

Diplomarbeit

Viabilität oraler Fibroblasten, osteoblastärer Zellen sowie von Mäusefibroblasten nach einer simulierten endodontischen Behandlung mittels Spüllösungen im Vergleich zur Laseranwendung

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der Zahnheilkunde
(Dr. med. dent.)**

an der

Medizinischen Universität Wien

ausgeführt an der

Abteilung für Zahnerhaltung und Parodontologie

unter der Anleitung von

**Ass. Prof. DDr. Barbara Cvikl
Mag. Dr. Alexander Franz**

eingereicht von

Thomas Tauber

0842215

Wien, März 2015

.....

Danksagung

Ich möchte mich bei folgenden Personen ganz herzlich für Ihre fachliche Unterstützung und Hilfestellung bei der Ausführung meiner Diplomarbeit bedanken:

Frau Ass. Prof. DDr. Barbara Cvikl

Herrn Mag. Dr. Alexander Franz

Frau Manuela Pensch

Insbesondere möchte ich auch meinen Eltern und meinem Bruder danken, die mir vor allem immer wieder als mentale Unterstützung zur Seite gestanden sind.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	ii
Kurzfassung	v
Abstract	vi
Abkürzungen	vii
1. Einleitung	7
1.1. Fragestellung	8
1.2. Parodont	9
1.2.1. Alveolarknochen	9
1.2.2. Parodontalligament (Desmodont)	10
1.2.3. Gingiva	10
1.2.4. Wurzelzement.....	12
1.3. Endodontologie	13
1.3.1. Das Endodont	13
1.3.2. Pulpaerkrankungen.....	16
1.3.3. Grundlagen zum Apex	18
1.3.4. Endodontische Therapie.....	18
1.4. Laser	23
1.4.1. Stimulierte Emission	23
1.4.2. Grundlegender Aufbau und Funktion	24
1.4.3. Betriebsarten eines Lasers	26
1.4.4. Lichtleitung	27
1.4.5. Wirkung.....	28
1.4.6. Einteilung der Laser	29
1.4.7. Laseranwendung in der Zahnheilkunde	30
2. Material und Methode	36
2.1. Studienvorbereitungen	36
2.2. Studiendesign	37
2.3. Ablauf der Hauptversuche.....	38
3. Ergebnisse	42
3.1. Statistische Auswertung	42
3.1.1. Gingivale Fibroblasten (GF)	43
3.1.2. Mäusefibroblasten (L929).....	46

3.1.3.	Osteoblastäre Zellen (MG-63)	49
3.1.4.	Zusammenfassung der Daten	52
3.1.5.	Vergleich der Behandlungsgruppen aller 3 Zellarten	53
3.2.	Mikroskopische Begutachtung der Zellen nach deren Behandlung.....	56
3.2.1.	Gingivale Fibroblasten (GF)	56
3.2.2.	Mäusefibroblasten (L929)	62
3.2.3.	Osteoblastäre Zellen (MG-63)	68
4.	Diskussion	74
	Abbildungsverzeichnis	79
	Tabellenverzeichnis	83
	Literaturverzeichnis.....	84

Kurzfassung

Hintergrund: Spezielle Laser sind als Desinfektions-Adjuvantien bei Entzündungen des Endodonts zur Therapie geeignet. Bisherige Studien haben sich über die mikrobiologischen Auswirkungen dieser Laser beschäftigt. Weitestgehend unerforscht ist der Effekt der Laseranwendung in der Endodontie auf umliegende Zellen und deren Viabilität.

Zielsetzung: Ziel war die Wirkung von endodontischer Laseranwendung im Vergleich zu Spüllösungen auf durch eine Dentinschicht abgeschirmte Zellen zu erforschen und somit eine klinische Situation zu simulieren.

Methodik: Um die Viabilität der durch eine Dentinschicht abgeschirmten Zellen (GF, L929, MG-63) zu untersuchen, wurden die Zellen durch eine Dentinschicht entweder mit 2 unterschiedlichen Lasern (Diodenlaser bzw. Er:YAG-Laser), mit 2 unterschiedlichen konventionellen Spüllösungen (CHX bzw. NaOCl) behandelt oder unbehandelt belassen. Die Viabilität der Zellen wurde mittels MTT ermittelt. Zudem erfolgte eine Fotodokumentation.

Ergebnisse: Die Daten zeigen, dass es bei allen drei Zelllinien zu einer stärkeren Reduktion der Viabilität in den direkten Behandlungsgruppen ohne Dentinschicht mit Er:YAG-Laser, Diodenlaser, CHX und NaOCl im Vergleich zu deren äquivalenten Behandlungsgruppen durch eine Dentinschicht kam. Weiters war die Viabilitätsreduktion bei Behandlungen durch eine Dentinschicht mit CHX und NaOCl stärker im Vergleich zu Er:YAG-Laser und Diodenlaser. Die Fotos bestätigen die Ergebnisse der MTT Tests.

Schlussfolgerung: Es gibt einen Einfluss von Er:YAG-Laser, Diodenlaser, CHX- und NaOCl-Spülung auf die Viabilität von osteoblastären Zellen (MG-63), Mäusefibroblasten (L929) und gingivaler Fibroblasten (GF) im „in vitro“-Versuch. Vor allem durch deren direkte Behandlung kommt es zu einer Reduktion der Viabilität in allen 3 Zelllinien. Bei Behandlung durch eine Dentinschicht wurde die Zytotoxizität der jeweiligen Behandlung abgeschwächt, blieb aber in gewissem Maße bei CHX und NaOCl immer vorhanden.

Abstract

Background: Special lasers are used as disinfection-adjuvant for therapy of inflammatory diseases of the endodont. Previous studies have concentrated on the microbiological effects of laser treatment. Unknown is, how the laser in the endodontic treatment affects the circumjacent cells and their viability.

Objectiv: Our objective was to explore the effects of an endodontic lasertreatment in comparison to antimicrobial irrigants through a cell protecting dentin layer and therefore create a clinical situation.

Methods: To investigate the viability of dentin layer protected cells (GF, L929, MG-63), the cells were either treated with 2 different laser (Diode-laser or Er:-YAG-Laser), or 2 conventional antimicrobial irrigants (CHX or NaOCl) or left untreated. The viability of the cells was determined by MTT. Photo-documentation was also performed.

Results: Our data show that there is a higher reduction of viability in the direct treatment groups without dentin layer in comparison to the indirect treatment groups through a dentin layer. Furthermore the viability reduction in the indirect treatment groups through a dentin layer with CHX and NaOCl was higher than in comparison to treatment with Er:YAG-laser and Diodelaser.

Conclusion: There is an influence of Er:YAG-laser, Diodelaser, CHX and NaOCl irrigation on the viability of osteoblast cells (MG-63), mouse fibroblasts (L929) and gingiva fibroblasts (GF) in “in vitro” experiment. Especially through direct treatment there is a reduction of viability in all three cell types. Treating through a dentin layer, the cytotoxic effect decreased in all groups, but still remained in the treatment groups CHX and NaOCl.

Abkürzungen

NaOCl	Natriumhypochlorit
CHX	Chlorhexidin
He-Ne-Laser	Helium-Neon
GaAIAs-Laser	Gallium, Aluminium, Arsenid
Nd:YAG-Laser	Neodymium:Yttrium-Aluminium-Granat
Ho:YAG-Laser	Holmium:Yttrium-Aluminium-Granat
Er:YAG-Laser	Erbium: Yttrium-Aluminium-Granat
CO ₂ -Laser	Kohlendioxid
KTP	Kalium-Titanyl-Phosphat (KTiOPO)
Er,Cr:YSGG	Erbium,Chromium:Yttrium-Scandium-Gallium-Granat
LED	Licht emittierende Diode
PAD	Lichtaktivierte Desinfektion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
MG-63	Osteosarkomzelle (osteoblastäre Zelle)
L929	Fibrosarkomzelle (Mäusefibroblast)
GF	Gingiva Fibroblasten
α -MEM	α -minimal essential medium
FCS	fetal calf serum
PSA	Penicillin, Streptomycin, Amphotericin

1. Einleitung

Viele Menschen haben im Laufe ihres Lebens Probleme mit Entzündungen der Zahnpulpa, wobei diese Entzündungen auch oft nach vollzogener Wurzelbehandlung des jeweiligen Zahnes nur schwer oder unzufrieden stellend abheilen und nicht selten in der Extraktion des Zahnes enden (1, 2). Der Grund für diese persistierenden Entzündungen sind zumeist verbleibende Bakterien im Zahn (3).

Die Entfernung und Abtötung dieser Bakterien erfolgt in der konventionellen Therapie durch mechanische Aufbereitung und chemische Desinfektion (4, 5). Dieses Vorgehen ist jedoch durch verschiedenste Faktoren wie zum Beispiel der Zahnanatomie, der Penetrationstiefe der Spüllösung oder der Organisation der Bakterien im Biofilm limitiert (2).

Der Einsatz von Lasern als Desinfektionsadjuvants hat sich hierbei in den letzten Jahren durchaus bewährt (6, 7).

Der folgende Teil dieser Arbeit dient als Einführung in die für diese Studie relevanten Themen und soll sowohl eine Grundvorstellung des Problembereiches dieser Arbeit, deren Fragestellung sowie deren Hintergründe vermitteln.

1.1. Fragestellung

In letzten Jahren wurden zahlreiche Studien betreffend Lasern und deren Einsatz in der Endodontie gemacht (8). Bei diesen bisherigen Studien mit Lasersystemen wurden aber vor allem die bakterizide Wirkung von Laserstrahlung untersucht (8). Es liegt jedoch einen Mangel an Studien über die Wirkung von Laserstrahlung auf die umliegenden Zellen des Endodonts vor.

Zur Beantwortung der Frage hinsichtlich möglicher Viabilitätsbeeinflussung durch Laserstrahlung im Vergleich zu konventionellen Spüllösungen wurde folgende Nullhypothese formuliert:

Es gibt keinen Unterschied in der Viabilitätsbeeinflussung von umliegenden Zellen des Endodonts zwischen Laser und konventionellen Spüllösungen durch die Dentinschicht.

Um diese Nullhypothese zu untersuchen werden 3 Hauptversuche durchgeführt auf deren Ausführung im Kapitel „Material & Methodik“ noch genauer eingegangen wird.

Um ein Verständnis für die Hauptversuche, deren Durchführung und der dazu benötigten Materialien zu haben werden in den folgenden drei Kapiteln Grundlagen in den Bereichen der Parodontologie, der Endodontie und des Lasers beschrieben.

1.2. Parodont

Das Parodont ist einer der Ursprungsorte der Zellen für unsere Viabilitätsversuche und bedarf daher einer genaueren Betrachtung.

Das Parodont ist eine strukturell funktionelle Einheit und besteht aus dem Alveolarknochen, dem Parodontalligament (Desmodont), der Gingiva und dem Wurzelzement (9).

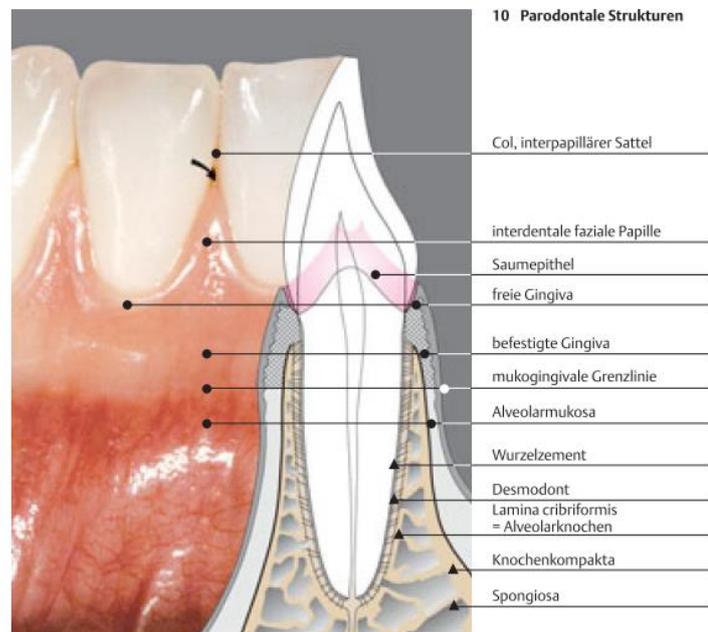


Abbildung 1.1 parodontale Strukturen

1.2.1. Alveolarknochen

Die Zähne sind im Ober- und Unterkiefer in jenem Teil des Knochens verankert, der sich Alveolarknochen nennt (9).

Die Außenwände des Alveolenfortsatzes und die Alveoleninnenwände dieses Alveolarknochens sind aus einer dünnen Schicht kompakten Knochens aufgebaut, dazwischen befindet sich spongiöser Knochen. In diesem äußeren kompakten Knochen befinden sich funktionelle Einheiten, die Osteone (10). Knochenlamellen sind hierbei im kompakten Knochen konzentrisch um einen zentralen Havers'schen Kanal angeordnet. Die Versorgung dieser funktionellen Einheiten erfolgt über die sogenannten Volkmann'schen Kanäle, die eine Verbindung zum Periost herstellen (9).

Spongiöser Knochen ist stärker durchblutet und reagiert folglich schneller auf mechanische Stimuli (9).

Zu den Zellen des Knochens zählt man die Osteoblasten, die Osteoklasten, die Osteozyten und die „Lining Cells“ (9).

Osteoklasten sind knochenresorbierende Riesenzellen. Sie sind entscheidend für den Knochenabbau (11).

Osteoblasten hingegen als deren Gegenspieler sind knochenbildende Zellen. Ihre Aufgabe besteht darin, Osteoid zu bilden und dieses in einem weiteren Schritt zu mineralisieren (11).

Osteozyten sind im Knochen eingebettete inaktive Osteoblasten. Sie kommunizieren mit anderen Osteozyten und können auf mechanische Reize reagieren (12).

„Lining Cells“ sitzen auf der Knochenoberfläche und steuern unter anderem den Ein- und Austritt von Kalzium- und Phosphationen (13).

MG-63

Für unsere Zellversuche wurden repräsentativ für den Alveolarknochen, humane osteoblastenähnliche Zellen namens MG-63 verwendet. Sie sind gängige Zellen zur Simulation von osteoblastären Reaktionen im in vitro Versuch (14, 15). Der wesentliche Unterschied zu humanen Osteoblasten liegt unter anderem in deren Proliferationsrate die bei den osteoblastenähnlichen MG-63 Osteosarkomzellen deutlich erhöht ist (15). Trotz Unterschiede geben diese MG-63 Osteosarkomzellen richtig angewendet eine brauchbare in vitro Situation für osteoblastäre Modelle her, ersetzen die primäre Zellstudie jedoch auf keinen Fall (15).

1.2.2. Parodontalligament (Desmodont)

Gebildet wird das Parodontalligament von Fibroblasten und zieht in Form von Sharpey'schen Fasern vom Alveolarknochen zum Wurzelzement. Koronal sind diese Sharpey'schen Fasern mit der Lamina propria der Gingiva verbunden. Die Aufgabe des Parodontalligament liegt in der Verankerung und Kräfteverteilung des Zahnes im Alveolarknochen. Es erfolgt hierbei eine belastungsabhängige Anpassung der Fasern auf die jeweiligen Kräfte (9).

Der vorherrschende Zelltyp im Desmodont sind Parodontalligament-Fibroblasten. Parodontalligament-Fibroblasten produzieren die Sharpey'schen Fasern, welche die Zähne im Alveolarknochen verankern und eine physiologische Mobilität erlauben (16).

1.2.3. Gingiva

Als Gingiva wird der nicht bewegliche keratinisierte Teil der Mundschleimhaut bezeichnet und bildet somit den periphersten Teil des Parodonts. Die Gingiva bedeckt den Alveolarknochen und ist fest mit dem darunter liegenden Periost verbunden. Als freie Gingiva bildet sie das zervikal umfassende Saumepithel an der Schmelz-Zement-Grenze, wohingegen die befestigte Gingiva von der Zahnfleischfurche bis zur Mukogingivalgrenze reicht (9).

Der vorherrschende Zelltyp der Gingiva sind Gingiva-Fibroblasten. Gingiva-Fibroblasten halten die Mundschleimhaut aufrecht, bedecken den Knochen und schützen ihn so vor äußeren Einflüssen (16).

Fibroblasten

Fibroblasten im Allgemeinen bilden sich genau wie Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten und Myozyten aus mesenchymalen Stammzellen (17). Sie finden sich in jedem Bindegewebe, stehen häufig in netzartigem Zusammenhang und dienen der Bildung von Interzellulärsubstanzen. Sie sind spindelförmig, haben einen ovalen Kern und besitzen mehrere Zellfortsätze. Mit der Bezeichnung Fibroblast bezeichnet man einen noch nicht ausgereiften Fibrozyten (10).

Gingiva-Fibroblasten (GF)

Gingiva-Fibroblasten wurden bei unseren Versuchen als Vertreter der oralen Fibroblasten herangezogen und befinden sich klinisch betrachtet als Zellen auch in einem nahen Lagebezug zur endodontischen Laserbehandlung. Orale Fibroblasten wie z. B. Gingiva Fibroblasten und Fibroblasten des parodontalen Ligaments unterscheiden sich hauptsächlich durch ihre Lokalisation untereinander. Im Vergleich zu Parodontalligament-Fibroblasten weisen Gingiva Fibroblasten jedoch in „in vitro“ Studien auch eine höhere Proliferationsrate auf (18), sie produzieren weniger Proteine und auch deren Zusammensetzung ist unterschiedlich (19). Typische Gemeinsamkeiten oraler Fibroblasten sind die Fähigkeit Gewebe zu regenerieren in Form der Bildung neuen Knochens, Zementes und einer Bindegewebsbefestigung (18).

L929

Bei L929 Zellen handelt es sich um Fibroblasten aus der Maus. Sie sind einer der Standardzelllinien für Zellzytotoxizitätstests und werden für viele Standardtests verwendet. L929 Zellen werden sowohl für Biokompatibilitätstests (20, 21), Zytotoxizitätstests (22, 23) als auch Zellbiologiestudien (24, 25) erfolgreich verwendet.

1.2.4. Wurzelzement

Als vierter Bestandteil des Parodonts bedeckt der Wurzelzement das Dentin unterhalb der Schmelz-Zement-Grenze im Alveolarfach. Er wird gebildet von Zementoblasten, Zementozyten und Fibroblasten (9).

Grundsätzlich unterscheidet man vier Zementtypen:

Typ 1: Der azelluläre, afibrilläre Zement enthält weder kollagen Fibrillen noch Zementozyten. Man findet ihn in Form von auf dem Zahnschmelz auf gelagerten Zementinseln und er bedeckt somit als einziger Zementtyp nicht das Dentin (26).

Typ 2: Der azelluläre Fremdfaserzement ist Bestandteil des zellulären Gemischtfaserzements und findet sich im zervikalen Drittel der Wurzeloberfläche. Sharpey'sche Fasern sind in ihm verankert und führen somit zur Stabilisierung des Zahnes in der Alveole (26).

Typ 3: Der zelluläre Eigenfaserzement ist ebenfalls Bestandteil des zellulären Gemischtfaserzements und kommt im mittleren Drittel der Wurzel im Bereich der Furkationen vor. Er ist reich an Zementozyten und ohne Sharpey'sche Fasern und kann als Zement Frakturspalten oder Resorptionslakunen ausfüllen (26).

Typ 4: Der zelluläre Gemischtfaserzement ist eine Kombination aus azellulärem Fremdfaserzement und zellulärem Eigenfaserzement. Sharpey'sche Fasern sind im azellulären Fremdfaserzement verankert und führen zur Zahnstabilisierung (26).

1.3. Endodontologie

Die Endodontologie ist die Disziplin in der Zahnmedizin, welche sich mit der Funktion und Form des Endodonts und der Ätiologie, Epidemiologie, Pathologie, Prävention, Diagnose und Behandlung von Erkrankungen des Endodonts beschäftigt (27). Der Begriff Endodont bezeichnet die Zahnpulpa und umgebendes Dentin, die entwicklungsgeschichtlich eine anatomisch-funktionelle Einheit bilden. Beide entstammen von ektomesenchymalem Gewebe und entwickelten sich aus der Zahnpapille. Klinisch gesehen stehen neben der Ätiologie vor allem die Diagnose und Behandlung im Vordergrund des zahnärztlichen Interesses.

Die Erfolge der Wurzelkanalbehandlung werden in der Literatur mit 70-98% angegeben (4, 27, 28). Diese wiederum hängen in hohem Maße mit der korrekten und sauberen Durchführung einer Wurzelkanalfüllung zusammen (28, 29). Insbesondere der Zahntyp, der präoperative periapikale Status sowie wie die postendodontische Versorgung spielen eine entscheidende Rolle bezüglich der Langzeitprognose von wurzelbehandelten Zähnen (30, 31). Ein signifikanter Einfluss spezieller Behandlungstechniken oder neuer Materialien konnte bisher nicht nachgewiesen werden (4).

1.3.1. Das Endodont

Wie bereits erwähnt besteht das Endodont aus der Zahnpulpa und dem umgebenden Dentin (27).

Die Zahnpulpa besteht aus gut vaskularisiertem und innerviertem Bindegewebe und ist von allen Seiten durch Dentin begrenzt. Topographisch kann man bei der Pulpa zwischen Kronenpulpa, Wurzelpulpa, Kronenkavum und Wurzelkanälen unterscheiden (27).

Im Pulparaum befinden sich kollagene und präkollagene Fasern und Fibrillen, verschiedene Zellen (Fibroblasten, Odontoblasten, Ersatzzellen, Abwehrzellen), Gefäße und Nerven (27).

Betrachtet man die Pulpa histologisch, bemerkt man ihre uneinheitliche Struktur und findet besonders im Bereich der Kronenpulpa einen schichtartigen Aufbau. Von außen nach innen betrachtet findet sich zuerst eine Dentinschicht mit ursprünglichem Prädentin, die wiederum von einer Odontoblastenschicht gebildet wird. Gefolgt von einer kernarmen Zone (Weil-Zone) mit Fortsätzen von Nerven und Fibroblasten. Dann kommt es zu einer Zone mit vielen Zellkernen und einer starken Verzweigung des zentralen Nervenbündels, welches als Raschkow-Plexus bezeichnet wird. Schlussendlich findet sich ein Bindegewebsstrang, in dem zentral Blutgefäße und Nervenfasern verlaufen (27).

Funktion

Alle diese erwähnten Strukturen haben eine biologische Verwendung. Die Pulpa besitzt hierbei 4 Basisfunktionen, die den Zahn ernähren sollen (nutritive Funktion), die mit dem Zahn kommunizieren sollen (sensorische Funktion), sowie eine abwehrende Funktion (defensive Funktion) und eine strukturbildende Aufgabe (formative Funktion) (27).

Zu den Abwehrfunktionen der Pulpa gehört vor allem die Tertiärdentinbildung, die auf unphysiologische Reize wie Karies oder Abrasion ausgelöst wird. Die Pulpa stellt ein Signal- und Warnorgan vor infektiösen, osmotischen, toxischen und thermischen Reizen dar und kann mit akuten oder chronischen Entzündungen reagieren bzw. über Nervenendigungen Schmerzempfindung weiterleiten (A-beta-, A-delta-, C-Fasern). Die nutritive Funktion wird über das Gefäßsystem und seine Innervation gewährleistet. Über das Foramen apicale, Seitenkanäle, akzessorische Kanäle und Pulpaperiodontalkanäle steht die Pulpa mit dem Parodont in Verbindung.

Dentin in von Sekundärdentin wird auch nach Abschluss der Wurzelbildung gebildet und zählt zu den formativen Funktionen der Pulpa. Somit nimmt das Volumen des Pulparaumes mit zunehmendem Alter immer mehr ab. Dies macht man sich unter anderem auch in der Altersbestimmung von Menschen zu Nutze (32). Altersbedingte Veränderungen können Vorgänge wie die Verkalkungen kleiner Gefäße, Abnahme der Fibroblastendichte und der Gefäßdichte sowie der Zunahme von kollagenen Fasern sein (27).

Anatomische Wurzelkonfiguration

Weiters ist in der Endodontie die Konfigurationen des Wurzelkanalsystems zu beachten.

