungen als auch für die Bindung des Wurzelfüllmaterials in der Obturation problematisch (McComb und Smith 1975, Moodnik, Dorn *et al.* 1976, Mader, Baumgartner *et al.* 1984). Es wurden einige Studien zur Wirksamkeit verschiedener Spüllösungen zur Entfernung des smear layers durchgeführt, wobei hauptsächlich EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), und Zitronensäure untersucht wurden (Pashley, Michelich *et al.* 1981, Siqueira, Batista *et al.* 1998, Hulsmann, Heckendorff *et al.* 2003, Zehnder, Schmidlin *et al.* 2005). Ebenfalls gab es einige vergleichende Studien, in denen antibiotische Präparate als Spüllösung erforscht wurden (Barkhordar, Watanabe *et al.* 1997, Shabahang und Torabinejad 2003, Mancini, Armellin *et al.* 2009).

EDTA und Zitronensäure sind Chelatoren. Durch die demineralisierende Wirkung können anorganischen Teile des smear layers gelöst werden, speziell durch die Bindung von Calcium (Hulsmann, Heckendorff *et al.* 2003, Zehnder, Schmidlin *et al.* 2005). Die Effektivität dieser beiden Wirkstoffe bei der Entfernung des smear layers ist mehrfach belegt (Zehnder, Schmidlin *et al.* 2005, Mancini, Armellin *et al.* 2009). Zehnder berichtet in seinem umfangreichen Review aus dem Jahr 2006 von in der Endodontie verwendeten Konzentrationen zwischen 10% und 17% für EDTA und zwischen 10% und 50% für Zitronensäure (Zehnder 2006). Einige Studien ergaben, dass EDTA und ähnliche Chelatoren über die Demineralisierung hinaus wirksam sind und einen antimikrobiellen Effekt haben (Yoshida, Shibata *et al.* 1995, Siqueira, Batista *et al.* 1998, Al-Bakri, Othman *et al.* 2009, Chávez de Paz, Bergenholtz *et al.*

2010). Siqueira interpretiert die antimikrobielle Wirkung als zusätzlichen, nicht als hauptsächlichen Vorteil, also sieht dennoch die Hauptaufgabe bei der Entfernung des smear layers als Abschlussspülung (Siqueira, Batista *et al.* 1998). Ein relativer Nachteil des EDTA ist die selbstlimitierende Wirkung (Seidberg und Schilder 1974), weshalb die Zufuhr an ungebundenen Chelate aufrecht erhalten werden muss. Für den Anwender ist dies im Sinne einer hochvolumigen Anwendung mit verlängerten Spülzeiten und ausreichender Menge zu verstehen.

Es wurden verschiedene Studien zu Spüllösungen mit antibiotischen Zusätzen zur Entfernung des smear layers veröffentlicht. MTAD ist eine Lösung, die ein Isomer aus der Gruppe der Tetrazykline enthält sowie eine Säure und ein Reinigungsmittel. Aus vergleichenden Studien gibt es kein eindeutiges Ergebnis, ob die Entfernung des smear layers durch EDTA oder durch MTAD erfolgen soll, beziehungsweise wie ein „ideales“ Spülprotokoll mit Zusatz von Antibiotikum kombiniert werden könnte (Shabahang und Torabinejad 2003, Torabinejad, Khademi *et al.* 2003, Mancini, Armellin *et al.* 2009). Auch wurde 1997 mit einer sauren Doxycyclin-Spüllösung geforscht und in dieser Studie als effektiv befunden (Barkhordar, Watanabe *et al.* 1997). Als Nachteil ist zu nennen, dass Resistenzen von aus Wurzelkanälen isolierten Bakterien gegen Tetrazykline erwiesen wurden (Dahlen, Samuelsson *et al.* 2000), wodurch einerseits die Effektivität solcher Spüllösungen infrage gestellt wird und andererseits Resistenzen möglicherweise vermehrt werden.

Bereits im Jahr 1987 stellte Baumgartner (Baumgartner und Mader 1987) fest, dass keine Spülung alleine in der Lage war, sowohl organisches als auch anorganisches Material zu entfernen. Diese Behauptung wurde in aktuelleren Studien (Torabinejad, Handysides *et al.* 2002, Torabinejad, Khademi *et al.* 2003) bestätigt, wodurch es bis in die heutige Forschung hinein zu zahlreichen Studien über Kombinationen diverser Spüllösungen und das Etablieren eines universellen Spülprotokolls führt. Es wird angestrebt, eine Kombination aus Desinfektion, Gewebsauflösung, Keimreduktion und Entfernung der Schmierschicht zu erreichen. Studien mit verschiedenen getesteten Kombinationen erachten die Kombination aus Natriumhypochlorit und EDTA als nützlichste, erfolgsversprechendste Variante (Yamada, Armas *et al.* 1983, Baumgartner und Mader 1987, Peters und Barbakow 2000, Niu, Yoshioka *et al.* 2002, Pascon, Kantovitz *et al.* 2012). Allerdings sind die Wechselwirkungen zwischen EDTA und Natriumhypochlorit zu beachten und gegebenenfalls als Nachteil zu nennen, da EDTA signifikant die Wirksamkeit des aktiven Chlors in

Natriumhypochlorit reduziert und somit seine Wirkung neutralisiert (Zehnder, Schmidlin *et al.* 2005, Clarkson, Podlich *et al.* 2011). Um dies zu vermeiden, muss die Reihenfolge der Spüllösungen eingehalten werden oder Maßnahmen zur Vermeidung der Wechselwirkungen müssen ergriffen werden, wie vermehrte Natriumhypochlorit-Spülung, Zwischenspülung oder -trocknung (Clarkson, Podlich *et al.* 2011). Andersherum hat Natriumhypochlorit keinen Einfluss auf die Wirksamkeit des EDTA (Saquy, Maia Campos *et al.* 1994). Dennoch fehlen weitere Studien, um Einigkeit über ein optimales Spülprotokoll zu erlangen (Yamada, Armas *et al.* 1983, Hulsmann, Heckendorff *et al.* 2003, Clarkson, Podlich *et al.* 2011).

Grundsätzlich bestehen die wissenschaftlichen Grundlagen zu den Spüllösungen, auch wenn die Vielfalt der Studien zeigt, dass noch kein ausnahmsloser Goldstandard besteht. Das Spülprotokoll ist eine Kombination aus chemischem Wissen und Verständnis der Wirkung der Lösungen. Die desinfizierende Wirkung von CHX ist vergleichbar mit Natriumhypochlorit und CHX weist eine geringe Toxizität auf. Jedoch hat CHX keine gewebsauflösende Wirkung, die für die Kanalaufbereitung unerlässlich ist (Jeansonne und White 1994). Insofern müssen alle Eigenschaften der Lösungen in Betracht gezogen und Prioritäten für eine endodontische Spüllösung gesetzt werden (Jeansonne und White 1994, Siqueira, Rocas *et al.* 2007, Rocas, Provenzano *et al.* 2016).

1.3.2.2 Medikamentöse Einlagen

Medikamentöse Einlagen werden empfohlen, um die Keime zu eliminieren, die durch Aufbereitung und Spülung nicht abgetötet wurden (Bystrom und Sundqvist 1985). Die Einlagen werden bei mehrzeitigen endodontischen Behandlungen zwischen den Terminen in den Wurzelkanal eingebracht, da es nicht möglich ist, allein durch die chemomechanische Aufbereitung alle Bakterien zu eliminieren. Somit gilt eine mehrzeitige endodontische Behandlung mit medikamentöser Einlage bei bakteriellem Befall als erfolgsversprechender (Sjogren, Figdor *et al.* 1997). In einer Studie aus dem Jahr 1981 wurde dargestellt, dass die Bakterienzahlen nach der Instrumentierung ohne medikamentöse Einlage zwischen den Terminen wieder deutlich anstiegen (Bystrom und Sundqvist 1981). Diverse Präparate wurden zu diesem Zweck genutzt und getestet (Trope 1990, Almyroudi, Mackenzie *et al.* 2002), wobei Calciumhydroxid inzwischen als das Mittel der Wahl empfohlen wird (Sjogren, Figdor *et al.* 1991, Spangberg und Haapasalo 2002). Seine antimikrobielle Wirkung

ist mehrfach erwiesen (Sjogren, Figdor *et al.* 1991, Sjogren, Figdor *et al.* 1997, Trope, Delano *et al.* 1999) und ist den anderen derzeit erforschten medikamentösen Einlagen überlegen (Bystrom, Claesson *et al.* 1985). Durch Calciumhydroxid können bakterielle Endotoxine inaktiviert werden (Tanomaru, Leonardo *et al.* 2003). Zusätzlich wurden höhere Heilungsraten bei apikaler Parodontitis mit Calciumhydroxid als Einlage belegt (Trope, Delano *et al.* 1999). Es wurde auch mit Calciumhydroxid als Spüllösung oder Kurzzeiteinlage geforscht und herausgefunden, dass kurze Kontaktzeiten keine ausreichende Effektivität aufwiesen (Sjogren, Figdor *et al.* 1991, Ohara, Torabinejad *et al.* 1993).

Weiterhin werden in aktuelleren Studien medikamentenversetzte Einlagen wie beispielsweise Ledermix-Paste erforscht, die durch Zugabe eines Antibiotikums und eines Kortikosteroids signifikant postoperative Schmerzen reduziert (Ehrmann, Messer *et al.* 2003) und somit eine diagnoseabhängige Ergänzung darstellt. Jedoch gilt es zu beachten, dass Schmerzfreiheit mit Ledermix als Einlage durch die antiinflammatorische Wirkung des Kortikosteroids möglicherweise verfälscht ist und eine abschließende medikamentöse Einlage mit Calciumhydroxid vor der Obturation sinnvoll sein könnte. Dadurch wird Ledermix bei nekrotischen, symptomatischen Zähnen zu einem wertvollen Medikament, ist allerdings nicht als Ersatz für Calciumhydroxid oder für sorgfältiges Procedere zu sehen (Ehrmann, Messer *et al.* 2003). Auch Tagelsir und Mitarbeiter forschten im Jahr 2016 mit „double antibiotic paste“ (DAP), wobei dessen Vorteile dieser Studie nach nicht überwogen (Tagelsir, Yassen *et al.* 2016).

Um das Wurzelkanalsystem vor Keimen aus der Mundhöhle und vor Reinfektion zwischen den Behandlungen zu schützen, wird der Zahn provisorisch verschlossen. Hierfür werden unter anderem Präparate wie Cavit, IRM, Glasionomerzemente, Zinkoxid-Eugenolpasten oder auch Adhäsivsysteme verwendet (Madison und Wilcox 1988, Kazemi, Safavi *et al.* 1994, Barthel, Strobach *et al.* 1999, Deveaux, Hildelbert *et al.* 1999). Die koronale Dichtigkeit wird als einer der ausschlaggebenden Faktoren für den Erfolg einer endodontischen Behandlung beurteilt (Madison und Wilcox 1988). Cavit wird als adäquater temporärer Verschluss gewertet (Kazemi, Safavi *et al.* 1994, Deveaux, Hildelbert *et al.* 1999) und gilt als Standard für den Verschluss zwischen Behandlungen. Allerdings wies auch Cavit über einen Zeitraum von 12 Tagen Undichtigkeiten auf (Barthel, Strobach *et al.* 1999). Der Verlust des provisorischen Verschlusses oder zu lange Zeiträume zwischen Terminen führen zu

erheblichen Undichtigkeiten (Swanson und Madison 1987, Torabinejad, Ung *et al.* 1990, Kazemi, Safavi *et al.* 1994, Barthel, Strobach *et al.* 1999, Deveaux, Hildelbert *et al.* 1999). Der Behandlungsverlauf sollte an die Zeiträume angepasst werden und gegebenenfalls auf Materialien oder Materialkombinationen ausgewichen werden, die über längere Zeiträume höhere Dichtigkeiten aufweisen.

1.3.3 Obturation des Wurzelkanalsystems

Die Obturation bezeichnet das vollständige, dichte Abfüllen und Verschließen des möglichst keimarmen Wurzelkanalsystems (Sjogren, Figdor *et al.* 1997) mit biokompatiblen Wurzelfüllmaterialien (Orstavik 1988, Ørstavik 2005). Das gesamte dreidimensionale Kanalsystem muss berücksichtigt werden (Schilder 2006). Daraus ergeben sich gewisse Anforderungen an Wurzelfüllmaterialien, die bereits 1978 von Grossman benannt wurden und bis heute gelehrt werden (Grossman 1978, Ørstavik 2005, Hellwig, Klimek *et al.* 2009). Die Kombination aus Guttapercha und Sealer gilt als die meist genutzte und bewährteste (Friedman, Sandrik *et al.* 1977, Reader, Himel *et al.* 1993, Ørstavik 2005, Hellwig, Klimek *et al.* 2009), wobei es verschiedene Techniken der Applikation gibt. Diese umfassen die klassische Methode der lateralen Kondensation sowie die Einstifttechnik, aber auch aufwendigere Methoden mit erwärmtem Guttapercha wie die warme vertikale oder die warme laterale Kondensation (Reader, Himel *et al.* 1993, El Sayed, Taleb *et al.* 2013, Samiei, Aghazade *et al.* 2014, Sadr, Golmoradizadeh *et al.* 2015). Guttapercha macht den festen, inerten Hauptbestandteil aus und wurde mit diversen Arten von Sealer erforscht (Orstavik 1988, Saleh, Ruyter *et al.* 2002), da es nicht möglich ist, Guttapercha selbst mit den Kanalwänden zu verbinden (de Souza Filho, Gallina *et al.* 2012). Somit wird unter anderem der Anspruch an den Sealer gestellt, die Wurzelfüllung mit der Zahnhartsubstanz zu verbinden und abzudichten (Ørstavik 2005, Hellwig, Klimek *et al.* 2009).

Sealer müssen im Allgemeinen gewisse Anforderungen erfüllen. Zunächst waren medikamentöse Eigenschaften nicht erwünscht (Hellwig, Klimek *et al.* 2009), andererseits ist grundsätzlich eine Anforderung an eine Wurzelfüllung die bakteriostatische oder bestenfalls bakterizide Funktion (Hellwig, Klimek *et al.* 2009). Es gibt verschiedene Arten von Sealer, die den heutigen Anforderungen entsprechen, beispielsweise Sealer auf Zinkoxid-Eugenol-Basis, Kalziumhydroxid-Basis und Glasionomerezemente (Ørstavik 2005). Etablierte Zinkoxid-Eugenol-Sealer

weisen eine zytotoxische Wirkung auf (Al-Awadhi, Spears *et al.* 2004), die ungezielt und nicht beabsichtigt ist, wodurch Überpressung in den periapikalen Bereich besonders vermieden werden muss (Ricucci und Langeland 1998). In manchen aktuelleren Studien wird unter Beachtung der Rolle der Keime geforscht. So hat Kitagawa 2014 einen Sealer auf Kunststoffbasis entwickelt, mit dem Ziel, *E. faecalis* abzutöten (Kitagawa, Kitagawa *et al.* 2014). Ein weiterer Ansatz der Keimfreiheit in der Wurzelfüllung wurde von Senia und Mitarbeiter 1975 erforscht, wobei Guttapercha vor der Obturation mit Natriumhypochlorit erfolgreich desinfiziert wurde (Senia, Marraro *et al.* 1975).

Die Dichtigkeit einer Wurzelfüllung, somit auch die Formstabilität, Unlöslichkeit und Haftung eines Sealers im Sinne des eigentlichen „seals“, also des Verschlusses durch den Sealer, ist eine wesentliche Anforderung (Hellwig, Klimek *et al.* 2009) und steht bedeutend im Zusammenhang zur Keimbelastung. Sehr viele Studien beschäftigen sich mit der Dichtigkeit im Sinne des „microleakage“ entlang der Wurzelfüllung, wobei verschiedene Methoden wie Farb- oder Bakterienwanderung angewandt werden (Goldman, Goldman *et al.* 1980, Swanson und Madison 1987, Torabinejad, Ung *et al.* 1990, Yucel, Guler *et al.* 2006, Yilmaz, Tuncel *et al.* 2009). Allerdings werden diese Studien unlängst kritisch hinterfragt und kontrovers betrachtet (Ørstavik 2005). Li und Mitarbeiter vergleichen in ihrem Review aus dem Jahr 2014 diverse Methodiken und zweifeln die klinische Relevanz sowie die Bedeutsamkeit der erforschten Erkenntnisse an (Li, Niu *et al.* 2014). Auch gibt es beispielsweise einen Vergleich zwischen Leakage-Studien, dessen Autoren die Standardisierung der statistischen Methoden für verfehlt und nicht ausreichend halten (Lucena, Lopez *et al.* 2013). Ferner gibt es Studien mit dem Ziel, die Dichtigkeit beispielsweise über Dentinkonditionierung und somit verbesserte Dentinadhäsion zu erhöhen (Saleh, Ruyter *et al.* 2002). Bis heute wird versucht, die Methoden und Materialien für die oben genannten Anforderungen und Ziele zu optimieren.

1.3.4 Möglichkeiten der sekundären endodontischen Behandlung

Bei fehlgeschlagener Ersttherapie gibt es indizierte Behandlungsmaßnahmen zum Erhalt des Zahnes wie die Revision oder Wurzelspitzenresektion. Bei der Revision werden nach Entfernung der alten Wurzelfüllung alle Schritte der Wurzelbehandlung wiederholt. Die Prognose der Sekundärbehandlung ist schlechter als bei der

Ersttherapie (Allen, Newton *et al.* 1989), da eine fehlgeschlagene Ersttherapie eine apikale Parodontitis bedeutet, die ohne Präsenz von Bakterien unmöglich ist (Siqueira 2011). Dadurch ist eines der Ziele, alle desinfizierenden und antibakteriellen Maßnahmen auszuschöpfen. Ein Vorschlag dafür ist die Nutzung von CHX als medikamentöse Einlage, da einige Studien die Effektivität von CHX gegen *E. faecalis* belegen (Heling, Steinberg *et al.* 1992, Almyroudi, Mackenzie *et al.* 2002, Schafer und Bossmann 2005). Dies ist relevant, da *E. faecalis* der maßgeblich prävalente Keim in apikal infizierten Zähnen ist (Molander, Reit *et al.* 1998). Hinzu kommt, dass *E. faecalis* lange Zeit unter schwierigen Bedingungen überleben kann (Figdor, Davies *et al.* 2003). Dadurch ist die Chance auf eine erfolgreiche Revision deutlich erschwert und macht mikrobiologisches Verständnis umso wichtiger.

Eine weitere Form der Sekundärtherapie ist die Wurzelspitzenresektion. Die gängige Methode umfasst die chirurgische Darstellung der Wurzelspitze mit Zugang durch den Knochen und das Abtrennen des apikalen Anteils sowie die Entfernung des infizierten periapikalen Gewebes. Je nach Möglichkeit wird auch eine retrograde Wurzelfüllung durchgeführt oder zumindest ein neuer apikaler Verschluss hergestellt (Kvist und Reit 1999). Hierbei muss beachtet werden, dass die Qualität der initialen Wurzelfüllung, wenn sie belassen wird, Einfluss auf den Erfolg der Therapie hat (Hirsch, Ahlstrom *et al.* 1979). Allerdings gibt es auch bei der Wurzelspitzenresektion Variationen und Verbesserungen der Technik, wie beispielsweise die Verfeinerung des Verfahrens durch mikrochirurgisches Vorgehen und Nutzung von optischer Vergrößerung (Rubinstein und Kim 1999). Auch die Verwendung hochwertiger Materialien ist relevant, da mehrfach erwiesen wurde, dass MTA als retrogrades Wurzelfüllmaterial sehr gute Ergebnisse erzielt (Chong, Pitt Ford *et al.* 2003, Christiansen, Kirkevang *et al.* 2009, von Arx, Hanni *et al.* 2010, Kim, Song *et al.* 2016).

Es gibt keinen Konsens über eine standardmäßige Therapie nach Misserfolg der Wurzelbehandlung und die Entscheidung liegt oft im Ermessen des Behandlers (Aryanpour, Van Nieuwenhuysen *et al.* 2000, Kvist und Reit 2002). Selbst die Gründe der Behandler für die Entscheidung der Wiederbehandlung wurden mehrfach erforscht und Strategien analysiert (Reit, Grondahl *et al.* 1985, Reit und Gröndahl 1987, Kvist, Reit *et al.* 1994, Kvist 2001), wodurch die Komplexität und die Kontroversität, aber auch die Subjektivität des Themas dargestellt wird. Vergleichende Studien zu Methoden der Wiederbehandlung liefern ähnliche

Ergebnisse der chirurgischen und nicht-chirurgischen Wiederbehandlung (Danin, Stromberg *et al.* 1996, Kvist und Reit 1999, Riis, Taschieri *et al.* 2018). Aus einer über einen längeren Forschungszeitraum erfolgten Studie geht hervor, dass die chirurgische Therapie möglicherweise nur anfänglich ähnliche Erfolge aufweist wie die orthograde Revision, später allerdings wieder zu schlechteren Ergebnissen führt (Kvist und Reit 1999). Torabinejad und Mitarbeiter kommen in ihrem umfangreichen Review ebenfalls zu diesem Schluss (Torabinejad, Corr *et al.* 2009).

Die Uneinigkeit über die Sekundärtherapie kombiniert mit den stark variierenden Erfolgsraten der Initialtherapie sollte den Fokus der Forschung auf zuverlässigere Methoden lenken, um die Wiederbehandlung zugänglicher, erfolgreicher und subjektiv rentabler für den Großteil der Behandler zu machen. Es ist festzustellen, dass auch für diese Studien die Kritik der Definition des „Erfolgs“ wie unter Punkt 1.1 gilt. Mit entsprechender Aufklärung des Behandlers und der Patienten könnte die erneute Behandlung zum Zahnerhalt vermehrt durchgeführt werden. Die Revision sollte primär durchgeführt werden, unter anderem weil bei umfangreicher, sehr genauer Behandlung patientenorientierte Erfolgsraten von bis zu 90% erwiesen wurden (He, White *et al.* 2017), aber auch weil die Wurzelspitzenresektion die letzte Therapiemöglichkeit vor Extraktion darstellt, während nach Revision prinzipiell die Wurzelspitzenresektion immer noch möglich ist. Der Zahnerhalt sollte generell im Vordergrund stehen, allerdings sind Patientenwunsch, Aussicht auf Erfolg und Wirtschaftlichkeit in Relation zu Aufwand zu beachten.

1.3.5 Verwendete Materialien

1.3.5.1 MTA – Mineral Trioxide Aggregate

MTA wird umfangreich und wirksam bei retrograden Wurzelfüllungen eingesetzt (Chong, Pitt Ford *et al.* 2003, Kim, Song *et al.* 2016). Es findet jedoch weitere Verwendung im endodontischen Bereich. Verbreitet ist die Deckung von iatrogenen Perforationen (Main, Mirzayan *et al.* 2004, Krupp, Bargholz *et al.* 2013, Mente, Leo *et al.* 2014). Es wird für die direkte Überkappung, also zur Deckung von freigelegtem Pulpengewebe, verwendet (Brizuela, Ormeno *et al.* 2017). Auch wird es in der Apexifikation eingesetzt, indem es bei Zähnen mit nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum als apikaler Plug angewandt wird (Witherspoon, Small *et al.* 2008). Seine Funktion als regulärer Sealer wird außerdem zunehmend gebräuchlich

(Samiei, Aghazade *et al.* 2014, Zhou, Du *et al.* 2015, Singh, Gupta *et al.* 2016). Die Überlegenheit von MTA gegenüber anderen, teilweise bewährten Materialien wird ebenfalls erforscht. So liefert MTA bei der direkten Überkappung bessere Ergebnisse als bewährtes Calciumhydroxid (Mente, Hufnagel *et al.* 2014). Auch im Bereich der Apexifikation stellt sich MTA als überlegen heraus (Damle, Bhattal *et al.* 2012), allerdings besteht Forschungsmangel in diesem Bereich. Zwei Reviews zur regenerativen Endodontie stellen Studien mit erfolgreichen, vielversprechenden Ergebnissen des MTAs neben Studien mit Calciumhydroxid, erkennen jedoch die fehlende vergleichende Forschung in diesem Gebiet an (Bakland und Andreasen 2012, Torabinejad, Nosrat *et al.* 2017).

MTA ist ein medizinisch modifizierter hydraulischer silikatbasierter Zement. Es ist ein hydrophiles Pulver bestehend aus Calciumverbindungen, vornehmlich Calcium-Silikatverbindungen und Mineraloxiden, wie dem für Röntgenopazität beigewetzten Bismutoxid. Durch Zugabe von Wasser verfestigt es sich. Seine weiteren Eigenschaften im Sinne eines endodontischen Materials wie pH-Wert, Löslichkeit und Abbindezeit wurden ebenfalls detailliert erforscht (Torabinejad, Hong *et al.* 1995, Roberts, Toth *et al.* 2008). Verschiedene MTA-Produkte mit verschiedenen Spezifikationen wurden untersucht. Auch das in dieser Forschungsarbeit verwendete Medcem MTA wurde im Kontrast zum Goldstandard der retrograden Wurzelfüllmaterialien erforscht und liefert vergleichbare Ergebnisse (Kollmuss, Preis *et al.* 2017), wird aber noch weiter untersucht und in der Forschung verwendet. Die oben genannten Anwendungen mit teils überlegenen Resultaten ergeben sich aus diversen Vorteilen. MTA ist besonders biokompatibel (Torabinejad, Hong *et al.* 1995, Osorio, Hefti *et al.* 1998, Camilleri, Montesin *et al.* 2004, Samara, Sarri *et al.* 2011), selbst Zellproliferation und -erhalt wurde *in vitro* nachgewiesen. Entsprechend gibt es Studien speziell zur Bioaktivität, von der Erforschung der zellulären Ebene (Torabinejad, Hong *et al.* 1995, Thomson, Berry *et al.* 2003, Samara, Sarri *et al.* 2011) bis zur Untersuchung der Bildung einer zementähnlichen Barriere angrenzend an MTA (Torabinejad, Hong *et al.* 1995, Shabahang, Torabinejad *et al.* 1999, Apaydin, Shabahang *et al.* 2004). MTA als Sealer weist sogar eine antibakterielle Wirkung auf (Singh, Gupta *et al.* 2016). Speziell wurde nachgeforscht, ob CHX als Anmischflüssigkeit anstatt sterilem Wasser den antimikrobiellen Effekt verstärkt (Stowe, Sedgley *et al.* 2004). Zum Nachteil wird der vergleichsweise hohe Preis (Kim, Song *et al.* 2016). Auch kann als Nachteil die relativ lange Abbindezeit genannt

werden (Torabinejad, Hong *et al.* 1995), wegen der eine mögliche Kontamination mit Blut die Eigenschaften verschlechtern kann (Nekoofar, Stone *et al.* 2010), wobei das Abbinden und die Möglichkeit der Nutzung trotz Blutung als Vorteil zu sehen ist. Torabinejad und Mitarbeiter argumentieren in einer Studie von 1995, dass MTA trotz Kontamination mit Blut höhere Dichtigkeit durch weniger Leakage aufweist als andere retrograde Füllmaterialien (Torabinejad, Higa *et al.* 1994), auch dank seiner hydrophilen Eigenschaft. Weiterhin wird festgestellt, dass manche MTA-Präparate gräuliche Verfärbungen im Zahn verursachen, vor allem graues MTA (Karabucak, Li *et al.* 2005). Daraufhin wurde weißes MTA entwickelt, das allerdings ebenfalls zu Verfärbungen führen kann (Felman und Parashos 2013). Zur Vermeidung dieser Verfärbungen wird beispielsweise die Zugabe gewisser Stoffe untersucht (Marciano, Camilleri *et al.* 2017), wobei auch die Behandlung bestehender Verfärbungen erforscht wird (Belobrov und Parashos 2011). Andererseits sind Forschungsergebnisse zu finden, die die Verfärbungen als akzeptabel und vergleichbar zu anderen Sealern einordnen (Lee, Lim *et al.* 2016).

In dieser Forschungsarbeit wurde Medcem MTA mit Gentamicin versetzt, um die antimikrobiellen Eigenschaften von MTA mit antibiotischem Zusatz zu untersuchen.