Mögliche Verläufe von Kanälen wurden von Weine (1989) in vier Kategorien eingeteilt (siehe Abbildung 1.2) (27):

- Kategorie 1: besteht aus einem Kanal
- Kategorie 2: besteht aus zwei Kanälen, die sich vor dem Apex vereinigen
- Kategorie 3: besteht aus zwei Kanälen mit getrennten apikalen Foramina
- Kategorie 4: besteht aus einem Kanal, der sich im mittleren oder apikalen Wurzelabschnitt in zwei Kanäle aufspaltet

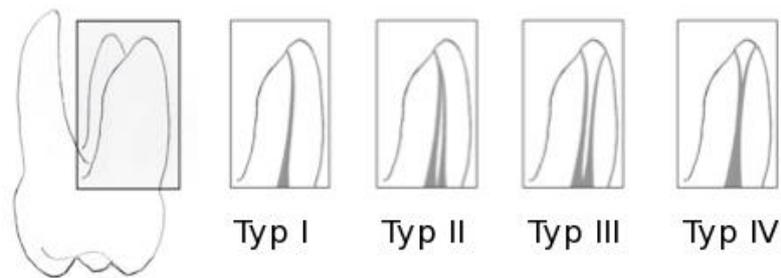


Abbildung 1.2 Weines Klassifikation der Wurzelkanalkonfigurationen

Diese Wurzelkonfigurationen sind jedoch nur idealisiert in dieser Form auffindbar. Oft sind sie extrem variabel in Bezug auf Anzahl, Querschnitt und Verlauf der Kanäle. Die größte Vielfalt findet sich im apikalen Delta wieder. Somit kann nicht von einem geradlinigen, in seinem Verlauf geschlossenen Wurzelkanal ausgegangen werden. Weiters kommt im Laufe der Zeit eine Verengung des Kanalsystems durch Sekundärdentinbildung hinzu. Im weiter koronalen Anteil des Wurzelkanals können auch so genannte Markkanäle angetroffen werden oder auch blind endende Kanalabzweigungen, so genannte Divertikel. All diese anatomischen Faktoren können die mechanische Aufbereitung bei einer notwendigen Wurzelkanalbehandlung in erheblichem Maße behindern. Denn der tatsächliche Erfolg eines endodontisch behandelten Zahnes liegt im tatsächlichen Ausmaß der bakteriellen Besiedelung (3, 33).

Weiters ist die Mikroanatomie bei der Ausbreitung der Entzündung und der Keimbesiedelung des Endodonts von entscheidender Bedeutung.

Das gesamte Dentin wird von einem System feinsten Dentintubuli durchzogen, die ein Netzwerk bilden, welches in Pulpanähe 45% der Kanaloberfläche umfasst. An der Pulpagrenze zum Dentin befinden sich bis zu 65000 Dentintubuli pro mm^2 , deren Anzahl jedoch bis zum Übergang vom Dentin zum Schmelz auf 15000/ mm^2 abnimmt (10). Die Durchmesser sind ebenfalls in Pulpanähe mit um die $3\mu\text{m}$ am größten und nehmen mit zunehmender Entfernung von der Kanaloberfläche ab. Bei einer Infektion werden nun die Dentintubuli von Bakterien penetriert und bieten somit ein ideales Keimreservoir mit hervorragenden Voraussetzungen für das Bakterienwachstum. Das gesamte Dentin wird zum Brutschrank, in welchem sich Bakterien der körpereigenen Abwehr entziehen können (34).

1.3.2. Pulpaerkrankungen

Die gesunde Pulpa reagiert auf genügend starke Irritationen mit einer lokalen Entzündung (Pulpitis). Bei anhaltendem Reiz können sich verschiedene Formen der Pulpitis ausbilden, die bei chronischem Verlauf auch lebensgefährlich sein können, indem sie das Myokardinfarktrisiko erhöhen (35). Grundsätzlich verläuft eine Pulpitis nach den gleichen Gesetzmäßigkeiten wie Entzündungen in anderen Bindegeweben des Körpers ab und weist die fünf Merkmale einer Entzündung mit Dolor, Rubor, Calor, Tumor und Functio laesa auf (9). Zu Beginn kommt es zu einer Hyperämie mit Gefäßdilatation welche normalerweise auch zu einer Rötung des Gewebes führt (Rubor). Die Entzündung ist auf den Bereich des einwirkenden Reizes beschränkt. Hält der Reiz an kommt es durch erhöhte Permeabilität der postkapillären Venolen zur Plasmaextravasation und somit zur Schwellung des Gewebes (Tumor). Aufgrund der starren Pulpanatomie ist eine räumliche Ausdehnung des Pulpagewebes nicht möglich und die Folge der Vasodilatation und der Plasmaextravasation ist ein erhöhter Gewebedruck, der wiederum zu Schmerzen führt (Dolor) (27).

Lokal kann eine solche Entzündung für lange Zeit, manchmal über Jahre anhalten. Nach ausreichend langer Einwirkzeit und Intensität eines Reizes kann sich die Entzündung auf die ganze Pulpa ausbreiten, von der Peripherie zur zentralen Pulpa und Wurzelpulpa hin. Eine schrittweise eintretende Nekrose des pulpalen Gewebes kann daraus resultieren (27).

Eingeteilt werden können die jeweiligen Stadien der Pulpitis in (10):

- *Hyperämie*
- *Pulpitis acuta serosa partialis und totalis*
- *Pulpitis acuta purulenta*
- *Pulpitis ulcerosa*
- *Pulpagangrän*
- *Chronische Pulpitiden*

Die *Hyperämie* ist grundsätzlich bei Entfernung des Reizes reversibel.

Die klinischen Symptome sind:

- Schmerzen auf kalt, warm, süß, sauer
- Sekundenschmerz

Der Zahn ist nicht perkussionsempfindlich und der Schmerz ist nicht reizüberdauernd.

Heilt die Entzündung nicht aus entwickelt sich eine *Pulpitis acuta serosa*. Dieses Stadium ist bereits irreversibel (27). Durch erweiterte Blutgefäße kommt es im starren Pulpencavum zur Kompression und Stauung der abführenden Gefäße im Bereich des Foramen apikale. Eine schmerzhafte Druckerhöhung ist die Folge.

Unterschieden wird die *Pulpitis acuta serosa partialis* und die *Pulpitis acuta serosa totalis*. Deren Unterschied besteht lediglich in der bereits fortgeschrittenen Ausbreitung der Entzündung (27).

Die *Pulpitis acuta serosa partialis* ist wie der Name schon sagt auf einen Teil der Pulpa beschränkt nämlich der Kronenpulpa. Sie ist charakterisiert durch die klinischen Symptome:

- Schmerzcharakteristik: lokalisierter Spontanschmerz
 Schmerz ist reizüberdauernd
- Reizsetzung: stärkere Schmerzen auf kalt als auf warm
- Perkussion: nicht perkussionsempfindlich

Hingegen hat sich die *Pulpitis acuta serosa totalis* bereits auf die gesamte Pulpa ausgebreitet. Die klinischen Symptome dieses Stadiums sind:

- Schmerzcharakteristik: Dauerschmerz
- Reizsetzung: Ausstrahlender Spontanschmerz (geringer Reiz)
 Die Ausstrahlung der Schmerzen findet im Unterkiefer ins Ohr statt und im Oberkiefer ins Auge und der Schläfe.
- Perkussion: perkussionsempfindlich

Das nächste Stadium läuft unter massiver Beteiligung von Leukozyteninfiltraten ab (36). Als Folge von Phagozytose und dem Zerfall von polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten, werden lysosomale Enzyme freigesetzt und es kommt zur Einschmelzung nekrotischen Materials (Eiter) (36). Man kann wieder eine *Pulpitis acuta purulenta partialis* von einer *Pulpitis acuta purulenta totalis* unterscheiden.

Die klinischen Symptome sind:

- Schmerzcharakteristik: Ausstrahlender Schmerz
 Diffuser Schmerz (kaum lokalisierbar)
- Reizsetzung: Schmerzen auf Wärme (Kälte lindert eher)
- Perkussion: Klopfschmerz

Dieses Stadium kann sich bis zu einem lebensbedrohlichen Abszess oder Phlegmone entwickeln.

Die *Pulpitis chronica ulcerosa aperta* kommt eher selten vor. Sie entwickelt sich durch spontane oder traumatische Öffnung der Pulpakammer. Dies vermindert den Druck (27).

Ein *Pulpagangrän* entwickelt sich bei einer weiteren Infektion des nekrotischen Gewebes mit anaeroben Bakterien (37). Die klinischen Symptome sind:

- Schmerzcharakteristik: Berührungsempfindlich
Fötiger Geruch
- Reizsetzung: Schmerzen auf warm und kalt nehmen ab (Nekrose)
- Perkussion: Deutlicher Perkussionsschmerz

Chronische Pulpitiden verlaufen klinisch häufig symptomlos. Histologisch kann man jedoch ein Zellinfiltrat mit geringer Hyperämie erkennen (10).

1.3.3. Grundlagen zum Apex

Bei Durchführung einer endodontischen Behandlung sind die Kenntnisse der anatomischen Grundlagen eine unabdingbare Voraussetzung für eine erfolgreiche Behandlung. Eine wichtige Grundlage sind die natürlichen Zugänge zur Pulpahöhle. Die engste Stelle des Wurzelkanals wird als physiologischer Apex (endodontischer Apex) bezeichnet. Der Abstand bis zur tatsächlichen anatomischen Wurzelspitze (anatomischer Apex) beträgt durchschnittlich 0,6 mm. In diesem Zusammenhang ist auch der röntgenologische Apex wichtig, der sich im Schnitt 1 mm unter dem physiologischen Apex befindet (38).

Diese verschiedenen Apexformen sind vor allem bei der Längenbestimmung bei der Wurzelkanalbehandlung von entscheidender Bedeutung (39).

1.3.4. Endodontische Therapie

Eine Wurzelkanalbehandlung umfasst eine Vielzahl an Arbeitsschritten wie, röntgenologischer Befund, fallweise Lokalanästhesie, Anlegen eines Kofferdams, Kariesentfernung, Zugangskavitätenpräparation, Kanallokalisierung, Sondierung des Kanals, röntgenologische Längenbestimmung, Aufbereitung des Wurzelkanals, Spülung, Trocknung, medikamentöse Einlage, fallweise provisorischer Verschluss, Wurzelkanalfüllung, Kontrollröntgenaufnahme, provisorische oder definitive Füllung (27).

Die röntgenologischen Befunde bilden die Grundlage einer Wurzelbehandlung. Sie helfen entscheidend dabei Indikationen einer Behandlung bzw. deren Kontraindikationen abzuwägen. Kontraindikationen wären nicht funktionell wiederherzustellende Zähne, Zähne mit ungenügendem parodontalen Halt und unkooperative Patienten (27).

Das Anlegen eines Kofferdams bietet dem Behandler einige Vorteile: Schutz des Patienten vor Verschlucken oder Aspiration der Wurzelkanalinstrumente, Schutz des Weichgewebes, möglichst aseptische Arbeitsweise, ungestörtes Arbeiten und Schutz vor infektiösen Erkrankungen für den Behandler (40).

Im nächsten Schritt werden kariöse Läsionen entfernt und eine ausreichende Zugangskavität präpariert. Dabei sollte darauf geachtet werden das gesamte Pulpdach abzutragen und somit eine vollständige Übersicht auf den Pulpaboden zu schaffen. Weiters sollte ein spannungsfreies Einführen der Wurzelkanalinstrumente möglich sein.

Die Lokalisation der Kanaleingänge sollte immer unter sauberen und trockenen Umständen in der Pulpakammer erfolgen. Sollten die Kanaleingänge nicht auffindbar sein empfiehlt sich eine Einfärbung des Pulpakammerbodens oder eine Austastung mittels geeigneter Endosonde. In manchen Fällen muss auch noch Dentin mit Hilfe eines Rosenbohrers oder eines Müller-Bohrers abgetragen werden. Auch der Einsatz eines Operationsmikroskops ist äußerst empfehlenswert (39).

Sind die Kanaleingänge aufgefunden verschafft man sich erste Informationen über Weite und Krümmung des Kanalsystems mittels Sondierung. Diese erfolgt der Anatomie des Zahnes betreffend entweder mit einem Instrument der Größe ISO 15 bei weitlumigen Kanälen oder ISO-Größe 08 bzw.10 bei englumigen Kanälen. Wichtig ist bei diesem Arbeitsschritt auch die richtige Längeneinstellung des Instrumentes bis zum physiologischen Apex des Zahnes (39).

Die anschließende Längenbestimmung und Festlegung der Arbeitslänge wird röntgenologisch oder endometrisch durchgeführt (38). Je nach Erfahrung des Behandlers beträgt der Sicherheitsabstand des endodontischen zum röntgenologischen Apex 1 bis 3 mm.

Einen absolut entscheidenden Arbeitsschritt stellt nun die Aufbereitung des komplexen, dreidimensionalen Wurzelkanalsystems dar. Die Herausforderungen hierbei bestehen wie bereits in den vorigen Kapiteln beschrieben in der komplexen Wurzelkonfiguration, der bakteriellen Besiedlung bis ins Dentin und einem möglicherweise insuffizienten Instrumentarium (41).

Die Behandlung des Wurzelkanals erfolgt in der konventionellen Endodontie chemomechanisch (42). Dies beschreibt eine Kombination aus mechanischer und chemischer Aufbereitung. Die mechanische Aufbereitung erfolgt mittels Handinstrumenten oder

maschinellen Instrumenten. Maschinelle Instrumente erleichtern und beschleunigen die Aufbereitung des Kanals, jedoch unter Verminderung des Tastgefühls (38, 42).

Zu den Handinstrumenten gehören Extirpationsnadeln, Reamer, K-Feilen und Hedström-Feilen. K-Feilen haben gegenüber Stahl-Instrumenten den Vorteil, dass sie sich gekrümmten Kanälen anpassen. Stahl-Instrumente hingegen müssen vorgebogen werden um nicht bereits zu Beginn eine Stufe in der Kanalaufbereitung zu verursachen.

Die chemische Aufbereitung erfolgt immer mit unterstützenden Spülungen nach jedem Aufbereitungsschritt. Diese Spüllösungen sollten eine geringe Toxizität, eine bakterizide Wirkung, eine auflösende Wirkung auf den Smearlayer (organisches und anorganisches Material), eine niedrige Oberflächenspannung und einen Schmiereffekt aufweisen (43, 44). Keine der momentan eingesetzten Spüllösungen ist jedoch in der Lage all die oben genannten Effekte zu erfüllen (43).

Am besten erfüllt diese Anforderungen Natrium-Hypochlorid (NaOCl) (5). Bei der üblicherweise angewendeten Konzentration von NaOCl von 0,5-5% kommt es zu einem antibakteriellen und gewebsauflösenden Effekt. Bei Konzentrationen über 5 % werden jedoch bereits Strukturveränderungen beim Dentin beobachtet (45). Die Schmierschicht kann nicht entfernt werden. Zu deren Entfernung werden Chelatverbindungen wie EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) oder Zitronensäure effektiv eingesetzt (46). Ebenfalls ergänzend wird 2%ige Chlorhexidinguconatlösung (CHX) empfohlen. Sie weist eine gute antimikrobielle Wirkung auf. Sie kann jedoch Gewebe nur unzureichend auflösen (5). Als neu eingeführtes Spülmittel wäre noch MTAD (Mixture Tetracycline Citric Acid and Detergent) zu erwähnen, welches sehr viel versprechend aufgrund seiner sowohl antibakteriellen als auch Smearlayer entfernenden Eigenschaften ist (47, 48).

Die Effektivität der Spüllösungen hängt vor allem von der Eindringtiefe, der Menge der wirkenden Spüllösung (Lumen des Kanals) sowie der angemessenen Einwirkzeit ab.

Ist ein Wurzelkanal aufbereitet müssen einige Kriterien erfüllt sein, um ihn endgültig abfüllen zu können. Der Zahn muss symptomlos sowie perkussionsunempfindlich sein und es dürfen weder Schmerzen, noch eine Schwellung vorhanden sein. Der Zahn muss im Kanalsystem vollständig getrocknet sein und er muss eine Geruchslosigkeit aufweisen (27). Erst wenn diese Kriterien erfüllt sind kann man mit dem Verschluss des Wurzelkanals beginnen. Dabei ist das Ziel das Kanalsystem vollständig zu verschließen und somit das erneute Eindringen von Mikroorganismen zu verhindern. Es müssen sowohl der apikale als auch der koronale

Bereich gefüllt werden, jedoch ohne über den physiologischen Apex hinaus zu füllen um keine Fremdkörperreaktion mit periapikaler Entzündung zu verursachen (38).

Bei den Wurzelkanalfüllmaterialien unterscheidet man zwischen erhärtenden Pasten bzw. Zementen (Wurzelzemente oder Sealer), plastischen bzw. semiplastischen Materialien und festen Materialien (49). Dabei sollten diese Materialien sowohl biologischen (Biokompatibilität, Bakteriostatik, fehlende Resorbierbarkeit), physikalischen (Dimensionsstabilität, Porenfreiheit, Unlöslichkeit, Haftung) und auch praktischen (Verarbeitungszeit, Entfernungsmöglichkeit, Applikationart, Radiopazität, fehlendes Zahnverfärbungspotential) Anforderungen entsprechen (49). Das Hauptmaterial einer Wurzelkanalfüllung ist der Stift, der in Verbindung mit einem Sealer in den Kanal eingebracht wird. Hierbei hat der Sealer die Aufgaben Ungleichheiten auszugleichen, die Dentintubuli zu verschließen und eine dichte Verbindung zwischen Stift und Kanalwand herzustellen. Die Präparate können dabei in Sealer auf Zinkoxid-Eugenol-Basis, auf Kunstharz-Basis, auf Kalziumhydroxid-Basis und auf Glasionomercement-Basis eingeteilt werden. Sealer auf Zinkoxid-Eugenol-Basis stechen beim Vergleich der vier Typen vor allem durch ihre antibakterielle Wirkung hervor (50, 51).

Das erprobteste Material für Stifte ist Guttapercha. Bei Temperaturen von ca. 60 C° ist es plastisch verformbar und ist desweiteren biokompatibel und inert. Guttaperchapoints sind die am meist verwendeten Stifte und bestehen zu 20% aus Guttapercha als Matrix und zusätzlich aus Zinkoxid, Wachsen bzw. Kunststoff und Metallsulfaten (Opazität) (52).

Zur Abfüllung des jeweiligen Wurzelkanals gibt es verschiedene Techniken. Zu den manuellen Techniken gehören die laterale und vertikale Kondensation und die Zentralstifttechnik. Wobei die am häufigsten angewendete Methode die laterale Kondensationstechnik ist. Der Stift wird entsprechend der Masterfeile (größte verwendete Feile) ausgewählt und sollte 0,5 mm über dem physiologischen Apex enden. Der zuletzt passende Masterpoint wird mit Sealer beschickt und unter pumpenden Bewegungen eingeführt. Danach wird der Masterpoint mittels eines Spreaders (Spreizgerät) gegen die Kanalwand gepresst und nach dessen Entfernung sofort mit einem weiteren Guttaperchastift gefüllt. Dieses Vorgehen wird so lange wiederholt bis kein weiterer Guttaperchapoint mehr in den Kanal eingebracht werden kann.

Bei der vertikalen Kondensationstechnik wird der erhitzte Masterpoint mit Pluggern (Stopfer) nach apikal kondensiert.

Bei der Zentralstifttechnik wird ein bereits konfektionierter Stift mit Sealer beschichtet und in den aufbereiteten Kanal eingebracht.

Als maschinelle Techniken sind die thermoplastische Kondensation und die thermoplastische Injektion zu nennen, bei denen das Füllmaterial thermoplastisch eingebracht wird (53).

Am Ende jeder Wurzelkanalbehandlung steht eine röntgenologische Untersuchung zur Füllungskontrolle.

1.4. Laser

Laser ist ein Kurzwort, welches aus den Anfangsbuchstaben mehrerer Wörter zusammen gesetzt ist. Es stammt aus dem englischen „*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*“, was übersetzt so viel wie Lichtverstärkung durch stimulierte Emission von Strahlung bedeutet. Somit beschreibt dieses Kurzwort den Effekt mit dem künstlich gerichtete Lichtstrahlen erzeugt werden können (34).

Aufgrund dieses Entstehungsprozesses der stimulierten Emission haben Laserstrahlen ganz spezielle Eigenschaften, die sie von klassischen Lichtquellen unterscheiden. Diese nutzt man für zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten in allen Bereichen des Lebens– auch in der Zahnmedizin.

All dies haben wir Herrn Maiman zu verdanken, der im Jahre 1960 den ersten Rubinlaser konstruierte. Ein Jahr später wurde der Laser bereits für medizinische Zwecke verwendet und vier Jahre später wurden bereits die ersten Einsätze in der Zahnmedizin erprobt (34). Anfang der 90er Jahr wurde der Laser für „soft tissue“ im oralen Bereich zugelassen und 1996 wurde dessen Anwendung auch für „hard tissue“ von der amerikanischen Food and Drug Administration genehmigt (54). Seither versucht man durch ständige Entwicklung neuer Lasersysteme immer mehr Anwendungsmöglichkeiten zu etablieren.

Um ein Verständnis für die in den Hauptversuchen verwendeten Laser zu bekommen, werden in den folgenden Kapiteln die Grundlagen im Bereich der Laseranwendung erläutert.

1.4.1. Stimulierte Emission

Es gibt drei Wechselwirkungen von Licht und Materie – *Absorption, spontane Emission & induzierte Emission* (34). Alle drei sind unverzichtbar für die Funktion des Lasers.

Bei der *Absorption* von Strahlung kann ein Atom durch Absorption eines ausreichenden Energiequants aus dem Ruhezustand in einen angeregten, energiereicheren Zustand übergehen.

In diesem energiereicheren Zustand ist das Atom instabil und tendiert dazu, die absorbierte Energie wieder abzugeben und so in den Ausgangszustand zu gelangen.

Erfolgt dies spontan und ohne Kausalität dann wird die abgegebene Strahlung als *spontane Emission* bezeichnet

Wird jedoch dieser Wechsel in den Zustand niedriger Energie durch ein Photon herbeigeführt, dessen Energie genau der Energiedifferenz zwischen dem aktuellen Zustand und einem Energieniveau mit geringerer Energie entspricht, dann nennt man diesen Vorgang *induzierte Emission*. Das neu erzeugte Photon hat nun die gleiche Energie und Wellenlänge wie das eingefallene Photon (siehe Abbildung 1.3) (34).

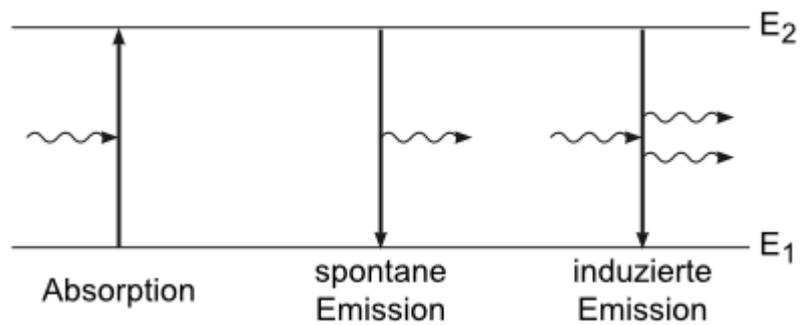


Abbildung 1.3 Wechselwirkung von Licht und Materie

Diese stimulierte Emission von Strahlung hat nun drei ganz spezielle Eigenschaften, durch die sie sich von anderen Lichtquellen und Strahlungen unterscheidet:

- 1) sie verlaufen parallel in einem schmalen Bündel (Kollimation)
- 2) sie sind zueinander in Phase (Kohärenz)
- 3) sie besitzen alle die gleiche Wellenlänge (Monochromie - Einfarbigkeit)

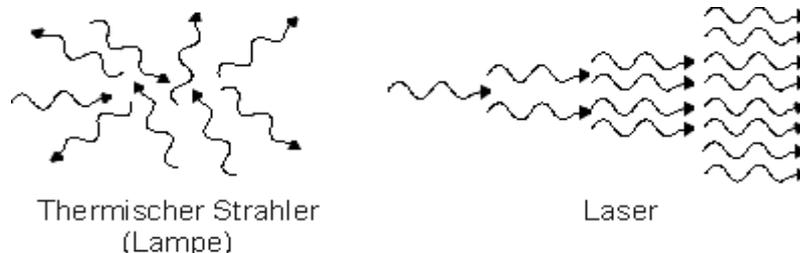


Abbildung 1.4 Eigenschaften klassischer Lichtquellen vs. Laserstrahlung

Mit diesen Eigenschaften gelingt es Licht in hohem Grade zu kontrollieren und nach Beliebigkeit des Einsatzgebietes zu manipulieren um Laserstrahlung in allen denkbaren Bereichen anzuwenden (55).

1.4.2. Grundlegender Aufbau und Funktion

Ein Laser besteht im einfachsten Fall immer aus drei Bestandteilen (55, 56):

- 1) einem *aktiven Medium*:

In diesem Medium finden die induzierten Emissionen statt mit Hilfe derer die Lichtstrahlen in einem gewissen Frequenzbereich verstärkt werden. Diese Medien können nun fest (z.B. Rubinkristall, Halbleitermaterial), gasförmig (z.B. CO₂) oder

flüssig (z.B. Farbstofflösungen) sein. Die Wahl des Mediums bestimmt die Laserenergie einer bestimmten Wellenlänge.

2) einer *Pumpquelle*:

Die Pumpe ist dafür zuständig die Atome des aktiven Mediums aus ihrem thermodynamischen Gleichgewicht in angeregte Zustände zu bringen. Die Energie die dabei eingesetzt wird, kann sowohl optisch, thermisch, chemisch oder elektrisch zugeführt werden.

3) einem *Resonator*:

Der Resonator sorgt für eine Rückkopplung und eine Selektion des erzeugten Lichtes, indem er eine bestimmte Wellenlänge des Lichtes zwischen zwei Spiegeln durch das aktive Medium immer wieder rückkoppelt. Da es bei jedem Strahlendurchgang durch das aktive Medium zur Verdoppelung der Photonen aufgrund der induzierten Emission kommt, löst der Resonator einen exponentiellen Anstieg der Photonen aus. Ein Spiegel ist teildurchlässig ausgeführt, so dass ein Teil des Lichts austreten und genutzt werden kann.

Oft enthalten Lasersysteme ergänzend noch Komponenten wie Kühlsysteme, Displays und Leitungssysteme zur Umleitung des Lichtes für den benötigten Einsatz (z.B. Mundhöhle) (56).

1.4.3. Betriebsarten eines Lasers

Die Abgabe der Laserenergie kann nun in unterschiedlichen Formen geschehen. Grundsätzlich gibt es drei verschiedene Arten der Energieabgabe (34):

1) Cw-Betrieb (continuous wave)

Hierbei gibt der Laser seine Energie kontinuierlich und gleichmäßig ab. Vorteil dieser Methode ist die durchgehende, gut kontrollierbare Gewebsbestrahlung während der Behandlung. Die auftretende thermische Belastung für das Gewebe aufgrund unzureichender Wärmeableitung ist als Nachteil zu nennen (siehe Abbildung 1.5).

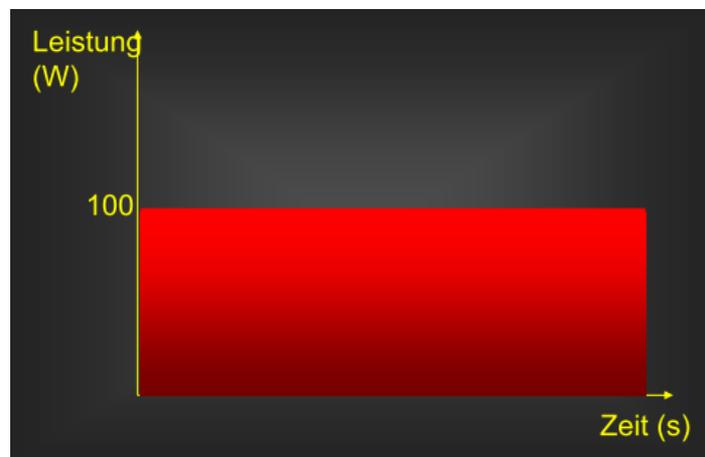


Abbildung 1.5 kontinuierlicher Laserbetrieb

2) Getakteter Betrieb (chopped)

Bei dieser Form der Energieabgabe wird der Laserstrahl in regelmäßigen Abständen unterbrochen um die thermische Belastung des Gewebes zu reduzieren (siehe Abbildung 1.6).

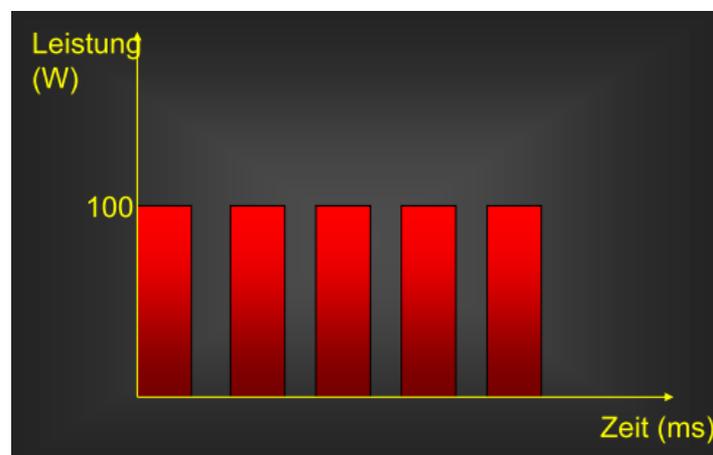


Abbildung 1.6 getakteter Laserbetrieb

3) Pulsbetrieb (pulsed)

Bei der gepulsten Energieabgabe werden kurze Pulsdauern (90 – 300 μ s) und hohe Energiedosen (1000 – 20000 Watt) verwendet. Der Vorteil dieser Form ist die geringe durchschnittliche Energieabgabe um trotzdem eine hohe Absorption bei geringer thermischer Belastung zu erreichen (siehe Abbildung 1.7) (55).

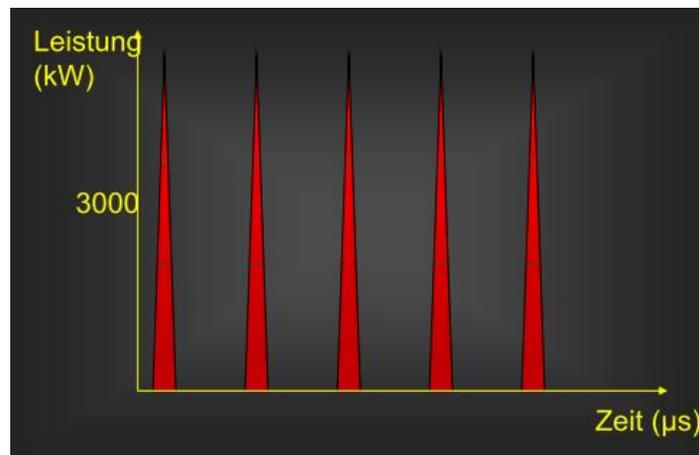


Abbildung 1.7 gepulster Laserbetrieb

1.4.4. Lichtleitung

Um das im Laser erzeugte Licht auch wirklich zufrieden stellend einsetzen zu können bedarf es einer gezielten Umleitung des Laserstrahls. Dies erfolgt durch Strahlenführungssysteme und Applikatoren. Es werden drei Strahlenführungssysteme verwendet:

Der *Spiegelgelenkarm* besitzt eine gute Strahlenqualität. Er ist jedoch sehr eingeschränkt und unflexibel. Er kann für alle Wellenlängen genutzt werden.

Der *Hohlleiter* ist im Gegenzug relativ flexibel. Er kann aber nur im Wellenlängenbereich von 3000 bis 12000 nm eingesetzt werden.

Der *Lichtwellenleiter* ist ebenfalls relativ flexibel. Er wiederum hat seinen Einsatzbereich im Bereich von 200 bis 3000 nm.

Um das tatsächliche Einsatzfeld in der Mundhöhle gut erreichen zu können müssen die Strahlen nochmals um 30 bis 120 Grad umgelenkt werden. Hierfür werden sowohl Faserapplikatoren als auch Fokussierhandstücke verwendet. Bei *Faserapplikatoren* erfolgt die Lichtleitung auf Faserbasis und sie können unter bzw. ohne Kontakt zum jeweiligen Einsatzbereich angewendet werden. Bei Fokussierhandstücken verhält es sich ähnlich mit dem Unterschied, dass der Strahl gebündelt wird und es somit zu hohen Energiedichten kommt, die unter Non-Kontakt angewendet werden.

1.4.5. Wirkung

Wann immer Licht an eine Grenzfläche gelangt, an der sich der Brechungsindex des Mediums ändert, kann Licht entweder gestreut, reflektiert oder absorbiert werden bzw. transmittieren (56). In den meisten Fällen kommt nie einer diese Effekte alleine vor sondern eine Kombination mit unterschiedlich intensiver Ausprägung.

Die Wirkung des Lasers auf Gewebe beruht hauptsächlich auf der Absorption. Hierbei gibt das Laserlicht Energie an das jeweilige Gewebe ab, wobei das Ausmaß von unterschiedlichen Faktoren abhängig ist.

Zum einen von der spezifischen Wellenlänge des Lasers und den optischen Eigenschaften des Gewebes auf welches es trifft. Dabei sind vor allem der Wassergehalt und die organischen bzw. anorganischen Anteile des Gewebes ausschlaggebend, da in ihnen die Strahlung absorbiert wird. Das Absorptionsmaximum von Zahnschmelz liegt bei einer Wellenlänge von $3\mu\text{m}$ (Wasseranteile) und $9,6\mu\text{m}$ (Hydroxylapatitanteile). Zum Anderen spielen für das Ausmaß der Absorption die Intensität der Strahlung (Betriebsart und Pulsrate) und deren Expositionszeit eine entscheidende Rolle (34).

Bei Absorption der Laserstrahlung vom behandelten Gewebe kann man vier Reaktionsarten erwarten (56):

Photochemische Wirkung:

Lichtabsorbierende Substanzen in der Zelle lösen eine biochemische Reaktion aus.

Photothermische Wirkung:

Der absorbierte Laserstrahl wird in Wärmeenergie umgewandelt woraufhin ein Gewebsabtrag erfolgt (Photoablation).

Photomechanischer Wirkung:

Die Erzeugung mechanischer Schockwellen führt zu explosionsartigen laserinduzierten Verdampfungen (Photodisruption).

Photokoagulation:

Hierbei kommt es zur Eiweißgerinnung durch Lasererhitzung

In der präparierenden Zahnheilkunde spielt vor allem der photothermische Effekt eine Rolle. Die Energie aus dem Laserstrahl wird durch Absorption in das bestrahlte Gewebe eingekoppelt und verursacht eine Temperaturerhöhung, die wiederum den bei der Zahnhartgewebsbearbeitung gewünschten Materialabtrag bewirkt (Ablation) (34). In der

Endodontie macht man sich den Laser mit bakteriziden Einstellungen zu Nutze ohne jedoch die Zahnschicht zu beschädigen oder abzutragen (57, 58).

1.4.6. Einteilung der Laser

Eine grobe Einteilung der Lasersysteme im zahnmedizinischen Bereich erfolgt über deren Wirkung am Gewebe in Softlaser und Hardlaser.

Softlaser zeichnen sich vor allem durch ihre Leistungen im Milliwatt-Bereich aus. Im Vordergrund stehen dabei deren abwehraktivierenden Mechanismen und die Beschleunigung der Wundheilung.

Hardlaser hingegen arbeiten im energiereicheren Watt-Bereich mit sofortiger sichtbarer Wechselwirkung mit dem Gewebe. Die in der Endodontie eingesetzten Laser sind aus dem Hardlasersektor.

Eine weitere Einteilung der Laser kann nach ihrem aktiven Medium getroffen werden:

- Festkörperlaser
- Gaslaser
- Flüssigkeitslaser
- Halbleiterlaser

Lasertyp	Wellenlänge [nm]
Argon-Laser	488-515
Diodenlaser	805
Nd:YAG-Laser	1064
Ho:YAG-Laser	2010
Er:YAG-Laser	2940
Er:YSSGG-Laser	2790
CO2-Laser	10600

Tabelle 1.1 zahnmedizinische Laser und deren charakteristischen Wellenlängen

Die für diese Studie verwendeten Laser sind der Er:YAG-Laser und der Diodenlaser. Im folgenden Teil werden diese beiden Laser genauer betrachtet.

Er:YAG-Laser

Der Erbium:Yttrium–Aluminium-Granat-Laser ist ein Festkörperlaser dessen aktives Medium Erbium ein Element aus der Gruppe der Seltenen Erden ist. Das Spektrum des Er:YAG-Lasers liegt im Infrarotbereich. Er emittiert bei einer Wellenlänge von 2940nm und ist damit ideal geeignet zur Abtragung von Gewebe, da das Wasser im Gewebe sein

Absorptionsmaximum bei 2900nm hat (59). Er entfaltet seine Gewebewirkung thermomechanisch. Der Ablationsprozess beruht darauf, dass der Anteil des im Gewebe enthaltenen Wassers bei Absorption der Laserstrahlung einen sprunghaften Übergang von seinem flüssigen in den dampfförmigen Aggregatzustand erfährt. Durch diesen schnellen Übergang entsteht ein Druck um Gewebe abzutragen (59).

Der Er:YAG-Laser findet bereits breite Anwendung in den Bereichen der Kariestherapie, Dentinkonditionierung, Schmelzkonditionierung, Fissurenversiegelung, Wurzelspitzenresektionen, Osteotomien sowie zur Knochenglättung. Im Bereich der Endodontie und Parodontologie steht sein Einsatz noch sehr am Entwicklungsbeginn. Weiters liegen Studien über die Wirkung von Er:YAG-Laser bei Zellen vor (60).

Diodenlaser

Der Diodenlaser zählt zu den Halbleiterlasern. Halbleiterlaser stellen eine Weiterentwicklung der als Anzeigenelemente verwendeten Leuchtdioden dar. Der Grundzustand in einem Diodenlaser ist das Valenzband, welches das Leitungsband anregt. In einer Leuchtdiode werden Elektronen durch elektrischen Strom in das Leitungsband befördert. Dann kehren sie in das Valenzband zurück und senden dabei Licht aus. Die meisten Halbleiter- oder Diodenlaser verwenden Galliumarsenid als aktives Medium. Die Wellenlänge kann je nach Einsatz von Mischkristallen verändert werden.

Eingesetzt wird der Diodenlaser in fast allen Bereichen der Zahnmedizin aber für Hartgewebsbearbeitungen ist er aufgrund seiner geringen Absorption nicht geeignet. Für unsere Versuche wurde der Diodenlaser aufgrund der langjährigen Einsatzerfahrung im Bereich der Endodontie ausgewählt (58, 61, 62).

1.4.7. Laseranwendung in der Zahnheilkunde

Die Einsatzgebiete von Lasern in der Zahnmedizin sind mittlerweile recht breit gestreut. Seit seiner Erfindung im Jahre 1960 haben sich die Möglichkeiten und auch die Arten der Laser vervielfacht. Heutzutage werden sie unter anderem zur Kariesprävention, Parodontaltherapie, Kavitätenpräparation, Endodontie, Chirurgie und vieles mehr eingesetzt.

In diesem Abschnitt soll ein kleiner Einblick verschafft werden wofür Lasersysteme heute überall eingesetzt werden und welche Effekte dafür genutzt werden.

Bleaching – Zahnaufhellung mit Laser

Der menschliche Wunsch nach Schönheit und den damit verbundenen evolutionsbiologischen Vorteilen ist so alt wie die Menschheit. Geändert hat sich über die Jahrtausende hingegen nur was als schön empfunden wird. Weiße Zähne gehören dabei heute sicher zu diesem momentan existierenden Schönheitsbild. Um in der Zahnmedizin diesem Wunsch nachzukommen gibt es das Bleaching welches eine einfache, effiziente und relativ kostengünstige Methode für die Behandlung von Zahnverfärbungen darstellt.

Bleaching ist ein chemischer Prozess mit aufhellenden Materialien, die meist in irgendeiner Form Wasserstoffperoxid enthalten. Bei diesem Vorgang werden organische Stoffe langsam in chemische Zwischenprodukte umgewandelt, deren Farbe heller ist als diejenige des ursprünglichen Stoffes. Die ablaufende chemische Reaktion nennt man Redox-Reaktion. Dabei gibt Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel Elektronen (freie Radikale) an den zu bleichenden Stoff ab und dies führt zu einer Aufhellung. Expositionszeit, Konzentration des Wasserstoffperoxids, das Debridement der zu behandelnden Fläche, eine abgeschlossene Umgebung, der PH-Wert, die Geschwindigkeit der chemischen Reaktion und die für ihre Förderung eingesetzten Energiequellen sind entscheidende Faktoren welche die Bleaching-Reaktion beeinflussen (34).

Um die Freisetzung von freien Radikalen aus dem Bleichmittel zu fördern können unterschiedliche Energiequellen eingesetzt werden. Halogenleuchten, Plasmalichtbogengeräte und LEDs führen jedoch zu keinem Verstärkungseffekt beim Bleaching. Laserlicht hingegen scheint sich günstig auf die Stärke der chemischen Bleichreaktion auszuwirken und fördert die Abgabe von freien Radikalen – daher auch der Einsatz von KTP-, Argon- und Dioden-Laser bei Bleaching-Behandlungen. Der Einsatz von Lasern kann jedoch auch zu erhöhter Sensibilität der behandelten Zähne führen und sollte daher nur indikationsgemäß eingesetzt werden (63).

Dentinhypersensibilität

Bei Freilegung der Dentinoberfläche eines Zahnes kann es zu Hypersensibilität kommen. Grund hierfür sind Dentintubuli die das Dentin durchziehen und eine Art Verbindung zwischen Pulpenkavum und Mundhöhle darstellen. In ihnen befinden sich Odontoblastenfortsätze, Tomes'sche Fasern und Dentinliquor um eine Reizübertragung zur Pulpa zu gewährleisten. Kommt es nun zur Freilegung von Dentin entweder durch Verlust von Zahnschmelz oder durch Entfernung von Zahnwurzelzement, können verschieden Reize

zu unangenehmen Empfindungen führen. Ob eine Behandlung notwendig ist hängt wiederum oft von der Stärke und der Schmerzempfindung des Patienten ab.

Zu den momentan meist verbreiteten Wirkstoffen zur Behandlung der Hypersensibilität zählen Strontium, Natrium Monofluorphosphat, Natriumfluorid, Kalziumhydroxid, Kaliumnitrat, Formaldehyd, Zinnfluorid und Glukokortikoide (34). Der Nachteil all dieser Stoffe besteht jedoch in deren notwendigen regelmäßigen Applikation um eine dauerhafte Schmerzfreiheit gewährleisten zu können, da sie durch chemische wie mechanische Prozesse immer wieder abgetragen werden.

Durch den Einsatz von Lasern eröffnen sich hier neue Behandlungsmethoden. Der Laser gilt in der Literatur als effektivere Behandlungsmethode als die konventionellen Wirkstoffe (64). Man nimmt an dass die Laserwirkung auf einer Versiegelung der Dentintubuli, einer Nervenanalgesie oder einem Placebo-Effekt beruht. Während die Versiegelung als dauerhaft anzusehen ist, ist dies bei der Nervenanalgesie und dem Placebo-Effekt nicht der Fall.

Die eingesetzten Laser sind der He-Ne-Laser, GaAIAs-Laser, Nd:YAG-Laser, Ho:YAG-Laser, Diodenlaser, Er:YAG-Laser und der CO₂-Laser.

Kariesprävention

Um den Zahn resistenter gegenüber Säureangriffen und deren folgende Demineralisation zu machen werden Fluoride in Form von Trinkwasser, Tabletten oder Mundhygieneartikeln verabreicht. Dies soll das Gleichgewicht wieder zu Gunsten der Remineralisation der Zahnhartsubstanz verschieben. Fissurenversiegelungen dienen dazu Nischen für Bakterien zu eliminieren und somit die Putzbarkeit des Zahnes zu verbessern. Laser können ebenfalls präventiv eingesetzt werden um die Schmelzoberfläche zu versiegeln und gegen Säure resistenter zu machen (65). Als kariesprotektive Laser werden der CO₂-Laser, der Argon-Laser, der Nd:YAG-Laser, der Er:YAG-Laser, der Er,Cr:YSGG-Laser und der Ho:YAG-Laser gehandhabt (65-67).

Kavitätenpräparation

Die Präparation einer Kavität kann mit Hilfe rotierender oder oszillierender Instrumente wie Bohrer erfolgen. Viele Patienten klagen dabei über unangenehme Empfindungen oder Schmerzen die durch Druck, Vibrationen, Temperaturanstieg oder einfach durch das Geräusch des Bohrers ausgelöst werden (68). Der Laser bietet hier eine deutlich schmerzärmer Alternative, da die Patienten keinem Druckschmerz, keiner Vibration und viel geringeren Temperaturempfindungen ausgesetzt sind (69). Um Hitzeschäden der Pulpa zu

vermeiden werden Laser in der Kavitätenpräparation nur mit Wasserkühlung angewendet. Nachteilig ist bei einer Laserpräparation die längere Präparationszeit aufgrund der geringeren applizierten Leistung (Turbine: ca. 15 Watt, Laser: ca. 6 Watt).

Eingesetzt werden für die Kavitätenpräparation Lasersysteme mit geringer Eindringtiefe und geringer Erwärmung des umliegenden Gewebes. Er:YAG-Laser und Er,Cr:YSGG-Laser gelten als Standardsysteme und dienen auch zur Kariesprävention durch ihre bakterizide Wirkung. Der Grund deren Einsatzes liegt in deren Wellenlänge und der Ablation der Zahnschubstanz in diesem Wellenlängenbereich (34).

Photopolymerisation

Lichthärtende Restaurationsmaterialien nehmen einen wichtigen Platz in der modernen Zahnmedizin ein. Um deren Aushärtung zu beschleunigen und da deren richtige Polymerisation einer der Grundvoraussetzungen beim Gelingen der Zahnrestauration ist, stellen Lasersysteme ein interessantes Einsatzmittel dar. Die speziellen Eigenschaften der Laserstrahlung wie Kollimation, Kohärenz und Monochromie werden zum großen Vorteil bei der Polymerisation gegenüber den herkömmlichen Aushärtungsmethoden mit Plasmabogengeräten, Halogenlampen und LEDs. Lichthärtende Restaurationsmaterialien enthalten Photoinitiatoren (z.B. Kampferchinon) um das Licht zu absorbieren. Im Gegensatz zu herkömmlichen Aushärtungsmethoden haben Lasersysteme ein geringeres Emissionsspektrum und lassen sich daher gezielt auf das Absorptionsmaximum des Photoinitiators einsetzen.

Das Lasersystem der Wahl für die Lichtaushärtung von kampferchinonhaltigen Materialien ist der Argon-Laser. Seine Wellenlänge von 488nm liegt genau im Absorptionsmaximum des Kampferchinons. Photopolymerisationen mit Hilfe des Argon-Lasers bieten Vorteile einer verkürzten Polymerisationszeit, besserer Aushärtung, geringerer Pulpareizung sowie daraus folgenden besseren physikalischen Eigenschaften der Restauration (70, 71).

Parodontologie

Die desinfizierende Wirkung von Lasern macht man sich vor allem in der Parodontologie zu Nutze (72). Oft wird der Laser hier ergänzend zu konventionellen Methoden eingesetzt um ein besseres Behandlungsergebnis zu erzielen. Auch zur Konkremententfernung wird vor allem der Er:YAG-Laser eingesetzt (73) oder zur Abtragung von Taschenepithel können Nd:YAG-Laser, CO₂-Laser bzw. Diodenlaser eingesetzt werden (74).

Orale Chirurgie

In der Chirurgie stehen vier verschiedene Methoden zur Behandlung zur Verfügung: das Skalpell, die chirurgische Diathermie, die Kryotherapie und der Laser. Für welche Indikation welche Methode zu wählen ist konnte bis jetzt jedoch noch nicht eindeutig geklärt werden.

Chirurgisch lassen sich Laser in vielen zahnmedizinischen Bereichen wie beispielsweise der Gingivachirurgie, der präprothetischen Chirurgie, zur Dekontamination bei Periimplantitis, bei Hyperkeratosen, Präkanzerosen, Zysten, Narbenbildung oder auch bei gutartigen Tumoren einsetzen (34). Die Vorteile vom chirurgischen Einsatz eines Lasers sind geringere Narbenbildung, geförderte Wundheilung und geringere postoperative Schmerzen. Während der Operation sind die Blutungsreduktion, präziserer Schnittführung und kalkulierbare Eindringtiefe von Vorteil.

Zum Einsatz kommen in der Chirurgie vor allem der Argon-, He-Ne-, Dioden-, Nd:YAG-, Ho:YAG-, Er,Cr:YSGG-, Er:YAG-Laser und CO₂-Laser.

Lichtaktivierte Desinfektion (PAD)

Lichtaktivierte Desinfektion (photoactivated disinfection) kann zur Abtötung von Bakterien verwendet werden (75). Dies funktioniert über den Effekt, dass photosensible Moleküle bei Bestrahlung mit Licht einer entsprechenden Wellenlänge zytotoxischen Singulett-Sauerstoff (Sauerstoffradikal) produzieren. Der wiederum schädigt die Bakterienmembran und deren DNS. Die Bakterien sterben. Lichtaktivierte Desinfektion kann sowohl spezifisch mit einem monoklonalen Antikörper als auch unspezifisch gegen alle Krankheitserreger wie Viren, Bakterien und Pilze eingesetzt werden. Somit hat die PAD ein weites Anwendungsgebiet von Desinfizierung von Kariesläsionen, Zahnfleischtaschen über Wurzelkanäle bis hin zu Periimplantitis und Schleimhautwunden. Anwendung finden vor allem der Diodenlaser und der He-Ne-Laser in der PAD (76, 77).

Endodontie

Das für diese Studie wichtigste Einsatzgebiet des Lasers ist die Endodontie. Die Endodontie gewinnt in der heutigen Zeit immer mehr an Bedeutung, geht es doch darum einen bereits verloren geglaubten Zahn noch zu retten. Doch um einen Zahn wirklich weiterhin dauerhaft erhalten zu können muss Keimfreiheit im Wurzelkanal herrschen (2).

Hierbei haben Laser in Studien gezeigt diese Keimfreiheit auch bei schwierigen Wurzelkonfigurationen durch tief eindringende Strahlung womöglich besser erreichen zu

können (6, 78). Viele Studien haben dabei ihr antimikrobielles Potential hervorgehoben (78). Die Lasertherapie sei ein exzellentes Adjuvants in der endodontischen Therapie (78). Jedoch konnten in den meisten dieser Studien diese Laseranwendung in der Endodontie nicht als vollständiger Ersatz für Spüllösungen mit signifikanten Verbesserungen bestätigt werden (57, 78-80).