1.3.5.2 Gentamicin

Gentamicin ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Aminoglykoside. Es ist wirksam gegen Staphylokokken, Streptokokken und Enterokokken sowie gegen weitere gramnegative Spezies (Bartal, Danon *et al.* 2003, Beraud, Le Moal *et al.* 2012). Bisher wird es unter anderem in der Orthopädie häufig eingesetzt, beispielsweise als Zusatz zu Zementen bei Gelenkersatz als prophylaktischer Infektionsschutz (Bourne 2004, Gutowski, Zmistowski *et al.* 2014) oder als Zusatz zu Knochenersatzmaterialien (Wu, Huang *et al.* 2018). Die Freisetzung aus Knochenzementen ist zwar erforscht, allerdings sind die Mechanismen noch nicht klar, wie vor allem in einem Review von van de Belt und Mitarbeiter dargestellt (van de Belt, Neut *et al.* 2000, van de Belt, Neut *et al.* 2001). Im Bereich der antibiotikaversetzten Knochenzemente findet bereits die Prüfung der Indikation statt, vor allem im Zusammenhang mit Resistenzen, von bereits genanntem generellen prophylaktischen Einsatz über individuelle Nutzen-Risiko-Abwägung (Hanssen 2004) bis hin zu strenger Indikation ausschließlich für Patienten mit hohem Infektionsrisiko (Jiranek, Hanssen *et al.* 2006). Im Review von van de Belt und Mitarbeiter wird die

Steigerung der Resistenzen speziell gegenüber Gentamicin im Laufe weniger Jahrzehnte beschrieben (van de Belt, Neut *et al.* 2001). Weiterhin ist es in anderen Bereichen der Medizin zu finden. In der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde wird es bei Morbus Menière eingesetzt, da trotz ototoxischer Wirkung vor allem eine signifikante Verringerung der Schwindelepisoden beobachtet wurde (Sam, Chung *et al.* 2016). Verbreitet ist auch die lokale Nutzung bei externen Augeninfekten mit bakteriellem Ursprung (Gwon 1992). Ebenfalls wird es bei bakteriell infizierter Endokarditis empfohlen, die zumeist durch Staphylokokken, Enterokokken und Streptokokken verursacht wird (Beraud, Le Moal *et al.* 2012).

1.4 Gründe für Misserfolg der endodontischen Behandlung

Nachdem die endodontische Behandlung sehr anspruchsvoll ist und aus vielen einzelnen, teils empfindlichen Schritten besteht, ist sie in ihrer Gesamtheit relativ anfällig für Fehler (Estrela, Pécora *et al.* 2017). Dies ist letztendlich eine mögliche Erklärung für Fälle ohne primären Therapieerfolg. Die Literatur beschreibt einige Fehlerquellen, größtenteils im Ablauf der Behandlung, allerdings mit entscheidenden Konsequenzen. Den bereits erörterten Behandlungsschritten sind Fehlerquellen zu entnehmen wie beispielsweise Missachtung der Diagnose und der entsprechenden Behandlungsabfolge sowie Nichteinhaltung der Sterilität im Ablauf durch Arbeiten ohne Kofferdam oder ungenügende Durchführung des entsprechenden Spülprotokolls. Auch die unvollständige Obturation führt folglich zu Undichtigkeiten. Letztendlich führen beinahe alle Mängel in der Behandlung zur Keimbelastung, welche den bedeutendsten Fehler darstellt. Im Folgenden wird darauf näher eingegangen und die Zusammenhänge erläutert.

1.4.1 Fehlerquellen aus Behandlungsabläufen

Wie bereits verdeutlicht, soll die Aufbereitung infiziertes Gewebe und Bakterien entfernen. Mancini und Mitarbeiter konnten zeigen, dass es trotz verschiedener Spülprotokolle sehr schwierig ist, das apikale Drittel zu reinigen (Mancini, Armellini *et al.* 2009). Die Schallaktivierung als zusätzlicher Aufwand verbessert die Reinigung, auch im apikalen Bereich (Sjogren und Sundqvist 1987, Mancini, Cerroni *et al.* 2013). Allerdings kann auch Verständnis der genutzten Materialien das Spülprotokoll verbessern, da Natriumhypochlorit bei kurzer Kontaktzeit und bei niedriger Konzentration *E. faecalis* nicht eliminieren kann (Retamozo, Shabahang *et al.* 2010). Weiterhin macht die individuelle Anatomie eines jeden Wurzelkanals die Aufbereitung kritisch. Allein bakterielles Eindringen in Dentintubuli erschwert deutlich die Reinigung des gesamten Wurzelkanalsystems (Matsuo, Shirakami *et al.* 2003). Ebenfalls ist die vollständige Desinfektion von ovalen Kanälen eine Herausforderung (Alves, Almeida *et al.* 2011), wobei generell alle nicht aufbereiteten Flächen Debris und Bakterien aufweisen und daher problematisch sind (Siqueira, Perez *et al.* 2017). Anatomische Anomalien und Seltenheiten haben generell Einfluss auf die endodontische Therapie (Ahmed und Dummer 2018). Ein häufig missachteter Aspekt sind zusätzliche Wurzelkanäle wie der repräsentative zweite mesiobukkale Kanal in den ersten Molaren des Oberkiefers. Es herrscht Einigkeit, dass erhöhtes

Bewusstsein für die Prävalenz und erhöhter Aufwand zum Auffinden des Kanals die Prognose verbessern würde, da eine Häufigkeit von mindestens 60% erwiesen wurde (Wolcott, Ishley *et al.* 2002, Wolcott, Ishley *et al.* 2005, Chakradhar Raju, Sathe *et al.* 2010, Hosoya, Yoshida *et al.* 2012).

Eine Überpressung und Verschleppung von infiziertem Material nach periapikal durch Überinstrumentierung oder unvorsichtiges Arbeiten kann zur Reizung und zum sogenannten Flare-up führen (Wittgow und Sabiston 1975). Die Definition des Flare-ups ist nicht genau festgelegt und variiert mit den Studien, beschreibt aber grundsätzlich eine akute Exazerbation während oder nach endodontischer Behandlung, eingegrenzt auf Stunden bis wenige Tage nach der Behandlung, oftmals einhergehend mit Schmerzen und Schwellung (Trope 1990, Walton und Fouad 1992, Iqbal, Kurtz *et al.* 2009, Udoe, Jafarzadeh *et al.* 2011). Es konnte ein signifikanter Unterschied in der Prävalenz bei Zähnen mit oder ohne apikaler Parodontitis festgestellt werden (Trope 1990, Iqbal, Kurtz *et al.* 2009). Auch wurde erforscht, dass bestimmte Bakterien mit der Exazerbation assoziiert sind, unter anderem der Anaerobier *P. micra* (Hashioka, Yamasaki *et al.* 1992, Gomes, Drucker *et al.* 1994, Gomes, Lilley *et al.* 1996, Siqueira 2003). Torabinejad und Mitarbeiter konnten in ihrer Studie einen Zusammenhang zwischen Schmerzen vor der Behandlung und Flare-up nachweisen (Torabinejad, Cymerman *et al.* 1994). Generell sind die Ursachen der Entstehung mechanischen, mikrobiellen oder chemischen Ursprungs (Seltzer und Naidorf 1985, Torabinejad, Kettering *et al.* 1988, Siqueira und Barnett 2004). Ein Ansatz, um diese Komplikation zu heilen oder gar zu vermeiden, ist die systemische Gabe von Antibiose (Walton und Chiappinelli 1993, Torabinejad, Cymerman *et al.* 1994, Fouad, Rivera *et al.* 1996, Pickenpaugh, Reader *et al.* 2001). Allerdings hat sich das mehrmals als unwirksam und somit ungeeignet erwiesen (Walton und Fouad 1992, Walton und Chiappinelli 1993, Fouad, Rivera *et al.* 1996, Pickenpaugh, Reader *et al.* 2001). Haapasalo und Mitarbeiter stellten in ihrem Review von 2003 fest, dass systemische Antibiose in der Endodontie keinen Wert hat, außer der Patient zeigt allgemeinmedizinische Indikationen für Antibiotika wie beispielsweise Fieber (Haapasalo, Udnæs *et al.* 2003). Dieselbe Aussage treffen Fouad und Mitarbeiter in ihrem Review und erforschen tiefgehend die Effektivität der systemischen Antibiose gegen Schmerzen (Fouad 2002). Generell ist in der Endodontie die lokale Keimelimination angezeigt.

Signifikant ist die Tatsache, dass Keimarmut des Wurzelkanals zum Zeitpunkt der Obturation essentiell und ausschlaggebend für den Erfolg der Behandlung ist (Fabricius, Dahlen *et al.* 2006). Wenn Bakterien bei einer irreversiblen Pulpitis noch nicht bis nach apikal durchgedrungen sind, kann diagnoseabhängig auf ein zweizeitiges Vorgehen möglicherweise verzichtet werden (Gesi, Hakeberg *et al.* 2006). Im Umkehrschluss ist dadurch das zweizeitige Vorgehen bei Infektion zu betonen. Dem zugehörig ist wiederum die Wichtigkeit der chemomechanischen Aufbereitung sowie der Bakterienelimination durch medikamentöse Einlage bei zweizeitigem Vorgehen (Sjogren, Figdor *et al.* 1997). Fehlerquellen bei der Obturation sind hauptsächlich mit der Dichtigkeit verknüpft, es kommen allerdings auch methodische Mängel vor, wie beispielsweise Nichteinhaltung der Arbeitslänge. Prognostisch ist die Überpressung von Wurzelfüllmaterial am schlechtesten, eine sogenannte zu lange Wurzelfüllung, da somit selbst in Abwesenheit von Bakterien eine periapikale Entzündung hervorgerufen werden kann. Dies hat auch mit der geringen Biokompatibilität der Materialien zu tun (Ricucci und Langeland 1998). Ebenfalls führt Überpressen zu Schmerzen nach dem Abfüllen, was es zu vermeiden gilt (Gesi, Hakeberg *et al.* 2006). Zu kurze Wurzelfüllungen führen zu Undichtigkeiten, wobei es zu beachten gilt, dass die apikale Konstriktion bis zu 3 mm vom radiologischen Apex entfernt sein kann und somit die individuelle Anatomie zum Tragen kommt (Ricucci und Langeland 1998). Übergeordnet gilt es, das Wurzelkanalsystem vollständig zu füllen (Ingle 1961). Die Methode der warmen vertikalen Obturation zeigte durchdringende Füllung bis in die Seitenkanälchen (Reader, Himel *et al.* 1993), wobei eine aktuelle Studie die Qualität der Wurzelfüllung als prognostisch wichtiger einschätzt als die Methode (Sarin, Gupta *et al.* 2016). Es gilt zu bedenken, dass eine einfachere Methode auch behandlerabhängige Fehler ausgleichen kann und somit insgesamt erfolgreichere Ergebnisse liefert. Daher sollte das Ziel sein, eine standardmäßige Technik zu entwickeln (Kerekes und Tronstad 1979).

1.4.2 Undichtigkeiten

Es gibt verschiedene Ursachen, weswegen Undichtigkeiten entstehen. Eine der größten Fehlerquellen ist der koronale Verschluss nach erfolgter Wurzelfüllung. Es wurde mehrfach erforscht, dass ohne adäquaten koronalen Verschluss unter anderem bakterielles Leakage entlang der Wurzelfüllung erfolgt (Madison und Wilcox

1988, Torabinejad, Ung *et al.* 1990, Trope, Chow *et al.* 1995). Es wurde sogar erwiesen, dass im direkten Vergleich eine dichte koronale Restauration signifikant bessere Ergebnisse liefert als eine radiologisch vollständige Wurzelfüllung (Ray und Trope 1995). Andererseits besteht die Ansicht, dass die koronale Restauration hauptsächlich bei unvollständiger Wurzelfüllung bedeutend ist (Siqueira, Rocas *et al.* 2005). Es wurden auch Undichtigkeiten im Sinne des unzureichenden apikalen Seals erforscht, welcher bei unvollständigen, aber auch zu kurzen Wurzelfüllungen mit persistierenden Keimen entstehen kann (Dow und Ingle 1955, Yilmaz, Tuncel *et al.* 2009). Allerdings wurde bereits 1983 festgestellt, dass *in vivo* und *in vitro* Microleakage-Studien schwierig zu vergleichen sind und möglicherweise *in vitro*-Studien überbewertet wurden (Pitt Ford 1983). Es wurde selbst eine Studie speziell zu den statistischen Defiziten der Leakage-Studien und der damit verbundenen unterschiedlichen Interpretationen durchgeführt (Lucena, Lopez *et al.* 2013). Im Review von Li und Mitarbeiter aus dem Jahr 2014 wird die Forschung und deren Schwerpunkte in den entsprechenden zeitlichen, derzeit akademischen Zusammenhang gesetzt und die Schwierigkeit der Analyse des Leakage beschrieben (Li, Niu *et al.* 2014).

1.4.3 Mikrobielle Ursachen und Persistenz der Bakterien

In Abwesenheit von Bakterien entsteht keine Infektion und keine apikale Parodontitis (Moller, Fabricius *et al.* 2004). Ein steriles, bakterienfreies Umfeld ruft weder Schaden an der Pulpa noch Abszedierung oder apikale Entzündung hervor (Kakehashi, Stanley *et al.* 1965). Es wurde mehrfach nachgewiesen, dass persistierende Bakterien maßgeblich verantwortlich für periapikale Entzündungen sind (Nair, Sjogren *et al.* 1990, Lin, Skribner *et al.* 1992, Ricucci und Siqueira 2010). Ebenfalls soll der Fokus auf mikrobielle Ursachenfindung gelegt werden, wenn apikale Läsionen bestehen beziehungsweise nicht heilen (Bystrom, Happonen *et al.* 1987). Somit wird die Prognose und die Heilung deutlich verbessert, wenn der Fokus auf komplette Bakterienentfernung vor der Obturation gelegt wird (Sjogren, Figdor *et al.* 1997). Außerdem ist der periapikale Zustand vor der Therapie einzuschätzen und der Einfluss der Keime bei prätherapeutischer apikaler Parodontitis zu beachten (Sjögren, Hägglund *et al.* 1990). Nachdem es nicht möglich ist, das gesamte Wurzelkanalsystem zu säubern und somit absolute Keimfreiheit nicht erlangt werden kann (Siqueira, Araujo *et al.* 1997, Ricucci und Langeland 1998, Mancini, Armellin *et*

al. 2009), geht der Erfolg der endodontischen Behandlung mit der größtmöglichen Keimelimination einher. Bakterieller Biofilm im infizierten Wurzelkanalsystem kann durch das gängige Spülprotokoll, Natriumhypochlorit und EDTA, signifikant reduziert werden (Ozdemir, Buzoglu *et al.* 2010). Somit erhöht sich das Verständnis für die Rolle des endodontischen Mikrobioms trotz vermeintlich visuell korrekter Wurzelfüllung (Spangberg 1998) und kann zum Verständnis der Therapie abhängig von der Diagnose führen. In primär infizierten Zähnen mit nekrotischer Pulpa konnte eine Vielfalt von Keimen, grampositive und gramnegative, jedoch größtenteils anaerobe Bakterien nachgewiesen werden (Gomes, Pinheiro *et al.* 2004, Sassone, Fidel *et al.* 2008, Gomes, Sarkis-Onofre *et al.* 2013). Einer der am häufigsten isolierten Anaerobier war *P. micra*, vor allem aus Zähnen mit unbehandelten Wurzelkanälen (Bystrom und Sundqvist 1981, Gomes, Pinheiro *et al.* 2004, Gajan, Aghazadeh *et al.* 2009, Kist, Kollmuss *et al.* 2017). Zumeist über eine kariöse Läsion und infolgedessen entstehender irreversibler Pulpitis kann *P. micra* in das Wurzelkanalsystem eindringen (Rocas, Lima *et al.* 2015), kann aber durch diverse desinfizierende Maßnahmen wirksam entfernt werden (Spratt, Pratten *et al.* 2001, Huth, Quirling *et al.* 2009). Gewissermaßen wird dies durch niedrige Prävalenzen im Keimspektrum der Misserfolge bekräftigt (Gomes, Pinheiro *et al.* 2004).

Sekundär infizierte Zähne mit apikaler Parodontitis nach endodontischer Behandlung zeigten häufig grampositive, fakultative Anaerobier (Molander, Reit *et al.* 1998, Sundqvist, Figdor *et al.* 1998, Gomes, Pinheiro *et al.* 2004). Mit zum Teil sehr hohen Prävalenzen wurde *E. faecalis* aus Fällen mit misslungener primärer Therapie am häufigsten nachgewiesen (Molander, Reit *et al.* 1998, Sundqvist, Figdor *et al.* 1998, Siqueira und Rocas 2004). Andererseits kommt *E. faecalis* selten bis kaum in der Flora eines primär infizierten Zahnes vor, wodurch ein Eindringen in das Kanalsystem während endodontischer Behandlung vermutet wird (Sundqvist, Figdor *et al.* 1998). Einmal ins Kanalsystem eingebracht, zeigt die hohe Prävalenz in sekundären Infektionen die Schwierigkeit der Elimination. Daher kann der Erfolg einer Revisionstherapie durch Vorhandensein von *E. faecalis* negativ beeinträchtigt werden (Sundqvist, Figdor *et al.* 1998). Generell kann dieser Keim unter schwersten Bedingungen überleben und somit auch nach langer Zeit zur apikalen Infektion führen (Figdor, Davies *et al.* 2003). Es sollten alle Maßnahmen ergriffen werden, um sowohl ein Eindringen von Bakterien zu vermeiden als auch alle beschriebenen Möglichkeiten der Keimelimination zu nutzen.

2 Ziel der Studie

Allein in der endodontischen Primärtherapie gibt es zahlreiche Möglichkeiten der Keimreduktion. Die hohe Anzahl und Vielfalt der Studien zur Keimelimination und generell Erforschung der endodontischen Mikrobiologie zeigt, dass die Zusammenhänge zwischen mikrobiellen Ursachen und Erfolg vermehrt verstanden werden. Trotzdem besteht in der Praxis ausreichend Bedarf für eine erneute Behandlung primär misslungener Fälle. Demnach kann die endodontische Therapie durch Verbesserung des mikrobiologischen Verständnisses der Zahnmediziner deutlich optimiert werden. Um weitere Aspekte der Keimreduktion zu untersuchen, wurden Erkenntnisse aus bestehenden Studien zum Keimspektrum mit Möglichkeiten der Keimreduktion kombiniert. Dazu soll untersucht werden, ob eine Kombination aus Medcem MTA und einem lokal wirksamen Antibiotikum zur Reduktion der Bakterien mit höchsten Prävalenzen bei primärer und sekundärer Infektion führt. Ziel dieser Studie ist es, die Freisetzung des Gentamicins aus Medcem MTA zu ermitteln sowie die Wirksamkeit verschiedener Konzentrationen des Gentamicins gegen *E. faecalis* und *P. micra*-Biofilme zu untersuchen.

Zur Untersuchung der Freisetzung sollen Proben aus Medcem MTA mit Gentamicin versetzt werden und die daraus ausgetretene Gentamicinmenge mittels ELISA-Assay gemessen werden. Parallel dazu soll mittels Gentamicin-Etest eine Konzentration von Gentamicin ermittelt werden, die mindestens aus der Freisetzung erreicht werden muss, um *E. faecalis* und *P. micra* abzutöten. Darauf folgend sollen verschiedene Proben aus mit Gentamicin versetztem MTA mit dem jeweiligen Biofilm der beiden Keime in Kontakt gebracht werden. Die verbliebenen Bakterien sollen nach dem Kontaktzeitraum quantifiziert und daraus Desinfektionsstufen abgeleitet werden.

Die Hypothese ist somit, dass Gentamicin aus der Medcem MTA-Probe austritt und einen antimikrobiellen Effekt sowohl auf *E. faecalis*-Biofilm als auch auf *P. micra*-Biofilm zeigt. Dadurch soll zusätzliche Keimreduktion erforscht werden.

3 Material und Methode

Im ersten Abschnitt wurde zunächst ermittelt, ob eine Freisetzung von Gentamicin aus medizinischem Portlandzement erfolgt. Dafür wurden verschiedene Konzentrationen des Gentamicins zu Medcem MTA beigemischt. In festgelegten Zeitabständen wurden Proben entnommen und die Menge an herausgelöstem Gentamicin mithilfe eines ELISA-Assays gemessen. Die Auswertung erfolgte qualitativ und quantitativ. Die Ergebnisse der Freisetzung des Gentamicins bestimmen die Parameter für weitere Versuche.

Im zweiten Abschnitt wurde die antimikrobielle Wirkung bestimmt, indem untersucht wurde, inwieweit mit Gentamicin versetztes MTA eine bakterizide Wirkung auf *E. faecalis* und *P. micra* aufweist. Dazu waren einige Vorversuche notwendig, um letztendlich einen Kontaktversuch zwischen bakteriellem Biofilm und gentamicinhaltigem Medcem MTA durchführen zu können. Zunächst wurde mittels Etest die Minimum Inhibitory Concentration (MIC) von Gentamicin für beide Bakterienarten ermittelt, um Konzentrationen für die Zementproben festzulegen. Es wurde aus Rinderzähnen Dentin entnommen und darauf Biofilme der jeweiligen Bakterienspezies angezüchtet. Letztlich wurde ein Kontaktversuch zwischen bakteriellem Biofilm und Zementproben mit verschiedenen Gentamicinmengen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mittels einer Verdünnungsreihe und Messung der Anzahl der bestehenden Bakterienkolonien (CFU) ermittelt. Die Auswertung erfolgte sowohl numerisch, graphisch als auch logarithmisch und es wurden daraus Statistiken ermittelt.

Nachfolgend werden alle Methoden beider Abschnitte beschrieben. Ebenfalls wird die Wahl der Auswertungsmethoden erklärt, die für die jeweiligen Versuche notwendig waren.

3.1 Gentamicin-Freisetzung aus Zementproben

Im ersten Abschnitt wurde die Freisetzung des Gentamicins aus MTA bestimmt, die für alle weiteren Versuche erforderlich ist. In diesem Versuch wurde Medcem MTA (MEDCEM MTA Röntgensichtbarer Medizinischer Portlandzement, Lot RX150627, Medcem GmbH, Weinfelden, Schweiz) verwendet. 50 ml einer Stammlösung mit einer Konzentration von 1000 µg/ml wurden in einem Falcon-Röhrchen aus Gentamicin (Gentamicin sulfate, Lot P500077, Sigma-Aldrich, USA) und Phosphate Buffered Saline (PBS) (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Lot RNBD2639, Sigma-Aldrich, USA) hergestellt. Die Konzentration von 1000 µg/ml wurden aus dem in 2.2 beschriebenen Gentamicin-Etest-Versuch entnommen, da diese beiden Versuche parallel zueinander geschahen.

3.1.1 Versuchsaufbau und Probenentnahmen

Für die Herstellung der Zementproben wurden Gentamicinlösungen mit PBS in den Konzentrationen 0 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml und 1000 µg/ml benötigt. Die Konzentration 0 µg/ml wurde durch reines PBS erreicht, die Konzentration von 1000 µg/ml wurde aus der Stammlösung entnommen. In drei weiteren Reaktionsgefäßen (Reagiergefäß 1,5 ml EASY CAP, Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland) wurden die Konzentrationen 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml hergestellt. In das erste Reaktionsgefäß wurden 900 µl PBS und 100 µl Gentamicin-Stammlösung pipettiert (Pipette Eppendorf research 1000µl, Eppendorf AG, Hamburg; Pipettierspitzen epT.I.P.S. Standard 50-1000 µl, Lot E164805R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland), um eine Konzentration von 100 µg/ml zu erreichen. In das zweite Gefäß wurden 750 µl PBS und 250 µl Stammlösung pipettiert, um eine Konzentration von 250 µg/ml zu erreichen. In das dritte Reaktionsgefäß wurden jeweils 500 µl PBS und Stammlösung pipettiert, um eine Konzentration von 500 µg/ml zu erreichen.

Medcem MTA wird als Kapsel vertrieben. Laut Hersteller enthält eine Kapsel circa 0,35 g Portlandzement (www.medcem.ch), die Flüssigkeitsmenge ist nicht konkret definiert. 116 µl Flüssigkeit pro Kapsel wurden determiniert, da der Zement mit der Konsistenz bei diesem Verhältnis gut zu verarbeiten war. Auf einem Anmischblock aus beschichtetem Papier wurden zwei Kapseln des medizinischen Portlandzements entleert und mit 232 µl PBS angemischt. Diese Probe wurde als Kontrollprobe für

Zement ohne Gentamicin mit einer Konzentration von 0 µg/ml hergestellt. Die Masse wurde zur Formgebung in die Öffnung eines Metallrings (20 mm Innendurchmesser, 2 mm Höhe) eingestrichen. Für jede Konzentration wurden zwei gefüllte Metallringe hergestellt. Dieser Vorgang wurde mit Gentamicinlösungen mit den Konzentrationen 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml und 1000 µg/ml wiederholt. Es wurden insgesamt zehn Zementproben hergestellt. Der Metallring wurde vor der Aushärtung entfernt, da es schwierig ist, die Probe vollständig im ausgehärteten Zustand herauszulösen. Die Form der Zementprobe soll unversehrt bleiben, da die Oberfläche für den Versuch wesentlich ist. Die Proben wurden anschließend zur Aushärtung im Inkubator (Inkubator INNOVENS, Jouan, USA) in einer feuchten Kammer mit 100% Luftfeuchtigkeit bei 37°C gelagert. Laut Webseite des Herstellers (FAQs der Webseite medcem.ch) ist nach circa 195 min die erste Abbindephase abgeschlossen. Demzufolge wurden mindestens vier Stunden Aushärtungszeit gewährleistet.

Für den nächsten Schritt wurden zwei 6-Well-Platten (6 Well Cell Culture Plate sterile with lid, CELLSTAR greiner bio-one, Österreich) vorbereitet. Dazu wurde in die erste 6-Well-Platte in fünf Wells jeweils 7 ml PBS pipettiert und jeweils eine der Zementproben der unterschiedlichen Konzentrationen eingelegt. In die zweite 6-Well-Platte wurde in fünf Wells jeweils 7 ml Alpha Medium (MEM Alpha Medium (1X) + GlutaMAX-I Minimum Essential Medium, gibco by Life Technologies Corporation, UK) pipettiert und ebenfalls jeweils eine der Zementproben der unterschiedlichen Konzentrationen eingelegt. Somit wurde jede Zementprobe in zwei verschiedenen Medien eingelegt, wie auf Abbildung 1 dargestellt. Beide 6-Well-Platten wurden in einem Inkubiercontainer (BD GasPak EZ Incubation Container, Becton, Dickinson and Company, USA) aufbewahrt, um Verdampfung des Mediums zu vermeiden. Dieser wurde bei 37°C in den Schüttler (Forma Orbital Shaker, Thermo Electron Corporation, USA) bei 25 rpm gestellt.



Abbildung 1: Gentamicinversetzte Zementproben im Inkubiercontainer

Nach jeweils 12 h, 24 h, 36 h und 48 h wurden 300 µl aus jeder Probe entnommen und in beschriftete Reagiergefäße pipettiert, wie auf Abbildung 2 dargestellt.

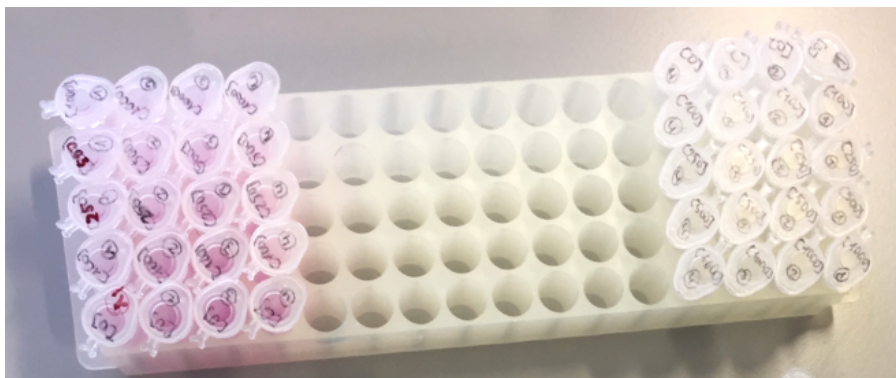


Abbildung 2: Entnommene Proben

3.1.2 Assay und Auswertungsmethode

Für die Quantifizierung des Gentamicins wurde ein GEN (Gentamicin) ELISA Kit (Gentamicin (GEN) ELISA Kit, Lot L04QGE28, MyBioSource, San Diego, CA, USA) verwendet. Bei diesem ELISA handelt es sich um ein kompetitives Immunoassay, wobei ein markiertes Antigen mit dem zu messenden Gentamicin konkurriert. Die Bindung an den Antikörper erfolgt in negativer Korrelation. Somit ist die beobachtete Färbung umgekehrt proportional zur vorhandenen Menge an Gentamicin, da eine hohe Farbentwicklung für eine große Menge an gebundenem markiertem Antigen spricht. Die im Kit enthaltenen Redissolving Solution, HRP-Conjugate und Waschpuffer wurden zunächst nach Anleitung verdünnt. Die Standardlösungen wurden unverdünnt aus dem Kit entnommen. Bei Durchführung wurde stets die

Anleitung für „Serum“ befolgt. Um im Messbereich des Assays zu liegen, wurde zunächst eine Verdünnungsreihe hergestellt. Dazu wurden 12,5 µl aus jeder der 20 Proben entnommen und in entsprechend beschriftete Reaktionsgefäße mit 987,5 µl der entsprechenden Lösung, PBS oder Alpha Medium, pipettiert. Daraus wurden die zu messenden Proben hergestellt, indem aus den jeweiligen verdünnten Proben 50 µl entnommen wurden und mit 950 µl der verdünnten Redissolving Solution für 1 min vermischt wurden. In die 48-Well-Platte wurden 50 µl der Standardlösungen beziehungsweise der Proben pipettiert. Jedem Well wurden 50 µl HRP-conjugate beigefügt. Die Platte wurde gevortext (Vortex Mixer, neoLab, Heidelberg, Deutschland), mit der Verschlussmembran versiegelt und bei 25°C für 30 min inkubiert. Danach wurden alle Reagenzien entfernt, indem die Platte geleert und durch viermaliges Waschen mit jeweils 250 µl Waschpuffer von überschüssiger Flüssigkeit befreit wurde. Anschließend wurde die Platte mittels Färbesubstrat eingefärbt. Dazu wurden 50 µl der Substrate A Solution und 50 µl der Substrate B Solution nacheinander in jedes Well pipettiert. Abbildung 3 zeigt die Mikroplatte nach dem Einfärben. Nach einer weiteren Inkubation im Dunklen für 15 min bei 25°C muss die Färbungsreaktion angehalten werden. Dazu wurden 50 µl der Stop Solution in jedes Well pipettiert, wodurch sich die Farbe von blau zu gelb veränderte. Abbildung 4 zeigt diese farbliche Veränderung. Die Platte konnte daraufhin gemessen und ausgewertet werden.