2. Material und Methode

2.1. Studienvorbereitungen

Um den Richtlinien zur Abfassung einer Diplomarbeit durch die Verwendung menschlichen Gewebes (für diese Studie in Form von extrahierten Zähnen und Gingiva Fibroblasten) nachzukommen, wurde ein bereits bestehender Antrag bei der Ethikkommission der Medizinischen Universität Wien verlängert und konnte für diese Studie verwendet werden (EK Nr. 980/2009). Ebenfalls der Studie vorausgehend erfolgte die Präsentation der geplanten Versuche im Rahmen des Qualitätszirkels.

Die Studie umfasste auch eine Reihe von Vorversuchen zur Berechnung der Fallzahl und zur Etablierung der Methode für die Hauptversuche.

Dentinplättchengewinnung

Für die Gewinnung der Dentinscheibchen wurden extrahierte menschliche Prämolaren und Molaren verwendet.

Die Zähne wurden in koronoapikaler Richtung mittels einer wassergekühlten Trennscheibe in 1 mm Schichten geschnitten. Anschließend wurden mit einer Stanze Dentinscheibchen mit 3 mm Durchmesser gestanzt.

Die Dentinscheibchen wurden dann für 10 Minuten bei 134 C° autoklaviert, um die bereits vorhandenen Mikroorganismen zu eliminieren.

Zellkultur

Für die einzelnen Experimente wurden osteoblastäre Zellen (MG-63), Mäusefibroblasten (L929) und gingivale Fibroblasten (GF) in Zellkulturflaschen angesetzt. Das nötige Nährmedium setzte sich zusammen aus α -minimal essential medium (α -MEM), welchem 10% fötales Kälberserum (FCS - fetal calf serum) und 1% Antibiotika, Antimykotikum (PSA – Penicillin, Streptomycin, Amphotericin) beigemischt wurden.

Das Wachstum der Zellen erfolgte im Inkubator bei 37° Celsius, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Gehalt. Die Zellen wurden einer täglichen mikroskopischen Kontrolle mit 4- bis 10-facher Vergrößerung unterzogen um die Zellvermehrung und Zellgesundheit morphologisch beurteilen zu können. Jeden 2. Tag wurde das Medium mittels mechanischer Absaugeinheit in steriler Umgebung abgesaugt und durch neues Medium ersetzt. Diese

Nährmediumzusammensetzung aus α -MEM, 10% FCS und 1% PSA sollte den Zellen ein ideales Wachstum ohne mikrobielle Störfaktoren gewährleisten.

Vorversuche

In den Vorversuchen und Testreihen wurden die labortechnischen Fähigkeiten, wie Zellkultivierung, Zellzahlbestimmung sowie der Umgang mit Lasersystemen erlernt. Durch die Vorversuche wurden die Fallzahl, das Studiendesign und Lasereinstellungen adaptiert und festgelegt.

MTT

Zur Messung der Viabilität der Zellen wurde „3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid“ (MTT) auf die Zellen aufgebracht (81). Das gelbe, wasserlösliche MTT wird von den Zellen in blau-violettes wasserunlösliches Formazan reduziert und kann anschließend photometrisch bei 550 nm gemessen werden. Die Messung erfolgt nach 2 Stunden. MTT wird in den Zellen durch Glykolyse reduziert bzw. zu einem geringen Teil in den Mitochondrien über die Succinat-Dehydrogenase reduziert. In beiden Fällen lässt diese Reduktion einen Rückschluss auf den Zellstoffwechsel bzw. Zellviabilität zu (81, 82).

2.2. Studiendesign

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine *in vitro* Studie bei der eine Laserbehandlung und eine konventionelle endodontische Spülung imitiert wurden. Dabei wurden 3 gleich ablaufende Hauptversuche durchgeführt. Es wurden die Zellen MG-63, L929 und GF durch Dentinscheibchen bzw. direkt mit Laser (Er:YAG-Laser, Diodenlaser) bzw. Spüllösungen (NaOCl, CHX) behandelt.

Ein Hauptversuch umfasste jeweils 3 Zellgruppen in Triplicates zu je 13 Behandlungen bzw. Kontrollen ($3 \times 3 \times 13 = 117$). Somit entstand eine Gesamtzahl von 351 Proben bei allen 3 Hauptversuchen.

2.3. Ablauf der Hauptversuche

Die inkubierten Zellen wurden bevor sie verwendet wurden einer primären mikroskopischen Kontrolle auf etwaige Kontaminationen, Zellvermehrung und Zelladhärenz unterzogen. Anschließend wurde das Nährmedium α -MEM, 10% FCS und 1% PSA in steriler Umgebung aus den Zellkulturflaschen abgesaugt. Die Zellen blieben aufgrund ihrer Adhärenz am Flaschenboden und wurden anschließend mit PBS (Phosphate buffered saline) gewaschen. PBS ist ein weit verbreiteter Puffer für Zellversuche. Er ist isotonisch, nicht zelltoxisch, hat einen PH-Wert zwischen 7,2-7,4 und schafft somit eine konstante Osmolarität (83).

Weiters wurde Trypsin 0.05% zugesetzt. Trypsin ist ein proteolytisches Enzym um die adhärennten Proteinbindungen der Zellen zueinander bzw. zur Zellkulturflasche aufzuspalten und die Zellen bei vollständig abgelaufenem Prozess in Suspension zu bringen (84). Die Wirkung sollte ca. 2-3 min andauern um einerseits alle adhäsiven Verbände zu lösen und andererseits die Zellen so wenig wie möglich zu schädigen (84, 85). Nach 2-3 min erfolgte die Zugabe von Nährmedium α -MEM, 10% FCS und 1% PSA zur Trypsininaktivierung und mikroskopische Kontrolle der gelösten Zellen in Suspension. Es folgte die Zentrifugation bei einer Einstellung von 1250 Umdrehungen/min für 6 min bei 24° Celsius. Der Überstand des Mediums wurde in steriler Umgebung abgesaugt und die verbliebenen Zellen am Zentrifugenröhrchenboden mit 10 ml Nährmedium α -MEM, 10% FCS und 1% PSA befüllt und durch Resuspension wieder vermischt. Von dieser Zellsuspension wurden 10 μ l auf ein Zählplättchen (DHC-N01, Neubauer, siehe Abbildung 2.1) getropft und die Zellzahl der Suspension unter dem Mikroskop ermittelt.

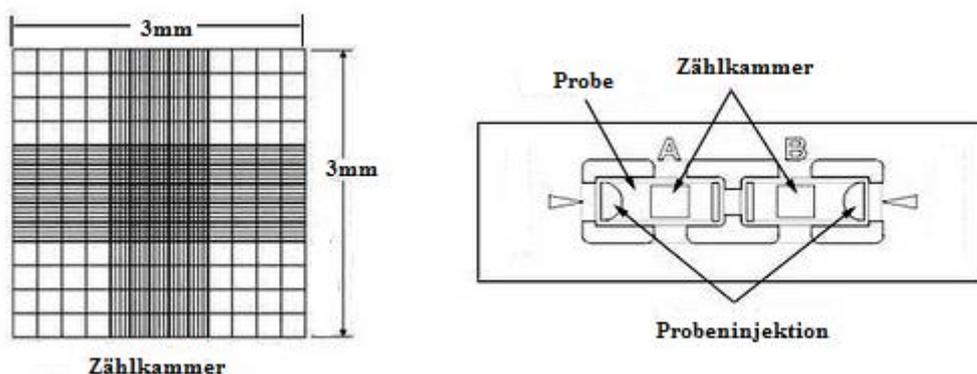


Abbildung 2.1 schematische Darstellung eines Zählplättchens DHC-N01

Aufgrund der ermittelten Zellanzahl der Suspension konnte auf eine ideale 10 ml Zellsuspension mit einer Zellzahl von 30.000 Zellen/cm² rückgerechnet werden und

dementsprechend die vorangegangene Zellsuspension mit einem errechneten Mediumvolumen verdünnt werden. Somit erhielten wir schlussendlich 3 ideale 10 ml Zellsuspensionen von MG-63, L929 und GF mit je gleicher Zellanzahl von annähernd 30.000 Zellen/cm².

Die Zellsuspensionen wurden jeweils in 3 96-Well-Platten angesetzt und kultiviert. Nach 24 Stunden wurde der Überstand verworfen, die Zelllinien in den 96-Well-Platten mit 100 µl PBS je well gewaschen. PBS wurde erneut abgesaugt und durch 100 µl Serum freies Medium (α -MEM, 1% PS) je well ersetzt.

Es folgten die jeweiligen Behandlungen der Zellsuspensionen durch bzw. ohne Dentin. Sie gliederten sich, wie in Abbildung 2.2, Abbildung 2.3, Abbildung 2.4 zu sehen ist. Es wurden bewusst Zeilen mit Behandlungen ausgelassen um etwaige Ergebnisverfälschungen durch benachbarte Behandlungen (z.B. durch Laserstrahlung, Spüllösungskontaminationen) zu vermeiden.

	GF			L929			MG-63		
CHX+Dentin									
CHX									
Ko									
Ko PBS									

Abbildung 2.2 schematischer Aufbau der 1. 96-Well-Platte eines Hauptversuches

	GF			L929			MG-63		
Ko									
Diode									
Diode+Dentin									
Er:YAG									
Er:YAG+Dentin									

Abbildung 2.3 schematischer Aufbau der 2. 96-Well-Platte eines Hauptversuches

	GF	L929	MG-63
NaOCl			
NaOCl+Dentin			
Ko+Dentin			
PBS+Dentin			

Abbildung 2.4 schematischer Aufbau der 3. 96-Well-Platte eines Hauptversuches

Jede well mit Dentinscheibchen wurde, wie in Abbildung 2.5 schematisch dargestellt bestückt. Dabei wurde mittels Periphery Wachs das Dentinscheibchen auf einen normierten Abstand von 0,5 mm an die Zellsuspension herangebracht.

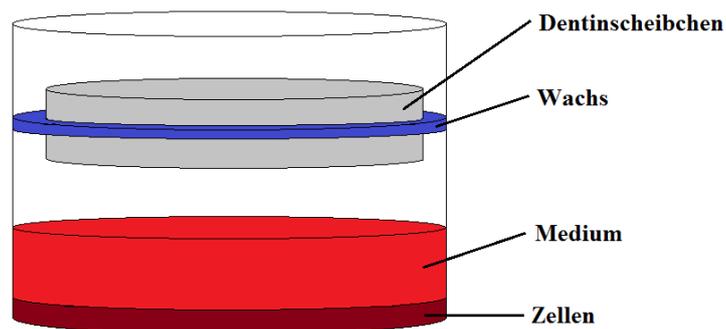


Abbildung 2.5 Schematische Darstellung einer Well aus einer 96-Well-Platte, wie sie für die Versuche mit Dentinscheibchen verwendet wurden

Die Zellsuspensionen in den 96-Well-Platten wurden nun dem Studiendesign zufolge mit je einem Er:YAG-Laser, einem Diodenlaser, einer Chlorhexidinspülung und einer Natriumhypochloridspülung jeweils mit Dentinscheibchen oder ohne Dentinscheibchen behandelt. Weiters gab es Kontrollgruppen mit und ohne Dentinscheibchen.

Der eingesetzte Er:YAG-Laser war ein Laser der Firma Syneron namens *LiteTouch*TM. Er arbeitet mit der für Er:YAG-Lasern typischen Strahlungswellenlänge von 2940 nm. Dabei schafft er Impulsenergien bis zu 700 mJ und eine Leistung bis zu 8,4 Watt am Gewebe. Aufsätze können mit Punktgrößen am distalen Ende von 0,2 bis 1,3 mm eingesetzt werden.

Der Er:YAG-Laser wurde angewendet mit den Einstellungen für „soft tissue“ 50 mJ, 20 Hz und einer Gesamtleistung von 1 Watt. Es wurde ein Fasertip mit einem Durchmesser von 1,3 mm ausgewählt.

Dabei wurde er im 60 Grad Winkel mit helikoiden Bewegungen eingesetzt. Es wurde über im Lasersystem eingebaute Wasserspülung gekühlt. Pro Wellfläche bzw. Dentinscheibchen wurde 10 Sekunden behandelt.

Der Diodenlaser (MDL 10, der Firma Vision GmbH, Göxe) kann sowohl im kontinuierlichen als auch im pulsierenden Modus angewendet werden. Mit Spitzen beim kontinuierlichen Modus von 2,5 W und beim pulsierenden von Repetitionsraten von bis zu 1000 Hz.

Der Diodenlaser wurde in dieser Studie mit 15 Hz und Gesamtleistung von 1,5 Watt angewendet. Diese Einstellungen lassen sich in der Literatur zur Endodontischen Behandlung wiederfinden und sind auch vom Laserhersteller empfohlen.

Beide Lasersysteme wurden mit einem flexiblen Lichtwellenleiter ausgestattet.

Die Spülungen mit CHX und NaOCl erfolgte einmal für 20 Sekunden je well, wurden anschließend abpipettiert und dann mit PBS gewaschen um sicher zu gehen, dass keine Spüllösungsrückstände beim Entfernen der Dentinplättchen zu den Zellsuspensionen kommen konnten.

Danach wurden alle Dentinscheibchen sowie das Periphery Wachs entfernt, das serumfreie Nährmedium (α -MEM, 1% PS) aus allen Wellplatten abgesaugt, alle wells mit 100 μ l PBS gewaschen um anschließend erneut mit serumfreien Nährmedium von 100 μ l je well versetzt und 10 μ l MTT zugegeben. Diese Wellplatten wurden dann für 2 Stunden im Inkubator bei 37° Celsius, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ gelagert (81).

Nach diesen 2 Stunden wurde das serumfreie Nährmedium verworfen, 100 μ l DMSO (Dimethylsulfoxid) je well zur Auflösung der Formazankristalle von MTT zugefügt (86). Die jeweilige Verfärbung wurde photometrisch gemessen und die gewonnenen Daten aufgezeichnet.

Die Daten wurden mittels Diagrammen, Mittelwert und Standardabweichung beschrieben. Aufgrund der Tatsache, dass keine Normalverteilung vorlag, wurden der Kruskal-Wallis-Test und der „post-hoc“ Mann-Whitney-U-Test angewandt. Das Signifikanzniveau wurde mit $P < 0,05$ definiert.

3. Ergebnisse

3.1. Statistische Auswertung

Da keine Normalverteilung der Ergebnisdaten vorlag, wurden der Kruskal-Wallis-Test und weiterführend der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Das Signifikanzniveau wurde mit $P < 0,05$ festgelegt.

Um die Ergebnisse der 3 Hauptversuche vergleichbar zu gestalten, wurden die Ergebnisse jeweils in Prozent umgerechnet und anschließend zusammen geführt. Als 100 Prozent wurde bei jedem der drei Hauptversuche der Mittelwert von unbehandelten Zellen ohne jegliche Behandlung festgelegt.. Relativ zu diesem Kontrollwert von unbehandelten Zellen wurden die restlichen Gruppen prozentual berechnet.

Diese prozentualen Ergebnisse werden in den kommenden Kapiteln behandelt.

3.1.1. Gingivale Fibroblasten (GF)

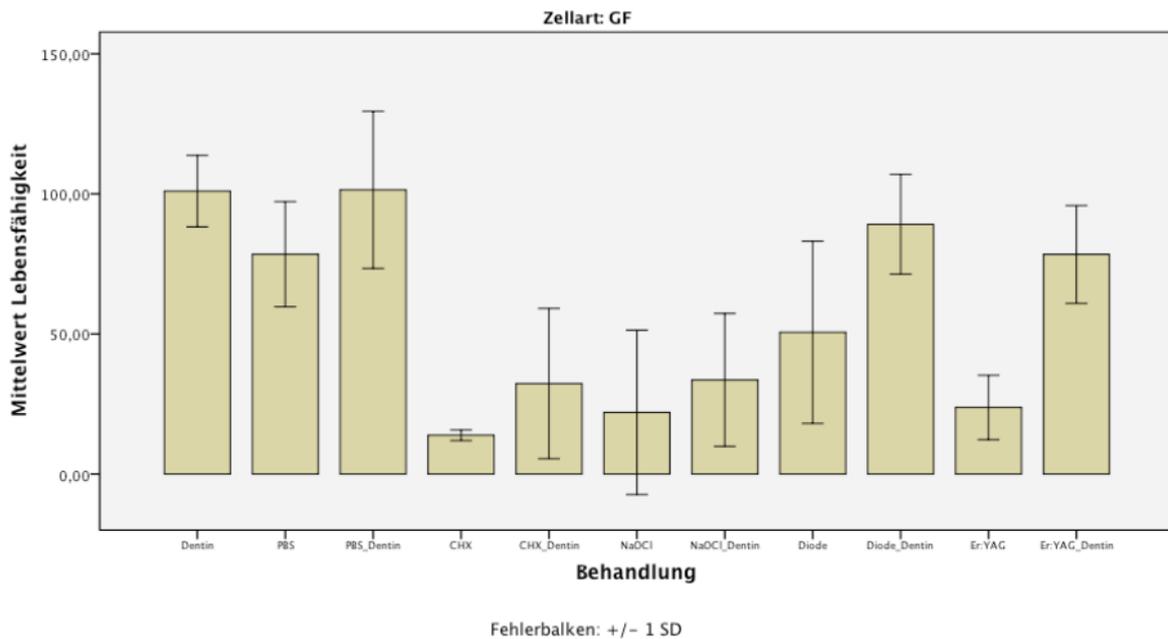


Abbildung 3.1 Ergebnisse der Viabilitätsmessungen von GF nach den jeweiligen Behandlungen relativ zur unstimulierten Kontrolle (=100). Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung

Beim Vergleich der Ergebnisdaten der Zellart GF zeigte sich im Kruskal-Wallis-Test eine asymptotische Signifikanz von $p < 0,001$. Es besteht somit ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen. Dieser Unterschied bedarf einer genaueren Analyse mittels Mann-Whitney-U-Test um Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen festlegen zu können. Hierbei wird die Behandlungsgruppe immer mit der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ verglichen und auf Signifikanz überprüft.

„Dentin“ vs. „PBS“ = signifikante Reduktion

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der direkten Behandlungsgruppe „PBS“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p = 0,021$ errechnet.

Somit liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „PBS_Dentin“ = kein signifikanter Unterschied

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der indirekten Behandlungsgruppe „PBS_Dentin“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p = 1,000$ errechnet.

Somit liegt kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „CHX“ = signifikante Reduktion

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der direkten Behandlungsgruppe „CHX“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p < 0,001$ errechnet.

Somit liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „CHX_Dentin“ = signifikante Reduktion

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der indirekten Behandlungsgruppe „CHX_Dentin“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p = 0,001$ errechnet.

Somit liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „NaOCl“ = signifikante Reduktion

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der direkten Behandlungsgruppe „NaOCl“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p = 0,002$ errechnet.

Somit liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „NaOCl_Dentin“ = signifikante Reduktion

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der indirekten Behandlungsgruppe „NaOCl_Dentin“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p = 0,001$ errechnet.

Somit liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „Diode“ = signifikante Reduktion

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der direkten Behandlungsgruppe „Diode“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p = 0,001$ errechnet.

Somit liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „Diode_Dentin“ = kein signifikanter Unterschied

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der indirekten Behandlungsgruppe „Diode_Dentin“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p=0,174$ errechnet.

Somit liegt kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „Er:YAG“ = signifikante Reduktion

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der direkten Behandlungsgruppe „Er:YAG“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p<0,001$ errechnet.

Somit liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „Er:YAG_Dentin“ = signifikante Reduktion

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der indirekten Behandlungsgruppe „Er:YAG_Dentin“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p=0,026$ errechnet.

Somit liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

3.1.2. Mäusefibroblasten (L929)

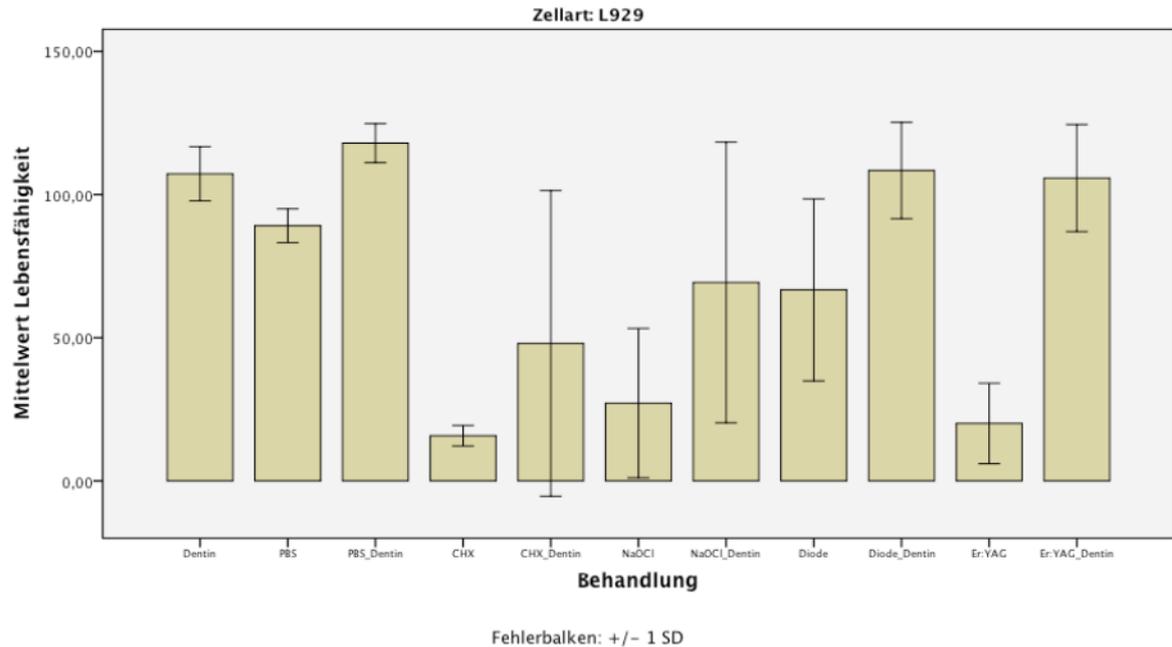


Abbildung 3.2 Ergebnisse der Viabilitätsmessungen von L929 nach den jeweiligen Behandlungen relativ zur unstimulierten Kontrolle (=100). Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung

Beim Vergleich der Ergebnisdaten der Zellart L929 zeigte sich im Kruskal-Wallis-Test eine asymptotische Signifikanz von $p < 0,001$. Es besteht somit ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen. Dieser Unterschied bedarf einer genaueren Analyse mittels Mann-Whitney-U-Test um Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen festlegen zu können. Hierbei wird die Behandlungsgruppe immer mit der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ verglichen und auf Signifikanz überprüft.

„Dentin“ vs. „PBS“ = signifikante Reduktion

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der direkten Behandlungsgruppe „PBS“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p = 0,004$ errechnet.

Somit liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „PBS_Dentin“ = signifikante Reduktion

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der indirekten Behandlungsgruppe „PBS_Dentin“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p = 0,038$ errechnet.

Somit liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „CHX“ = signifikante Reduktion

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der direkten Behandlungsgruppe „CHX“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p < 0,001$ errechnet.

Somit liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „CHX_Dentin“ = kein signifikanter Unterschied

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der indirekten Behandlungsgruppe „CHX_Dentin“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p = 0,209$ errechnet.

Somit liegt kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „NaOCl“ = signifikante Reduktion

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der direkten Behandlungsgruppe „NaOCl“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p = 0,001$ errechnet.

Somit liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „NaOCl_Dentin“ = kein signifikanter Unterschied

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der indirekten Behandlungsgruppe „NaOCl_Dentin“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p = 0,165$ errechnet.

Somit liegt kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „Diode“ = signifikante Reduktion

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der direkten Behandlungsgruppe „Diode“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p = 0,002$ errechnet.

Somit liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „Diode_Dentin“ = kein signifikanter Unterschied

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der indirekten Behandlungsgruppe „Diode_Dentin“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p=1,000$ errechnet.

Somit liegt kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „Er:YAG“ = signifikante Reduktion

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der direkten Behandlungsgruppe „Er:YAG“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p=0,001$ errechnet.

Somit liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „Er:YAG_Dentin“ = kein signifikanter Unterschied

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der indirekten Behandlungsgruppe „Er:YAG_Dentin“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p=0,535$ errechnet.