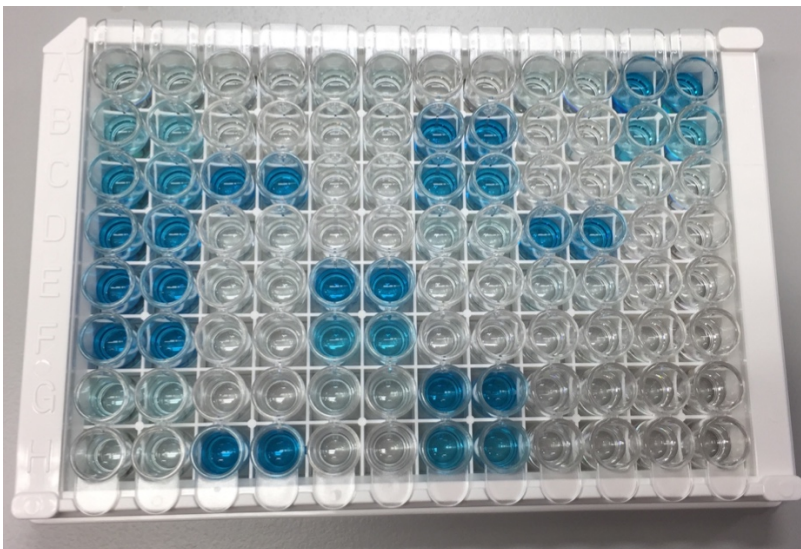


Abbildung 3: Mikroplatte nach Einfärben

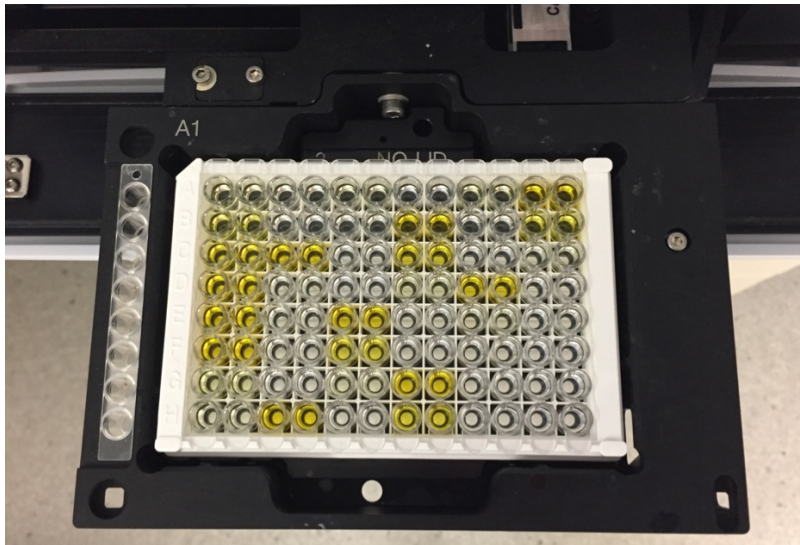


Abbildung 4: Mikroplatte vor Messung

Es wurden im Photometer (VARIOSKAN, Thermo Electron Corporation, USA) die Extinktionen der Proben bei 450 nm gemessen. Für die Auswertung wurden die Messwerte der bekannten Standards mit den Messwerten der Proben verglichen. Dazu wurden nach Anleitung des Assays die prozentuale Absorption errechnet und graphisch aufgetragen, um eine Standardkurve zu erhalten. Dieser Wert wurde mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert, um die absolute Menge an freigesetztem Gentamicin zu ermitteln. Diese Ergebnisse wurden graphisch aufgetragen, jeweils für den Versuch mit PBS und Alpha MEM.

Vor der quantitativen Auswertung konnte anhand des farblichen Vergleichs der Proben auf der Platte mit dem Standard qualitativ festgestellt werden, dass eine wesentliche Freisetzung erfolgt ist, wie auf den Abbildungen 3 und 4 zu sehen ist.

3.2 Grundlagen der Bakterienanzucht

In dieser Studie wurden *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) und *Parvimonas micra* (ATCC 33270) verwendet. Aufgrund der jeweiligen mikrobiologischen Eigenschaften mussten Unterschiede in der Anzucht beachtet werden, unter anderem bei der Wahl des Nährmediums, des Sauerstoffgehalts und der Wachstumszeit.

3.2.1 Nährmedien, Erstanzucht und Stammerhaltung

Es wurden zwei verschiedene Nährmedien verwendet. Zur Anzucht des *E. faecalis* wurden Columbia-Agarplatten (Columbia Agar with 5% Sheep Blood, BD, USA) benutzt, für die Anzucht des *P. micra* wurden Schaedler-Agarplatten (Schaedler Agar with Vitamin K1 and 5% Sheep Blood, BD, USA) verwendet. Die Wahl des Nährmediums richtete sich nach dem anzuzüchtenden Bakterium, da Columbia-Agar als unspezifisches, für Enterokokken geeignetes Nährmedium gilt und Schaedler-Agar für obligate Anaerobier das entsprechende unspezifische Nährmedium darstellt. Die genaue Zusammensetzung der Nährmedien ist dem Verzeichnis unter Stichpunkt 9 zu entnehmen.

Für die Anzucht von *E. faecalis* und *P. micra* wurde ein Impfösausstrich auf die jeweilige Platte durchgeführt. Es wurde ein Dreifelderausstrich gewählt, um isoliert wachsende Reinkulturen als Einzelkolonien für die Weiterverarbeitung zu erhalten. Dies wird erreicht, indem man zuerst eine etwas größere Menge des Bakteriums auf eine Seite einer Impföse aufnimmt. Die Fläche der Impföse wird mit sanftem Druck in Serpentinform über knapp die Hälfte der Agarplatte gestrichen. Die Impföse wird um 180° gedreht, mit der anderen Fläche wird einmal über die bereits beimpfte Fläche gestrichen und damit eines der freien Viertel bestrichen. Für das letzte Viertel wird das Procedere mit der Kante der Impföse wiederholt. Abbildung 5 zeigt einen Dreifelderausstrich von *P. micra*. Nach dieser ersten Anzucht wurden die isolierten Einzelkolonien neu überimpft. Bei *E. faecalis* wurde eine einzelne Kolonie überimpft, bei *P. micra* wurden circa zehn Einzelkolonien für ausreichendes Wachstum überimpft (Bast 2014).

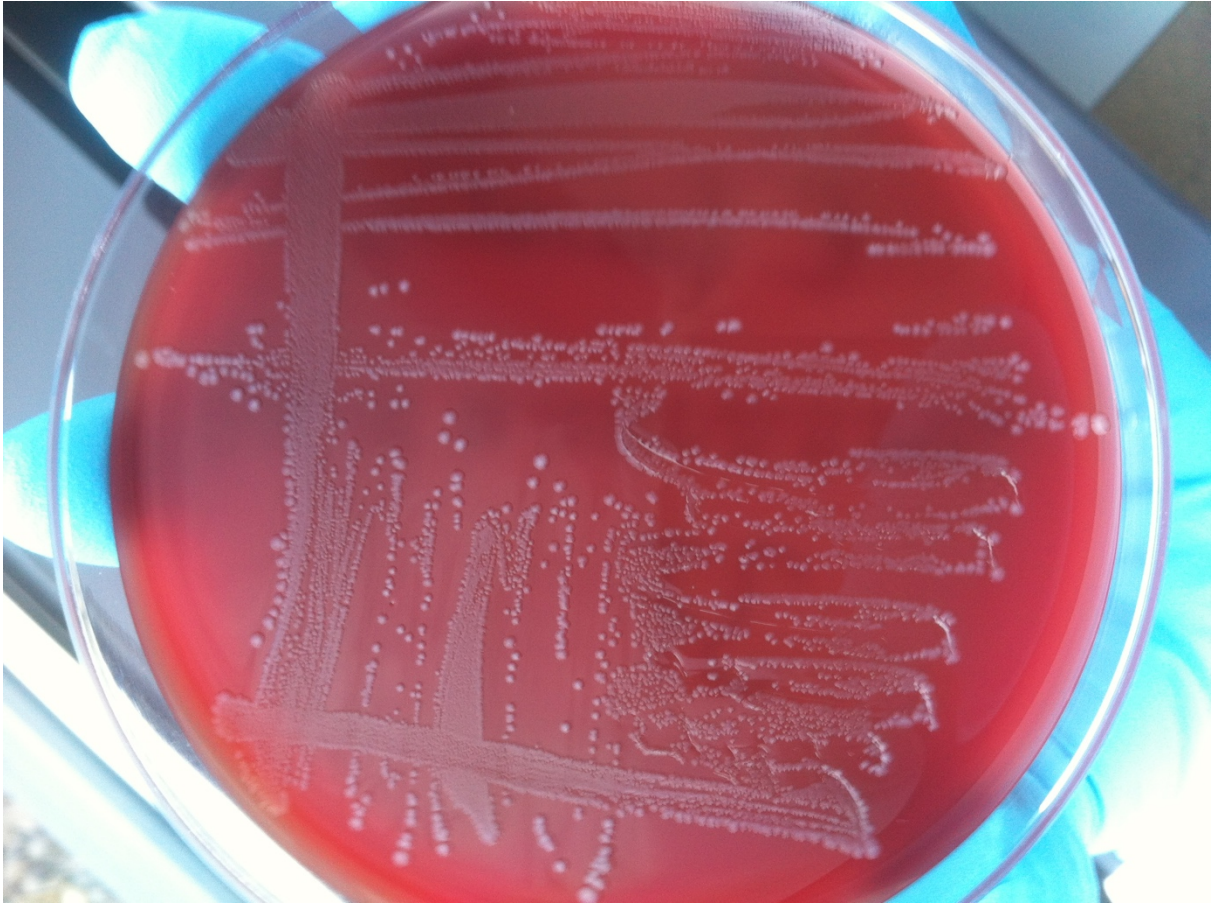


Abbildung 5: Dreifelderausstrich von *P. micra*

Für die Stammerhaltung wurden 100 ml Brain-Heart-Infusion (BHI) (Brain-Heart-Infusion (BHI), BD, USA) mit 10% Glycerin hergestellt. Dafür wurden, den Herstellerangaben folgend, 37 g des BHI-Pulvers in 1000 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Nach Autoklavierung wurden 10 ml Glycerin hinzugefügt. Die genaue Zusammensetzung ist dem Verzeichnis unter Stichpunkt 9 zu entnehmen. Es wurden 2 ml BHI in ein Falcon-Röhrchen pipettiert und eine große Menge Bakterien mittels einer Impföse aufgenommen und hinzugegeben. Zunächst wurde das Reaktionsgefäß bei -20°C eingefroren und nach circa 5 Tagen in der Stickstoffkühlung (flüssiges N_2 , Gasphase) gelagert.

3.2.2 Inkubation und Wachstum

Neben der passenden Wahl des Mediums sind die Inkubationsbedingungen entscheidend für das Wachstum eines Bakteriums. Beide in diesem Versuch verwendeten Keime wurden bei 37°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70% und 5,8% CO_2 inkubiert (Steri-Cult CO_2 Incubator, Thermo Electron Corporation, USA).

Die Inkubation der Platten mit *E. faecalis* kann im aeroben Milieu geschehen. Die beimpften Columbia-Agarplatten wurden für 24 h in den Inkubator gestellt, der Wachstumszeit für *E. faecalis* entsprechend. *P. micra* hingegen wird anaerob inkubiert. Die beimpften Platten wurden im bereits beschriebenen Containersystem von BD im anaeroben Milieu, erzeugt durch EZ GazPaks (GasPak EZ Anaerobe Gas Generating Pouch System with Indicator, Becton, Dickinson and Company (BD), USA), im Inkubator aufbewahrt. Die Wachstumszeit beträgt 5 Tage.

Für den folgenden Versuch, den Gentamicin-Etests, wurden vier Platten *E. faecalis* und *P. micra* angezüchtet.

3.3 Gentamicin-Etest

Um die Minimum Inhibitory Concentration (MIC) von Gentamicin bei jeweils *E. faecalis* und *P. micra* zu bestimmen, wurden Etests durchgeführt. Die MIC beschreibt die geringste benötigte Konzentration eines antibakteriellen Mittels, um das Wachstum eines Mikroorganismus zu hemmen (Hof, Dörries *et al.* 2009).

Der Versuchsaufbau ist für *E. faecalis* und *P. micra* identisch, bis auf die anaerob gehaltene Inkubation des *P. micras* über die Wachstumszeit und der unterschiedlichen Agarplatten. Für den Versuch wurde von mehreren Agarplatten mithilfe einer Impföse (Impfösen starr 10 µl, VWR International, Darmstadt, Deutschland) eine größere Menge Bakterien aufgenommen und mit 500 µl PBS in einem Reaktionsgefäß für 30 s gevortext. Aus dieser hochkonzentrierten Bakterienlösung wurden Verdünnungen von 1:10 und 1:100 hergestellt. Dazu wurden in zwei weitere Reagiergefäße jeweils 900 µl PBS pipettiert. Aus der konzentrierten Bakterienlösung wurden 100 µl entnommen und dem ersten Reagiergefäß beigefügt. Dieses entspricht der 1:10-Verdünnung und wurde für 10 s gevortext. Aus der 1:10-Verdünnung wurden 100 µl entnommen und dem zweiten Reagiergefäß beigefügt. Diese wurde als die 1:100-Verdünnung beschriftet und für 10 s gevortext.

Es wurden 100 µl der 1:100-Verdünnung entnommen und auf einer Columbia- bzw. Schaedler-Agar-Platte ausplattiert, um einen gleichmäßigen Bakterienrasen zu bilden. Dafür wurde die Agarplatte mit der Bakterienlösung auf dem Petrischalen-Drehtisch (Petrischalen Drehtisch petriturn-M, schuett-biotec.de) gedreht und mit einem Spatel (Spatel T-Form, VWR International, Darmstadt) gleichmäßig auf das Nährmedium ausplattiert. Abbildung 6 zeigt das Ausplattieren der jeweiligen Bakterienlösung. Dies wird mit der 1:10-Verdünnung sowie mit der hochkonzentrierten Bakterienlösung wiederholt.



Abbildung 6: Ausplattieren der Bakterienlösung

Auf jede der drei beimpften Platten wurde ein Gentamicin-Etest-Streifen (Gentamicin GM 256, bioMérieux USA, North Carolina, USA) mittig aufgelegt und inkubiert. Die Inkubationszeit und -art richtet sich nach dem Bakterium. Die Platten mit *E. faecalis* wurden für 24 Stunden bei den bereits beschriebenen Konditionen inkubiert, während die Platten mit *P. micra* für fünf Tage im anaeroben Milieu bebrütet wurden.

Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Platten entnommen und nach Anleitung des Herstellers ausgewertet, indem der Wert auf dem Gentamicin-Etest-Streifen an der Wachstumsgrenze des Bakterienfilms, an der Grenze der sogenannten Hemmhof-Ellipse, abgelesen wurde. Dieser Wert entspricht der Gentamicinkonzentration an dieser Stelle des Streifens und repräsentiert die Konzentration des Gentamicins, bei der die Hemmung des Bakterienwachstums beginnt. Abbildungen 7 und 8 zeigen einen Etest-Versuch mit *E. faecalis*. Abbildung 8 ist die Nahaufnahme der Platte auf Abbildung 7. Der gesamte Versuch wurde dreimal durchgeführt, um einen Mittelwert der MIC zu ermitteln. Für die Freisetzungs- und Kontaktversuche wurde ein Vielfaches der Konzentration des Gentamicins gewählt, da die freigesetzte Menge zu Beginn nicht bekannt war.

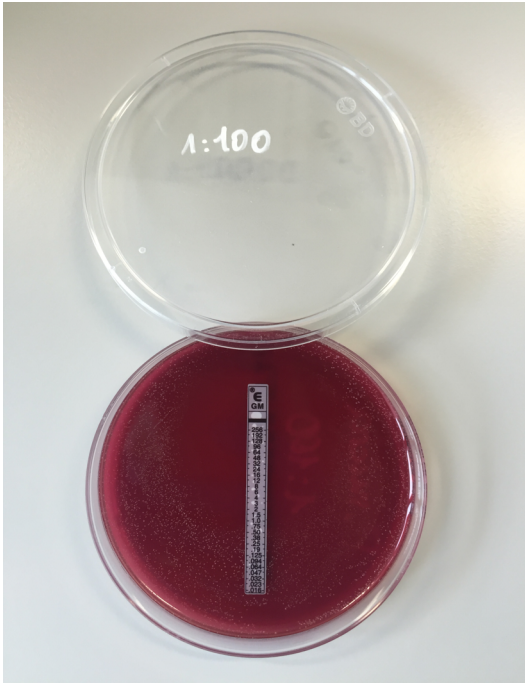


Abbildung 7: Etest-Versuch mit *E. faecalis* in höchster Verdünnung mit Inhibitionszone (Hemmhof-Ellipse)

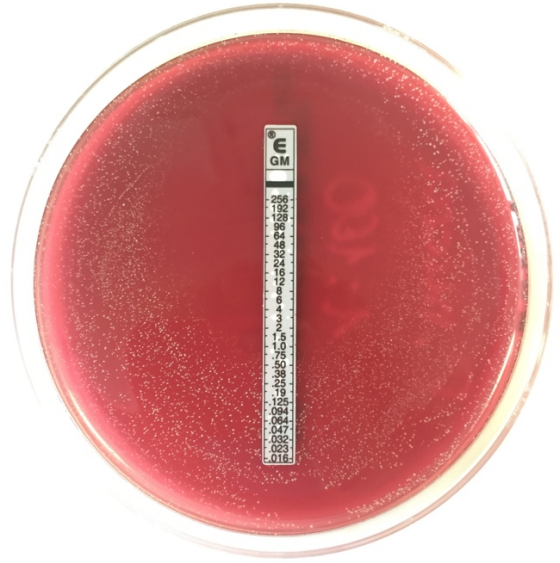


Abbildung 8: Nahaufnahme der Inhibitionszone (Hemmhof-Ellipse)

3.4 Rinderzahnextraktion und -aufbereitung

Für den anschließenden Versuch wurde ein Dentin-Biofilm aus dem jeweiligen Bakterium benötigt. Um eine möglichst große Dentinfläche zur Verfügung zu haben, wurden Rinderfrontzähne verwendet, sodass eine dementsprechend große Biofilmfläche angezchtet werden konnte. Es wurden in diesem Versuch zwei Frontzähne verwendet. Diese wurden aus einem Rinderunterkiefer extrahiert und dem Querschnitt nach mithilfe einer Diamantsäge in 2 mm dicke Scheiben zugeschnitten. Abbildung 9 zeigt das Sägen der extrahierten Rinderzähne, Abbildung 10 zeigt einen solchen Rinderzahn und Abbildung 11 zeigt ein gesägtes Dentinscheibchen.

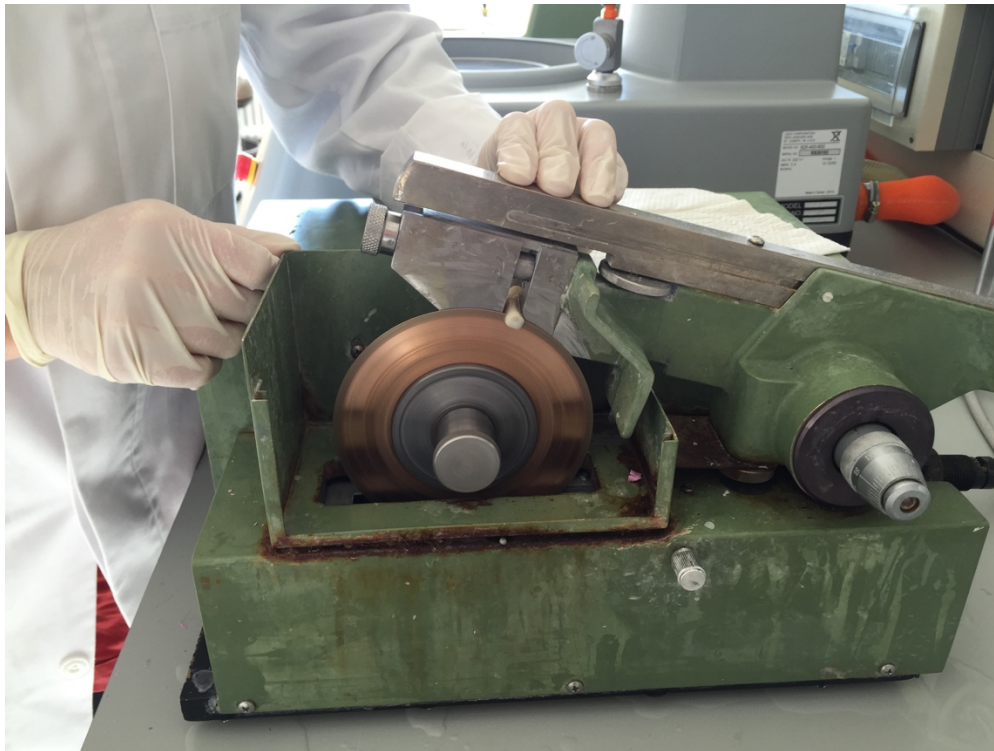


Abbildung 9: Sägen der extrahierten Rinderzähne



Abbildung 10: Extrahierter Rinderfrontzahn



Abbildung 11: Gesägtes Scheibchen des extrahierten Rinderfrontzahns

Zur Keimreduktion der Dentinplättchen wurde zunächst mechanisch der Pulpaanteil entfernt. Die chemische Aufbereitung erfolgte mit Natriumhypochlorit und EDTA. Die Dentinplättchen wurden für 15 min in 3%-iges Natriumhypochlorit (HISTOLITH NaOCl 3%, lege artis Pharma GmbH, Dettenhausen, Deutschland) eingelegt, wobei die antimikrobielle und gewebssauflösende Wirkung des Natriumhypochlorits genutzt wurde. Anschließend wurden sie für 5 min in 17%-iges EDTA (hauseigene Apotheke, LMU Klinikum) eingelegt, um anorganische Verunreinigungen zu lösen und den smear layer zu entfernen. Abschließend wurden die Dentinplättchen autoklaviert (Varioklav Dampfsterilisator, Schembera, München, Deutschland). Diese Vorgehensweise sollte im Vorfeld des Hauptversuches möglichst eine Sterilität des Dentins gewährleisten.

3.5 Biofilmanzucht

Nach Aufbereitung der Dentinplättchen wurde ein Biofilm der jeweiligen Bakterien angezüchtet. Dafür wurden im Vorfeld fünf Platten der beiden Bakterienarten frisch überimpft, da eine größere Menge Bakterien benötigt wurde.

3.5.1 *Enterococcus faecalis*-Biofilmanzucht

Das in diesem Versuch verwendete Modell soll möglichst genau die Konditionen im menschlichen Wurzelkanal simulieren. Daher wurde zur Biofilmanzucht das von Wong und Mitarbeiter im Jahr 2007 beschriebene Medium Basal Medium Mucin (BMM) hergestellt und verwendet. BMM simuliert orales Fluid, enthält Speichelproteine und Aminosäuren und eignet sich speziell für die Anzucht des benötigten Dentinbiofilms. Die genaue Zusammensetzung des Mediums ist dem Verzeichnis unter Stichpunkt 9 zu entnehmen. (Wong und Sissons 2007).

Abbildung 12 zeigt den nachfolgend beschriebenen Versuchsaufbau. In eine 6-Well-Platte wurde in zwei der Wells ein gereinigter und desinfizierter Ständer für die Dentinplättchen hineingelegt. Diese selbst hergestellten Ständer wurden benutzt, um möglichst viel Dentinoberfläche für das Biofilmwachstum zugänglich zu machen. In die Reihen des Ständers wurden pro Well sechs Dentinplättchen gestellt. Es wurde darauf geachtet, dass die zusammengehörigen Dentinplättchen in einem Well annähernd die gleiche Größe haben, sodass die zu bewachsende Fläche etwa gleich ist. Jedes Well wurde mit BMM befüllt, bis alle Dentinplättchen mit Medium bedeckt waren und die Menge wurde auf dem Deckel notiert. Es wurden zwei Reagiergefäße mit 300 µl sterilem Wasser befüllt. Mit Impfösen wurde eine große Menge Bakterien von jeder der im Vorfeld überimpften Platten entnommen und im Reagiergefäß mit dem Wasser vermengt und gevortext. Es wurde darauf geachtet, dass in etwa dieselbe Menge Bakterien gleichmäßig von allen Platten beiden Reagiergefäßen zugesetzt wurde. Die Bakteriensuspensionen wurden jeweils in die beiden Wells hineinpipettiert und vorsichtig mit der Pipette vermischt. Die Well-Platte wurde bei 37°C im Shaker bei 25 rpm inkubiert.

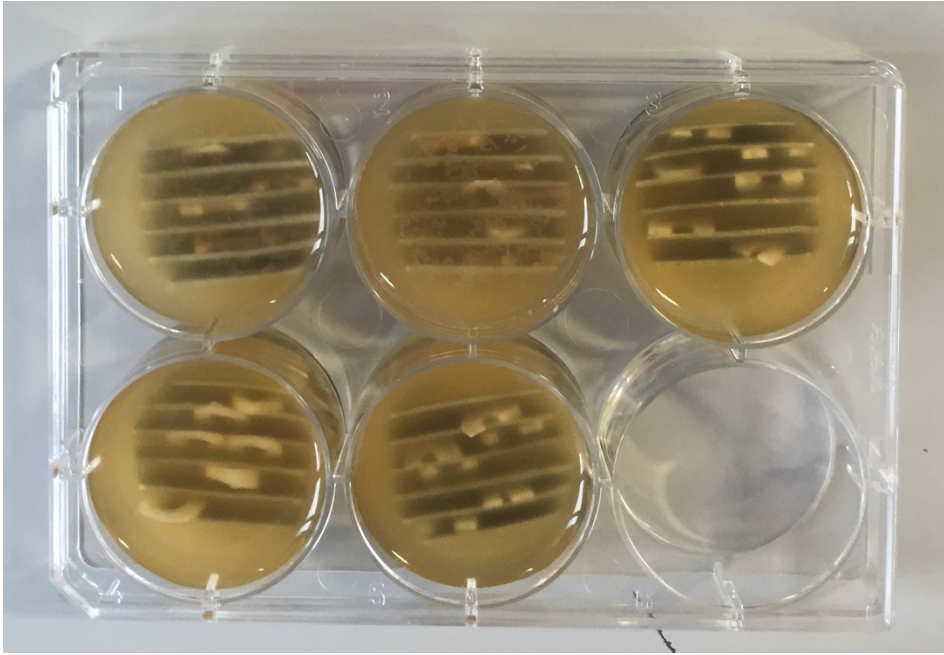


Abbildung 12: Biofilmanzucht auf Dentinplättchen in BMM-Nährmedium

Die Wachstumszeit für den Biofilm war fünf Tage. Nachdem *E. faecalis* relativ aktiv ist und schnell metabolisiert, wurde täglich das Medium gewechselt und frisches BMM hinzugegeben. Dafür wurde die Hälfte des Mediums aus jedem Well pipettiert und die gleiche Menge frisch hinzugegeben. Am dritten Tag wurden frische Bakterien hinzugefügt. Dazu wurden zwei Reagiergefäße mit jeweils 300 µl sterilem Wasser gefüllt und jedem der Reagiergefäße von zwei verschiedenen Platten *E. faecalis* mit einer Impföse beigegeben. Dies wurde gevortext und den beiden Wells hinzugefügt. Es muss darauf geachtet werden, dass rechtzeitig, unter Beachtung der Wachstumszeit von 24 Stunden, frische *E. faecalis*-Platten überimpft werden.

Dieser Biofilm wurde für den nachfolgend beschriebenen Kontaktversuch hergestellt, sodass die Anzahl der Wiederholungen sich an der Versuchsanzahl des Kontaktversuchs orientiert. Dementsprechend muss der Biofilm jedes Mal voneinander unabhängig, in separaten Wells für den jeweiligen Versuch, angezüchtet werden.

3.5.2 *Parvimonas micra*-Biofilmanzucht

Die grundlegende Anzucht des *P. micra*-Biofilms gleicht der beschriebenen *E. faecalis*-Anzucht, allerdings müssen einige essentielle Unterschiede beachtet werden. Als Anaerobier muss die Biofilmanzucht des *P. micra* im sauerstofffreien Milieu erfolgen. Demnach wurde die präparierte 6-Well-Platte für die gesamte

Biofilmanzucht im Containersystem von BD gelagert, in dem mithilfe der EZ GazPaks ein anaerobes Milieu erzeugt wurde. Dies musste bei jedem Öffnen von Neuem gewährleistet werden. Für den im Vergleich zu *E. faecalis* etwas langsamer metabolisierenden *P. micra* reichte es aus, lediglich einmal das Medium zu wechseln und im Zuge dessen frische Bakterien hinzuzugeben. Dies erfolgte ebenfalls am dritten Tag der Anzucht. Auch hierfür ist es wesentlich, die längere Wachstumszeit des *P. micra* von fünf Tagen zu beachten, um rechtzeitig eine ausreichende Bakterienmenge für alle Schritte des Versuchs überimpft zu haben. Im Vorfeld des Versuchs wurde das BMM vorreduziert, um im Medium selbst die Sauerstoffmenge möglichst gering zu halten. Dazu wurde das Behältnis mit BMM in einen passenden Container gestellt und leicht geöffnet mit einem EZ GazPak gelagert.

3.6 Zementprobenherstellung

Für den Kontaktversuch zwischen Dentinbiofilm und gentamicinversetztem MTA wurden Zementproben wie für den unter Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Freisetzungsversuch hergestellt. Es wurden Zementproben mit Konzentrationen 0 µg/ml, 500 µg/ml und 1000 µg/ml hergestellt. Für jeden der Kontaktversuche, dementsprechend für jedes separate Well mit biofilmbewachsenen Dentinplättchen, werden jeweils eine Probe pro Konzentration benötigt.

3.7 Kontaktversuch zwischen gentamicinhaltiger Zementprobe und biofilmbewachsenen Dentinplättchen

Für diesen Versuch wurden die mit Biofilm bewachsenen Dentinplättchen mit den gentamicinhaltigen Zementproben in Kontakt gebracht. Dadurch sollte festgestellt werden, ob eine Bakterienreduktion auf den Dentinplättchen erfolgte und welchen Einfluss die Gentamicinkonzentration hat. Eine Übersicht des Kontaktversuchs ist Abbildung 13 zu entnehmen, Abbildung 14 zeigt eine Nahaufnahme eines Teils des Versuchs.

Um Austrocknung zu vermeiden, wurden die Proben während des Kontaktversuchs in einer feuchten Kammer gelagert. In diesem Versuch wurden dazu separate Zellkulturplatten (Cell Culture Dishes, PS, 60x15 mm, Lot E10100DU, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) verwendet. Es wurde destilliertes Wasser hineinpipettiert, sodass der Boden ausreichend bedeckt war. Die für die Biofilmanzucht beschriebenen Dentinplättchenständer wurden als Erhöhung benutzt, um die Proben in der Zellkulturplatte in unmittelbarer Nähe des destillierten Wassers zu lagern.

Für jede Versuchsreihe wurde eine Zellkulturplatte als Kontrolle präpariert. Demnach wurde die Platte mit jeweils einer Positivkontrolle, einem mit Biofilm bewachsenen Dentinplättchen ohne Zementkontakt und einer Negativkontrolle, einer Zementprobe ohne Gentamicinzusatz, vorbereitet. Für die Zementproben mit Gentamicinzusatz wurden separate Platten verwendet. Auf die Zementproben mit 500 µg/ml sowie auf die Zementproben mit 1000 µg/ml wurden jeweils zwei mit Biofilm bewachsene Dentinplättchen gelegt. Die Entnahme der Dentinplättchen und der Zementproben erfolgte mit sterilen Pinzetten. Es wurden auf jedes Dentinplättchen zwei Tropfen PBS pipettiert. Die Kontaktzeit wurde auf 24 Stunden festgelegt und für diese Zeit in einem geschlossenen Containersystem bei 37°C inkubiert.

Für jede separate Versuchsreihe wurden drei Zellkulturplatten dem beschriebenen Versuchsaufbau folgend vorbereitet. Der Versuch wurde viermal durchgeführt.

Der Versuchsaufbau ist für die Versuchsreihe des *P. micra*-Biofilms identisch, die Inkubation für die Dauer des Kontaktversuchs erfolgt im anaeroben Milieu.



Abbildung 13: Übersicht des Kontaktversuchs



Abbildung 14: Nahaufnahme des Kontaktversuchs

3.8 Der Effekt der Zementproben auf den Biofilm

Es musste eine Methode des Nachweises gewählt werden, um sowohl die Auswirkung der verschiedenen Zementproben auf den Bakterienbiofilm darzustellen als auch um die verschiedenen Gentamicinkonzentrationen zu vergleichen. Dazu wurden nach der festgelegten Kontaktzeit die Bakterien von den Dentinplättchen gelöst und auf dem Bakterium entsprechenden Agarplatten in einer Verdünnungsreihe ausplattiert. Somit konnten die Bakterienkolonien, die sogenannten colony forming units (CFU) mit einer Spanne von fünf log-Stufen quantifiziert werden, die je nach Menge der verbliebenen Bakterien auf den dementsprechenden Platten gezählt werden konnten. Im Vergleich zu den Kontrollversuchen konnten Keimzahlreduzierungen und daraus logarithmische Desinfektionsstufen ausgewertet werden.

3.8.1 Verdünnungsreihe und Koloniedarstellung

Nach Ablauf der Kontaktzeit wurden die Dentinplättchen mithilfe einer sterilen Pinzette von den Zementproben vorsichtig aufgehoben und jeweils in ein mit 500 µl PBS gefülltes Reagiergefäß gelegt und verschlossen.

Es wurden nacheinander Verdünnungsreihen für jedes Dentinplättchen hergestellt, wie auf Abbildung 15 dargestellt. Das erste Reagiergefäß mit Dentinplättchen wurde für 60 s gevortext, um die am Dentin haftenden Bakterien abzulösen und dem PBS zuzusetzen. Aus diesem Gemisch wurden 100 µl entnommen und in ein zweites Reagiergefäß mit 900 µl PBS pipettiert. Diese Mischung wurde für 5 s gevortext und daraus 100 µl in ein drittes Reagiergefäß mit 900 µl PBS pipettiert. Für jedes Dentinplättchen wurden diese Schritte wiederholt, um für jede Bakterienlösung eine Verdünnungsreihe von vier Zehnerpotenzen herzustellen.

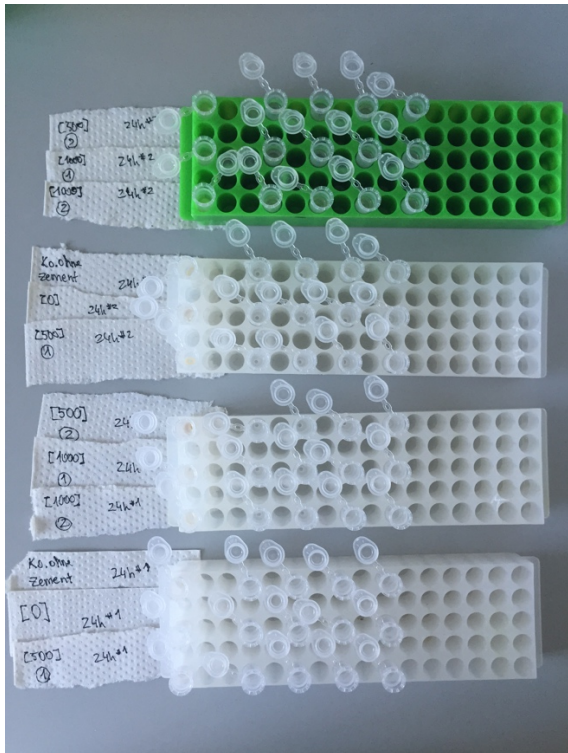


Abbildung 15: Herstellung der Verdünnungsreihe für *E. faecalis* für $n=1$ und $n=2$

Um die Kolonien darzustellen und folglich die Menge an Bakterien zählen zu können, wurden die Bakterienlösungen in allen fünf Verdünnungen ausplattiert. Die Methode der Ausplattierung dient dazu, Bakterienkolonien auf die gesamte Fläche einer Agarplatte auszubreiten, wie es bereits für den unter Abschnitt 3.3 beschriebenen Gentamicin-Etest durchgeführt wurde. Dazu wurden auf die dem Bakterium entsprechende Agarplatte 100 μ l der am meisten verdünnten Lösung der Verdünnungsreihe pipettiert und auf dem Petrischalen-Drehtisch ausplattiert. Auf der Drehplatte wurde mithilfe eines T-Spatels die Flüssigkeit auf dem Agar gleichmäßig verteilt. Um einen gleichmäßigen Bakterienrasen zu erzeugen, wurde die Lösung mit dem Spatel unter leichtem Druck sowohl über die Mitte der Agarplatte als auch bis zu dem Rand des Agars verteilt. Die Ausplattierung wurde für alle vier weiteren Verdünnungen einer Reihe vorgenommen.

Alle Proben der Verdünnungsreihen der jeweiligen Dentinplättchen wurden auf diese Weise ausplattiert. Abbildung 16 zeigt beispielhaft die ausplattierte Verdünnungsreihe der Kontrollprobe ohne Zement im Versuch $n=4$ mit *P. micra*.

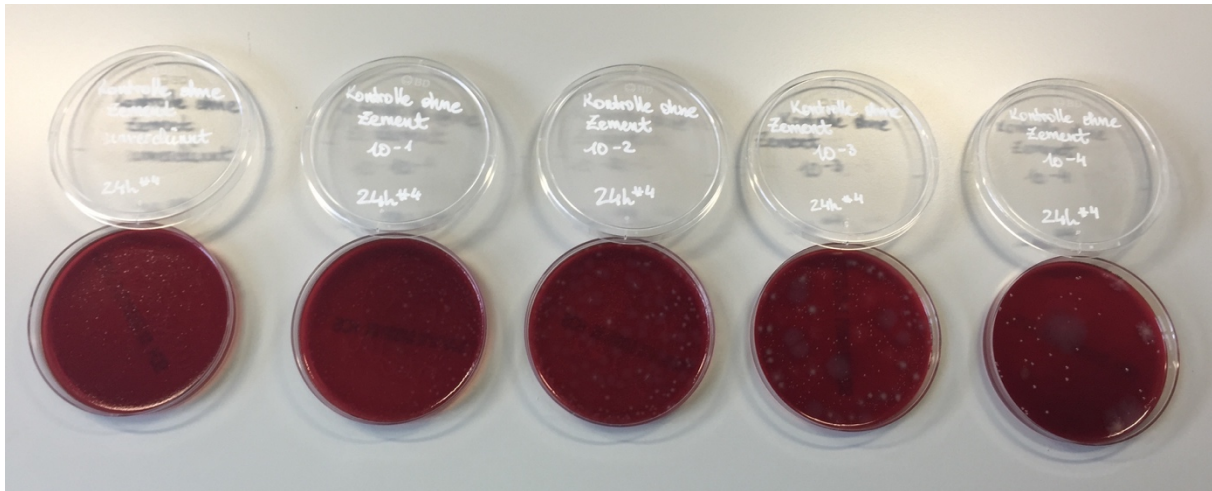


Abbildung 16: Ausplattierte Verdünnungsreihe der Kontrollprobe ohne Zement im Versuch n=4 mit *P. micra*

In dieser Arbeit wurden zuerst alle Versuche mit *E. faecalis* durchgeführt und abgeschlossen, von der Erstanzucht bis zur Ausplattierung. Die auf Columbia-Agar ausplattierten Agarplatten wurden für die festgelegte Dauer der Inkubationszeit von 24 h aerob im CO₂-Inkubator bei 37°C bebrütet. Das Procedere für die Versuche mit dem Anaerobier *P. micra* unterschied sich nur durch die Inkubation, da die ausplattierten Schaedler-Agarplatten anaerob über eine Wachstumszeit von fünf Tagen inkubiert wurden.

3.8.2 Auswertungsmethode des Biofilmversuchs

Nach der entsprechenden Inkubationszeit des verwendeten Keims wurden die CFU gezählt. Dafür wurden aus jeder Verdünnungsreihe zwei eindeutig zählbare Platten ausgesucht, auf denen die einzelnen Bakterienkolonien gut sichtbar und voneinander abgegrenzt waren. Um die Platten mit einer hohen Anzahl von CFU möglichst genau zählen zu können, wurde der Umfang einer Agarplatte auf ein kariertes Blatt gezeichnet und in acht Anteile eingeteilt. Die Linien waren in direktem Licht durch den Agar zu erkennen. So konnten die einzelnen Anteile gezählt und im Nachhinein addiert werden. Bei niedrigen Verdünnungsstufen waren die Zahlen sehr hoch, sodass nur die halbe Platte gezählt und die Zahl verdoppelt wurde.

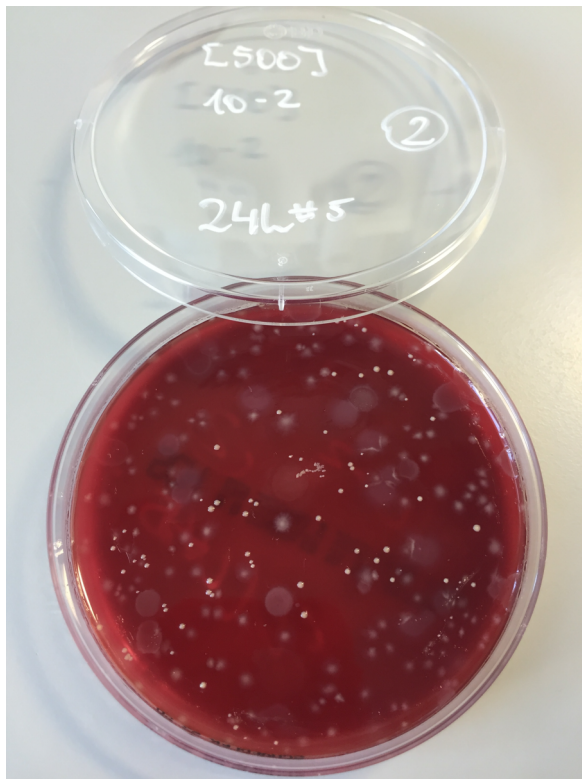


Abbildung 17: Unterschied in CFU innerhalb einer Verdünnungsreihe zwischen zwei log-Stufen mit *E. faecalis* – Verdünnung bei $\log 10^{-2}$



Abbildung 18: Unterschied in CFU innerhalb einer Verdünnungsreihe zwischen zwei log-Stufen mit *E. faecalis* – Verdünnung bei $\log 10^{-4}$

Die Auswertungsmethode soll die Bakterienreduktion bestmöglich darstellen. Durch die Verdünnungsreihe als Methode konnten für jedes der Dentinplättchen die Kolonien jeweils um den Faktor 10 dargestellt werden, um die Genauigkeit durch zwei mittelbare Werte von zwei zählbaren Platten zu erhöhen. Der Unterschied zwischen Platten einer Verdünnungsreihe wird auf Abbildungen 17 und 18 gezeigt, zwischen denen zwei log-Stufen Verdünnung liegen. Für die Auswertung wurden die absoluten CFU-Mengen durch Multiplikation mit den jeweiligen Verdünnungsfaktoren errechnet und bei verschiedenen Gentamicinkonzentrationen graphisch dargestellt. Es wurden prozentuale und logarithmische Reduktionsstufen errechnet und ebenfalls graphisch dargestellt. Daraus konnten die Ergebnisse statistisch verglichen werden.

3.8.3 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden sowohl graphisch als auch deskriptiv dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde eine univariate Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Für diese einfaktorielle ANOVA müssen gewisse Voraussetzungen erfüllt werden, die im Zusammenhang mit der Skalierung der Variablen, der

Unabhängigkeit der Messwerte und der Normalverteilung stehen. Je nach Varianzhomogenität wird der dementsprechende Post-Hoc-Test ausgewählt. Die statistische Auswertung wurde mithilfe des Programms SPSS (V26, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Gentamicinfreisetzung aus MTA

Die Ergebnisse der Freisetzung von Gentamicin in PBS sind Abbildung 19 zu entnehmen. Es wird jeweils die Menge an herausgelöstem Gentamicin im PBS über den Versuchszeitraum von 48 Stunden der jeweiligen Zementproben dargestellt. Dazu wurde aus den Extinktionen und den Verdünnungsfaktoren eine absolute Menge berechnet, wie im Methodenabschnitt beschrieben. Die geringste Freisetzung war 136,38 ng/ml nach 12 Stunden bei 100 µg/ml Gentamicin in der Zementprobe, die meiste Freisetzung fand mit geringer Abweichung bei allen Messungen der Zementprobe mit 1000 µg/ml Gentamicin statt, bei einer Freisetzung von $195,31 \pm 2,14$ ng/ml. In allen Proben wurde eine Mindestmenge von 193,32 ng/ml Gentamicin innerhalb des Versuchszeitraums erreicht.

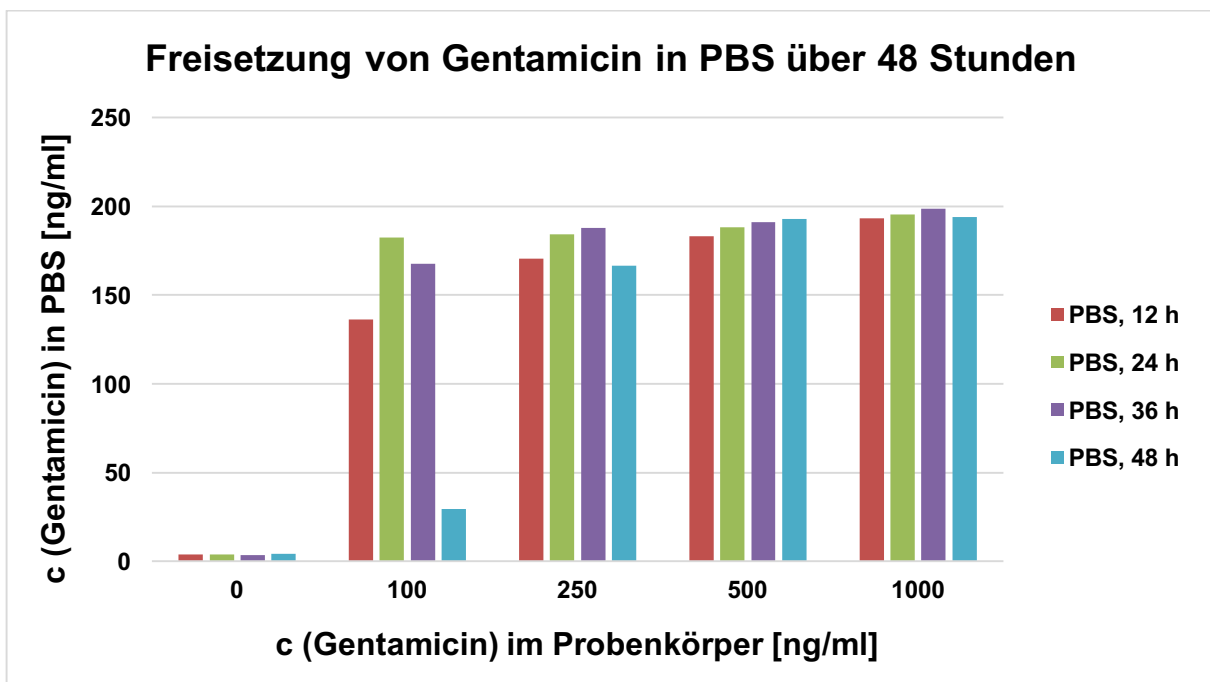


Abbildung 19: Absolute Menge an freigesetztem Gentamicin über 48 Stunden im Versuch mit PBS

Die Ergebnisse der Freisetzung von Gentamicin in Alpha MEM sind Abbildung 20 zu entnehmen. Es wird jeweils die Menge an herausgelöstem Gentamicin im MEM über den Versuchszeitraum von 48 Stunden der jeweiligen Zementproben dargestellt. Dazu wurde aus den Extinktionen und den Verdünnungsfaktoren eine absolute Menge berechnet, wie im Methodenabschnitt beschrieben. Die geringste Freisetzung war 12,10 ng/ml nach 12 Stunden bei 100 µg/ml Gentamicin in der Zementprobe, die

meiste Freisetzung fand mit geringer Abweichung bei allen Messungen der Zementprobe mit 1000 µg/ml Gentamicin statt, bei einer Freisetzung von $196,39 \pm 2,62$ ng/ml. In allen Proben wurde eine Mindestmenge von 193,57 ng/ml Gentamicin innerhalb des Versuchszeitraums erreicht.

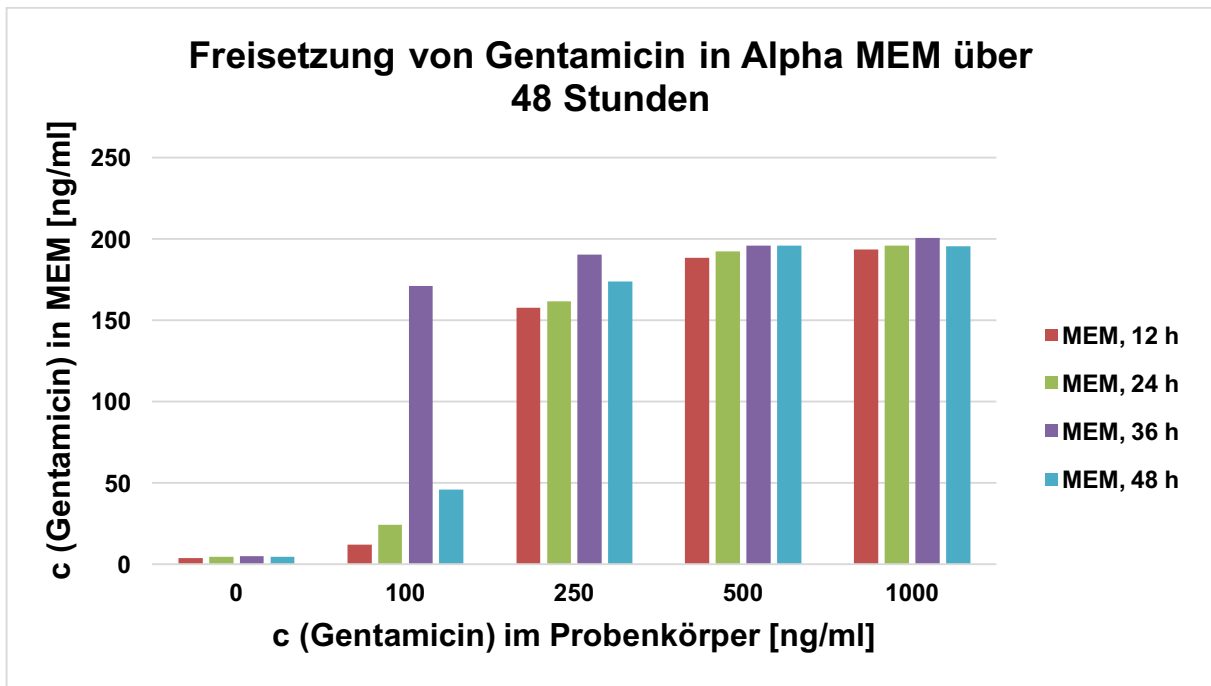


Abbildung 20: Absolute Menge an freigesetztem Gentamicin über 48 Stunden im Versuch mit Alpha MEM

Sowohl im Versuch mit PBS als auch mit Alpha MEM wurden ähnliche Gentamicinkonzentrationen gemessen, allerdings unterschied sich die Freisetzung der Zementprobe mit 100 µg/ml in der Geschwindigkeit der Freisetzung über den Messzeitraum, wobei die absolute Menge nach 48 Stunden vergleichbar war. In beiden Versuchen wiesen die Zementproben mit 500 µg/ml und 1000 µg/ml innerhalb des gesamten Versuchszeitraums hohe Freisetzungswerte auf. Diese Werte liegen alle im Bereich von $194,57 \pm 1,19$ ng/ml. Um die Grenzen der Freisetzung zu ermitteln, muss der Verdünnungsfaktor entsprechend gewählt werden. Im unteren Freisetzungsbereich, der in diesem Versuch gemessen wurde, wird der Messbereich durch die Sättigung des Assays eingegrenzt.

4.2 Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Die Ermittlung der MIC für beide Keime erfolgte quantitativ durch Ablesen des Werts auf dem Etest-Streifen an der Hemmhof-Ellipse, die auf Abbildung 21 zu sehen ist. Dafür wurden mit einer hochauflösenden Kamera Fotos gemacht, um möglichst genau den Wert ermitteln zu können. Die MIC für beide Keime war 0,5 µg/ml, bei 1,0 µg/ml waren jeweils keine Einzelkolonien mehr zu sehen.

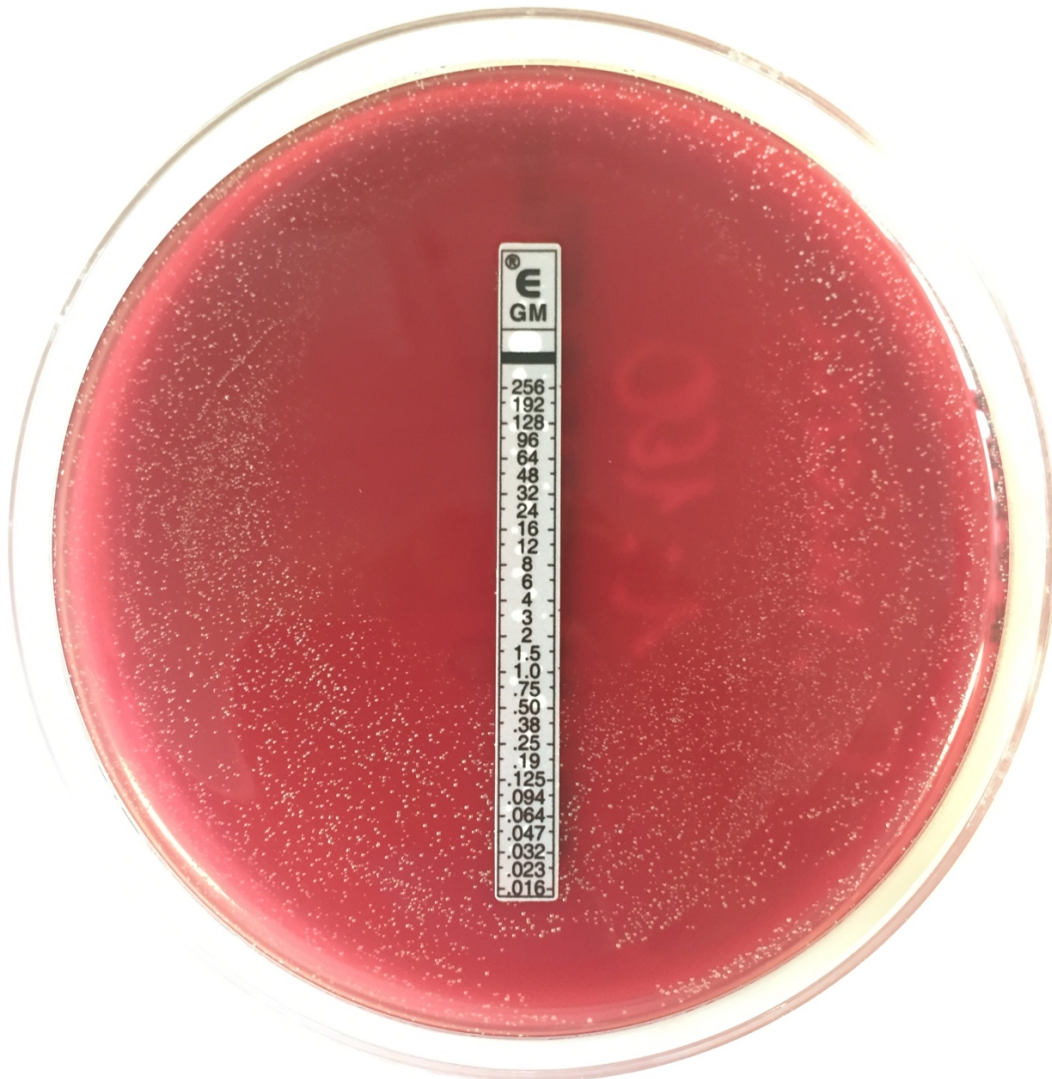


Abbildung 21: Etest für Gentamicin mit Inhibitionszone

4.3 Bakterienreduktion im Dentinbiofilm durch gentamicinhaltiges MTA

4.3.1 Auswertung der Bakterienreduktion im *E. faecalis*-Biofilm

Abbildung 22 zeigt die Mittelwerte aller Versuche der CFU pro Milliliter. Diese wurden durch Multiplikation der Zählwerte der CFU mit den entsprechenden Verdünnungsfaktoren errechnet. Der Verdünnungsfaktor 5 für die unverdünnte Probe erhöhte sich um Faktor 10 für jede Verdünnung (50 bei erster, zehnfacher Verdünnung, 500 bei zweiter Verdünnung, 5000 bei dritter Verdünnung, 50000 bei vierter Verdünnung).

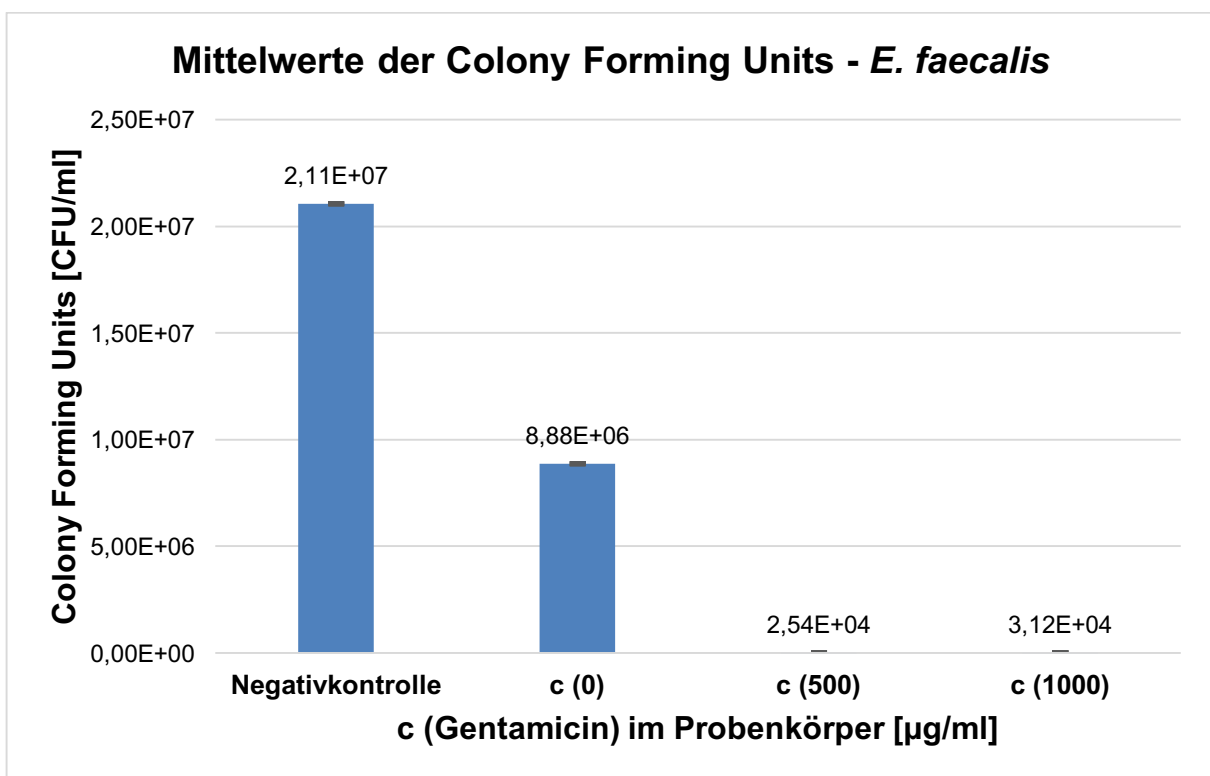


Abbildung 22: Mittelwert der Colony Forming Units pro Milliliter aller Bakterienreduktionsversuche mit *E. faecalis*

Abbildung 23 zeigt die CFU pro Milliliter in logarithmischer Darstellung. Es wurde eine signifikante Bakterienreduktion von 3 log-Stufen sowohl im Vergleich zwischen der Negativkontrolle und der Probe mit 500 $\mu\text{g/ml}$ Gentamicin ($\text{SD} \pm 0,5$) als auch im Vergleich der Negativkontrolle zur Probe mit 1000 $\mu\text{g/ml}$ Gentamicin ($\text{SD} \pm 0,6$) nachgewiesen ($p < 0,0001$).

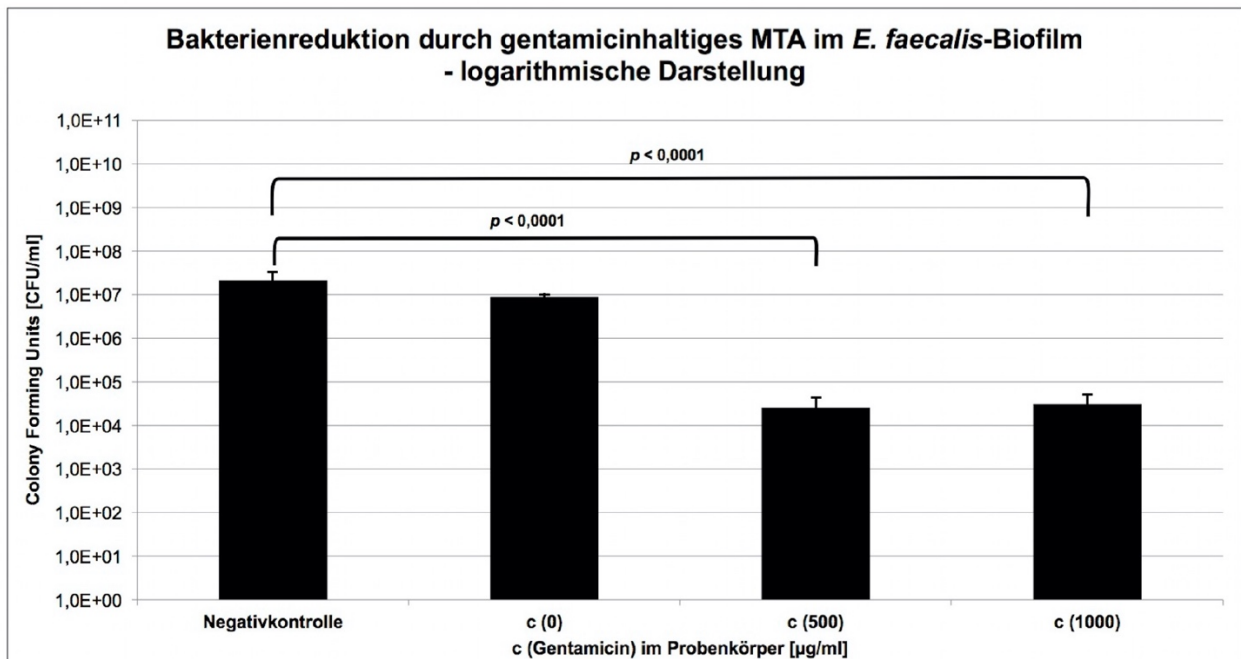


Abbildung 23: Logarithmische Darstellung der Bakterienreduktion im *E. faecalis*-Biofilm durch Probenkörper mit verschiedenen Gentamicinkonzentrationen

Die prozentuale Bakterienreduktion wird in Tabelle 1 präsentiert.

	Prozentuale Bakterienreduktion MW ± SD (%), n=4
Negativkontrolle > c (0)	47,16 ± 20,84
Negativkontrolle > c (500)	99,83 ± 0,15
Negativkontrolle > c (1000)	99,79 ± 0,16

Tabelle 1: Mittelwerte mit Standardabweichung der prozentualen Bakterienreduktion im Versuch mit *E. faecalis*

4.3.2 Auswertung der Bakterienreduktion im *P. micra*-Biofilm

Die Vorgehensweisen für alle Versuche mit *P. micra* waren den Versuchen mit *E. faecalis* entsprechend.

Abbildung 24 zeigt die Mittelwerte aller Versuche der CFU pro Milliliter. Diese wurden durch Multiplikation der Zählwerte der CFU mit den entsprechenden Verdünnungsfaktoren errechnet. Der Verdünnungsfaktor 5 für die unverdünnte Probe erhöhte sich um Faktor 10 für jede Verdünnung (50 bei erster, zehnfacher Verdünnung, 500 bei zweiter Verdünnung, 5000 bei dritter Verdünnung, 50000 bei vierter Verdünnung).

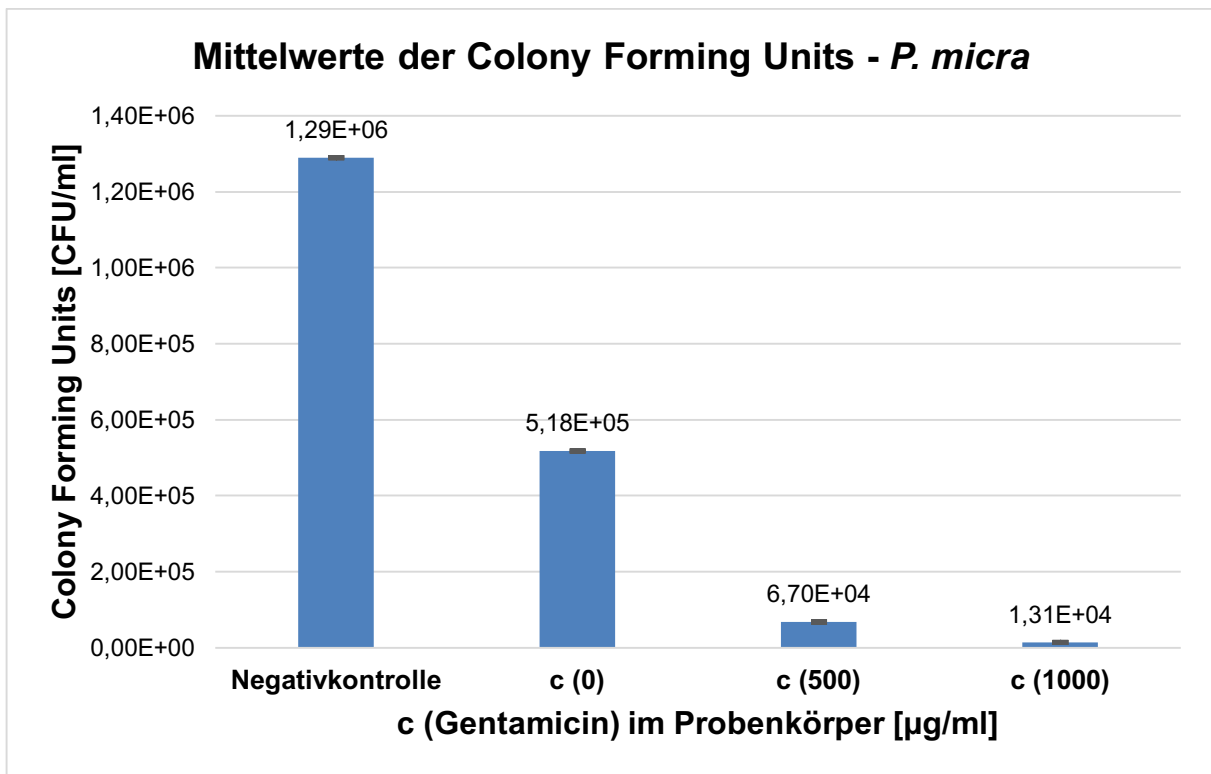


Abbildung 24: Mittelwert der Colony Forming Units pro Milliliter aller Bakterienreduktionsversuche mit *P. micra*

Abbildung 25 zeigt die CFU pro Milliliter in logarithmischer Darstellung. Es wurde eine signifikante Bakterienreduktion von $1,3 \pm 0,7$ log-Stufen im Vergleich zwischen der Negativkontrolle und der Probe mit 500 µg/ml Gentamicin ($p = 0,010$) sowie eine signifikante Bakterienreduktion von $2 \pm 0,6$ log-Stufen im Vergleich der Negativkontrolle zur Probe mit 1000 µg/ml Gentamicin nachgewiesen ($p < 0,0001$). Die Bakterienmenge auf der Ausgangsprobe, der Negativkontrolle, war im Versuch mit *P. micra* kleiner als im Versuch mit *E. faecalis*.

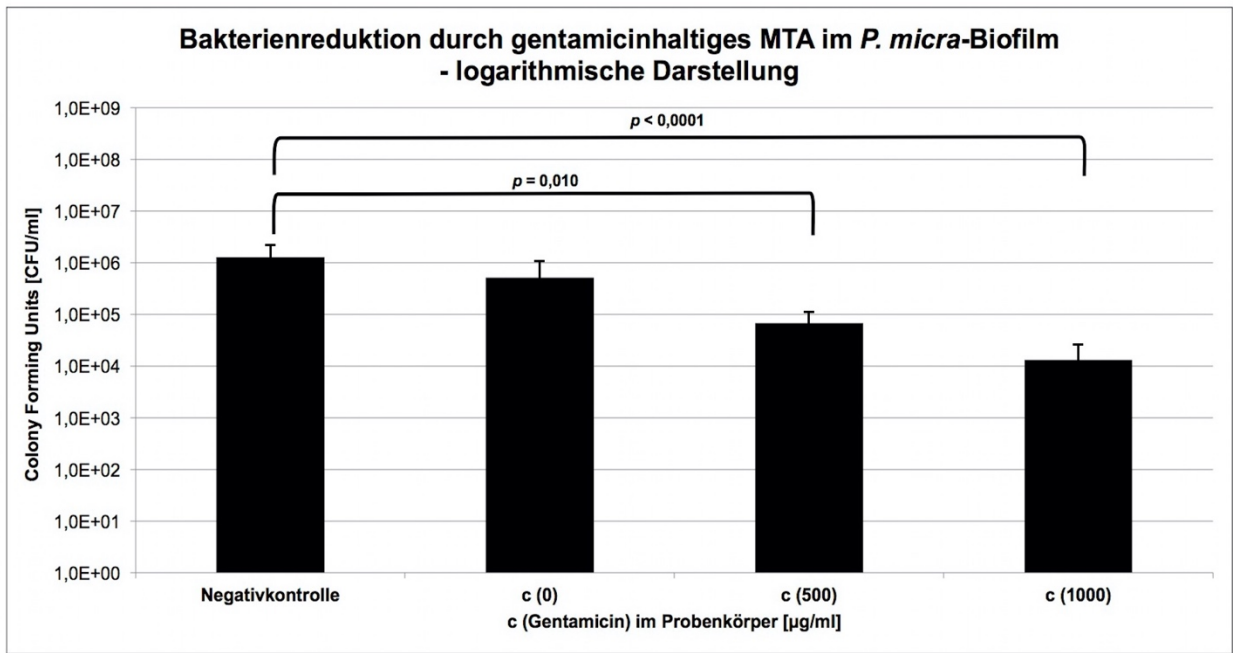


Abbildung 25: Logarithmische Darstellung der Bakterienreduktion im *P. micra*-Biofilm durch Probenkörper mit verschiedenen Gentamicinkonzentrationen

Die prozentuale Bakterienreduktion wird in Tabelle 2 präsentiert.

	Prozentuale Bakterienreduktion MW ± SD (%), n=5)
Neg > [0]	69,11 ± 21,90
Neg > [500]	87,83 ± 10,39
Neg > [1000]	96,56 ± 4,86

Tabelle 2: Mittelwerte mit Standardabweichung der prozentualen Bakterienreduktion im Versuch mit *P. micra*

5 Diskussion

Ziel dieser Studie war es, eine Keimreduktion durch mit Gentamicin versetztes Medcem MTA nachzuweisen. Dadurch musste die Konzentration von Gentamicin ermittelt werden, bei der Bakterienwachstum gehemmt beziehungsweise Keime eliminiert werden sowie eine Freisetzung des Gentamicins aus der MTA-Probe nachgewiesen werden konnte.

Der erste Teil der Versuche sollte eine Freisetzung des Gentamicins aus MTA-Proben nachweisen. Innerhalb des Versuchszeitraums von 48 Stunden konnte eine deutliche Gentamicinfreisetzung ermittelt werden, wobei bereits innerhalb der ersten 24 Stunden ein sehr hoher Freisetzungswert gemessen wurde. Das Versuchsspektrum des ELISA-Assays wurde gewählt, um die anfängliche Freisetzung zu quantifizieren, daher die Sättigung des Assays in hohen Freisetzungsbereichen bei 48 Stunden. Auch in Studien zu Gentamicinfreisetzung aus Knochenzementen wurde dieser frühe Freisetzungszeitraum bestätigt (Dunne, Hill *et al.* 2008). Die per Gentamicin-Etest ermittelten Konzentrationen ergaben eine Hemmhof-Ellipse bei 0,5 µg/ml, bei 1,0 µg/ml wurden alle Einzelkolonien komplett entfernt. Demzufolge wurden Konzentrationen für die Zementproben im Freisetzungsversuch gewählt, bei denen bei lokaler Wirkung sichere Keimelimination erfolgt. Für die antimikrobielle Wirkung des Gentamicins auf bakteriellen Biofilm muss eine gewisse Menge im Kontaktversuch freigesetzt werden.

Im Kontaktversuch konnte signifikante Keimreduktion erwiesen werden. Im Versuch mit *E. faecalis* wurden höhere Keimreduktionsstufen erreicht als im Versuch mit *P. micra*. Allerdings war die Ausgangsmenge der Bakterien im Versuch mit *E. faecalis* höher als bei *P. micra*, wodurch die Keimreduktion effektiver war, die absolute finale Bakterienmenge jedoch ähnlich. Auch die Kontrollgruppe von MTA ohne Gentamicin hatte eine antibakterielle Wirkung, wie bereits von Singh und Mitarbeiter erforscht (Singh, Gupta *et al.* 2016). Die keimreduzierende Wirkung der Kontrollgruppe von MTA ohne Gentamicin (c (0)) war höher für *P. micra* als für *E. faecalis*. Dies unterstützt die Annahme, dass *P. micra* empfindlicher ist und unter anderem durch desinfizierende Maßnahmen maßgeblich vermindert werden kann (Spratt, Pratten *et al.* 2001). Auch wird dies durch niedrige Prävalenz in sekundären Infektionen verglichen mit prädominanter Prävalenz in primärer Infektion unterstützt (Gomes, Pinheiro *et al.* 2004). Demgegenüber steht *E. faecalis* in prädominanter Prävalenz

bei sekundärer, persistierender Infektion und geringer Prävalenz in primärer Infektion (Gomes, Pinheiro *et al.* 2004, Gajan, Aghazadeh *et al.* 2009), wodurch die Assoziation mit Misserfolg verdeutlicht wird. Somit ist das Ergebnis der Keimreduktion von *E. faecalis* um drei log-Stufen besonders vielversprechend, während die Keimreduktion um zwei log-Stufen mit theoretischer vorangegangener Instrumentierung und Aufbereitung sich für *P. micra* als sehr effektiv erweisen dürfte. In dieser Studie wird die Grundlagenforschung zur Keimreduktion durch lokal appliziertes Gentamicin behandelt, diese Ergebnisse müssen jedoch im Kontext der endodontischen Behandlung angesehen werden. Keine einzelne desinfizierende Maßnahme ist in der Wurzelkanalbehandlung ausreichend und das höhere Ziel soll sein, die endodontische Behandlung zu verbessern.

In dieser Studie wurde die MIC auf einer Agarplatte und nicht als Biofilm ermittelt. Es wurde erforscht, dass die Permeabilität von manchen Aminoglykosiden in Biofilmen, unter anderem Gentamicin, im Vergleich zu anderen Antibiotika reduziert war (Shigeta, Tanaka *et al.* 1997) und dass die MIC von Gentamicin für Anaerobier signifikant höher war als von anderen Antibiotika (Tack und Sabath 1985). Möglicherweise könnten präzisere Konzentrationen ermittelt werden, wenn der Versuch mit *E. faecalis* und *P. micra* als Biofilm durchgeführt werden würde. Nichtsdestotrotz war die für diese Studie gewählte Methode effektiv, wie die positiven Ergebnisse der Keimelimination darlegen. Ein weiterer zu diskutierender Punkt ist das Alter des Biofilms, da bereits nach drei Wochen Biofilme resistenter gegen die gleichen antimikrobiellen Mittel waren als nach einer Woche (Stojicic, Shen *et al.* 2013). Andererseits, auf ein Wurzelkanalsystem übertragen, würde dem Einbringen einer medizinisch wirksamen Substanz eine aufwendige chemomechanische Aufbereitung vorangehen, wodurch bereits ein erheblicher Teil des Biofilms eliminiert werden sollte.

Generell ist es sinnvoll, die Anzahl der Versuche möglichst zu maximieren. So hätte die statistische Relevanz durch vermehrte Kontaktversuche verbessert werden können. Auch kann bedacht werden, dass die Resultate des Kontaktversuchs durch Zählen der ausplattierten CFU stattgefunden hat. Zwar wurde aus diesem Grund eine Verdünnungsreihe angefertigt, sodass eine Bakterienkonzentration entstand, bei der die Zählung möglich war. Zudem wurden für die Proben mit Gentamicinkonzentrationen von 500 µg/ml und 1000 µg/ml jeweils zwei Dentinplättchen verwendet, sodass ein Mittelwert aus letztlich acht Versuchsreihen

für *E. faecalis* und zehn für *P. micra* errechnet werden konnte, um das Ergebnis weiter zu präzisieren. Trotzdem kann diese Methode bei hohen CFU-Zahlen fehleranfällig sein. Die Erhöhung der Versuchsanzahl könnte auch in diesem Fall die Fehleranfälligkeit ausgleichen. Auch im Freisetzungsversuch wäre dies eine Möglichkeit, um die Gentamicinmenge aus dem MTA präziser zu quantifizieren. Allerdings ist das qualitative Ergebnis praktisch ausreichend, da die nachgewiesene Freisetzung in Kombination mit den Ergebnissen des Kontaktversuchs eine signifikante Keimelimination von drei log-Stufen aufweist.

Als generelle Kritik an eine *in vitro*-Studie sei festzustellen, dass nicht alle Bedingungen simuliert werden können. Zwar wurden alle MTA-Proben in allen Versuchsabschnitten bei 100% Luftfeuchtigkeit gelagert, jedoch konnten nicht alle Konditionen vor, während und nach einer endodontischen Behandlung reproduziert werden. Weiterhin simuliert das Biofilm-Modell mit Dentinplättchen nicht die komplexe Anatomie des Wurzelkanalsystems, wie auch andere Biofilm-Modelle diese Limitation aufweisen (Spratt, Pratten *et al.* 2001). Spratt und Mitarbeiter bemerken jedoch, dass Forschung mit extrahierten Zähnen nicht die eigentliche Effektivität des Desinfektionsmittels ermittelt, da im Wurzelkanal nicht alle Flächen zu erreichen sind (Spratt, Pratten *et al.* 2001). Dies steht im Kontrast zum eigentlichen Ziel der endodontischen Desinfektion. Dafür wird ein akkurateres *in vitro*-Modell mit infizierten extrahierten Zähnen genutzt (Ozdemir, Buzoglu *et al.* 2010, Soares, Roque de Carvalho *et al.* 2010), in dem die Schwierigkeit des Zugangs zum Kanalsystem das Ergebnis beeinflusst. Dennoch ergab die hier verwendete Methode die Grundlage für weitere Forschung, sodass zunächst weitere Parameter *in vitro* gemessen werden sollten, bevor aufwendige *in vivo*-Methoden entworfen werden. Dazu kann auch die weitere Forschung klären, ob die erheblich geringeren Mengen des MTA *in vivo* im Wurzelkanal eine höhere Konzentration von Gentamicin erforderlich macht oder ob die Keimzahl in Relation ähnliche Dimensionen aufweist und somit die tatsächliche Menge an Gentamicin ausreichend wäre.

Das Konzept, MTA für endodontische Nutzung mit einem antibakteriellen Zusatz zu versehen, wurde bereits mit CHX erforscht (Stowe, Sedgley *et al.* 2004). Die Wahl von Gentamicin als Zusatz entstand aus der bereits etablierten Nutzung in Knochenzementen (Gutowski, Zmistowski *et al.* 2014). In diesem Bereich der Forschung existieren bereits Studien zur Veränderung der Eigenschaften des Zements, wie beispielsweise der Langzeitstabilität oder des Abbindeverhaltens

(Samara, Moriarty *et al.* 2017). Ferner wurde geforscht, ob durch weitere Zusätze im Knochenzement die Freisetzung von Gentamicin verbessert werden kann, ohne die Eigenschaften erheblich zu verändern (Frutos, Pastor *et al.* 2010, Letchmanan, Shen *et al.* 2017). In der Mischung von MTA mit CHX wurde beobachtet, dass die Abbindezeit von MTA sich verkürzte, ohne dass dies ein Forschungsparameter der Studie war (Stowe, Sedgley *et al.* 2004). Da diese Studie die erste ist, in der MTA mit Gentamicin versetzt wird, besteht die Grundlagenforschung zu mechanischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften dieser Kombination noch nicht. Vermutlich sind die Prioritäten und Anforderungen an orthopädisch genutzten Zement anders als bei endodontisch genutztem Zement, da mechanische Eigenschaften wie Druckfestigkeit oder Flexibilität in einem Zement zum Gelenkersatz essentiell sind, auch für die Langzeitprognose (Dunne, Hill *et al.* 2008, Letchmanan, Shen *et al.* 2017), während für diese Studie relevant wäre, wie Dichtigkeit, Porosität, Abbindeverhalten, Biokompatibilität und andere mechanische und physische Eigenschaften beeinflusst werden. Auch unterscheiden sich gängige Knochenzemente von MTA, die zumeist auf Acrylatbasis sind und durch die Temperatur der initialen exothermen Abbindereaktion eine Verschlechterung der Stabilität von Gentamicin erwiesen wurde, was bei Körpertemperatur aber nicht der Fall war (Samara, Moriarty *et al.* 2017). Zu MTA existiert eine Studie, in der pH-Wert und Anmischflüssigkeit variiert wurden (Watts, Holt *et al.* 2007), allerdings ist auch dies nicht ausreichend relevant für diese Studie. Daher gilt es, diese Eigenschaften speziell für die Kombination in Hinblick auf endodontische Nutzung zu erforschen.

Weiterhin ist die lokale Applikation von Antibiotika im Wurzelkanal über längere Zeit, also als medikamentöse Einlage, bereits erforscht und bewährt (Ehrmann, Messer *et al.* 2003). Der Versuch, durch eine antibiotische medikamentöse Einlage die Bakterienzahl zu reduzieren, zeigte keinen bedeutsamen Vorteil gegenüber bewährter medikamentöser Einlagen (Molander, Reit *et al.* 1990). Systemische Antibiose hingegen wird bei postoperativem Flare-up, bei symptomatischer irreversibler Pulpitis oder bei symptomatischer apikaler Parodontitis verabreicht (Skucaite, Peciuliene *et al.* 2010, Germack, Sedgley *et al.* 2017). Häufig verschriebene Antibiotika zeigten *in vitro* generell Effektivität gegen üblicherweise isolierte Keime aus symptomatischen apikalen Infektionen (Skucaite, Peciuliene *et al.* 2010). Auch wurde im Bereich der Aufnahme von gewissen Antibiotika in Serum, Knochen und Pulpengewebe geforscht und Anreicherung in oralen Geweben

gefunden, jedoch waren diese Konzentrationen mäßig (Akimoto, Komiya *et al.* 1986). Allerdings sind dies keine Argumente für die vielfache Gabe von Antibiotika, da die Wirksamkeit kaum durch evidente Studien belegt ist, wie eine aktuelle Metaanalyse feststellt (Cope, Francis *et al.* 2018). Auch fehlt Zahnärzten oft das Wissen zur streng regulierten endodontischen Indikation für Antibiose, wodurch es zur unverhältnismäßig häufigen Gabe aus zumeist falschen Gründen führt (Germack, Sedgley *et al.* 2017, Al Masan, Dummer *et al.* 2018). Auch vergleichende Studien zeigen Unterschiede, da bei Studenten das Bewusstsein für Resistenzen höher war als bei niedergelassenen Zahnärzten (Al Masan, Dummer *et al.* 2018). Ebenfalls kommen Studien zum Vergleich der Lehre auf internationaler Ebene vor (Qualtrough, Whitworth *et al.* 1999). Es versteht sich, dass das vermehrte Aufkommen von Resistenzen von Bakterien gegen Antibiotika abgesehen von der Ineffektivität in zahlreichen Bereichen der Medizin eine große Rolle spielt (Read und Woods 2014). Systemische Antibiose hat einen Effekt auf das gesamte humane Mikrobiom, nicht nur, wenn überhaupt, auf endodontisch vorkommende Bakterien, wobei auch diese Resistenzen gegen Antibiotika vorweisen (Skucaite, Peciuliene *et al.* 2010). Daher gilt es, möglichst effektiv Keime zu eliminieren, ohne Resistenzen zu verstärken.

Bei Fällen mit primärem therapeutischen Misserfolg besteht Behandlungsbedarf. Mögliche endodontische Sekundärbehandlungen wurden im Laufe dieser Studie erläutert. In der Forschung wird des Weiteren diskutiert, ob und in welchen Fällen die Extraktion des Zahnes und Ersatz durch Implantate indiziert ist (Sim, Lim *et al.* 2016, Torabinejad und White 2016). Es existieren Studien, in denen die Erfolgs- und Überlebensrate endodontisch behandelter Zähne und Implantate verglichen werden, sowie Gründe für verschiedene Komplikationen erläutert werden. Chercoles-Ruiz und Mitarbeiter diskutieren dies in ihrem Review, stellen jedoch fest, dass die vergleichende Forschung noch spärlich ist (Chercoles-Ruiz, Sanchez-Torres *et al.* 2017). Die Entscheidung liegt im Ermessen des Behandlers.

Wie bereits im Laufe dieser Forschungsarbeit ausgeführt, ist die Keimpersistenz der Hauptgrund für endodontische Misserfolge (Moller, Fabricius *et al.* 2004). Die hohe Prävalenz und Bedeutsamkeit von *E. faecalis* und *P. micra* (Sundqvist, Figdor *et al.* 1998, Gomes, Pinheiro *et al.* 2004) führten zu deren Wahl für diese Studie. Die Wirksamkeit gegen den resistenten, mit Misserfolg assoziierten *E. faecalis* (Rocas, Siqueira *et al.* 2004) ist besonders erfreulich, wobei nachfolgende Studien zu weiteren in apikaler Infektion vorherrschenden Bakterien interessant wären.

Im Laufe dieser Forschungsarbeit wurden vielerlei Möglichkeiten dargestellt, wie im Verlauf einer endodontischen Behandlung ein möglichst keimfreies Wurzelkanalsystem erlangt werden kann. Ebenfalls wurde dargestellt, wie variabel das Verständnis, das Interesse an und die Durchführung der endodontischen Behandlung sein kann. Andererseits wird auch präzise Forschung zur Keimelimination auf verschiedene Weisen betrieben, wie die Optimierung der Spülung (Ozdemir, Buzoglu *et al.* 2010) oder Optimierung des provisorischen Verschlusses zwischen Behandlungen (Deveaux, Hildelbert *et al.* 1999), um nur wenige Beispiele zu wiederholen. Keimarmut sollte das primäre Ziel in allen Abschnitten der Behandlung sein. Diese Studie hat erwiesen, dass lokal appliziertes Gentamicin in MTA effektiv gegen zwei dominante, prävalente endodontische Keime ist und somit die Hypothese unterstützt wird. Es wurde nachgewiesen, dass Gentamicin aus der MTA-Probe freigesetzt wurde. Somit konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass eine signifikante Keimelimination im Biofilm bewirkt wurde. Die lokale Wirksamkeit und die frühe, zeitlich begrenzte Freisetzung spricht für Effektivität, ohne systemische Folgen zu haben, wobei auch diese in Langzeitstudien erforscht werden können. Zukünftig betrachtet stellt sich die Frage, in welcher Form mit Gentamicin versetztes Medcem MTA genutzt werden soll. Es ist zu erforschen, ob ein angemessener technischer Standard in Kombination mit gentamicinhaltigem Sealer den Erfolg einer endodontischen Behandlung so wesentlich verbessern würde, dass eine standardmäßige Nutzung zu rechtfertigen ist, oder ob ein solches Produkt einer strengen Indikation, beispielsweise als Sealer bei Revisionsbehandlungen, unterliegen sollte.

6 Zusammenfassung

Bakterielle Persistenz ist die Ursache von apikaler Parodontitis, die maßgeblich an misslungener endodontischer Behandlung beteiligt ist. Mikrobiologische Forschung hat ergeben, dass *Parvimonas micra* in primären Infektionen hohe Prävalenzen aufweist und *Enterococcus faecalis* in Fällen mit primärem Misserfolg und Reinfektion vorherrscht. Ohne die Anwesenheit von Bakterien kommt es nicht zur apikalen Parodontitis. Demnach sollte die Reduktion der Keime den Erfolg der Therapie deutlich verbessern.

Medizinische Zemente, wie sie in modifizierter Form auch in der endodontischen Therapie genutzt werden, werden gebräuchlich in der Orthopädie als Knochenzement mit Antibiotikum versetzt, unter anderem mit Gentamicin. Sollten also modifizierte Zemente mit lokal wirksamen Antibiotika versetzt werden können, besteht die Annahme, dass die lokale Wirkung essentiell zur Bakterienreduktion beitragen kann und somit die Wurzelkanalbehandlung, vor allem bei sekundärer Therapie und reinfizierten Fällen, verbessert werden kann.

Dazu wurde in dieser Studie zunächst ermittelt, ob Gentamicin aus Medcem MTA, einem modifizierten silikatbasierten MTA, freigesetzt wird. Dazu wurden MTA-Zementproben mit Gentamicin in den Konzentrationen 0 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml und 1000 µg/ml hergestellt. Der Versuch wurde jeweils mit PBS und mit Alpha MEM als Medium durchgeführt, in dem die Proben nach Aushärtung in einer 6-Well-Platte jeweils für 48 Stunden gelagert wurden. In festgelegten Zeitabständen von 12 h, 24 h, 36 h und 48 h wurden aus dem Medium Proben entnommen, um die Menge an herausgelöstem Gentamicin zu messen. Die Freisetzung wurde mittels ELISA nachgewiesen, einem kompetitiven Immunoassay, bei dem ein markiertes Antigen mit dem zu messenden Gentamicin konkurriert. Parallel dazu wurde mittels Gentamicin-E-Test die Wirksamkeit und Konzentration des Gentamicins ermittelt, bei der *E. faecalis* und *P. micra* Wachstumsinhibition zeigten und woraus sich dementsprechend die Konzentration für die Durchführung des Freisetzungsversuchs ergab. Für die Durchführung eines E-Tests wird eine verdünnte Lösung des zu messenden Keims hergestellt und ein gleichmäßiger Bakterienrasen auf der dem Keim entsprechenden Agarplatte ausplattiert. Darauf wird mittig ein E-Test-Streifen gelegt, dessen Oberfläche aufsteigende Konzentrationen des Antibiotikums enthält. Bei der entsprechenden Konzentration,

bei der keine Einzelkolonien mehr zu sehen sind, ist die sogenannte Hemmhof-Ellipse. Diese entspricht der Minimum Inhibitory Concentration (MIC) des jeweiligen Keims, die für sowohl *E. faecalis* als auch *P. micra* bei 0,5 µg/ml war. Bei 1,0 µg/ml waren keine Einzelkolonien mehr zu sehen.

Es wurde anfangs eine sehr hohe Konzentration gewählt, um zunächst die Freisetzung zu messen. Diese Konzentration sollte bei lokaler Wirkung die größtmögliche Keimeliminierung bewirken und mit geringeren Mengen verglichen werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass alle Probenkörper Gentamicin in effektiven Mengen freisetzen. Im Versuch mit PBS wurde in allen Proben eine Mindestmenge von 193,32 ng/ml erreicht, im Versuch mit Alpha MEM 193,57 ng/ml.

Im darauffolgenden Kontaktversuch wurden Medcem MTA-Zementproben mit verschiedenen Konzentrationen von Gentamicin versetzt und mit Dentinplättchen in Kontakt gebracht, auf denen *E. faecalis*- und *P. micra*-Biofilme angezüchtet wurden. Die Dentinplättchen wurden aus extrahierten Rinderzähnen gesägt und aufbereitet. In allen Versuchen wurden *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 und *Parvimonas micra* ATCC 33270 verwendet. Die Biofilme wurden zuvor fünf Tage lang unter den jeweiligen bakterienspezifischen Bedingungen auf Columbia-Agarplatten für *E. faecalis* und Schaedler-Agarplatten für *P. micra* angezüchtet. Es wurden Gentamicinkonzentrationen von 0 µg/ml, 500 µg/ml und 1000 µg/ml gewählt, sowie einer Negativkontrolle im Sinne eines Dentinplättchens ohne Kontakt zu Zementproben. Nach einem Kontaktzeitraum von 24 Stunden wurde die Anzahl an verbliebenen Bakterien ermittelt und mit zwei Kontrollgruppen verglichen, einer Zementprobe ohne Gentamicin und einem Dentinplättchen ohne Kontakt zur Zementprobe. Es wurden mindestens vier unabhängige Kontaktversuche für jeden Keim durchgeführt. Zur Quantifizierung wurden die Dentinplättchen gevortext und eine Verdünnungsreihe hergestellt, um die Anzahl verbliebener Bakterien durch Zählen der colony forming units (CFU) zu ermitteln. Somit konnte die Bakterienreduktion gemessen werden und ergab signifikante Ergebnisse. Für die Auswertung wurden die absoluten CFU-Mengen durch Multiplikation mit den entsprechenden Verdünnungsfaktoren errechnet und graphisch dargestellt. Daraus wurden die Reduktionsstufen zwischen den Negativkontrollen und den gentamicinversetzten Zementproben prozentual und logarithmisch errechnet und dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde eine ANOVA durchgeführt mit dem entsprechenden Post-Hoc-Test. Die Bakterienreduktion im *E. faecalis*-Biofilm betrug

drei \log_{10} -Stufen im Vergleich sowohl zwischen Negativkontrolle und 500 $\mu\text{g/ml}$ Gentamicin in der Zementprobe als auch zwischen Negativkontrolle und 1000 $\mu\text{g/ml}$ Gentamicin in der Zementprobe ($p < 0,0001$). Bei *P. micra* betrug die Bakterienreduktion im Vergleich zwischen Negativkontrolle und 500 $\mu\text{g/ml}$ Gentamicin in der Zementprobe eine \log_{10} -Stufe ($p = 0,010$) und im Vergleich zwischen Negativkontrolle und 1000 $\mu\text{g/ml}$ Gentamicin in der Zementprobe zwei \log_{10} -Stufen ($p < 0,0001$). Dies entspricht einer Desinfektion von 99,9% für *E. faecalis* und 99% für *P. micra*.

Die Wirksamkeit dieses *in vitro*-Versuchsaufbaus konnte somit erwiesen werden. Sowohl die Freisetzung des Gentamicins aus den Zementproben konnte erwiesen werden, als auch die Wirksamkeit des Kontaktversuchs mit den entsprechenden Konzentrationen des Gentamicins. Weitere Forschung zu möglichen Veränderungen der Materialeigenschaften des mit Gentamicin versetzten Medcem MTA ist notwendig sowie das Stellen einer Indikation für ein mögliches Präparat aus dieser Kombination für die endodontische Behandlung.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Adriaens, P. A., J. A. De Boever and W. J. Loesche (1988). "Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. A reservoir of periodontopathic bacteria." J Periodontol **59**(4): 222-230.
- 2 Ahmed, H. M. A. and P. M. H. Dummer (2018). "A new system for classifying tooth, root and canal anomalies." Int Endod J **51**(4): 389-404.
- 3 Akbar, I., A. Iqbal and M. K. Al-Omiri (2013). "Flare-up rate in molars with periapical radiolucency in one-visit vs two-visit endodontic treatment." J Contemp Dent Pract **14**(3): 414-418.
- 4 Akimoto, Y., M. Komiya, K. Kaneko, A. Fujii and T. Tamura (1986). "Ampicillin concentrations in human serum, gingiva, mandibular bone, dental follicle, and dental pulp following a single oral administration of bacampicillin." J Oral Maxillofac Surg **44**(2): 107-112.
- 5 Al Masan, A. A., P. M. H. Dummer, D. J. J. Farnell and M. E. Vianna (2018). "Antibiotic prescribing for endodontic therapies: a comparative survey between general dental practitioners and final year Bachelor of Dental Surgery students in Cardiff, UK." Int Endod J **51**(7): 717-728.
- 6 Al-Awadhi, S., R. Spears, J. L. Gutmann and L. A. Opperman (2004). "Cultured primary osteoblast viability and apoptosis in the presence of root canal sealers." J Endod **30**(7): 527-533.
- 7 Al-Bakri, A. G., G. Othman and Y. Bustanji (2009). "The assessment of the antibacterial and antifungal activities of aspirin, EDTA and aspirin-EDTA combination and their effectiveness as antibiofilm agents." J Appl Microbiol **107**(1): 280-286.
- 8 Albashaireh, Z. S. and A. S. Alnegrish (1998). "Postobturation pain after single- and multiple-visit endodontic therapy. A prospective study." J Dent **26**(3): 227-232.
- 9 Allen, R. K., C. W. Newton and C. E. Brown, Jr. (1989). "A statistical analysis of surgical and nonsurgical endodontic retreatment cases." J Endod **15**(6): 261-266.
- 10 Almyroudi, A., D. Mackenzie, S. McHugh and W. P. Saunders (2002). "The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medications: an in vitro study." J Endod **28**(3): 163-167.

- 11 Alves, F. R., B. M. Almeida, M. A. Neves, J. O. Moreno, I. N. Rocas and J. F. Siqueira, Jr. (2011). "Disinfecting oval-shaped root canals: effectiveness of different supplementary approaches." J Endod **37**(4): 496-501.
- 12 Anderl, J. N., M. J. Franklin and P. S. Stewart (2000). "Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin." Antimicrob Agents Chemother **44**(7): 1818-1824.
- 13 Apaydin, E. S., S. Shabahang and M. Torabinejad (2004). "Hard-tissue healing after application of fresh or set MTA as root-end-filling material." J Endod **30**(1): 21-24.
- 14 Aryanpour, S., J.-P. Van Nieuwenhuysen and W. D'Hoore (2000). "Endodontic retreatment decisions: no consensus." International Endodontic Journal **33**(3): 208-218.
- 15 Athanassiadis, B., P. V. Abbott and L. J. Walsh (2007). "The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics." Aust Dent J **52**(1 Suppl): S64-82.
- 16 Bakland, L. K. and J. O. Andreasen (2012). "Will mineral trioxide aggregate replace calcium hydroxide in treating pulpal and periodontal healing complications subsequent to dental trauma? A review." Dent Traumatol **28**(1): 25-32.
- 17 Barkhordar, R. A., L. G. Watanabe, G. W. Marshall and M. Z. Hussain (1997). "Removal of intracanal smear by doxycycline in vitro." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **84**(4): 420-423.
- 18 Bartal, C., A. Danon, F. Schlaeffer, K. Reisenberg, M. Alkan, R. Smoliakov, A. Sidi and Y. Almog (2003). "Pharmacokinetic dosing of aminoglycosides: a controlled trial." Am J Med **114**(3): 194-198.
- 19 Barthel, C., M. Georgi, E. Schäfer, A. Petschelt, S. Flachsenberg, T. Neuber, C. Kockapan, R. Weiger and M. Hülsmann. (2006). "Stellungnahme DGZMK Spüllösungen." from [http://www.dgzmk.de/uploads/tx_szdgmkddocuments/DGZMK Stellungnahme_Wurzelkanalspuelung_10_2006.pdf](http://www.dgzmk.de/uploads/tx_szdgmkddocuments/DGZMK_Stellungnahme_Wurzelkanalspuelung_10_2006.pdf).
- 20 Barthel, C. R., A. Strobach, H. Briedigkeit, U. B. Gobel and J. F. Roulet (1999). "Leakage in roots coronally sealed with different temporary fillings." J Endod **25**(11): 731-734.
- 21 Basrani, B., L. Tjaderhane, J. M. Santos, E. Pascon, H. Grad, H. P. Lawrence and S. Friedman (2003). "Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **96**(5): 618-624.

- 22 Basrani, B. R., S. Manek, R. N. Sodhi, E. Fillery and A. Manzur (2007). "Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate." J Endod **33**(8): 966-969.
- 23 Bast, E. (2014). Mikrobiologische Methoden, Springer Berlin Heidelberg.
- 24 Baumgartner, J. C. and C. L. Mader (1987). "A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens." J Endod **13**(4): 147-157.
- 25 Becker, G. L., S. Cohen and R. Borer (1974). "The sequelae of accidentally injecting sodium hypochlorite beyond the root apex. Report of a case." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **38**(4): 633-638.
- 26 Becking, A. G. (1991). "Complications in the use of sodium hypochlorite during endodontic treatment. Report of three cases." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **71**(3): 346-348.
- 27 Belobrov, I. and P. Parashos (2011). "Treatment of tooth discoloration after the use of white mineral trioxide aggregate." J Endod **37**(7): 1017-1020.
- 28 Benno, Y., K. Suzuki, K. Suzuki, K. Narisawa, W. R. Bruce and T. Mitsuoka (1986). "Comparison of the fecal microflora in rural Japanese and urban Canadians." Microbiol Immunol **30**(6): 521-532.
- 29 Beraud, G., G. Le Moal, A. Elsendoorn, P. Tattevin, C. Godet, S. Alfandari, W. Couet, P. Roblot and F. Roblot (2012). "A survey on the use of gentamicin in infective endocarditis." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **31**(7): 1413-1418.
- 30 Bourne, R. B. (2004). "Prophylactic use of antibiotic bone cement: an emerging standard--in the affirmative." J Arthroplasty **19**(4 Suppl 1): 69-72.
- 31 Brizuela, C., A. Ormeno, C. Cabrera, R. Cabezas, C. I. Silva, V. Ramirez and M. Mercade (2017). "Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide, Mineral Trioxide Aggregate, and Biodentine in Permanent Young Teeth with Caries: A Randomized Clinical Trial." J Endod **43**(11): 1776-1780.
- 32 Bystrom, A., R. Claesson and G. Sundqvist (1985). "The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals." Endod Dent Traumatol **1**(5): 170-175.
- 33 Bystrom, A., R. P. Happonen, U. Sjogren and G. Sundqvist (1987). "Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis." Endod Dent Traumatol **3**(2): 58-63.

- 34 Bystrom, A. and G. Sundqvist (1981). "Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy." Scand J Dent Res **89**(4): 321-328.
- 35 Bystrom, A. and G. Sundqvist (1985). "The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy." Int Endod J **18**(1): 35-40.
- 36 Camilleri, J., F. E. Montesin, S. Papaioannou, F. McDonald and T. R. Pitt Ford (2004). "Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate." Int Endod J **37**(10): 699-704.
- 37 Card, S. J., A. Sigurdsson, D. Orstavik and M. Trope (2002). "The effectiveness of increased apical enlargement in reducing intracanal bacteria." J Endod **28**(11): 779-783.
- 38 Carr, G. B., R. S. Schwartz, C. Schaudinn, A. Gorur and J. W. Costerton (2009). "Ultrastructural examination of failed molar retreatment with secondary apical periodontitis: an examination of endodontic biofilms in an endodontic retreatment failure." J Endod **35**(9): 1303-1309.
- 39 Chakradhar Raju, R. V., N. Sathe, P. K. Morisetty and C. Veeramachaneni (2010). "Endodontic management of a maxillary first molar with unusual location of second mesio buccal orifice." J Conserv Dent **13**(3): 162-164.
- 40 Chávez de Paz, L. E., G. Bergenholtz and G. Svensäter (2010). "The Effects of Antimicrobials on Endodontic Biofilm Bacteria." Journal of Endodontics **36**(1): 70-77.
- 41 Chercoles-Ruiz, A., A. Sanchez-Torres and C. Gay-Escoda (2017). "Endodontics, Endodontic Retreatment, and Apical Surgery Versus Tooth Extraction and Implant Placement: A Systematic Review." J Endod **43**(5): 679-686.
- 42 Chhabra, R. S., J. E. Huff, J. K. Haseman, M. R. Elwell and A. C. Peters (1991). "Carcinogenicity of p-chloroaniline in rats and mice." Food Chem Toxicol **29**(2): 119-124.
- 43 Chong, B. S., T. R. Pitt Ford and M. B. Hudson (2003). "A prospective clinical study of Mineral Trioxide Aggregate and IRM when used as root-end filling materials in endodontic surgery." International Endodontic Journal **36**(8): 520-526.
- 44 Christiansen, R., L. L. Kirkevang, P. Horsted-Bindslev and A. Wenzel (2009). "Randomized clinical trial of root-end resection followed by root-end filling with mineral trioxide aggregate or smoothing of the orthograde gutta-percha root filling--1-year follow-up." Int Endod J **42**(2): 105-114.

- 45 Chugal, N., S. M. Mallya, B. Kahler and L. M. Lin (2017). "Endodontic Treatment Outcomes." Dent Clin North Am **61**(1): 59-80.
- 46 Chugal, N. M., J. M. Clive and L. S. W. Spångberg (2003). "Endodontic infection: some biologic and treatment factors associated with outcome." Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology **96**(1): 81-90.
- 47 Clarkson, R. M., H. M. Podlich and A. J. Moule (2011). "Influence of Ethylenediaminetetraacetic Acid on the Active Chlorine Content of Sodium Hypochlorite Solutions When Mixed in Various Proportions." Journal of Endodontics **37**(4): 538-543.
- 48 Cope, A. L., N. Francis, F. Wood and I. G. Chestnutt (2018). "Systemic antibiotics for symptomatic apical periodontitis and acute apical abscess in adults." Cochrane Database Syst Rev **9**: CD010136.
- 49 Cvek, M., P. E. Cleaton-Jones, J. C. Austin and J. O. Andreasen (1982). "Pulp reactions to exposure after experimental crown fractures or grinding in adult monkeys." J Endod **8**(9): 391-397.
- 50 Dahlen, G., W. Samuelsson, A. Molander and C. Reit (2000). "Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal." Oral Microbiol Immunol **15**(5): 309-312.
- 51 Damle, S. G., H. Bhattal and A. Loomba (2012). "Apexification of anterior teeth: a comparative evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide paste." J Clin Pediatr Dent **36**(3): 263-268.
- 52 Danin, J., T. Stromberg, H. Forsgren, L. E. Linder and L. O. Ramskold (1996). "Clinical management of nonhealing periradicular pathosis. Surgery versus endodontic retreatment." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **82**(2): 213-217.
- 53 De Moor, R. J., G. M. Hommez, J. G. De Boever, K. I. Delme and G. E. Martens (2000). "Periapical health related to the quality of root canal treatment in a Belgian population." Int Endod J **33**(2): 113-120.
- 54 de Sousa, E. L. R., C. C. R. Ferraz, B. P. F. d. A. Gomes, E. T. Pinheiro, F. B. Teixeira and F. J. de Souza-Filho (2003). "Bacteriological study of root canals associated with periapical abscesses." Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology **96**(3): 332-339.
- 55 de Souza Filho, F. J., G. Gallina, L. Gallottini, R. Russo and E. M. Cumbo (2012). "Innovations in endodontic filling materials: guttapercha vs Resilon." Curr Pharm Des **18**(34): 5553-5558.

- 56 Delany, G. M., S. S. Patterson, C. H. Miller and C. W. Newton (1982). "The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **53**(5): 518-523.
- 57 DeVan, M. M. (1952). "The nature of the partial denture foundation: Suggestions for its preservation." The Journal of Prosthetic Dentistry **2**(2): 210-218.
- 58 Deveaux, E., P. Hildelbert, C. Neut and C. Romond (1999). "Bacterial microleakage of Cavit, IRM, TERM, and Fermit: a 21-day in vitro study." J Endod **25**(10): 653-659.
- 59 Diogenes, A. R., N. B. Ruparel, F. B. Teixeira and K. M. Hargreaves (2014). "Translational Science in Disinfection for Regenerative Endodontics." Journal of Endodontics **40**(4): S52-S57.
- 60 Dorasani, G., K. Madhusudhana and S. K. Chinni (2013). "Clinical and radiographic evaluation of single-visit and multi-visit endodontic treatment of teeth with periapical pathology: An in vivo study." J Conserv Dent **16**(6): 484-488.
- 61 Dow, P. R. and J. I. Ingle (1955). "Isotope determination of root canal failure." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **8**(10): 1100-1104.
- 62 Doyle, S. L., J. S. Hodges, I. J. Pesun, A. S. Law and W. R. Bowles (2006). "Retrospective cross sectional comparison of initial nonsurgical endodontic treatment and single-tooth implants." J Endod **32**(9): 822-827.
- 63 Drake, D. R., A. H. Wiemann, E. M. Rivera and R. E. Walton (1994). "Bacterial retention in canal walls in vitro: effect of smear layer." J Endod **20**(2): 78-82.
- 64 Dunne, N. J., J. Hill, P. McAfee, R. Kirkpatrick, S. Patrick and M. Tunney (2008). "Incorporation of large amounts of gentamicin sulphate into acrylic bone cement: effect on handling and mechanical properties, antibiotic release, and biofilm formation." Proc Inst Mech Eng H **222**(3): 355-365.
- 65 Eckerbom, M., J. E. Andersson and T. Magnusson (1989). "A longitudinal study of changes in frequency and technical standard of endodontic treatment in a Swedish population." Endod Dent Traumatol **5**(1): 27-31.
- 66 Ehrmann, E. H., H. H. Messer and G. G. Adams (2003). "The relationship of intracanal medicaments to postoperative pain in endodontics." Int Endod J **36**(12): 868-875.
- 67 El Sayed, M. A., A. A. Taleb and M. S. Balbahaith (2013). "Sealing ability of three single-cone obturation systems: An in-vitro glucose leakage study." J Conserv Dent **16**(6): 489-493.

- 68 Eriksen, H. M. and E. Bjertness (1991). "Prevalence of apical periodontitis and results of endodontic treatment in middle-aged adults in Norway." Endod Dent Traumatol **7**(1): 1-4.
- 69 Eriksen, H. M., L.-L. Kirkevang and K. Petersson (2002). "Endodontic epidemiology and treatment outcome: general considerations." Endodontic Topics **2**(1): 1-9.
- 70 Estrela, C., J. D. Pécora, C. R. A. Estrela, O. A. Guedes, B. S. F. Silva, C. J. Soares and M. D. Sousa-Neto (2017). "Common Operative Procedural Errors and Clinical Factors Associated with Root Canal Treatment." Brazilian Dental Journal **28**: 179-190.
- 71 Fabricius, L., G. Dahlen, S. E. Holm and A. J. Moller (1982). "Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys." Scand J Dent Res **90**(3): 200-206.
- 72 Fabricius, L., G. Dahlen, G. Sundqvist, R. P. Happonen and A. J. Moller (2006). "Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth." Eur J Oral Sci **114**(4): 278-285.
- 73 Felman, D. and P. Parashos (2013). "Coronal tooth discoloration and white mineral trioxide aggregate." J Endod **39**(4): 484-487.
- 74 Figdor, D., J. K. Davies and G. Sundqvist (2003). "Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum." Oral Microbiol Immunol **18**(4): 234-239.
- 75 Fouad, A. F. (2002). "Are antibiotics effective for endodontic pain?" Endodontic Topics **3**(1): 52-66.
- 76 Fouad, A. F., E. M. Rivera and R. E. Walton (1996). "Penicillin as a supplement in resolving the localized acute apical abscess." Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology **81**(5): 590-595.
- 77 Friedman, C. E., J. L. Sandrik, M. A. Heuer and G. W. Rapp (1977). "Composition and physical properties of gutta-percha endodontic filling materials." J Endod **3**(8): 304-308.
- 78 Frisk, F. and M. Hakeberg (2005). "A 24-year follow-up of root filled teeth and periapical health amongst middle aged and elderly women in Goteborg, Sweden." Int Endod J **38**(4): 246-254.
- 79 Frutos, G., J. Y. Pastor, N. Martinez, M. R. Virto and S. Torrado (2010). "Influence of lactose addition to gentamicin-loaded acrylic bone cement on the

- kinetics of release of the antibiotic and the cement properties." Acta Biomater **6**(3): 804-811.
- 80 Gajan, E. B., M. Aghazadeh, R. Abashov, A. Salem Milani and Z. Moosavi (2009). "Microbial Flora of Root Canals of Pulpally-infected Teeth: *Enterococcus faecalis* a Prevalent Species." J Dent Res Dent Clin Dent Prospects **3**(1): 24-27.
- 81 Georgopoulou, M. K., A. P. Spanaki-Voreadi, N. Pantazis, E. G. Kontakiotis and A. S. Morfis (2008). "Periapical status and quality of root canal fillings and coronal restorations in a Greek population." Quintessence Int **39**(2): e85-92.
- 82 Germack, M., C. M. Sedgley, W. Sabbah and B. Whitten (2017). "Antibiotic Use in 2016 by Members of the American Association of Endodontists: Report of a National Survey." J Endod **43**(10): 1615-1622.
- 83 Gesi, A., M. Hakeberg, J. Warfvinge and G. Bergenholtz (2006). "Incidence of periapical lesions and clinical symptoms after pulpectomy--a clinical and radiographic evaluation of 1- versus 2-session treatment." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **101**(3): 379-388.
- 84 Ghoddusi, J., M. Javidi, M. H. Zarrabi and H. Bagheri (2006). "Flare-ups incidence and severity after using calcium hydroxide as intracanal dressing." N Y State Dent J **72**(4): 24-28.
- 85 Goldman, L. B., M. Goldman, J. H. Kronman and J. M. Letourneau (1980). "Adaptation and porosity of poly-HEMA in a model system using two microorganisms." Journal of Endodontics **6**(8): 683-686.
- 86 Gomes, B. P., V. B. Berber, A. S. Kokaras, T. Chen and B. J. Paster (2015). "Microbiomes of Endodontic-Periodontal Lesions before and after Chemomechanical Preparation." J Endod **41**(12): 1975-1984.
- 87 Gomes, B. P., D. B. Drucker and J. D. Lilley (1994). "Associations of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms." Int Endod J **27**(6): 291-298.
- 88 Gomes, B. P., J. D. Lilley and D. B. Drucker (1996). "Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria." Int Endod J **29**(2): 69-75.
- 89 Gomes, B. P., E. T. Pinheiro, C. R. Gade-Neto, E. L. Sousa, C. C. Ferraz, A. A. Zaia, F. B. Teixeira and F. J. Souza-Filho (2004). "Microbiological examination of infected dental root canals." Oral Microbiol Immunol **19**(2): 71-76.

- 90 Gomes, G. B., R. Sarkis-Onofre, M. L. Bonow, A. Etges and R. C. Jacinto (2013). "An investigation of the presence of specific anaerobic species in necrotic primary teeth." Braz Oral Res **27**(2): 149-155.
- 91 Grossman, L. I. (1978). Endodontic Practice. Philadelphia, Lea & Febiger.
- 92 Gutowski, C. J., B. M. Zmistowski, C. T. Clyde and J. Parvizi (2014). "The economics of using prophylactic antibiotic-loaded bone cement in total knee replacement." The Bone & Joint Journal **96-B**(1): 65-69.
- 93 Gwon, A. (1992). "Topical ofloxacin compared with gentamicin in the treatment of external ocular infection. Ofloxacin Study Group." Br J Ophthalmol **76**(12): 714-718.
- 94 Haapasalo, M. and D. Orstavik (1987). "In vitro infection and disinfection of dentinal tubules." J Dent Res **66**(8): 1375-1379.
- 95 Haapasalo, M., T. Udnæs and U. Endal (2003). "Persistent, recurrent, and acquired infection of the root canal system post-treatment." Endodontic Topics **6**(1): 29-56.
- 96 Hand, R. E., M. L. Smith and J. W. Harrison (1978). "Analysis of the effect of dilution on the necrotic tissue dissolution property of sodium hypochlorite." J Endod **4**(2): 60-64.
- 97 Hanssen, A. D. (2004). "Prophylactic use of antibiotic bone cement: an emerging standard--in opposition." J Arthroplasty **19**(4 Suppl 1): 73-77.
- 98 Harrison, J. W. (1984). "Irrigation of the root canal system." Dent Clin North Am **28**(4): 797-808.
- 99 Hasheminia, S., A. R. Farhad, M. Saatchi and M. Rajabzadeh (2013). "Synergistic antibacterial activity of chlorhexidine and hydrogen peroxide against *Enterococcus faecalis*." J Oral Sci **55**(4): 275-280.
- 100 Hashioka, K., M. Yamasaki, A. Nakane, N. Horiba and H. Nakamura (1992). "The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals." J Endod **18**(11): 558-561.
- 101 He, J., R. K. White, C. A. White, J. L. Schweitzer and K. F. Woodmansey (2017). "Clinical and Patient-centered Outcomes of Nonsurgical Root Canal Retreatment in First Molars Using Contemporary Techniques." Journal of Endodontics **43**(2): 231-237.
- 102 Heard, F. and R. E. Walton (1997). "Scanning electron microscope study comparing four root canal preparation techniques in small curved canals." Int Endod J **30**(5): 323-331.

- 103 Heling, I., D. Steinberg, S. Kenig, I. Gavrilovich, M. N. Sela and M. Friedman (1992). "Efficacy of a sustained-release device containing chlorhexidine and Ca(OH)₂ in preventing secondary infection of dentinal tubules." Int Endod J **25**(1): 20-24.
- 104 Hellwig, E., J. Klimek and T. Attin (2009). Einführung in die Zahnerhaltung
- 105 Hiatt, W. H. (1977). "Pulpal periodontal disease." J Periodontol **48**(9): 598-609.
- 106 Hirsch, J. M., U. Ahlstrom, P. A. Henrikson, G. Heyden and L. E. Peterson (1979). "Periapical surgery." Int J Oral Surg **8**(3): 173-185.
- 107 Hof, H., R. Dörries and G. Geginat (2009). Medizinische Mikrobiologie, Thieme.
- 108 Hosoya, N., T. Yoshida, F. Iino, T. Arai, A. Mishima and K. Kobayashi (2012). "Detection of a secondary mesio-buccal canal in maxillary first molar: A comparative study." J Conserv Dent **15**(2): 127-131.
- 109 Hulsmann, M. and W. Hahn (2000). "Complications during root canal irrigation--literature review and case reports." Int Endod J **33**(3): 186-193.
- 110 Hulsmann, M., M. Heckendorff and A. Lennon (2003). "Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use." Int Endod J **36**(12): 810-830.
- 111 Huth, K. C., M. Quirling, S. Lenzke, E. Paschos, K. Kamereck, K. Brand, R. Hickel and N. Ilie (2011). "Effectiveness of ozone against periodontal pathogenic microorganisms." European Journal of Oral Sciences **119**(3): 204-210.
- 112 Huth, K. C., M. Quirling, S. Maier, K. Kamereck, M. Alkhayer, E. Paschos, U. Welsch, T. Miethke, K. Brand and R. Hickel (2009). "Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model." Int Endod J **42**(1): 3-13.
- 113 Imura, N., E. T. Pinheiro, B. P. F. A. Gomes, A. A. Zaia, C. C. R. Ferraz and F. J. Souza-Filho (2007). "The Outcome of Endodontic Treatment: A Retrospective Study of 2000 Cases Performed by a Specialist." Journal of Endodontics **33**(11): 1278-1282.
- 114 Ince, B., E. Ercan, M. Dalli, C. T. Dulgergil, Y. O. Zorba and H. Colak (2009). "Incidence of postoperative pain after single- and multi-visit endodontic treatment in teeth with vital and non-vital pulp." Eur J Dent **3**(4): 273-279.

- 115 Ingle, J. I. (1961). "A standardized endodontic technique utilizing newly designed instruments and filling materials." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **14**: 83-91.
- 116 Iqbal, M., E. Kurtz and M. Kohli (2009). "Incidence and factors related to flare-ups in a graduate endodontic programme." Int Endod J **42**(2): 99-104.
- 117 Jeansonne, M. J. and R. R. White (1994). "A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants." Journal of Endodontics **20**(6): 276-278.
- 118 Ji, H., H. Li, Y. He and B. Hou (2014). "[Study of association between Parvimonas micra and pulp dominant pathogens in the infected root canals with chronic periradicular periodontitis]." Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi **49**(8): 495-499.
- 119 Jiranek, W. A., A. D. Hanssen and A. S. Greenwald (2006). "Antibiotic-loaded bone cement for infection prophylaxis in total joint replacement." J Bone Joint Surg Am **88**(11): 2487-2500.
- 120 Kakehashi, S., H. R. Stanley and R. J. Fitzgerald (1965). "The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **20**: 340-349.
- 121 Kamberi, B., V. Hoxha, M. Stavileci, E. Dragusha, A. Kuci and L. Kqiku (2011). "Prevalence of apical periodontitis and endodontic treatment in a Kosovar adult population." BMC Oral Health **11**: 32.
- 122 Karabucak, B., D. Li, J. Lim and M. Iqbal (2005). "Vital pulp therapy with mineral trioxide aggregate." Dent Traumatol **21**(4): 240-243.
- 123 Kazemi, R. B., K. E. Safavi and L. S. Spangberg (1994). "Assessment of marginal stability and permeability of an interim restorative endodontic material." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **78**(6): 788-796.
- 124 Kerekes, K. and L. Tronstad (1979). "Long-term results of endodontic treatment performed with a standardized technique." J Endod **5**(3): 83-90.
- 125 Kim, S. (1985). "Microcirculation of the dental pulp in health and disease." J Endod **11**(11): 465-471.
- 126 Kim, S., M. Song, S.-J. Shin and E. Kim (2016). "A Randomized Controlled Study of Mineral Trioxide Aggregate and Super Ethoxybenzoic Acid as Root-end Filling Materials in Endodontic Microsurgery: Long-term Outcomes." Journal of Endodontics **42**(7): 997-1002.

- 127 Kipioti, A., M. Nakou, N. Legakis and F. Mitsis (1984). "Microbiological findings of infected root canals and adjacent periodontal pockets in teeth with advanced periodontitis." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **58**(2): 213-220.
- 128 Kirkevang, L. L., M. Vaeth, P. Horsted-Bindslev and A. Wenzel (2006). "Longitudinal study of periapical and endodontic status in a Danish population." Int Endod J **39**(2): 100-107.
- 129 Kishen, A. (2010). "Advanced therapeutic options for endodontic biofilms." Endodontic Topics **22**(1): 99-123.
- 130 Kist, S., M. Kollmuss, J. Jung, S. Schubert, R. Hickel and K. C. Huth (2017). "Comparison of ozone gas and sodium hypochlorite/chlorhexidine two-visit disinfection protocols in treating apical periodontitis: a randomized controlled clinical trial." Clinical Oral Investigations **21**(4): 995-1005.
- 131 Kitagawa, R., H. Kitagawa, N. Izutani, N. Hirose, M. Hayashi and S. Imazato (2014). "Development of an antibacterial root canal filling system containing MDPB." J Dent Res **93**(12): 1277-1282.
- 132 Kollmuss, M., C. E. Preis, S. Kist, R. Hickel and K. C. Huth (2017). "Differences in physical characteristics and sealing ability of three tricalcium silicate-based cements used as root-end-filling materials." Am J Dent **30**(4): 185-189.
- 133 Krishnamurthy, S. and S. Sudhakaran (2010). "Evaluation and prevention of the precipitate formed on interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine." J Endod **36**(7): 1154-1157.
- 134 Krupp, C., C. Bargholz, M. Brusehaber and M. Hulsmann (2013). "Treatment outcome after repair of root perforations with mineral trioxide aggregate: a retrospective evaluation of 90 teeth." J Endod **39**(11): 1364-1368.
- 135 Kuriyama, T., T. Karasawa, K. Nakagawa, E. Yamamoto and S. Nakamura (2002). "Bacteriology and antimicrobial susceptibility of gram-positive cocci isolated from pus specimens of orofacial odontogenic infections." Oral Microbiol Immunol **17**(2): 132-135.
- 136 Kvist, T. (2001). "Endodontic retreatment. Aspects of decision making and clinical outcome." Swed Dent J Suppl(144): 1-57.
- 137 Kvist, T. and C. Reit (1999). "Results of endodontic retreatment: a randomized clinical study comparing surgical and nonsurgical procedures." J Endod **25**(12): 814-817.
- 138 Kvist, T. and C. Reit (2002). "The perceived benefit of endodontic retreatment." International Endodontic Journal **35**(4): 359-365.

- 139 Kvist, T., C. Reit, M. Esposito, P. Mileman, S. Bianchi, K. Pettersson and C. Andersson (1994). "Prescribing endodontic retreatment: towards a theory of dentist behaviour." Int Endod J **27**(6): 285-290.
- 140 Langeland, K. (1987). "Tissue response to dental caries." Endod Dent Traumatol **3**(4): 149-171.
- 141 Lee, D. S., M. J. Lim, Y. Choi, V. Rosa, C. U. Hong and K. S. Min (2016). "Tooth discoloration induced by a novel mineral trioxide aggregate-based root canal sealer." Eur J Dent **10**(3): 403-407.
- 142 Letchmanan, K., S. C. Shen, W. K. Ng, P. Kingshuk, Z. Shi, W. Wang and R. B. H. Tan (2017). "Mechanical properties and antibiotic release characteristics of poly(methyl methacrylate)-based bone cement formulated with mesoporous silica nanoparticles." J Mech Behav Biomed Mater **72**: 163-170.
- 143 Li, G. H., L. N. Niu, W. Zhang, M. Olsen, G. De-Deus, A. A. Eid, J. H. Chen, D. H. Pashley and F. R. Tay (2014). "Ability of new obturation materials to improve the seal of the root canal system: a review." Acta Biomater **10**(3): 1050-1063.
- 144 Lin, L. M., J. E. Skribner and P. Gaengler (1992). "Factors associated with endodontic treatment failures." J Endod **18**(12): 625-627.
- 145 Liu, H., X. Wei, J. Ling, W. Wang and X. Huang (2010). "Biofilm Formation Capability of Enterococcus faecalis Cells in Starvation Phase and Its Susceptibility to Sodium Hypochlorite." Journal of Endodontics **36**(4): 630-635.
- 146 Loe, H. (1973). "Does chlorhexidine have a place in the prophylaxis of dental diseases?" J Periodontal Res Suppl **12**: 93-99.
- 147 Lucena, C., J. M. Lopez, R. Pulgar, C. Abalos and M. J. Valderrama (2013). "Potential errors and misuse of statistics in studies on leakage in endodontics." Int Endod J **46**(4): 323-331.
- 148 Mader, C. L., J. C. Baumgartner and D. D. Peters (1984). "Scanning electron microscopic investigation of the smeared layer on root canal walls." J Endod **10**(10): 477-483.
- 149 Madison, S. and L. R. Wilcox (1988). "An evaluation of coronal microleakage in endodontically treated teeth. Part III. In vivo study." J Endod **14**(9): 455-458.
- 150 Main, C., N. Mirzayan, S. Shabahang and M. Torabinejad (2004). "Repair of root perforations using mineral trioxide aggregate: a long-term study." J Endod **30**(2): 80-83.

- 151 Mancini, M., E. Armellin, A. Casaglia, L. Cerroni and L. Cianconi (2009). "A Comparative Study of Smear Layer Removal and Erosion in Apical Intraradicular Dentine With Three Irrigating Solutions: A Scanning Electron Microscopy Evaluation." Journal of Endodontics **35**(6): 900-903.
- 152 Mancini, M., L. Cerroni, L. Iorio, E. Armellin, G. Conte and L. Cianconi (2013). "Smear Layer Removal and Canal Cleanliness Using Different Irrigation Systems (EndoActivator, EndoVac, and Passive Ultrasonic Irrigation): Field Emission Scanning Electron Microscopic Evaluation in an In Vitro Study." Journal of Endodontics **39**(11): 1456-1460.
- 153 Manfredi, M., L. Figini, M. Gagliani and G. Lodi (2016). "Single versus multiple visits for endodontic treatment of permanent teeth." Cochrane Database of Systematic Reviews(12).
- 154 Marchesan, M. A., B. Pasternak Junior, M. M. Afonso, M. D. Sousa-Neto and C. Paschoalato (2007). "Chemical analysis of the flocculate formed by the association of sodium hypochlorite and chlorhexidine." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **103**(5): e103-105.
- 155 Marciano, M. A., J. Camilleri, R. M. Costa, M. A. Matsumoto, B. M. Guimaraes and M. A. H. Duarte (2017). "Zinc Oxide Inhibits Dental Discoloration Caused by White Mineral Trioxide Aggregate Angelus." J Endod **43**(6): 1001-1007.
- 156 Matsuo, T., T. Shirakami, K. Ozaki, T. Nakanishi, H. Yumoto and S. Ebisu (2003). "An immunohistological study of the localization of bacteria invading root pulpal walls of teeth with periapical lesions." J Endod **29**(3): 194-200.
- 157 McComb, D. and D. C. Smith (1975). "A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures." J Endod **1**(7): 238-242.
- 158 McCrary, B. R., J. L. Streckfuss and H. J. Keene (1989). "Oral hygiene and the prevalence of oral group D streptococci in medically-physically compromised and periodontal disease patients." J Periodontol **60**(5): 255-258.
- 159 Mente, J., S. Hufnagel, M. Leo, A. Michel, H. Gehrig, D. Panagidis, D. Saure and T. Pfefferle (2014). "Treatment outcome of mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide direct pulp capping: long-term results." J Endod **40**(11): 1746-1751.
- 160 Mente, J., M. Leo, D. Panagidis, D. Saure and T. Pfefferle (2014). "Treatment outcome of mineral trioxide aggregate: repair of root perforations-long-term results." J Endod **40**(6): 790-796.
- 161 Molander, A., C. Reit and G. Dahlen (1990). "Microbiological evaluation of clindamycin as a root canal dressing in teeth with apical periodontitis." Int Endod J **23**(2): 113-118.

- 162 Molander, A., C. Reit, G. Dahlen and T. Kvist (1998). "Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis." Int Endod J **31**(1): 1-7.
- 163 Moller, A. J., L. Fabricius, G. Dahlen, G. Sundqvist and R. P. Happonen (2004). "Apical periodontitis development and bacterial response to endodontic treatment. Experimental root canal infections in monkeys with selected bacterial strains." Eur J Oral Sci **112**(3): 207-215.
- 164 Moodnik, R. M., S. O. Dorn, M. J. Feldman, M. Levey and B. G. Borden (1976). "Efficacy of biomechanical instrumentation: a scanning electron microscopic study." J Endod **2**(9): 261-266.
- 165 Morgental, R. D., A. Singh, H. Sappal, P. M. Kopper, F. V. Vier-Pelisser and O. A. Peters (2013). "Dentin inhibits the antibacterial effect of new and conventional endodontic irrigants." J Endod **39**(3): 406-410.
- 166 Nair, P. N. (1987). "Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions." J Endod **13**(1): 29-39.
- 167 Nair, P. N., U. Sjogren, G. Krey, K. E. Kahnberg and G. Sundqvist (1990). "Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study." J Endod **16**(12): 580-588.
- 168 Nekoofar, M. H., D. F. Stone and P. M. Dummer (2010). "The effect of blood contamination on the compressive strength and surface microstructure of mineral trioxide aggregate." Int Endod J **43**(9): 782-791.
- 169 Ng, Y. L., V. Mann, S. Rahbaran, J. Lewsey and K. Gulabivala (2007). "Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature - part 1. Effects of study characteristics on probability of success." Int Endod J **40**(12): 921-939.
- 170 Nichols, W. W., M. J. Evans, M. P. Slack and H. L. Walmsley (1989). "The penetration of antibiotics into aggregates of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*." J Gen Microbiol **135**(5): 1291-1303.
- 171 Niu, W., T. Yoshioka, C. Kobayashi and H. Suda (2002). "A scanning electron microscopic study of dentinal erosion by final irrigation with EDTA and NaOCl solutions." Int Endod J **35**(11): 934-939.
- 172 Noble, C. J. (1978). "Carriage of group D streptococci in the human bowel." J Clin Pathol **31**(12): 1182-1186.
- 173 Oginni, A. O. and C. I. Udoeye (2004). "Endodontic flare-ups: comparison of incidence between single and multiple visit procedures in patients attending a Nigerian teaching hospital." BMC Oral Health **4**(1): 4.

- 174 Ohara, P., M. Torabinejad and J. D. Kettering (1993). "Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected anaerobic bacteria." Endod Dent Traumatol **9**(3): 95-100.
- 175 Okino, L. A., E. L. Siqueira, M. Santos, A. C. Bombana and J. A. Figueiredo (2004). "Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel." Int Endod J **37**(1): 38-41.
- 176 Orstavik, D. (1988). "Endodontic materials." Adv Dent Res **2**(1): 12-24.
- 177 Orstavik, D. and M. Haapasalo (1990). "Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules." Endod Dent Traumatol **6**(4): 142-149.
- 178 Ørstavik, D. A. G. (2005). "Materials used for root canal obturation: technical, biological and clinical testing." Endodontic Topics **12**(1): 25-38.
- 179 Osorio, R. M., A. Hefti, F. J. Vertucci and A. L. Shawley (1998). "Cytotoxicity of endodontic materials." J Endod **24**(2): 91-96.
- 180 Ozdemir, H. O., H. D. Buzoglu, S. Calt, A. Stabholz and D. Steinberg (2010). "Effect of Ethylenediaminetetraacetic Acid and Sodium Hypochlorite Irrigation on Enterococcus faecalis Biofilm Colonization in Young and Old Human Root Canal Dentin: In Vitro Study." Journal of Endodontics **36**(5): 842-846.
- 181 Pak, J. G., S. Fayazi and S. N. White (2012). "Prevalence of Periapical Radiolucency and Root Canal Treatment: A Systematic Review of Cross-sectional Studies." Journal of Endodontics **38**(9): 1170-1176.
- 182 Pascon, F. M., K. R. Kantovitz, F. D. Cavallaro and R. M. Puppini-Rontani (2012). "Permeability and smear layer removal: effects of different chemical agents on the primary root dentin." Pediatr Dent **34**(4): e81-85.
- 183 Pashley, D. H., V. Michelich and T. Kehl (1981). "Dentin permeability: effects of smear layer removal." J Prosthet Dent **46**(5): 531-537.
- 184 Patil, A. A., S. B. Joshi, S. V. Bhagwat and S. A. Patil (2016). "Incidence of Postoperative Pain after Single Visit and Two Visit Root Canal Therapy: A Randomized Controlled Trial." J Clin Diagn Res **10**(5): ZC09-12.
- 185 Pedro, F. M., A. Marques, T. M. Pereira, M. C. Bandeca, S. Lima, M. C. Kuga, M. R. Tonetto, A. Semenoff-Segundo and A. H. Borges (2016). "Status of Endodontic Treatment and the Correlations to the Quality of Root Canal Filling and Coronal Restoration." J Contemp Dent Pract **17**(10): 830-836.

- 186 Peters, O. A. and F. Barbakow (2000). "Effects of irrigation on debris and smear layer on canal walls prepared by two rotary techniques: a scanning electron microscopic study." J Endod **26**(1): 6-10.
- 187 Pickenpaugh, L., A. Reader, M. Beck, W. J. Meyers and L. J. Peterson (2001). "Effect of Prophylactic Amoxicillin on Endodontic Flare-Up in Asymptomatic, Necrotic Teeth." Journal of Endodontics **27**(1): 53-56.
- 188 Pitt Ford, T. R. (1983). "Relation between seal of root fillings and tissue response." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **55**(3): 291-294.
- 189 Qi, Z., H. Cao, H. Jiang, J. Zhao and Z. Tang (2016). "Combinations of bacterial species associated with symptomatic endodontic infections in a Chinese population." Int Endod J **49**(1): 17-25.
- 190 Qualtrough, A. J., J. M. Whitworth and P. M. Dummer (1999). "Preclinical endodontology: an international comparison." Int Endod J **32**(5): 406-414.
- 191 Rao, K. N., R. Kandaswamy, G. Umashetty, V. P. Rathore, C. Hotkar and B. S. Patil (2014). "Post-Obturation pain following one-visit and two-visit root canal treatment in necrotic anterior teeth." J Int Oral Health **6**(2): 28-32.
- 192 Ray, H. A. and M. Trope (1995). "Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of the root filling and the coronal restoration." Int Endod J **28**(1): 12-18.
- 193 Read, A. F. and R. J. Woods (2014). "Antibiotic resistance management." Evol Med Public Health **2014**(1): 147.
- 194 Reader, C. M., V. T. Himel, L. P. Germain and M. M. Hoen (1993). "Effect of three obturation techniques on the filling of lateral canals and the main canal." J Endod **19**(8): 404-408.
- 195 Reit, C. and H.-G. Gröndahl (1987). "Endodontic decision-making under uncertainty: A decision analytic approach to management of periapical lesions in endodontically treated teeth." Dental Traumatology **3**(1): 15-20.
- 196 Reit, C., H.-G. Gröndahl and B. Engström (1985). "Endodontic treatment decisions: A study of the clinical decision-making process." Dental Traumatology **1**(3): 102-107.
- 197 Retamozo, B., S. Shabahang, N. Johnson, R. M. Aprecio and M. Torabinejad (2010). "Minimum Contact Time and Concentration of Sodium Hypochlorite Required to Eliminate *Enterococcus faecalis*." Journal of Endodontics **36**(3): 520-523.

- 198 Ricucci, D. and K. Langeland (1998). "Apical limit of root canal instrumentation and obturation, part 2. A histological study." Int Endod J **31**(6): 394-409.
- 199 Ricucci, D. and J. F. Siqueira (2010). "Biofilms and Apical Periodontitis: Study of Prevalence and Association with Clinical and Histopathologic Findings." Journal of Endodontics **36**(8): 1277-1288.
- 200 Riis, A., S. Taschieri, M. Del Fabbro and T. Kvist (2018). "Tooth Survival after Surgical or Nonsurgical Endodontic Retreatment: Long-term Follow-up of a Randomized Clinical Trial." J Endod.
- 201 Risso, P. A., A. J. Cunha, M. C. Araujo and R. R. Luiz (2008). "Postobturation pain and associated factors in adolescent patients undergoing one- and two-visit root canal treatment." J Dent **36**(11): 928-934.
- 202 Roberts, H. W., J. M. Toth, D. W. Berzins and D. G. Charlton (2008). "Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature." Dent Mater **24**(2): 149-164.
- 203 Rôças, I. N., M. Hülsmann and J. F. Siqueira (2008). "Microorganisms in Root Canal-treated Teeth from a German Population." Journal of Endodontics **34**(8): 926-931.
- 204 Rocas, I. N., K. C. Lima, I. V. Assuncao, P. N. Gomes, I. V. Bracks and J. F. Siqueira, Jr. (2015). "Advanced Caries Microbiota in Teeth with Irreversible Pulpitis." J Endod **41**(9): 1450-1455.
- 205 Rocas, I. N., J. C. Provenzano, M. A. Neves and J. F. Siqueira, Jr. (2016). "Disinfecting Effects of Rotary Instrumentation with Either 2.5% Sodium Hypochlorite or 2% Chlorhexidine as the Main Irrigant: A Randomized Clinical Study." J Endod **42**(6): 943-947.
- 206 Rocas, I. N., J. F. Siqueira, Jr. and K. R. Santos (2004). "Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases." J Endod **30**(5): 315-320.
- 207 Rosenthal, S., L. Spangberg and K. Safavi (2004). "Chlorhexidine substantivity in root canal dentin." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **98**(4): 488-492.
- 208 Rubinstein, R. A. and S. Kim (1999). "Short-term observation of the results of endodontic surgery with the use of a surgical operation microscope and super-EBA as root-end filling material." Journal of Endodontics **25**(1): 43-48.
- 209 Sadr, S., A. Golmoradzadeh, M. Raoof and M. J. Tabanfar (2015). "Microleakage of Single-Cone Gutta-Percha Obturation Technique in Combination with Different Types of Sealers." Iran Endod J **10**(3): 199-203.

- 210 Saleh, I. M., I. E. Ruyter, M. Haapasalo and D. Orstavik (2002). "The effects of dentine pretreatment on the adhesion of root-canal sealers." Int Endod J **35**(10): 859-866.
- 211 Sam, G., D. W. Chung, R. van der Hoeven, S. Verweij and M. Becker (2016). "The effect of intratympanic gentamicin for treatment of Meniere's disease on lower frequency hearing." Int J Clin Pharm **38**(4): 780-783.
- 212 Samara, A., Y. Sarri, D. Stravopodis, G. N. Tzanetakis, E. G. Kontakiotis and E. Anastasiadou (2011). "A Comparative Study of the Effects of Three Root-end Filling Materials on Proliferation and Adherence of Human Periodontal Ligament Fibroblasts." Journal of Endodontics **37**(6): 865-870.
- 213 Samara, E., T. F. Moriarty, L. A. Decosterd, R. G. Richards, E. Gautier and P. Wahl (2017). "Antibiotic stability over six weeks in aqueous solution at body temperature with and without heat treatment that mimics the curing of bone cement." Bone Joint Res **6**(5): 296-306.
- 214 Samiei, M., M. Aghazade, F. Farhadi, N. Shahveghar, A. Torab and S. M. Vahid Pakdel (2014). "Sealing Efficacy of Single-cone Obturation Technique with MTA and CEM Cement: An in Vitro Bacterial Leakage Study." J Dent Res Dent Clin Dent Prospects **8**(2): 77-83.
- 215 Saquy, P. C., G. Maia Campos, M. D. Sousa Neto, L. F. Guimaraes and J. D. Pecora (1994). "Evaluation of chelating action of EDTA in association with Dakin's solution." Braz Dent J **5**(1): 65-70.
- 216 Sarin, A., P. Gupta, J. Sachdeva, A. Gupta, S. Sachdeva and R. Nagpal (2016). "Effect of Different Obturation Techniques on the Prognosis of Endodontic Therapy: A Retrospective Comparative Analysis." J Contemp Dent Pract **17**(7): 582-586.
- 217 Sassone, L. M., R. Fidel, M. Faveri, S. Fidel, L. Figueiredo and M. Feres (2008). "Microbiological evaluation of primary endodontic infections in teeth with and without sinus tract." Int Endod J **41**(6): 508-515.
- 218 Schafer, E. and K. Bossmann (2005). "Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*." J Endod **31**(1): 53-56.
- 219 Schilder, H. (2006). "Filling root canals in three dimensions. 1967." J Endod **32**(4): 281-290.
- 220 Schirmeister, J. F., A. L. Liebenow, G. Braun, A. Wittmer, E. Hellwig and A. Al-Ahmad (2007). "Detection and eradication of microorganisms in root-filled teeth associated with periradicular lesions: an in vivo study." J Endod **33**(5): 536-540.

- 221 Segura-Egea, J. J., A. Jimenez-Pinzon, M. Poyato-Ferrera, E. Velasco-Ortega and J. V. Rios-Santos (2004). "Periapical status and quality of root fillings and coronal restorations in an adult Spanish population." Int Endod J **37**(8): 525-530.
- 222 Seidberg, B. H. and H. Schilder (1974). "An evaluation of EDTA in endodontics." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **37**(4): 609-620.
- 223 Seltzer, S. and I. J. Naidorf (1985). "Flare-ups in endodontics: I. Etiological factors." J Endod **11**(11): 472-478.
- 224 Senia, E. S., R. V. Marraro, J. L. Mitchell, A. G. Lewis and L. Thomas (1975). "Rapid sterilization of gutta-percha cones with 5.25% sodium hypochlorite." J Endod **1**(4): 136-140.
- 225 Shabahang, S. and M. Torabinejad (2003). "Effect of MTAD on Enterococcus faecalis-contaminated root canals of extracted human teeth." J Endod **29**(9): 576-579.
- 226 Shabahang, S., M. Torabinejad, P. P. Boyne, H. Abedi and P. McMillan (1999). "A comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs." J Endod **25**(1): 1-5.
- 227 Shahriari, S., Z. Mohammadi, M. M. Mokhtari and R. Yousefi (2010). "Effect of hydrogen peroxide on the antibacterial substantivity of chlorhexidine." Int J Dent **2010**: 946384.
- 228 Shigeta, M., G. Tanaka, H. Komatsuzawa, M. Sugai, H. Suginaka and T. Usui (1997). "Permeation of antimicrobial agents through Pseudomonas aeruginosa biofilms: a simple method." Chemotherapy **43**(5): 340-345.
- 229 Sim, I. G., T. S. Lim, G. Krishnaswamy and N. N. Chen (2016). "Decision Making for Retention of Endodontically Treated Posterior Cracked Teeth: A 5-year Follow-up Study." J Endod **42**(2): 225-229.
- 230 Singh, G., I. Gupta, F. M. Elshamy, N. Boreak and H. E. Homeida (2016). "In vitro comparison of antibacterial properties of bioceramic-based sealer, resin-based sealer and zinc oxide eugenol based sealer and two mineral trioxide aggregates." Eur J Dent **10**(3): 366-369.
- 231 Singh, S. and A. Garg (2012). "Incidence of post-operative pain after single visit and multiple visit root canal treatment: A randomized controlled trial." J Conserv Dent **15**(4): 323-327.
- 232 Sipaviciute, E. and R. Maneliene (2014). "Pain and flare-up after endodontic treatment procedures." Stomatologija **16**(1): 25-30.

- 233 Siqueira, J. F. (2005). "Reaction of periradicular tissues to root canal treatment: benefits and drawbacks." Endodontic Topics **10**(1): 123-147.
- 234 Siqueira, J. F. (2011). Treatment of endodontic infections. Berlin, Germany, Quintessence Publishing Co. Ltd.
- 235 Siqueira, J. F. and F. Barnett (2004). "Interappointment pain: mechanisms, diagnosis, and treatment." Endodontic Topics **7**(1): 93-109.
- 236 Siqueira, J. F., Jr. (2001). "Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail." Int Endod J **34**(1): 1-10.
- 237 Siqueira, J. F., Jr. (2003). "Microbial causes of endodontic flare-ups." Int Endod J **36**(7): 453-463.
- 238 Siqueira, J. F., Jr. (2010). "Standing on our standards: time for reflection." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **110**(5): 545-547.
- 239 Siqueira, J. F., Jr., M. C. Araujo, P. F. Garcia, R. C. Fraga and C. J. Dantas (1997). "Histological evaluation of the effectiveness of five instrumentation techniques for cleaning the apical third of root canals." J Endod **23**(8): 499-502.
- 240 Siqueira, J. F., Jr., M. M. Batista, R. C. Fraga and M. de Uzeda (1998). "Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria." J Endod **24**(6): 414-416.
- 241 Siqueira, J. F., Jr., M. De Uzeda and M. E. Fonseca (1996). "A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria." J Endod **22**(6): 308-310.
- 242 Siqueira, J. F., Jr., A. R. Perez, M. F. Marceliano-Alves, J. C. Provenzano, S. G. Silva, F. R. Pires, G. C. Vieira, I. N. Rocas and F. R. Alves (2017). "What happens to unprepared root canal walls: a correlative analysis using micro-computed tomography and histology/scanning electron microscopy." Int Endod J.
- 243 Siqueira, J. F., Jr. and I. N. Rocas (2004). "Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **97**(1): 85-94.
- 244 Siqueira, J. F., Jr., I. N. Rocas, F. R. Alves and L. C. Campos (2005). "Periradicular status related to the quality of coronal restorations and root canal fillings in a Brazilian population." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **100**(3): 369-374.

- 245 Siqueira, J. F., Jr., I. N. Rocas, A. Favieri and K. C. Lima (2000). "Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite." J Endod **26**(6): 331-334.
- 246 Siqueira, J. F., Jr., I. N. Rocas, S. S. Paiva, T. Guimaraes-Pinto, K. M. Magalhaes and K. C. Lima (2007). "Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **104**(1): 122-130.
- 247 Siqueira, J. F., Jr., I. N. Rocas, F. N. Riche and J. C. Provenzano (2008). "Clinical outcome of the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis using an antimicrobial protocol." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **106**(5): 757-762.
- 248 Siqueira, J. F., Jr., I. N. Rocas, R. Souto, M. Uzeda and A. P. Colombo (2001). "Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **92**(4): 451-457.
- 249 Siqueira, J. F., I. N. Rôças and D. Ricucci (2010). "Biofilms in endodontic infection." Endodontic Topics **22**(1): 33-49.
- 250 Sjogren, U., D. Figdor, S. Persson and G. Sundqvist (1997). "Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis." Int Endod J **30**(5): 297-306.
- 251 Sjogren, U., D. Figdor, L. Spangberg and G. Sundqvist (1991). "The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing." Int Endod J **24**(3): 119-125.
- 252 Sjögren, U., B. Hägglund, G. Sundqvist and K. Wing (1990). "Factors affecting the long-term results of endodontic treatment." Journal of Endodontics **16**(10): 498-504.
- 253 Sjogren, U. and G. Sundqvist (1987). "Bacteriologic evaluation of ultrasonic root canal instrumentation." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **63**(3): 366-370.
- 254 Skucaite, N., V. Peciuliene, R. Maneliene and V. Maciulskiene (2010). "Antibiotic prescription for the treatment of endodontic pathology: a survey among Lithuanian dentists." Medicina (Kaunas) **46**(12): 806-813.
- 255 Skucaite, N., V. Peciuliene, A. Vitkauskiene and V. Machiulskiene (2010). "Susceptibility of Endodontic Pathogens to Antibiotics in Patients with Symptomatic Apical Periodontitis." Journal of Endodontics **36**(10): 1611-1616.

- 256 Smyth, C. J., M. K. Halpenny and S. J. Ballagh (1987). "Carriage rates of enterococci in the dental plaque of haemodialysis patients in Dublin." Br J Oral Maxillofac Surg **25**(1): 21-33.
- 257 Soares, J. A., M. A. Roque de Carvalho, S. M. Cunha Santos, R. M. C. Mendonça, A. P. Ribeiro-Sobrinho, M. Brito-Júnior, P. P. Magalhães, M. H. Santos and L. de Macêdo Farias (2010). "Effectiveness of Chemomechanical Preparation with Alternating Use of Sodium Hypochlorite and EDTA in Eliminating Intracanal Enterococcus faecalis Biofilm." Journal of Endodontics **36**(5): 894-898.
- 258 Soltanoff, W. (1978). "A comparative study of the single-visit and the multiple-visit endodontic procedure." Journal of Endodontics **4**(9): 278-281.
- 259 Souza, M. A., C. Z. Menon, L. F. Nery, C. D. Bertol, L. G. Rossato-Grando and D. Cecchin (2018). "Effect of root canal preparation techniques on chlorhexidine substantivity on human dentin: a chemical analysis." Clin Oral Investig **22**(2): 859-865.
- 260 Spangberg, L., B. Engstrom and K. Langeland (1973). "Biologic effects of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **36**(6): 856-871.
- 261 Spangberg, L. S. (1998). "Contemporary endodontology." Aust Endod J **24**(1): 11-17.
- 262 Spangberg, L. S. W. and M. Haapasalo (2002). "Rationale and efficacy of root canal medicaments and root filling materials with emphasis on treatment outcome." Endodontic Topics **2**(1): 35-58.
- 263 Spratt, D. A., J. Pratten, M. Wilson and K. Gulabivala (2001). "An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates." Int Endod J **34**(4): 300-307.
- 264 Stassen, I. G., G. M. Hommez, H. De Bruyn and R. J. De Moor (2006). "The relation between apical periodontitis and root-filled teeth in patients with periodontal treatment need." Int Endod J **39**(4): 299-308.
- 265 Stojicic, S., Y. Shen and M. Haapasalo (2013). "Effect of the source of biofilm bacteria, level of biofilm maturation, and type of disinfecting agent on the susceptibility of biofilm bacteria to antibacterial agents." J Endod **39**(4): 473-477.
- 266 Stojicic, S., S. Zivkovic, W. Qian, H. Zhang and M. Haapasalo (2010). "Tissue dissolution by sodium hypochlorite: effect of concentration, temperature, agitation, and surfactant." J Endod **36**(9): 1558-1562.

- 267 Stowe, T. J., C. M. Sedgley, B. Stowe and J. C. Fenno (2004). "The effects of chlorhexidine gluconate (0.12%) on the antimicrobial properties of tooth-colored ProRoot mineral trioxide aggregate." J Endod **30**(6): 429-431.
- 268 Sunay, H., J. Tanalp, I. Dikbas and G. Bayirli (2007). "Cross-sectional evaluation of the periapical status and quality of root canal treatment in a selected population of urban Turkish adults." Int Endod J **40**(2): 139-145.
- 269 Sundqvist, G., D. Figdor, S. Persson and U. Sjögren (1998). "Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment." Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology **85**(1): 86-93.
- 270 Swanson, K. and S. Madison (1987). "An evaluation of coronal microleakage in endodontically treated teeth. Part I. Time periods." J Endod **13**(2): 56-59.
- 271 Tack, K. J. and L. D. Sabath (1985). "Increased minimum inhibitory concentrations with anaerobiasis for tobramycin, gentamicin, and amikacin, compared to latamoxef, piperacillin, chloramphenicol, and clindamycin." Chemotherapy **31**(3): 204-210.
- 272 Tagelsir, A., G. H. Yassen, G. F. Gomez and R. L. Gregory (2016). "Effect of Antimicrobials Used in Regenerative Endodontic Procedures on 3-week-old *Enterococcus faecalis* Biofilm." Journal of Endodontics **42**(2): 258-262.
- 273 Tanomaru, J. M., M. R. Leonardo, M. Tanomaru Filho, I. Bonetti Filho and L. A. Silva (2003). "Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS." Int Endod J **36**(11): 733-739.
- 274 Tavares, P. B., E. Bonte, T. Boukpepsi, J. F. Siqueira, Jr. and J. J. Lasfargues (2009). "Prevalence of apical periodontitis in root canal-treated teeth from an urban French population: influence of the quality of root canal fillings and coronal restorations." J Endod **35**(6): 810-813.
- 275 The, S. D., J. C. Maltha and A. J. Plasschaert (1980). "Reactions of guinea pig subcutaneous connective tissue following exposure to sodium hypochlorite." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **49**(5): 460-466.
- 276 Thoden van Velzen, S. K. (2005). "[Root canal treatment. Quality and result]." Ned Tijdschr Tandheelkd **112**(11): 411-415.
- 277 Thomson, T. S., J. E. Berry, M. J. Somerman and K. L. Kirkwood (2003). "Cementoblasts maintain expression of osteocalcin in the presence of mineral trioxide aggregate." J Endod **29**(6): 407-412.
- 278 Torabinejad, M., R. Corr, R. Handysides and S. Shabahang (2009). "Outcomes of nonsurgical retreatment and endodontic surgery: a systematic review." J Endod **35**(7): 930-937.

- 279 Torabinejad, M., J. J. Cymerman, M. Frankson, R. R. Lemon, J. D. Maggio and H. Schilder (1994). "Effectiveness of various medications on postoperative pain following complete instrumentation." J Endod **20**(7): 345-354.
- 280 Torabinejad, M., R. Handysides, A. A. Khademi and L. K. Bakland (2002). "Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **94**(6): 658-666.
- 281 Torabinejad, M., R. K. Higa, D. J. McKendry and T. R. Pitt Ford (1994). "Dye leakage of four root end filling materials: effects of blood contamination." J Endod **20**(4): 159-163.
- 282 Torabinejad, M., C. U. Hong, S. J. Lee, M. Monsef and T. R. Pitt Ford (1995). "Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs." J Endod **21**(12): 603-608.
- 283 Torabinejad, M., C. U. Hong, F. McDonald and T. R. Pitt Ford (1995). "Physical and chemical properties of a new root-end filling material." J Endod **21**(7): 349-353.
- 284 Torabinejad, M., C. U. Hong, T. R. Pitt Ford and J. D. Kettering (1995). "Cytotoxicity of four root end filling materials." J Endod **21**(10): 489-492.
- 285 Torabinejad, M., J. D. Kettering, J. C. McGraw, R. R. Cummings, T. G. Dwyer and T. S. Tobias (1988). "Factors associated with endodontic interappointment emergencies of teeth with necrotic pulps." Journal of Endodontics **14**(5): 261-266.
- 286 Torabinejad, M., A. A. Khademi, J. Babagoli, Y. Cho, W. B. Johnson, K. Bozhilov, J. Kim and S. Shabahang (2003). "A new solution for the removal of the smear layer." J Endod **29**(3): 170-175.
- 287 Torabinejad, M., A. Nosrat, P. Verma and O. Udochukwu (2017). "Regenerative Endodontic Treatment or Mineral Trioxide Aggregate Apical Plug in Teeth with Necrotic Pulps and Open Apices: A Systematic Review and Meta-analysis." Journal of Endodontics **43**(11): 1806-1820.
- 288 Torabinejad, M., B. Ung and J. D. Kettering (1990). "In vitro bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth." J Endod **16**(12): 566-569.
- 289 Torabinejad, M. and S. N. White (2016). "Endodontic treatment options after unsuccessful initial root canal treatment: Alternatives to single-tooth implants." J Am Dent Assoc **147**(3): 214-220.
- 290 Tronstad, L. (1992). "Recent development in endodontic research." Scand J Dent Res **100**(1): 52-59.

- 291 Tronstad, L., K. Asbjornsen, L. Doving, I. Pedersen and H. M. Eriksen (2000). "Influence of coronal restorations on the periapical health of endodontically treated teeth." Endod Dent Traumatol **16**(5): 218-221.
- 292 Trope, M. (1990). "Relationship of intracanal medicaments to endodontic flare-ups." Endod Dent Traumatol **6**(5): 226-229.
- 293 Trope, M., E. Chow and R. Nissan (1995). "In vitro endotoxin penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth." Endod Dent Traumatol **11**(2): 90-94.
- 294 Trope, M., E. O. Delano and D. Orstavik (1999). "Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: single vs. multivisit treatment." J Endod **25**(5): 345-350.
- 295 Udoye, C. I., H. Jafarzadeh, E. N. Aguwa and M. Habibi (2011). "Flare-up incidence and related factors in Nigerian adults." J Contemp Dent Pract **12**(2): 120-123.
- 296 Urban, K., D. Donnermeyer, E. Schafer and S. Burklein (2017). "Canal cleanliness using different irrigation activation systems: a SEM evaluation." Clin Oral Investig **21**(9): 2681-2687.
- 297 van de Belt, H., D. Neut, W. Schenk, J. R. van Horn, H. C. van der Mei and H. J. Busscher (2001). "Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements. A review." Acta Orthop Scand **72**(6): 557-571.
- 298 van de Belt, H., D. Neut, D. R. Uges, W. Schenk, J. R. van Horn, H. C. van der Mei and H. J. Busscher (2000). "Surface roughness, porosity and wettability of gentamicin-loaded bone cements and their antibiotic release." Biomaterials **21**(19): 1981-1987.
- 299 von Arx, T., S. Hanni and S. S. Jensen (2010). "Clinical results with two different methods of root-end preparation and filling in apical surgery: mineral trioxide aggregate and adhesive resin composite." J Endod **36**(7): 1122-1129.
- 300 Vransky, J. D., P. S. Stewart and P. A. Suci (1997). "Comparison of recalcitrance to ciprofloxacin and levofloxacin exhibited by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms displaying rapid-transport characteristics." Antimicrob Agents Chemother **41**(6): 1352-1358.
- 301 Walker, T. L. and C. E. del Rio (1991). "Histological evaluation of ultrasonic debridement comparing sodium hypochlorite and water." J Endod **17**(2): 66-71.
- 302 Walton, R. and A. Fouad (1992). "Endodontic interappointment flare-ups: a prospective study of incidence and related factors." J Endod **18**(4): 172-177.

- 303 Walton, R. E. and J. Chiappinelli (1993). "Prophylactic penicillin: effect on posttreatment symptoms following root canal treatment of asymptomatic periapical pathosis." J Endod **19**(9): 466-470.
- 304 Wang, C., P. Xu, L. Ren, G. Dong and L. Ye (2010). "Comparison of post-obturation pain experience following one-visit and two-visit root canal treatment on teeth with vital pulps: a randomized controlled trial." Int Endod J **43**(8): 692-697.
- 305 Watts, J. D., D. M. Holt, T. J. Beeson, T. C. Kirkpatrick and R. E. Rutledge (2007). "Effects of pH and mixing agents on the temporal setting of tooth-colored and gray mineral trioxide aggregate." J Endod **33**(8): 970-973.
- 306 Weiger, R., W. Geurtsen, D. Heidemann, C. Löst, A. Petschelt, W. Raab, E. Schäfer and R. Hickel. (2000). "Zur Prognose von Wurzelkanalbehandlungen." Wissenschaftliche Stellungnahme Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, from [http://www.dgzmk.de/uploads/tx_szdgzmkdocuments/Zur Prognose von Wurzelkanalbehandlungen.pdf](http://www.dgzmk.de/uploads/tx_szdgzmkdocuments/Zur_Prognose_von_Wurzelkanalbehandlungen.pdf).
- 307 Weiger, R., S. Hitzler, G. Hermle and C. Lost (1997). "Periapical status, quality of root canal fillings and estimated endodontic treatment needs in an urban German population." Endod Dent Traumatol **13**(2): 69-74.
- 308 Williams, B. L., G. F. McCann and F. D. Schoenknecht (1983). "Bacteriology of dental abscesses of endodontic origin." J Clin Microbiol **18**(4): 770-774.
- 309 Witherspoon, D. E., J. C. Small, J. D. Regan and M. Nunn (2008). "Retrospective Analysis of Open Apex Teeth Obturated with Mineral Trioxide Aggregate." Journal of Endodontics **34**(10): 1171-1176.
- 310 Wittgow, W. C., Jr. and C. B. Sabiston, Jr. (1975). "Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps." J Endod **1**(5): 168-171.
- 311 Wolcott, J., D. Ishley, W. Kennedy, S. Johnson and S. Minnich (2002). "Clinical investigation of second mesiobuccal canals in endodontically treated and retreated maxillary molars." J Endod **28**(6): 477-479.
- 312 Wolcott, J., D. Ishley, W. Kennedy, S. Johnson, S. Minnich and J. Meyers (2005). "A 5 yr clinical investigation of second mesiobuccal canals in endodontically treated and retreated maxillary molars." J Endod **31**(4): 262-264.
- 313 Wong, A. W., C. S. Tsang, S. Zhang, K. Y. Li, C. Zhang and C. H. Chu (2015). "Treatment outcomes of single-visit versus multiple-visit non-surgical endodontic therapy: a randomised clinical trial." BMC Oral Health **15**: 162.

- 314 Wong, L. and C. H. Sissons (2007). "Human dental plaque microcosm biofilms: effect of nutrient variation on calcium phosphate deposition and growth." Arch Oral Biol **52**(3): 280-289.
- 315 Wu, C. C., Y. K. Huang, W. J. Chang, Y. C. Wu, C. C. Wang and K. C. Yang (2018). "Limitation of the antibiotic-eluting bone graft substitute: An example of gentamycin-impregnated calcium sulfate." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **106**(1): 80-87.
- 316 Yamada, R. S., A. Armas, M. Goldman and P. S. Lin (1983). "A scanning electron microscopic comparison of a high volume final flush with several irrigating solutions: Part 3." J Endod **9**(4): 137-142.
- 317 Yesilsoy, C., E. Whitaker, D. Cleveland, E. Phillips and M. Trope (1995). "Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants." J Endod **21**(10): 513-515.
- 318 Yilmaz, Z., B. Tuncel, H. O. Ozdemir and A. Serper (2009). "Microleakage evaluation of roots filled with different obturation techniques and sealers." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **108**(1): 124-128.
- 319 Yoshida, T., T. Shibata, T. Shinohara, S. Gomyo and I. Sekine (1995). "Clinical evaluation of the efficacy of EDTA solution as an endodontic irrigant." J Endod **21**(12): 592-593.
- 320 Yu, C. and P. V. Abbott (2007). "An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury." Aust Dent J **52**(1 Suppl): S4-16.
- 321 Yucel, A. C., E. Guler, A. U. Guler and E. Ertas (2006). "Bacterial penetration after obturation with four different root canal sealers." J Endod **32**(9): 890-893.
- 322 Zehnder, M. (2006). "Root canal irrigants." J Endod **32**(5): 389-398.
- 323 Zehnder, M., P. Schmidlin, B. Sener and T. Waltimo (2005). "Chelation in root canal therapy reconsidered." J Endod **31**(11): 817-820.
- 324 Zeng, C., J. Willison, M. M. Meghil, B. E. Bergeron, C. W. Cutler, F. R. Tay, L. Niu and J. Ma (2018). "Antibacterial efficacy of an endodontic sonic-powered irrigation system: An in vitro study." J Dent **75**: 105-112.
- 325 Zhang, C., B. X. Hou, H. Y. Zhao and Z. Sun (2012). "Microbial diversity in failed endodontic root-filled teeth." Chin Med J (Engl) **125**(6): 1163-1168.
- 326 Zhou, H. M., T. F. Du, Y. Shen, Z. J. Wang, Y. F. Zheng and M. Haapasalo (2015). "In vitro cytotoxicity of calcium silicate-containing endodontic sealers." J Endod **41**(1): 56-61.

8 **Abbildungsverzeichnis**

<i>Abbildung 1: Gentamicinversetzte Zementproben im Inkubiercontainer</i>	42
<i>Abbildung 2: Entnommene Proben</i>	42
<i>Abbildung 3: Mikroplatte nach Einfärben</i>	43
<i>Abbildung 4: Mikroplatte vor Messung</i>	44
<i>Abbildung 5: Dreifelderausstrich von P. micra</i>	46
<i>Abbildung 6: Ausplattieren der Bakterienlösung</i>	49
<i>Abbildung 7: Etest-Versuch mit E. faecalis in höchster Verdünnung mit Inhibitionszone (Hemmhof-Ellipse)</i>	50
<i>Abbildung 8: Nahaufnahme der Inhibitionszone (Hemmhof-Ellipse)</i>	50
<i>Abbildung 9: Sägen der extrahierten Rinderzähne</i>	51
<i>Abbildung 10: Extrahierter Rinderfrontzahn</i>	52
<i>Abbildung 11: Gesägtes Scheibchen des extrahierten Rinderfrontzahns</i>	52
<i>Abbildung 12: Biofilmanzucht auf Dentinplättchen in BMM-Nährmedium</i>	54
<i>Abbildung 13: Übersicht des Kontaktversuchs</i>	58
<i>Abbildung 14: Nahaufnahme des Kontaktversuchs</i>	58
<i>Abbildung 15: Herstellung der Verdünnungsreihe für E. faecalis für n=1 und n=2</i> ...	60
<i>Abbildung 16: Ausplattierte Verdünnungsreihe der Kontrollprobe ohne Zement im Versuch n=4 mit P. micra</i>	61
<i>Abbildung 17: Unterschied in CFU innerhalb einer Verdünnungsreihe zwischen zwei log-Stufen mit E. faecalis – Verdünnung bei $\log 10^{-2}$</i>	62
<i>Abbildung 18: Unterschied in CFU innerhalb einer Verdünnungsreihe zwischen zwei log-Stufen mit E. faecalis – Verdünnung bei $\log 10^{-4}$</i>	62
<i>Abbildung 19: Absolute Menge an freigesetztem Gentamicin über 48 Stunden im Versuch mit PBS</i>	64
<i>Abbildung 20: Absolute Menge an freigesetztem Gentamicin über 48 Stunden im Versuch mit Alpha MEM</i>	65

<i>Abbildung 21: Etest für Gentamicin mit Inhibitionszone</i>	66
<i>Abbildung 22: Mittelwert der Colony Forming Units pro Milliliter aller Bakterienreduktionsversuche mit E. faecalis.....</i>	67
<i>Abbildung 23: Logarithmische Darstellung der Bakterienreduktion im E. faecalis- Biofilm durch Probenkörper mit verschiedenen Gentamicinkonzentrationen.....</i>	68
<i>Abbildung 24: Mittelwert der Colony Forming Units pro Milliliter aller Bakterienreduktionsversuche mit P. micra</i>	69
<i>Abbildung 25: Logarithmische Darstellung der Bakterienreduktion im P. micra-Biofilm durch Probenkörper mit verschiedenen Gentamicinkonzentrationen.....</i>	70

9 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Mittelwerte mit Standardabweichung der prozentualen Bakterienreduktion im Versuch mit E. faecalis</i>	68
<i>Tabelle 2: Mittelwerte mit Standardabweichung der prozentualen Bakterienreduktion im Versuch mit P. micra.....</i>	70

10 Verzeichnis der verwendeten Materialien und Rezepte

Anzucht von *Enterococcus faecalis*

BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood (aus Gebrauchsanweisung des Herstellers)

- 12 g Pankreatisch abgebautes Casein
- 5 g Peptisch abgebautes Tiergewebe
- 3 g Hefeextrakt
- 3 g Rindfleischextrakt
- 1 g Maisstärke
- 5 g Natriumchlorid
- 13,5 g Agar
- Defibriertes Schafblut 5%

Stammerhaltung von *Enterococcus faecalis*

Brain Heart Infusion (BHI)

- 37 g Brain Heart Infusion
- 1000 ml destilliertes Wasser
- 10 ml Glycerin

Anzucht von *Parvimonas micra*

BD Schaedler Agar with Vitamin K1 and 5% Sheep Blood (aus Gebrauchsanweisung des Herstellers)

- 8,2 g Pankreatisch abgebautes Casein
- 2,5 g Peptisch abgebautes Tiergewebe
- 1 g Papainisch abgebautes Sojamehl
- 5,8 g Glucose
- 5 g Hefeextrakt
- 1,7 g Natriumchlorid
- 0,8 g Dikaliumphosphat
- 0,4 g L-Cystin
- 0,01 g Hämin
- 0,01 g Vitamin K
- 3 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

13,5 g Agar
5% Schafblut, defibriert

Stammerhaltung von *Parvimonas micra*

Brain Heart Infusion (BHI)

37 g Brain Heart Infusion
1000 ml destilliertes Wasser
10 ml Glycerin

Medium zur Biofilmanzucht

Basal Medium Mucin (BMM) (nach Wong et al. 2007)

2,5 g pig gastric mucin
10 g Peptone No. 3
5 g Trypticase
5 g Hefeextrakt
2,5 g Kaliumchlorid
unter Erhitzung in 1000 µl H₂O gelöst
Autoklavieren bei 121° C für 15 min

11 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Karin Huth für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie für die Bereitstellung aller notwendigen Mittel.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Gudermann, Dekan der Medizinischen Fakultät, möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit in seinem Hause abschließen zu dürfen.

Auch möchte ich Herrn Prof. Reinhard Hickel, Direktor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, herzlich danken, dass ich diese Arbeit in seiner Abteilung und zu seiner Zeit als Dekan durchführen durfte.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Maximilian Kollmuß für die außerordentliche Betreuung in allen Bereichen dieser Arbeit. Sowohl bei der Planung und Durchführung der zahlreichen Versuche und jeglichen Arbeiten im Labor, als auch bei der Niederschrift der wissenschaftlichen Arbeit konnte ich auf seine Unterstützung zählen. Diverse Korrekturen, sprachliche und zeitliche Hürden und reichlich Fragen haben wir gemeistert. Vielen Dank dafür!

Meinen lieben Freunden gilt Dank für die Ermutigungen, die Formatierungshilfe, die sprachliche Durchsicht und den Beistand.

Meinen Eltern danke ich für die bedingungslose Unterstützung in allen erdenklichen Hinsichten.



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Eidesstattliche Versicherung

Berkesch, Marisa Isabelle

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Modifikation eines hydraulischen Silikatzements (MTA) durch Zusatz von Gentamicin – Freisetzung und antimikrobielle Wirkung auf Biofilme zweier endodontologisch pathogener Bakterienspezies in vitro selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Hallbergmoos, den 24.04.2023

Ort, Datum

Marisa Isabelle Berkesch

Unterschrift Doktorandin/Doktorand