Somit liegt kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

3.1.3. Osteoblastäre Zellen (MG-63)

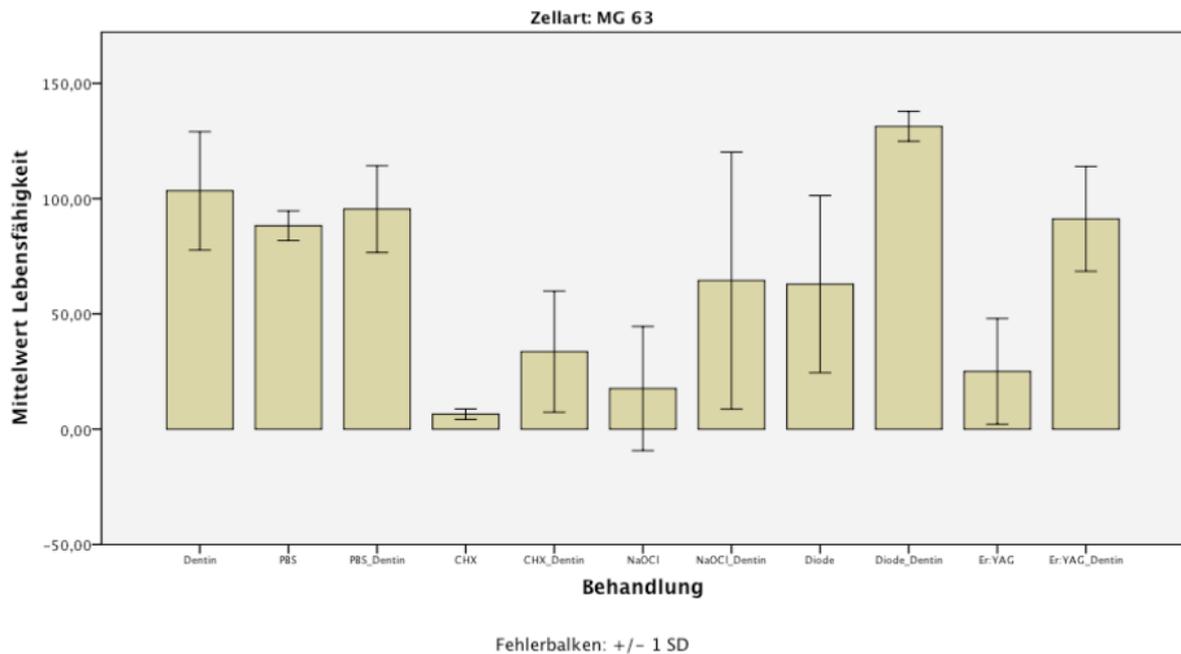


Abbildung 3.3 Ergebnisse der Viabilitätsmessungen von MG-63 nach den jeweiligen Behandlungen relativ zur unstimulierten Kontrolle (=100). Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung

Beim Vergleich der Ergebnisdaten der Zellart MG-63 zeigte sich im Kruskal-Wallis-Test eine asymptotische Signifikanz von $p < 0,001$. Es besteht somit ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen. Dieser Unterschied bedarf einer genaueren Analyse mittels Mann-Whitney-U-Test um Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen festlegen zu können. Hierbei wird die Behandlungsgruppe immer mit der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ verglichen und auf Signifikanz überprüft.

„Dentin“ vs. „PBS“ = signifikante Reduktion

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der direkten Behandlungsgruppe „PBS“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p = 0,038$ errechnet.

Somit liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „PBS_Dentin“ = kein signifikanter Unterschied

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der indirekten Behandlungsgruppe „PBS_Dentin“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p=0,318$ errechnet.

Somit liegt kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „CHX“ = signifikante Reduktion

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der direkten Behandlungsgruppe „CHX“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p<0,001$ errechnet.

Somit liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „CHX_Dentin“ = signifikante Reduktion

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der indirekten Behandlungsgruppe „CHX_Dentin“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p=0,002$ errechnet.

Somit liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „NaOCl“ = signifikante Reduktion

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der direkten Behandlungsgruppe „NaOCl“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p=0,001$ errechnet.

Somit liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „NaOCl_Dentin“ = kein signifikanter Unterschied

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der indirekten Behandlungsgruppe „NaOCl_Dentin“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p=0,165$ errechnet.

Somit liegt kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „Diode“ = signifikante Reduktion

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der direkten Behandlungsgruppe „Diode“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p=0,017$ errechnet.

Somit liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „Diode_Dentin“ = signifikante Steigerung

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der indirekten Behandlungsgruppe „Diode_Dentin“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p=0,002$ errechnet.

Somit liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „Er:YAG“ = signifikante Reduktion

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der direkten Behandlungsgruppe „Er:YAG“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p=0,001$ errechnet.

Somit liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

„Dentin“ vs. „Er:YAG_Dentin“ = kein signifikanter Unterschied

Beim Vergleich der Viabilität zwischen der unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“ und der indirekten Behandlungsgruppe „Er:YAG_Dentin“ wurde mittels Mann-Whitney-U-Test eine exakte Signifikanz (2*einseitige Signifikanz) von $p=0,383$ errechnet.

Somit liegt kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen vor.

3.1.4. Zusammenfassung der Daten

	GF	L929	MG-63
„Dentin“ vs. „PBS“	signifikante Reduktion	signifikante Reduktion	signifikante Reduktion
„Dentin“ vs. „PBS_Dentin“	kein signifikanter Unterschied	signifikante Reduktion	kein signifikanter Unterschied
„Dentin“ vs. „CHX“	signifikante Reduktion	signifikante Reduktion	signifikante Reduktion
„Dentin“ vs. „CHX_Dentin“	signifikante Reduktion	kein signifikanter Unterschied	signifikante Reduktion
„Dentin“ vs. „NaOCl“	signifikante Reduktion	signifikante Reduktion	signifikante Reduktion
„Dentin“ vs. „NaOCl_Dentin“	signifikante Reduktion	kein signifikanter Unterschied	kein signifikanter Unterschied
„Dentin“ vs. „Diode“	signifikante Reduktion	signifikante Reduktion	signifikante Reduktion
„Dentin“ vs. „Diode_Dentin“	kein signifikanter Unterschied	kein signifikanter Unterschied	signifikante Steigerung
„Dentin“ vs. „Er:YAG“	signifikante Reduktion	signifikante Reduktion	signifikante Reduktion
„Dentin“ vs. „Er:YAG_Dentin“	signifikante Reduktion	kein signifikanter Unterschied	kein signifikanter Unterschied

Tabelle 3.1 Unterschiede der jeweiligen Behandlungsgruppe im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“

Bei den direkten Behandlungsgruppen kam es bei allen 3 Zelllinien zu einer signifikanten Reduktion der Viabilität. Bei den indirekten Behandlungsgruppen mit Dentinscheibchen kam es je Zellart zu unterschiedlichen Signifikanzen (siehe Tabelle 3.1).

Die einzige signifikante Steigerung der Viabilität kam bei der Gruppe mit „Diode_Dentin“ bei MG-63 Zellen zustande.

3.1.5. Vergleich der Behandlungsgruppen aller 3 Zellarten

Im folgenden Kapitel werden die erhobenen prozentualen Ergebnisse der Behandlungen von allen 3 Zellarten (GF, L929 und MG-63) miteinander betrachtet.

Dabei beobachteten wir, dass es bei allen drei Zelllinien zu einer stärkeren Reduktion der Viabilität in den direkten Behandlungsgruppen mit Er:YAG-Laser, Diodenlaser, CHX und NaOCl im Vergleich zu deren äquivalenten Behandlungsgruppen durch das Dentinscheibchen kam (siehe Abbildung 3.4).

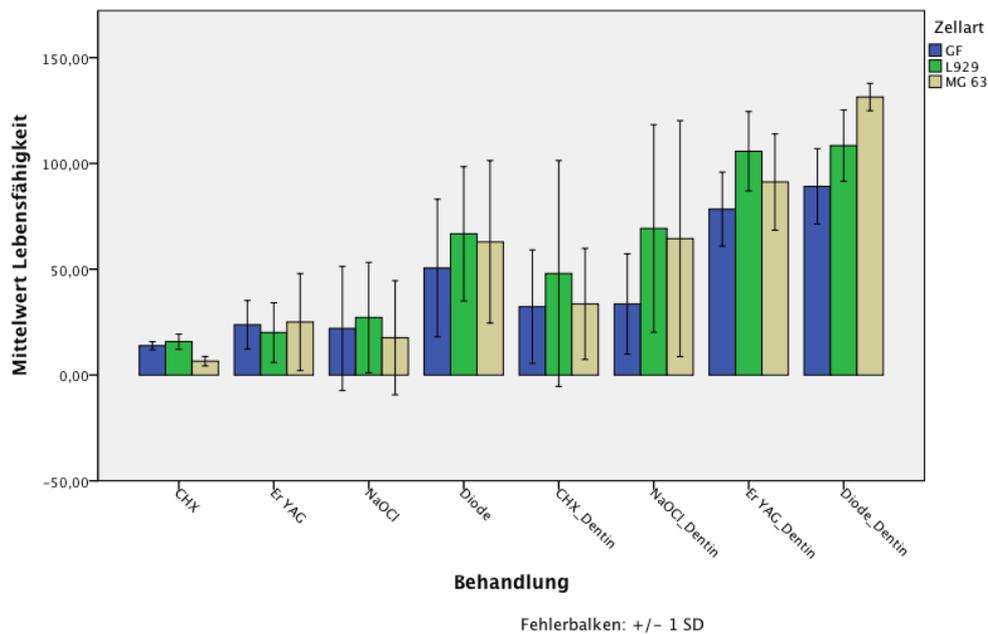


Abbildung 3.4 Ergebnisse der Viabilitätsmessungen aller 3 Zelllinien nach direkter und indirekter Behandlung. Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung

In der Reihenfolge von der zelltoxischsten Behandlung zur unbeeinflusstesten Behandlung bei allen drei Zelllinien, wies die direkte Behandlungsgruppe mit CHX die größte Viabilitätsreduktion auf, gefolgt von der direkten Behandlung mit Er:YAG-Laser, anschließend die direkte Behandlung mit NaOCl und die direkte Behandlung mit dem Diodenlaser. Weiters wurden bei allen drei Zelllinien deutliche Viabilitätsreduktionen bei CHX Behandlung durch ein Dentinscheibchen, gefolgt von der Behandlung mit NaOCl durch ein Dentinscheibchen beobachtet (siehe Abbildung 3.5).

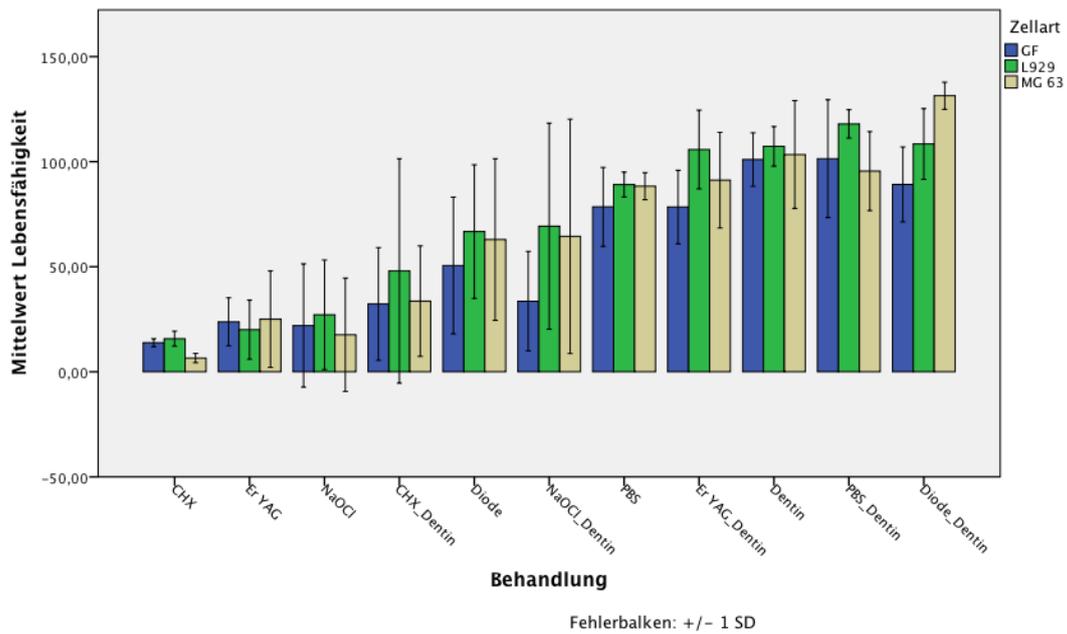


Abbildung 3.5 Ergebnisse der Viabilitätsmessungen aller 3 Zelllinien nach der jeweiligen Behandlung. Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung

Bei indirekten Behandlungen durch ein Dentinscheibchen mit Er:YAG-Laser bzw. Diodenlaser konnten wir keine Signifikanz zur Reduktion bei allen drei Zelllinien feststellen. Bei der indirekten Behandlung mit dem Diodenlaser bei MG-63 Zellen wurde sogar eine Signifikanz zur Stimulation der Viabilität im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe gemessen (siehe Abbildung 3.6).

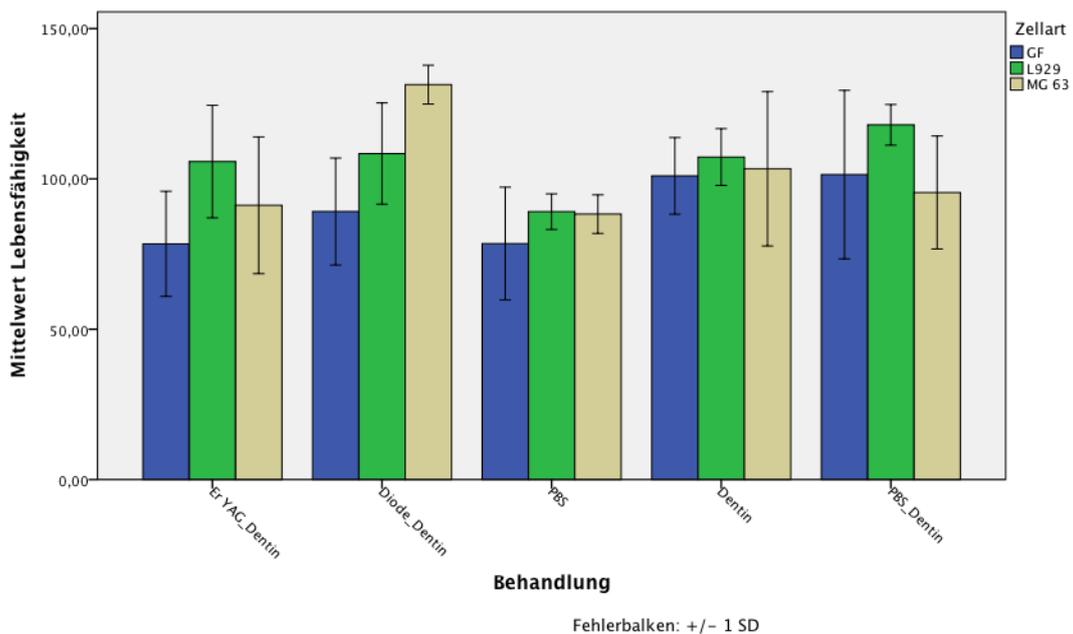


Abbildung 3.6 Ergebnisse der Viabilitätsmessungen aller 3 Zelllinien nach der Behandlung mit den Lasern im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung

Es kam zu keiner signifikanten Veränderung der Viabilität der Zellen durch die Kontrollgruppen mit Dentinscheibchen ohne Behandlung bzw. mit Dentinscheibchen. Die direkte Spülung mit PBS wiederum wies eine Tendenz zur Viabilitätsreduktion der Zellen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle auf (siehe Abbildung 3.7).

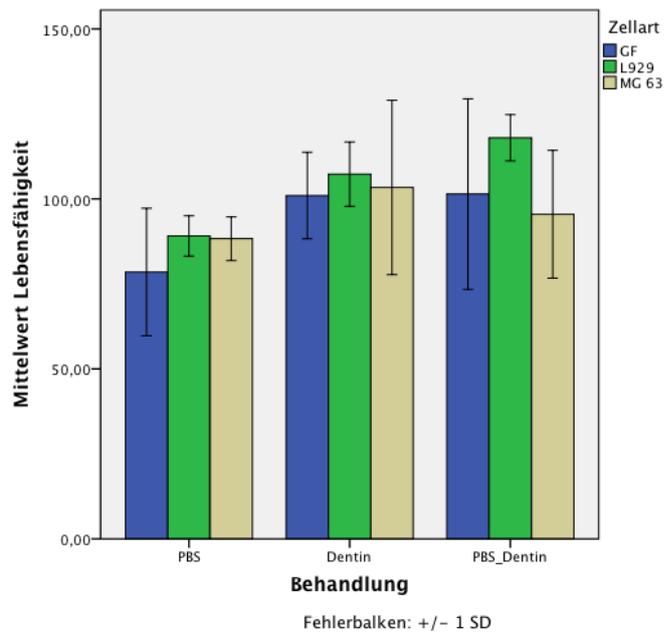


Abbildung 3.7 Ergebnisse der Viabilitätsmessungen aller 3 Zelllinien bei den 3 Kontrollgruppen. Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung

3.2. Mikroskopische Begutachtung der Zellen nach deren Behandlung

3.2.1. Gingivale Fibroblasten (GF)

Auf den kommenden Seiten werden Bilder von GF nach den jeweiligen Behandlungen abgelichtet. Die Aufnahmen wurden bei einer 10-fachen Vergrößerung unter dem Mikroskop gemacht. Das erste Bild der jeweiligen Seite entspricht der direkten Behandlung der Zellen während das zweite Bild die indirekte Behandlung durch das Dentinscheibchen wiedergibt. Abbildung 3.8 entspricht der unbehandelten Kontrollgruppe.

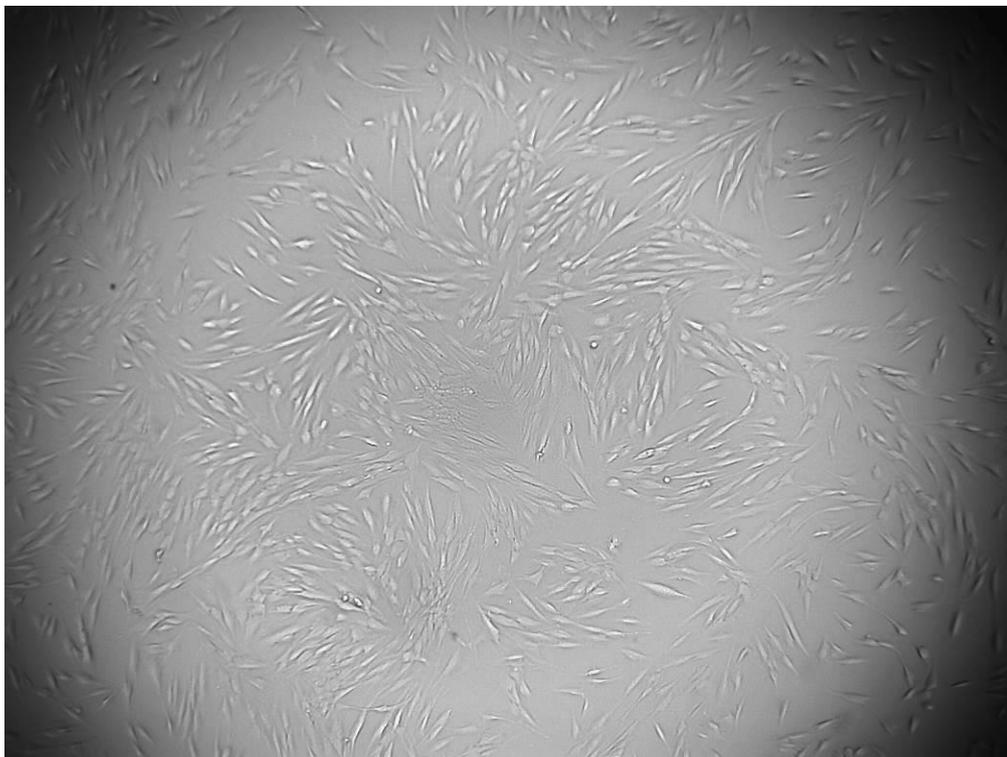


Abbildung 3.8 GF bei unbehandelter Kontrollgruppe unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung

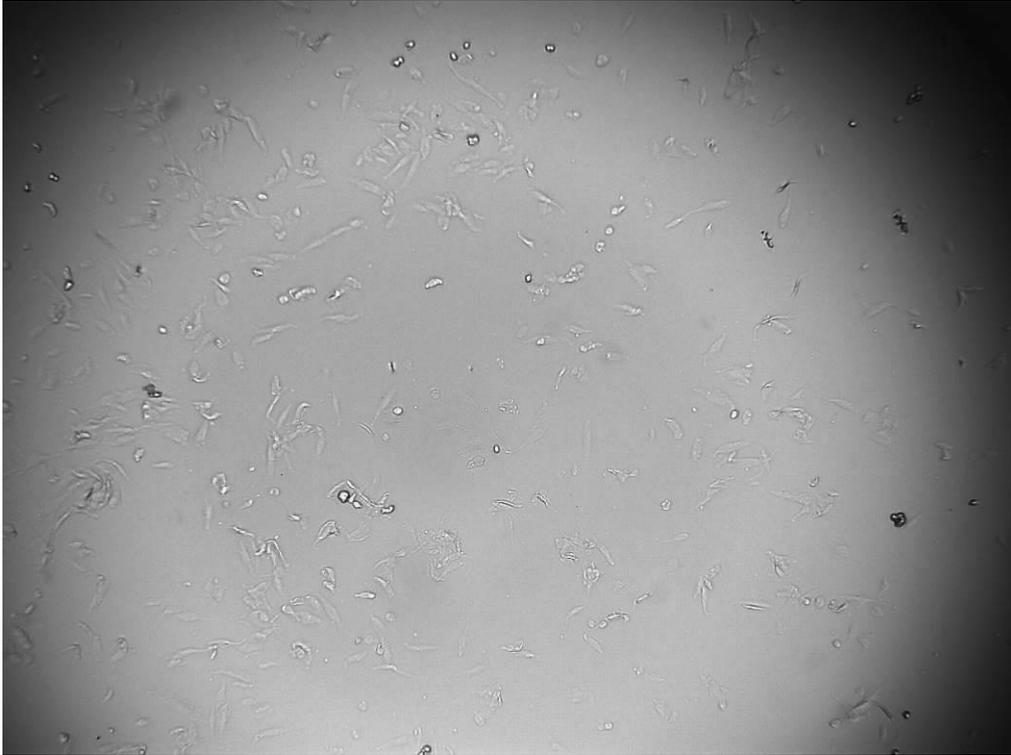


Abbildung 3.9 GF bei direkter Behandlung mit Diodenlaser unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung

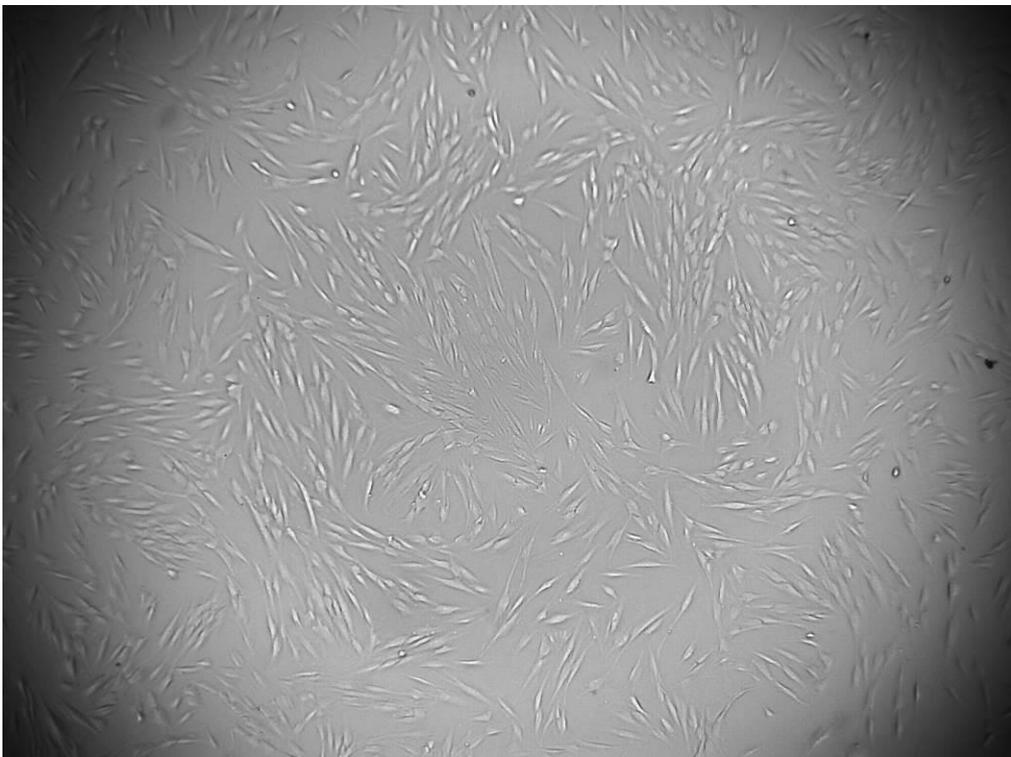


Abbildung 3.10 GF bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit Diodenlaser unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung

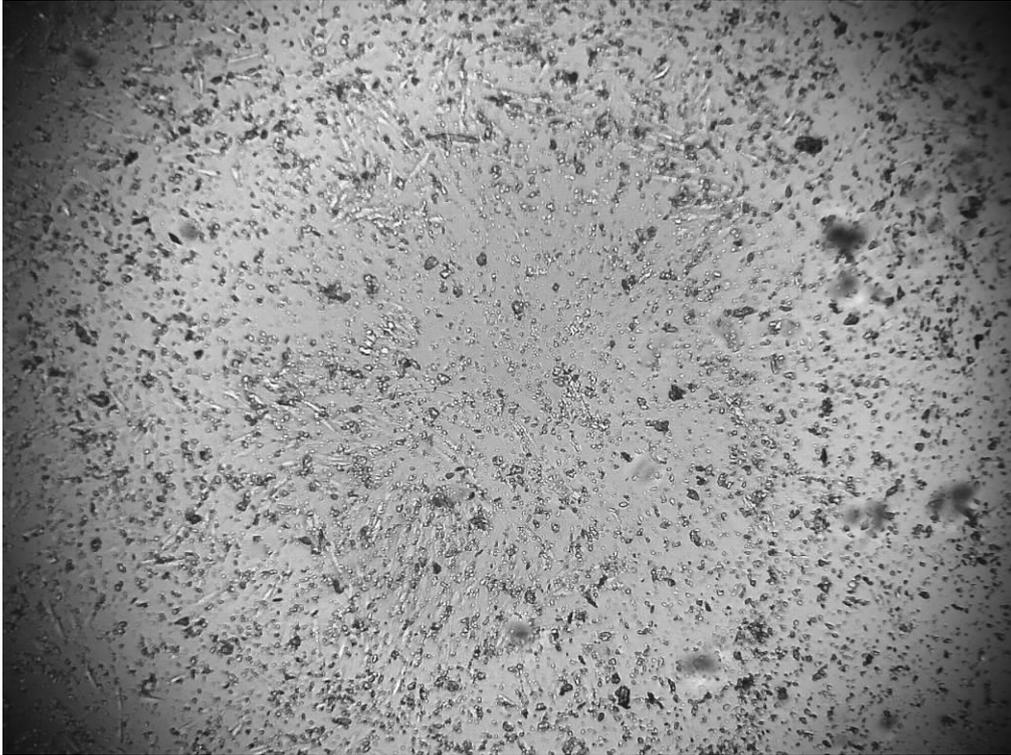


Abbildung 3.11 GF bei direkter Behandlung mit Er:YAG-Laser unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung

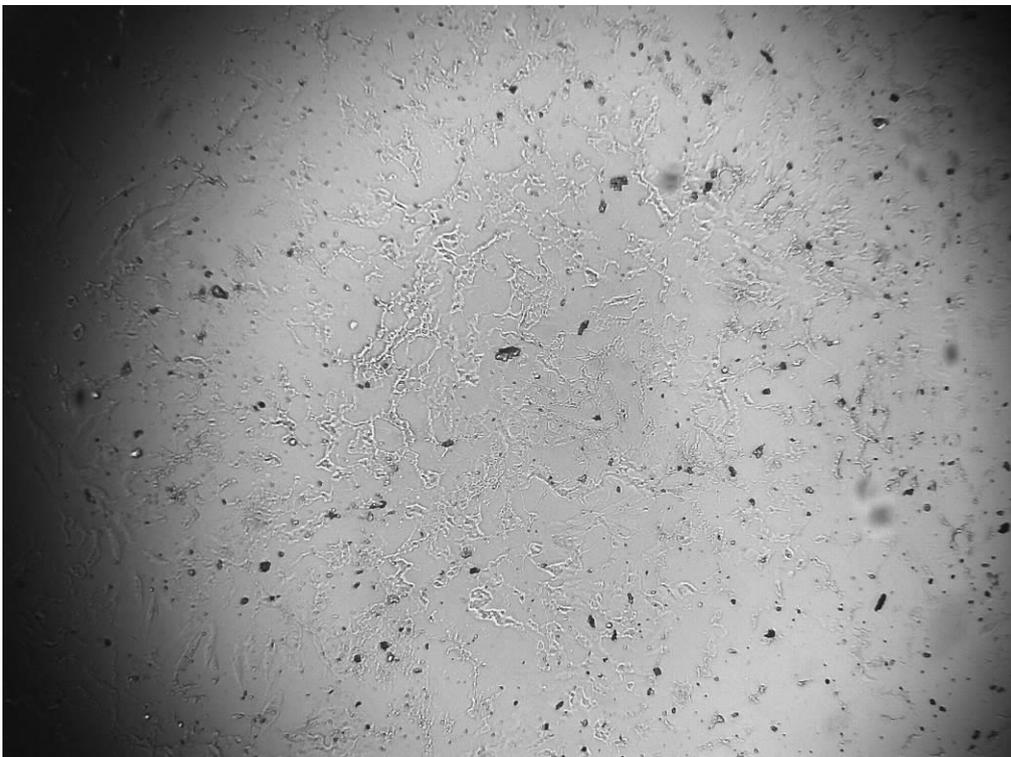


Abbildung 3.12 GF bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit Er:YAG-Laser unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung

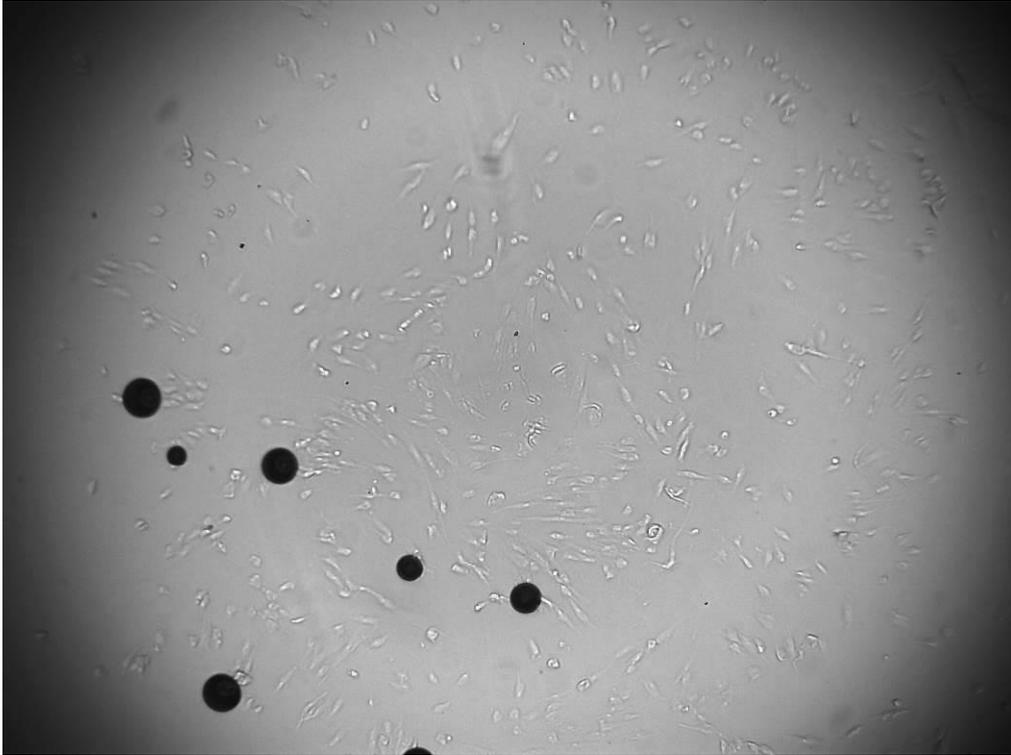


Abbildung 3.13 GF bei direkter Behandlung mit NaOCl unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung

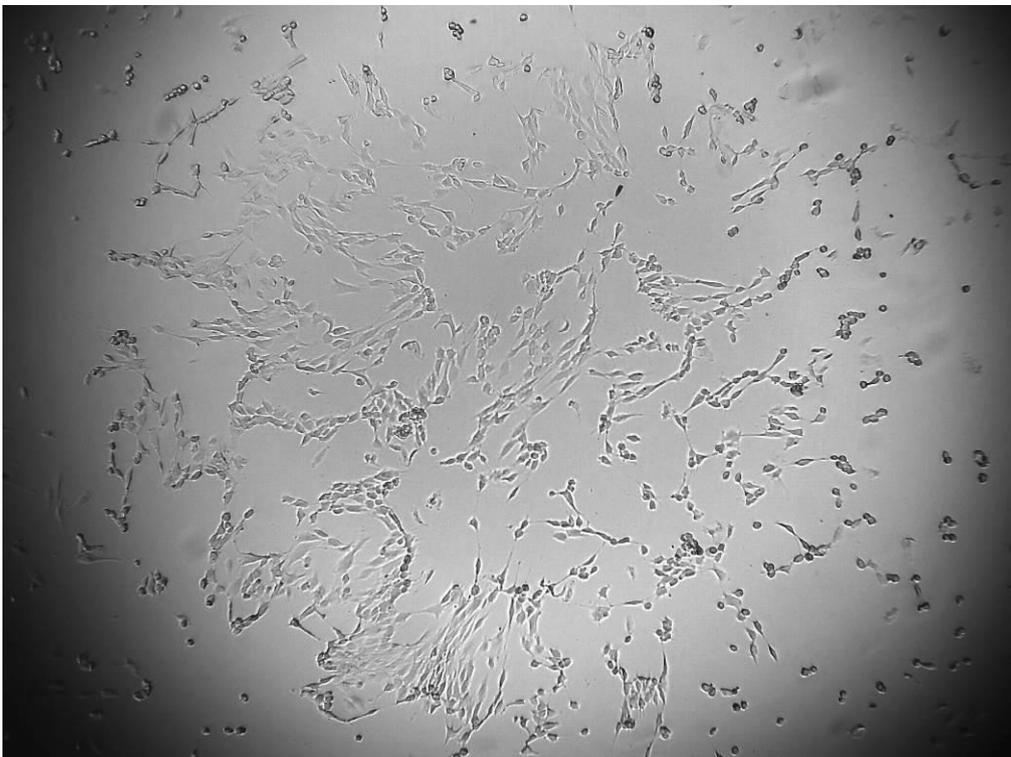


Abbildung 3.14 GF bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit NaOCl unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung

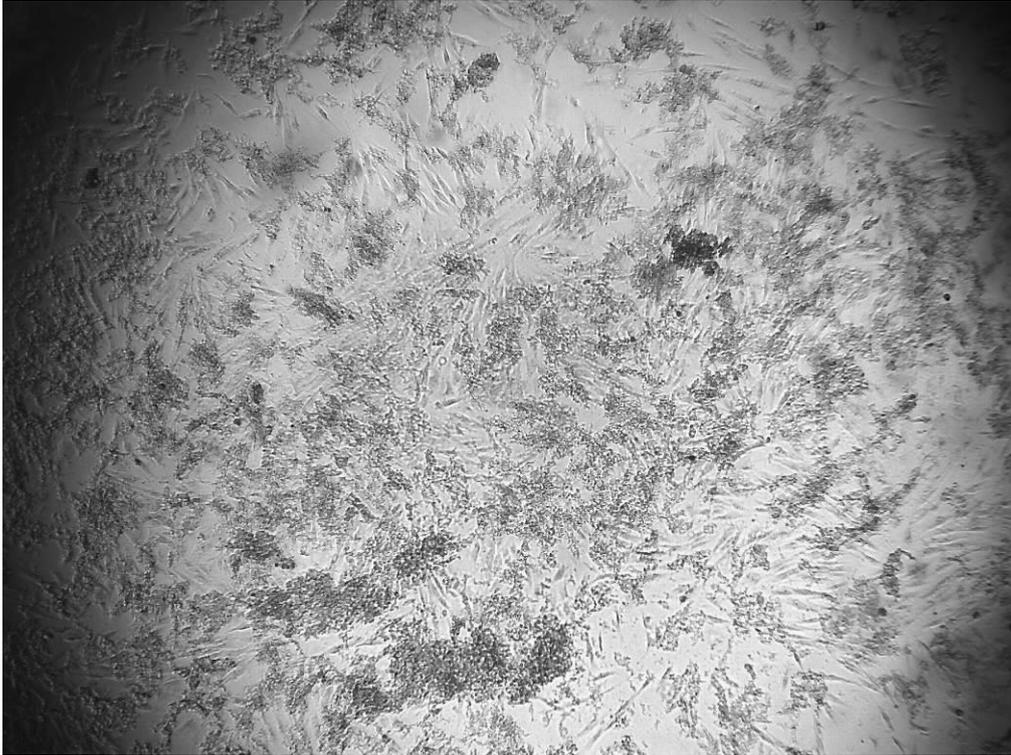


Abbildung 3.15 GF bei direkter Behandlung mit CHX unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung

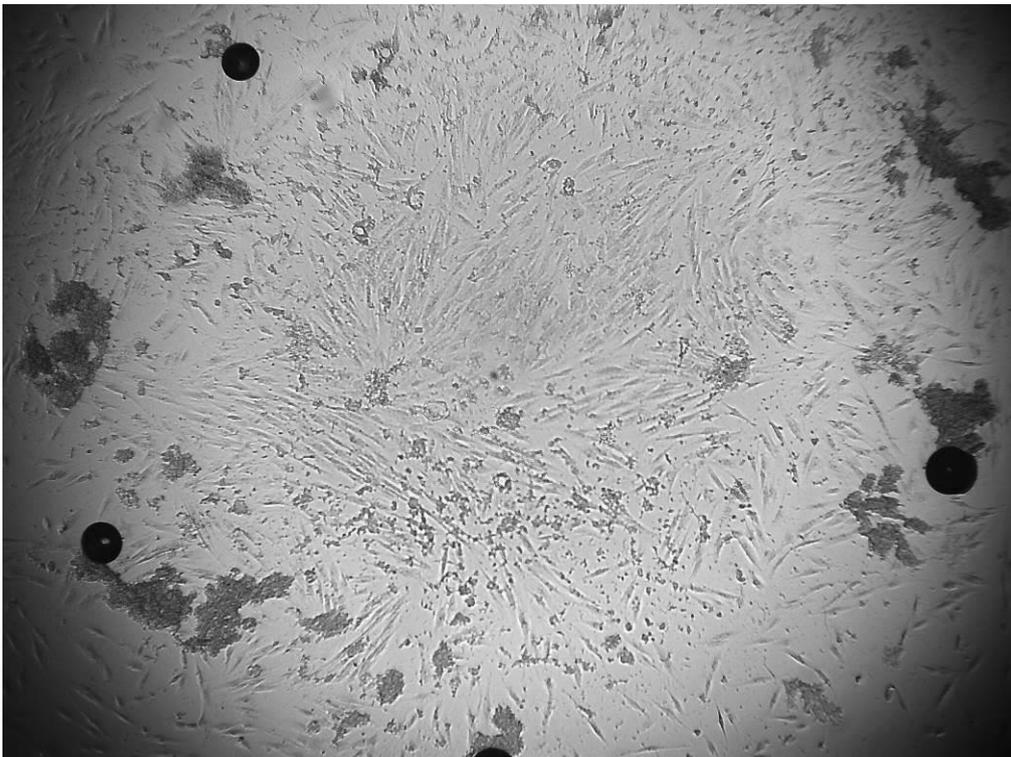


Abbildung 3.16 GF bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit CHX unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung

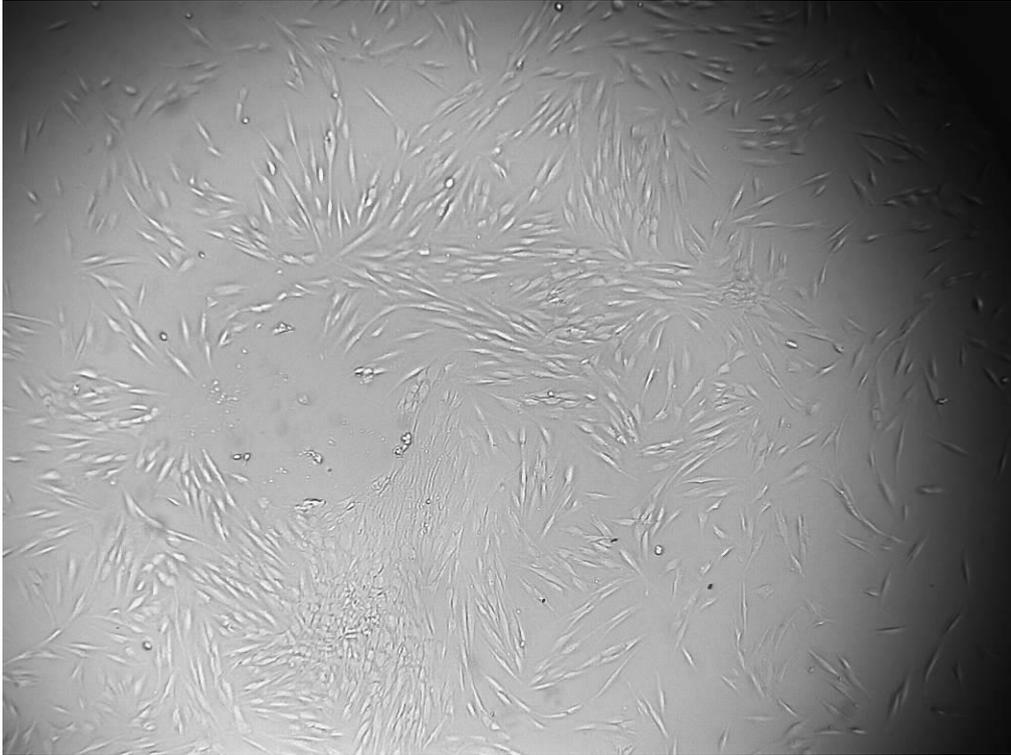


Abbildung 3.17 GF bei direkter Behandlung mit PBS unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung

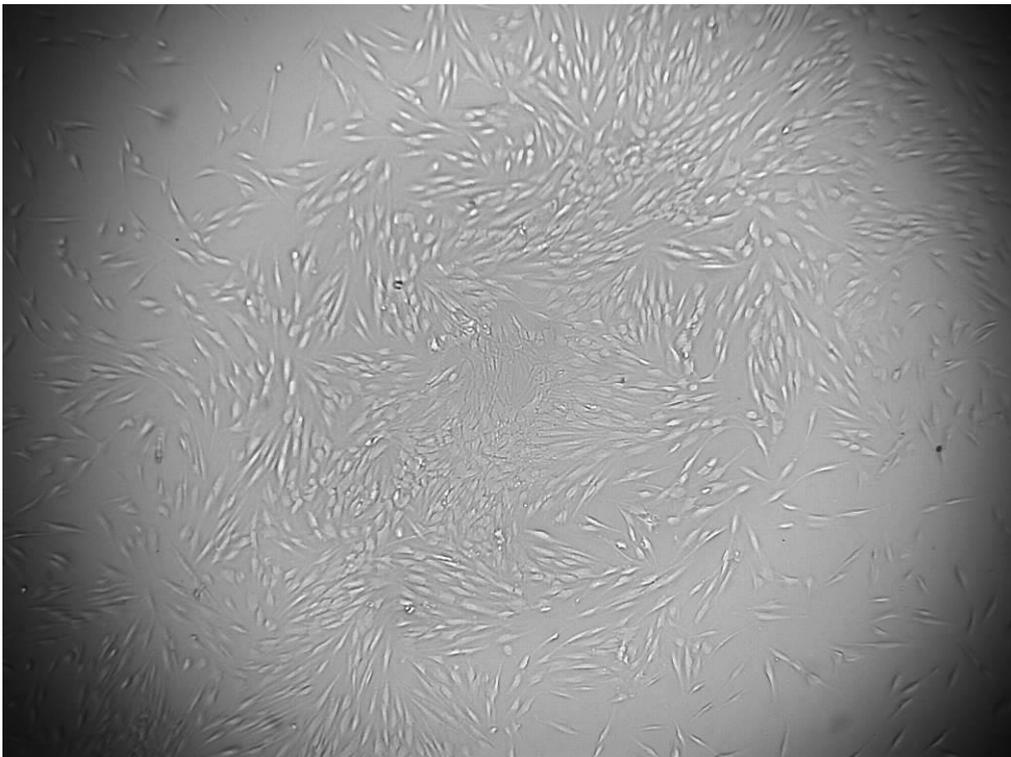


Abbildung 3.18 GF bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit PBS unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung

3.2.2. Mäusefibroblasten (L929)

Auf den kommenden Seiten werden Bilder von L929 Zellen nach den jeweiligen Behandlungen abgelichtet. Die Aufnahmen wurden bei einer 10-fachen Vergrößerung unter dem Mikroskop gemacht. Das erste Bild der jeweiligen Seite entspricht der direkten Behandlung der Zellen während das zweite Bild die indirekte Behandlung durch das Dentinscheibchen wiedergibt. Abbildung 3.19 entspricht der unbehandelten Kontrollgruppe.

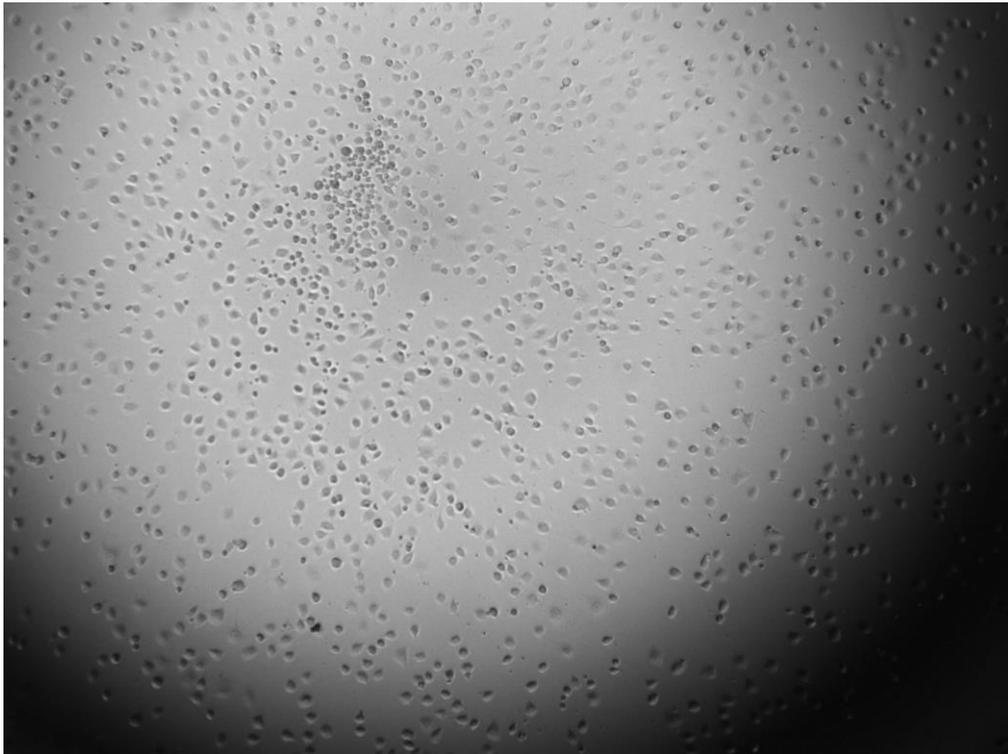


Abbildung 3.19 L929 bei un behandelter Kontrollgruppe unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung



Abbildung 3.20 L929 bei direkter Behandlung mit Diodenlaser unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung

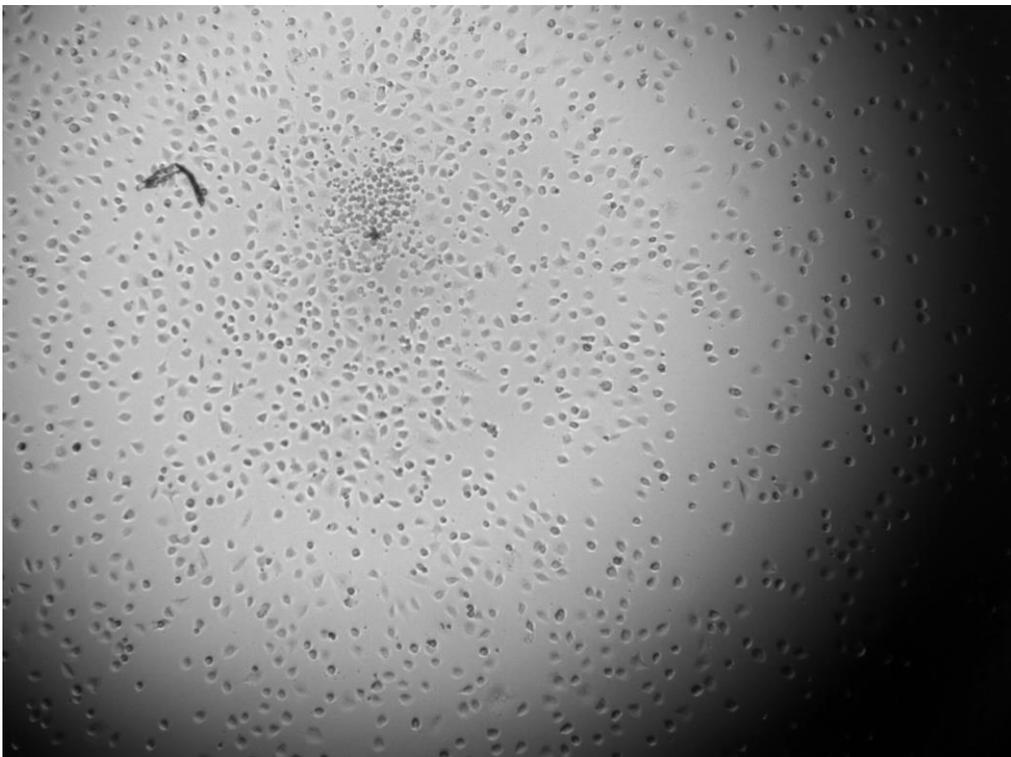


Abbildung 3.21 L929 bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit Diodenlaser unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung

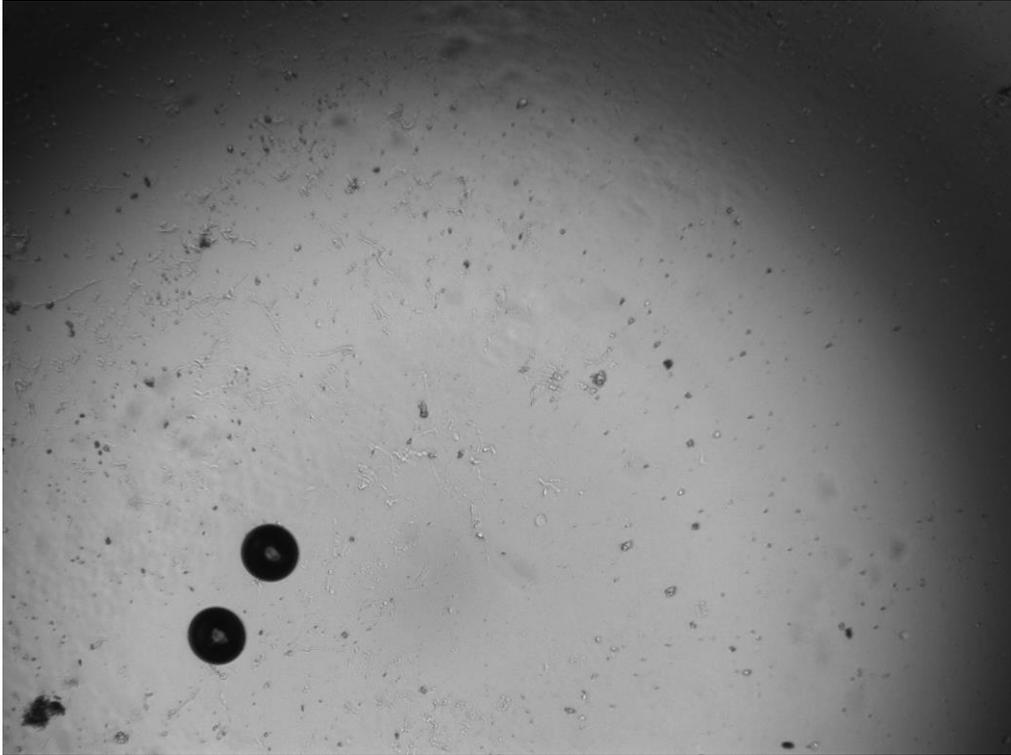


Abbildung 3.22 L929 bei direkter Behandlung mit Er:YAG-Laser unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung

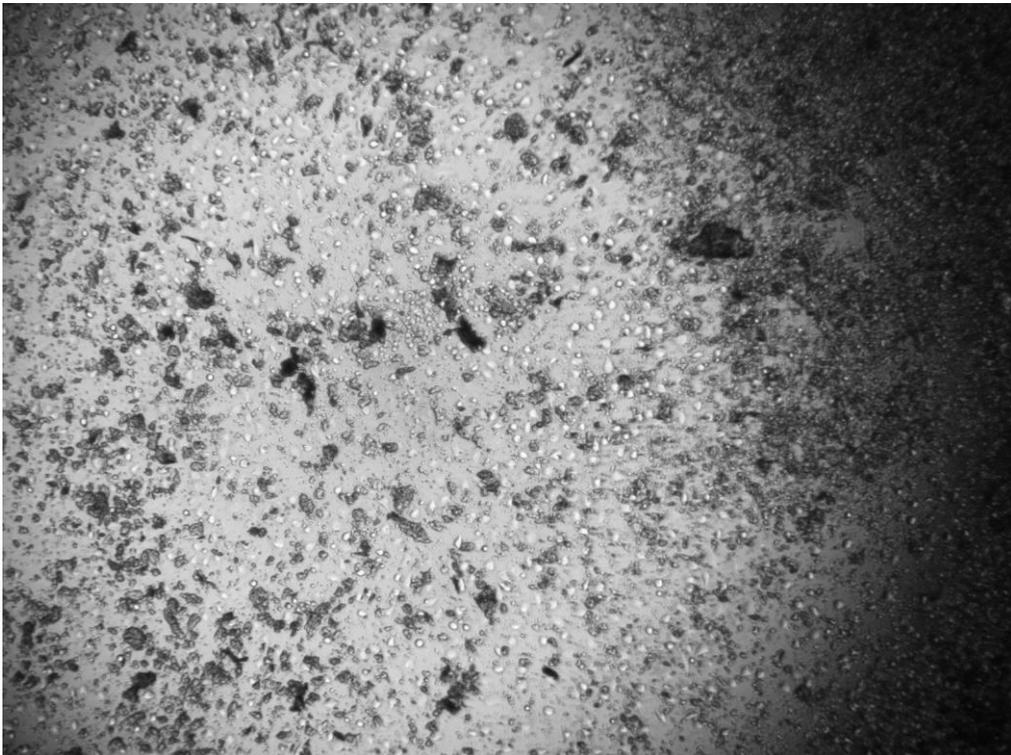


Abbildung 3.23 L929 bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit Er:YAG-Laser unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung

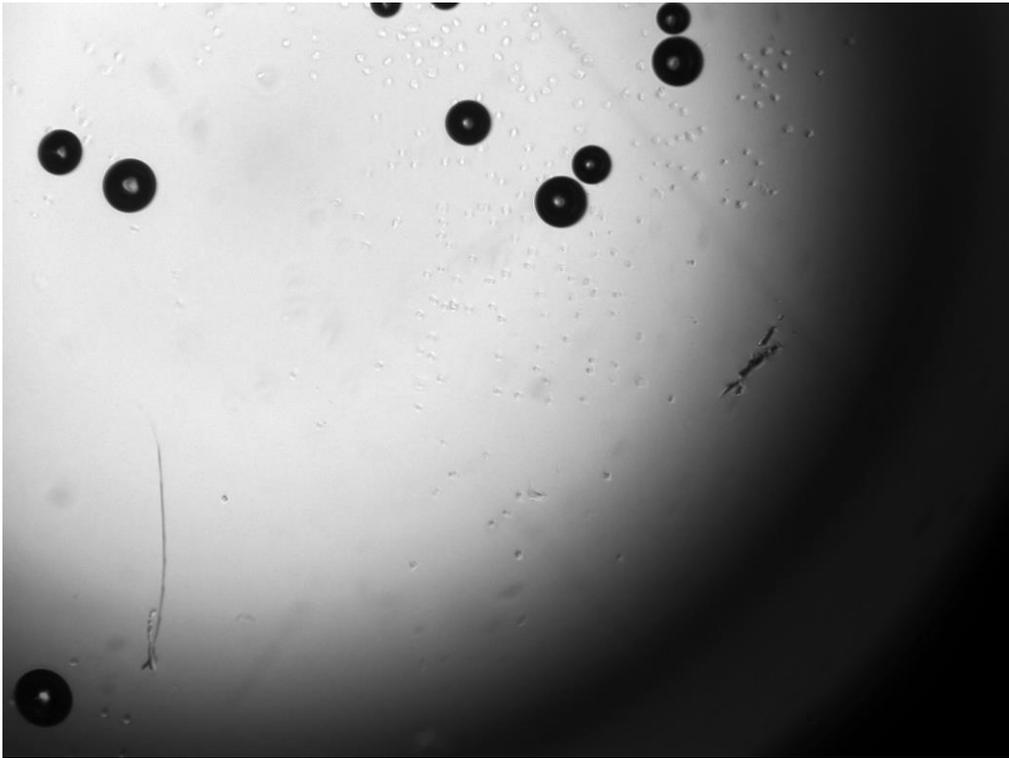


Abbildung 3.24 L929 bei direkter Behandlung mit NaOCl unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung

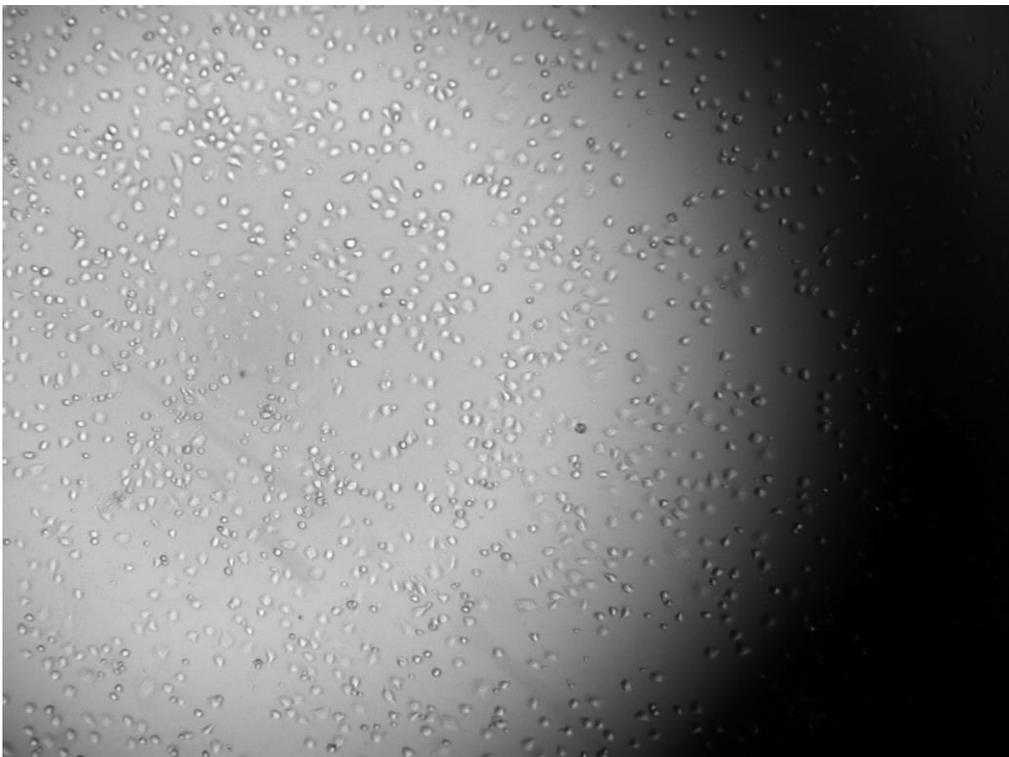


Abbildung 3.25 L929 bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit NaOCl unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung

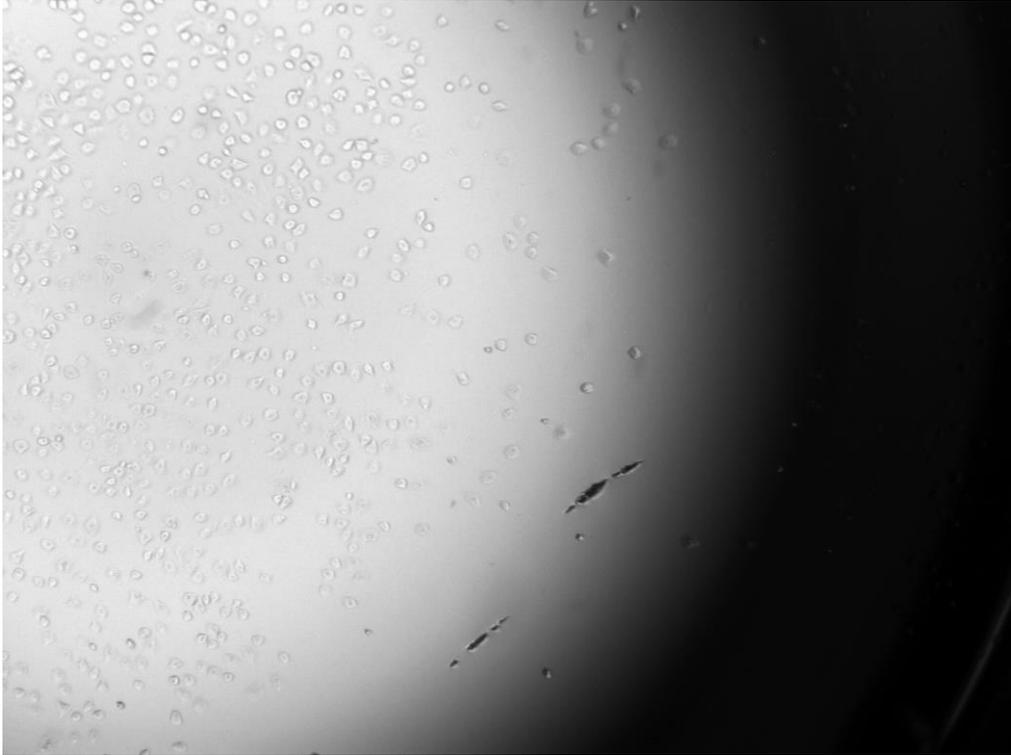


Abbildung 3.26 L929 bei direkter Behandlung mit CHX unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung



Abbildung 3.27 L929 bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit CHX unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung



Abbildung 3.28 L929 bei direkter Behandlung mit PBS unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung



Abbildung 3.29 L929 bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit PBS unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung

3.2.3. Osteoblastäre Zellen (MG-63)

Auf den kommenden Seiten werden Bilder von MG-63 Zellen nach den jeweiligen Behandlungen abgelichtet. Die Aufnahmen wurden bei einer 10-fachen Vergrößerung unter dem Mikroskop gemacht. Das erste Bild der jeweiligen Seite entspricht der direkten Behandlung der Zellen während das zweite Bild die indirekte Behandlung durch das Dentinscheibchen wiedergibt. Abbildung 3.30 entspricht der unbehandelten Kontrollgruppe.

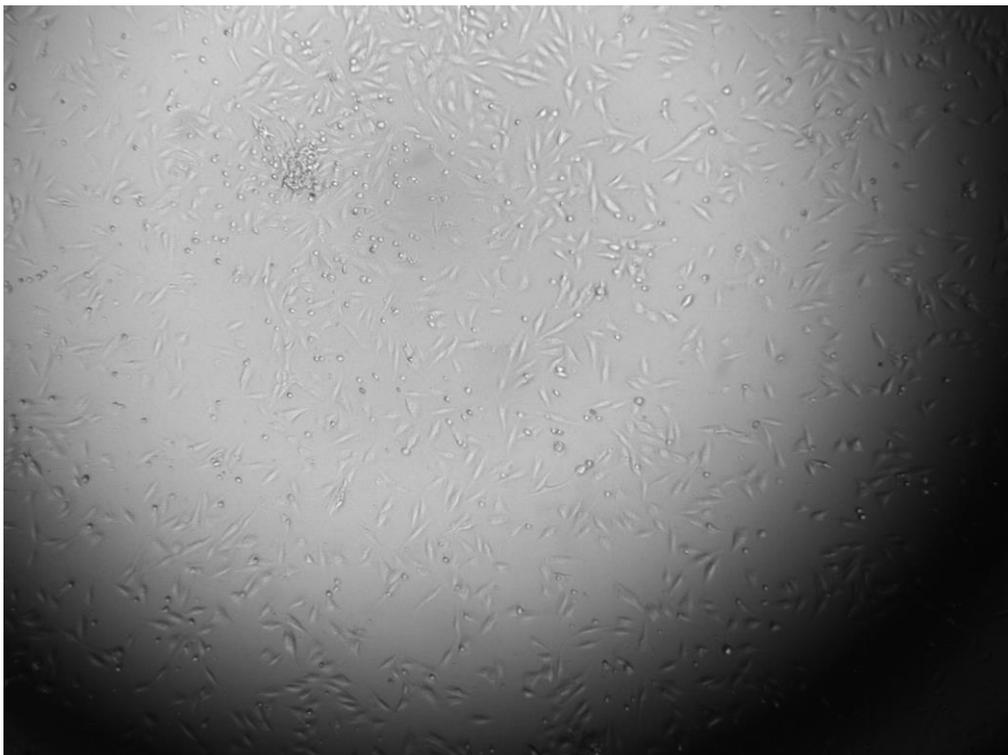


Abbildung 3.30 MG-63 bei unbehandelter Kontrollgruppe unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung



Abbildung 3.31 MG-63 bei direkter Behandlung mit Diodenlaser unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung

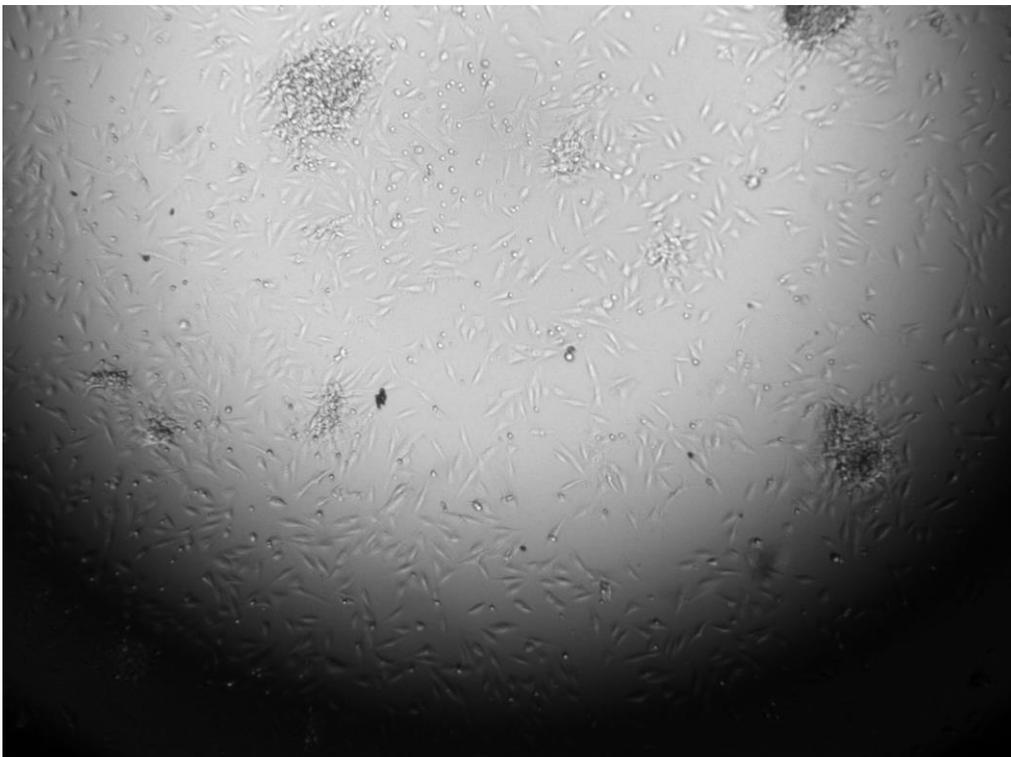


Abbildung 3.32 MG-63 bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit Diodenlaser unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung

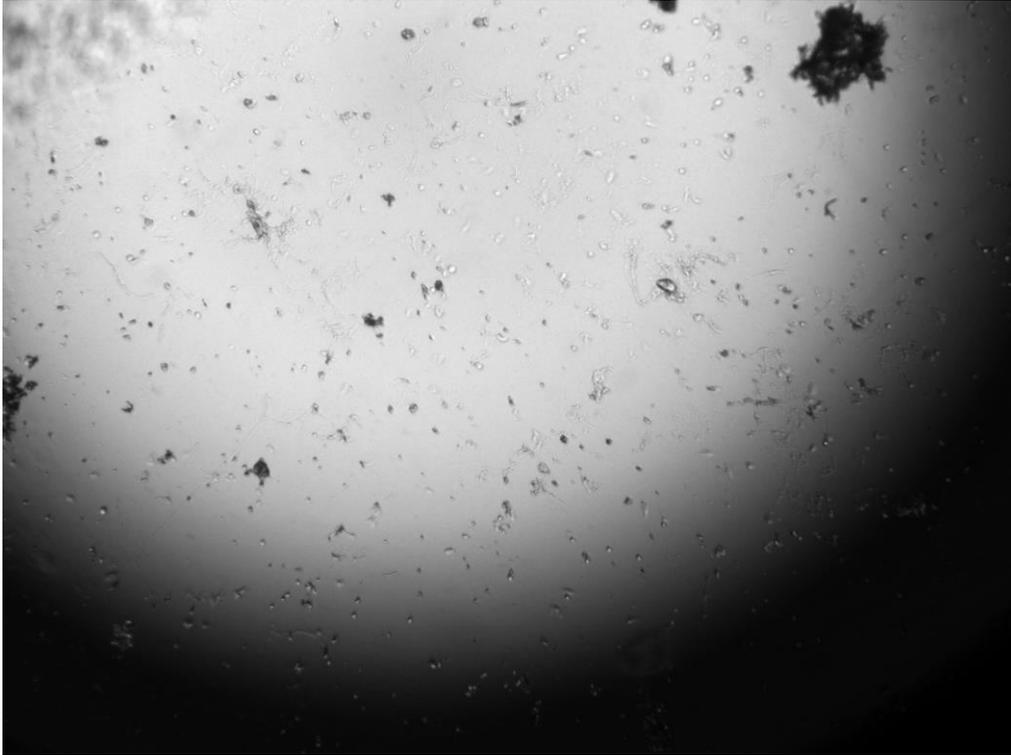


Abbildung 3.33 MG-63 bei direkter Behandlung mit Er:YAG-Laser unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung

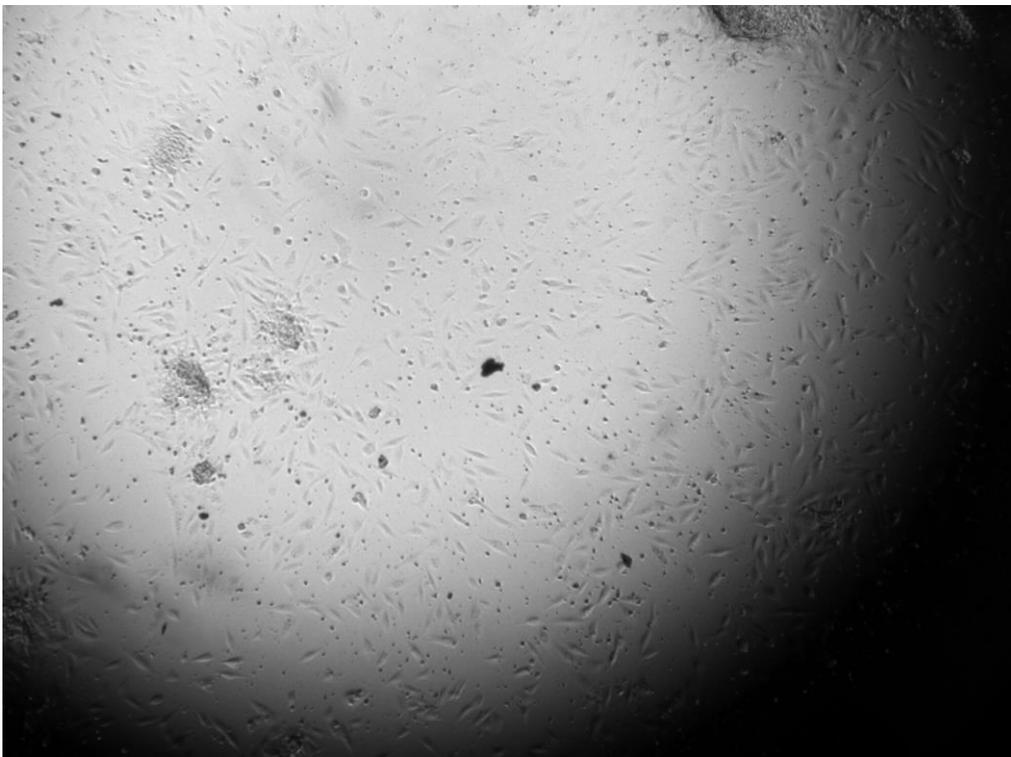


Abbildung 3.34 MG-63 bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit Er:YAG-Laser unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung

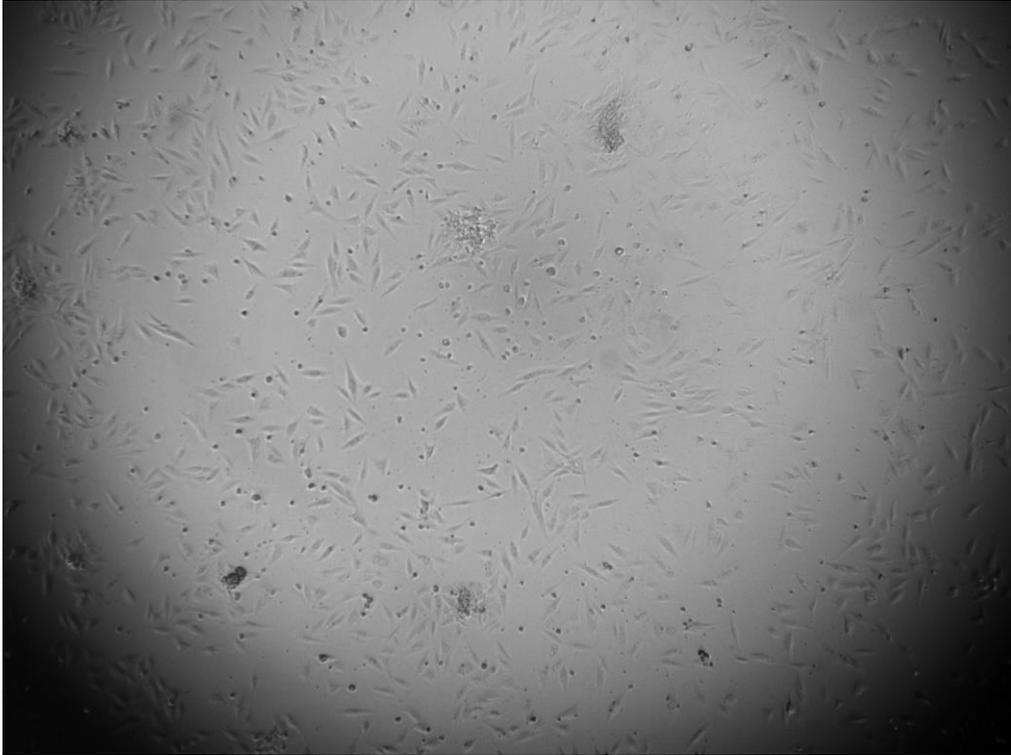


Abbildung 3.35 MG-63 bei direkter Behandlung mit NaOCl unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung



Abbildung 3.36 MG-63 bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit NaOCl unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung



Abbildung 3.37 MG-63 bei direkter Behandlung mit CHX unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung

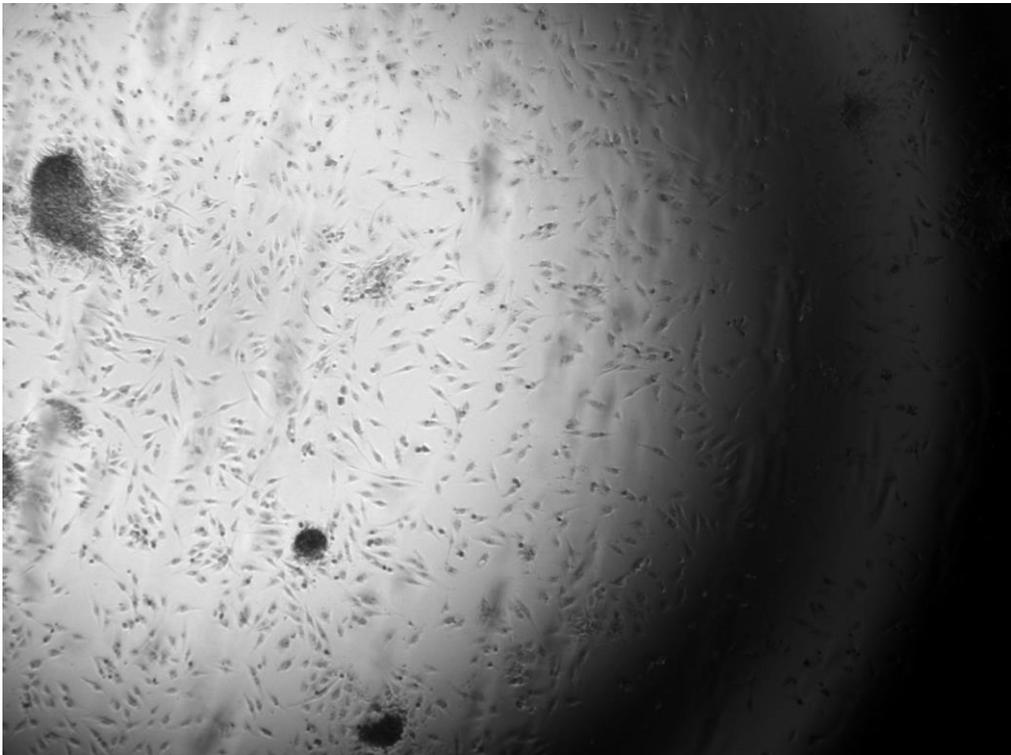


Abbildung 3.38 MG-63 bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit CHX unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung



Abbildung 3.39 MG-63 bei direkter Behandlung mit PBS unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung

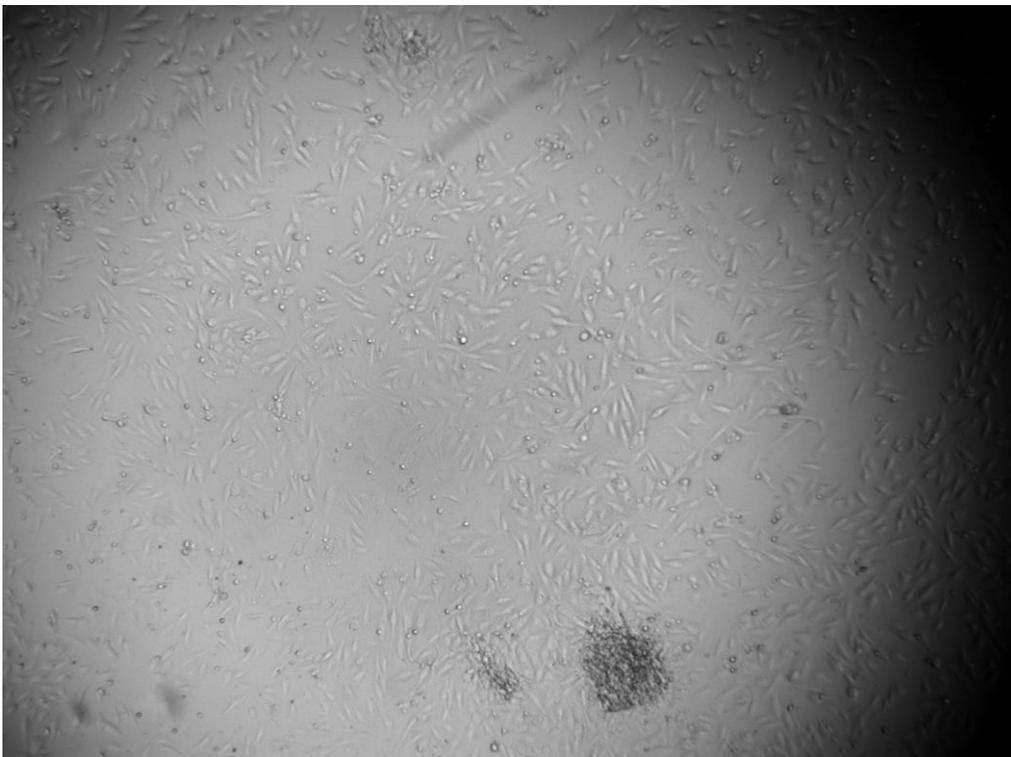


Abbildung 3.40 MG-63 bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit PBS unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung

4. Diskussion

Datenzusammenfassung

Um den Einfluss von Er:YAG-Laser, Diodenlaser, CHX- und NaOCl-Spülung auf gingivale Fibroblasten, osteoblastäre Zellen, sowie auf Mäusefibroblasten zu erforschen, wurden die jeweiligen Zellen jeweils direkt bzw. indirekt durch ein Dentinscheibchen behandelt. Die Ergebnisse belegen, dass die Viabilität aller für die Versuche verwendeten Zellen bei allen Behandlungsgruppen „in vitro“ reduziert wurde. Speziell die Viabilität der direkt behandelten Zellen wurde stark reduziert.

Durch unsere Ergebnisse konnten wir unser Verständnis über die Vorgänge im Parodont im Zuge einer endodontisch durchgeführten Therapie mittels Er:YAG-Laser, Diodenlaser, CHX- und NaOCl-Spülung dahingehend erweitern, als dass es neben den toxischen Wirkungen von CHX und NaOCl bei direkter Anwendung auf die Zellen (87-90), auch Hinweise gibt, die für eine toxische Wirkung auf Zellen bei direkter Behandlung durch Er:YAG-Laser und Diodenlaser mit den von uns gewählten endodontischen Einstellungen gab. Somit zeigen unsere Resultate die Notwendigkeit einer weiteren Erforschung der Effekte vom endodontischen Einsatz von Er:YAG-Laser und Diodenlaser.

Derzeitige Studienlage

Bei der zytotoxischen Wirkung von NaOCl und CHX auf alle 3 Zelllinien decken sich die Ergebnisse dieser Studie mit der derzeitigen Studienlage. Die viabilitätsreduzierende Wirkung von speziell NaOCl auf Zellen ist schon länger bekannt (90). Auch bei CHX gibt es einen zytotoxischen Effekt (88).

Dieser zytotoxische Effekt wurde unter anderem bei einer Studie mit parodontalen Fibroblasten nachgewiesen. In dieser Studie wurden sowohl CHX als auch NaOCl getestet. Der zytotoxische Effekt war dabei bei CHX auf die parodontalen Fibroblasten nicht so stark ausgeprägt wie bei NaOCl (89).

Die Ergebnisse unserer Studie würden hingegen eine stärkere zytotoxische Wirkung von CHX im Vergleich zu NaOCl nahelegen. Gründe für diese Datenlage könnten in den verwendeten Konzentrationen bzw. Wirkdauern der beiden Spüllösungen liegen. Dies beiden Faktoren beeinflussen deren zytotoxisches Potential entscheidend (89).

Bei Laseranwendung liegen viele Studien über deren antibakterielle Eigenschaften vor (78). Die Lasertherapie sei ein exzellentes Adjuvants in der endodontischen Therapie (78). Jedoch konnten in den meisten dieser Studien die alleinige Laseranwendung in der Endodontie nicht als vollständiger Ersatz mit signifikanten Verbesserungen gegenüber Spüllösungen bestätigt werden (57, 78-80).

Studien bezüglich deren Eigenschaften auf Zellen bei endodontischer Behandlung sind nicht so häufig (91).

Um der klinischen Situation im „in vitro“-Versuch näher zu kommen, wurde ein Dentinscheibchen als Simulation verwendet. Ähnliche endodontische Studien mit Zahnhartsubstanz liegen bereits vor (61).

Die Konstellation für diese Studie gewählten Lasereinstellungen, Zellarten und Studiendesign mit Dentinscheibchen liegen in der Literatur noch nicht vor und erweitern die momentane Studiensituation. Es ergeben sich neue und differenziertere Aussagen als bei bisherigen endodontischen Studien durch etwaige Behandlungen.

Studienlimitierung

Diese Studie zeigt die Wirkung von Er:YAG-Laser, Diodenlaser, CHX- und NaOCl-Spülung direkt auf Zellen bzw. durch ein Dentinscheibchen im „in vitro“-Versuch. Per Definition ist ein in „in vitro“-Versuch ein Versuch in „kontrolliert künstlicher Umgebung außerhalb des lebenden Organismus“ (10). Aus dieser Definition kann abgeleitet werden, dass diese „kontrolliert künstliche Umgebung“ eine andere und vereinfachte Lebenssituation der Zellen im Vergleich zum menschlichen Organismus darstellt. Der menschliche Zahnhalteapparat stellt ein komplexes Gefüge dar, welches sich nur unzureichend in Laborstudien wiedergeben lässt.

Weiters wurden in dieser Studie Dentinscheibchen von einheitlicher Dicker von 1 mm für die Versuche verwendet. Die Situation im menschlichen Körper ist eine andere. Aufgrund der Morphologie des menschlichen Zahnes ob Incisivus, Prämolare oder Molare bestehen alle Zähne aus einem dickeren koronalen Querschnitt der Wurzel und damit breiter Dentinschicht, zusammenlaufend Richtung Wurzelspitze mit dünnerem Querschnitt und verminderter Dentinschichtdicke (92). Somit ergeben sich bei der endodontischen Behandlung im Mund je nach Lokalisation im Wurzelkanal unterschiedliche Dentinschichtdicken zu den umliegenden Zellen des Parodonts, die für unsere Studie verwendet wurden. Folglich treffen unsere Ergebnisse nur für eingeschränkte Bereiche des Zahnes zu in dem eine ähnliche

Dentinschichtdicke vorliegt wie bei dieser Studie gewählten Dentinschichtdicke von 1 mm. Jedoch aufgrund der Notwendigkeit einer Standardisierung wurde diese Dentinschichtdicke gewählt. Wie weit unterschiedliche Dentinschichtdicken die Ergebnisse beeinflussen würden, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Diese Studie behandelt die Auswirkung der endodontischen Behandlung auf speziell ausgewählte Zelllinien. Diese 3 Zelllinien wurden aufgrund ihres bereits längeren Einsatzes im Bereich Zellzytotoxizitätstests, ihrer relativ guten Kultivierbarkeit bzw. starkem Wachstums ausgewählt (14, 15, 22, 23). Zwei dieser Zelllinien nämlich MG-63 und L929 stammen aus malignen Tumorzellen. Richtig angewendet geben diese beiden Zellen im Vergleich zu ihren primären benignen Zellen eine brauchbare in vitro Situation für Zellstudienmodelle her, ersetzen die primäre Zellstudie jedoch auf keinen Fall (15).

Die für diese Versuche gewählten Lasereinstellungen waren für Er:YAG-Laser bei 50 mJ, 20 Hz, 1 Watt und für den Diodenlaser 100 mJ, 15 Hz bei durchschnittlicher Leistung von 1,5 Watt. Ergebnisse dieser Studie auf die verwendeten Zellen können nur in diesem Einstellungsbereich Gültigkeit erlangen. Um Einblicke in die Zellreaktion in anderen Einstellungsbereichen zu erlangen, wären weitere Studien von Nöten.

Weiters spielt die zeitliche Einwirkdauer von NaOCl und CHX einen entscheidenden Faktor auf das zytotoxische Verhalten der beiden Substanzen (89). Folglich gelten die Ergebnisaussagen dieser Studie bei den ausgewählten Spüllösungen CHX und NaOCl im Bereich der für diese Studie verwendeten Konzentrationen der beiden Spüllösungen bzw. der angewendeten Wirkdauer von 20 Sekunden. Beide Faktoren – Konzentration und Wirkdauer – sind entscheidende Faktoren bei deren zytotoxischen Verhalten (89).

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit auch nicht geklärt wie Er:YAG-Laser, Diodenlaser, CHX- und NaOCl-Spülung auf andere Komponenten des Körpers, wie beispielsweise andere Zellen, wirken.

Aufgrund dieser großen Vielfalt an Limitierungen dieser „in vitro“-Studie lassen sich nur begrenzt Aussagen über die womöglichen Reaktionen einer endodontischen Behandlungen mit Er:YAG-Laser, Diodenlaser, CHX- und NaOCl-Spülung auf das parodontale Gewebe „in vivo“ treffen.

Dennoch liefert diese Studie einen weiteren wichtigen Beitrag dazu, die endodontische Behandlung mit Er:YAG-Laser, Diodenlaser, CHX- und NaOCl-Spülung im „in-vitro“-Versuch besser zu verstehen und „in-vivo“-Versuchen als Datengrundlage zu dienen.

Klinische Relevanz

Unsere Versuchsergebnisse könnten in einigen Punkten eine gewisse klinische Relevanz haben. Es konnte gezeigt werden, dass der direkte Kontakt von Zellen und Spüllösungen mit sehr großen Viabilitätsreduktionen einhergeht. Klinisch könnte diese Viabilitätsreduktion im schlimmsten Fall zu größeren Nekrosen führen. Somit konnte gezeigt werden, dass der direkte Einsatz von Spüllösungen im periapikalen Bereich, also ein Einsatz über den Apex des Wurzelkanals hinaus, absolut zu vermeiden ist.

Dasselbe könnte für den Einsatz mit Er:YAG-Laser und Diodenlaser angenommen werden. Auch bei diesen beiden Lasern hat man in den direkten Behandlungsgruppen eine deutliche, wenn auch nicht so starke Viabilitätsreduktion der Zellen im Vergleich zu den Spüllösungen, den Daten entnehmen können. Auch dies könnte einen Einsatz der beiden Laser mit den gewählten Einstellungen über den Apex des Wurzelkanals hinaus als kontraindiziert zeigen.

Weiters könnte es interessant sein, dass bei den indirekten Behandlungsgruppen durch Dentin ein gewisser zytotoxischer Effekt bei NaOCl und CHX vorhanden blieb, bei den Behandlungen mit Er:YAG-Laser und Diodenlaser jedoch kein zytotoxischer Effekt mehr zu beobachten war.

Auch die viabilitätsstimulierende Tendenz die bei Diodenlaser auf MG-63 bei dieser Studie gezeigt werden konnte, könnte klinisch interessant sein. Den Diodenlaser einerseits antibakteriell endodontisch zu nutzen während er gleichzeitig die Regeneration der geschädigten Zellen fördert und der Viabilität stimuliert.

Schlussfolgerung

Nach unseren Untersuchungen und basierend auf unseren Daten konnten wir zeigen, dass es einen Einfluss von Er:YAG-Laser, Diodenlaser, CHX- und NaOCl-Spülung auf die Viabilität von osteoblastären Zellen (MG-63), Mäusefibroblasten (L929) und Gingiva Fibroblasten (GF) im „in vitro“-Versuch gibt. Vor allem durch deren direkte Behandlung kommt es zu einer Reduktion der Viabilität in allen 3 Zelllinien. Bei Behandlung durch ein normiertes Dentinscheibchen wurde die Zytotoxizität der jeweiligen Behandlung abgeschwächt, blieb aber in gewissem Maße bei CHX und NaOCl immer vorhanden. Bei der Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit Diodenlaser konnte bei MG-63 Zellen eine Tendenz zur Viabilitätssteigerung beobachtet werden. Um den Einfluss von Er:YAG-Laser, Diodenlaser,

CHX- und NaOCl-Spülung bei der endodontischen Behandlung auf das umliegende Parodont noch besser beurteilen zu können, sind weitere Studien notwendig. Des Weiteren sollten präklinische Studien durchgeführt werden, um konkrete Möglichkeiten und Grenzen der klinischen Anwendung aufzuzeigen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	parodontale Strukturen	9
Abbildung 1.2	Weines Klassifikation der Wurzelkanalkonfigurationen	15
Abbildung 1.3	Wechselwirkung von Licht und Materie.....	24
Abbildung 1.4	Eigenschaften klassischer Lichtquellen vs. Laserstrahlung	24
Abbildung 1.5	kontinuierlicher Laserbetrieb	26
Abbildung 1.6	getakteter Laserbetrieb	26
Abbildung 1.7	gepulster Laserbetrieb	27
Abbildung 2.1	schematische Darstellung eines Zählplättchens DHC-NO1	38
Abbildung 2.2	schematischer Aufbau der 1. 96-Well-Platte eines Hauptversuches	39
Abbildung 2.3	schematischer Aufbau der 2. 96-Well-Platte eines Hauptversuches	39
Abbildung 2.4	schematischer Aufbau der 3. 96-Well-Platte eines Hauptversuches	40
Abbildung 2.5	Schematische Darstellung einer Well aus einer 96-Well-Platte, wie sie für die Versuche mit Dentinscheibchen verwendet wurden.....	40
Abbildung 3.1	Ergebnisse der Viabilitätsmessungen von GF nach den jeweiligen Behandlungen relativ zur unstimulierten Kontrolle (=100). Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung.....	43
Abbildung 3.2	Ergebnisse der Viabilitätsmessungen von L929 nach den jeweiligen Behandlungen relativ zur unstimulierten Kontrolle (=100). Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung.....	46
Abbildung 3.3	Ergebnisse der Viabilitätsmessungen von MG-63 nach den jeweiligen Behandlungen relativ zur unstimulierten Kontrolle (=100). Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung.....	49
Abbildung 3.4	Ergebnisse der Viabilitätsmessungen aller 3 Zelllinien nach direkter und indirekter Behandlung. Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung	53
Abbildung 3.5	Ergebnisse der Viabilitätsmessungen aller 3 Zelllinien nach der jeweiligen Behandlung. Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung	54

Abbildung 3.6	Ergebnisse der Viabilitätsmessungen aller 3 Zelllinien nach der Behandlung mit den Lasern im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung.....	54
Abbildung 3.7	Ergebnisse der Viabilitätsmessungen aller 3 Zelllinien bei den 3 Kontrollgruppen. Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung.....	55
Abbildung 3.8	GF bei unbehandelter Kontrollgruppe unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	56
Abbildung 3.9	GF bei direkter Behandlung mit Diodenlaser unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung	57
Abbildung 3.10	GF bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit Diodenlaser unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	57
Abbildung 3.11	GF bei direkter Behandlung mit Er:YAG-Laser unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	58
Abbildung 3.12	GF bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit Er:YAG-Laser unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung	58
Abbildung 3.13	GF bei direkter Behandlung mit NaOCl unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	59
Abbildung 3.14	GF bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit NaOCl unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	59
Abbildung 3.15	GF bei direkter Behandlung mit CHX unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	60
Abbildung 3.16	GF bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit CHX unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	60
Abbildung 3.17	GF bei direkter Behandlung mit PBS unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung	61
Abbildung 3.18	GF bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit PBS unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	61
Abbildung 3.19	L929 bei unbehandelter Kontrollgruppe unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	62

Abbildung 3.20	L929 bei direkter Behandlung mit Diodenlaser unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung	63
Abbildung 3.21	L929 bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit Diodenlaser unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	63
Abbildung 3.22	L929 bei direkter Behandlung mit Er:YAG-Laser unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	64
Abbildung 3.23	L929 bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit Er:YAG-Laser unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung	64
Abbildung 3.24	L929 bei direkter Behandlung mit NaOCl unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	65
Abbildung 3.25	L929 bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit NaOCl unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	65
Abbildung 3.26	L929 bei direkter Behandlung mit CHX unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	66
Abbildung 3.27	L929 bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit CHX unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	66
Abbildung 3.28	L929 bei direkter Behandlung mit PBS unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	67
Abbildung 3.29	L929 bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit PBS unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	67
Abbildung 3.30	MG-63 bei unbehandelter Kontrollgruppe unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	68
Abbildung 3.31	MG-63 bei direkter Behandlung mit Diodenlaser unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	69
Abbildung 3.32	MG-63 bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit Diodenlaser unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	69
Abbildung 3.33	MG-63 bei direkter Behandlung mit Er:YAG-Laser unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	70
Abbildung 3.34	MG-63 bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit Er:YAG-Laser unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung	70

Abbildung 3.35	MG-63 bei direkter Behandlung mit NaOCl unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung	71
Abbildung 3.36	MG-63 bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit NaOCl unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	71
Abbildung 3.37	MG-63 bei direkter Behandlung mit CHX unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	72
Abbildung 3.38	MG-63 bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit CHX unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	72
Abbildung 3.39	MG-63 bei direkter Behandlung mit PBS unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	73
Abbildung 3.40	MG-63 bei indirekter Behandlung durch ein Dentinscheibchen mit PBS unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung.....	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	zahnmedizinische Laser und deren charakteristischen Wellenlängen	29
Tabelle 3.1	Unterschiede der jeweiligen Behandlungsgruppe im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe „Dentin“	52

Literaturverzeichnis

1. Touré B, Faye B, Kane AW, Lo CM, Niang B, Boucher Y. Analysis of reasons for extraction of endodontically treated teeth: a prospective study. *J Endod.* 2011;37(11):1512-5.
2. Ng YL, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of non-surgical root canal treatment: part 2: tooth survival. *Int Endod J.* 2011;44(7):610-25.
3. Sakamoto M, Siqueira JF, Rôças IN, Benno Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23(4):275-81.
4. Fleming CH, Litaker MS, Alley LW, Eleazer PD. Comparison of classic endodontic techniques versus contemporary techniques on endodontic treatment success. *J Endod.* 2010;36(3):414-8.
5. Fedorowicz Z, Nasser M, Sequeira-Byron P, de Souza RF, Carter B, Heft M. Irrigants for non-surgical root canal treatment in mature permanent teeth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;9:CD008948.
6. Cheng X, Guan S, Lu H, Zhao C, Chen X, Li N, et al. Evaluation of the bactericidal effect of Nd:YAG, Er:YAG, Er,Cr:YSGG laser radiation, and antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in experimentally infected root canals. *Lasers Surg Med.* 2012;44(10):824-31.
7. Asnaashari M, Safavi N. Disinfection of Contaminated Canals by Different Laser Wavelengths, while Performing Root Canal Therapy. *J Lasers Med Sci.* 2013;4(1):8-16.
8. Mohammadi Z. Laser applications in endodontics: an update review. *Int Dent J.* 2009;59(1):35-46.
9. Rateitschak H K WHF. *Farbatlantent der Zahnmedizin: Parodontologie.* Stuttgart: Thieme Verlag Stuttgart; 2004.
10. Junqueira LCU CJ. *Histologie.* Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 2004.
11. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.* 2002;8(3):147-59.
12. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* 2011;26(2):229-38.
13. Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem.* 2012;45(12):863-73.
14. Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards RG, Hayes JS. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *Eur Cell Mater.* 2012;24:1-17.
15. Czekanska EM, Stoddart MJ, Ralphs JR, Richards RG, Hayes JS. A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing. *J Biomed Mater Res A.* 2014;102(8):2636-43.
16. Phipps RP, Borrello MA, Blieden TM. Fibroblast heterogeneity in the periodontium and other tissues. *J Periodontal Res.* 1997;32(1 Pt 2):159-65.
17. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-7.
18. Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res.* 1988;67(1):66-70.
19. Hou LT, Yaeger JA. Cloning and characterization of human gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol.* 1993;64(12):1209-18.
20. Brétagneol F, Rauscher H, Hasiwa M, Kylián O, Ceccone G, Hazell L, et al. The effect of sterilization processes on the bioadhesive properties and surface chemistry of a plasma-polymerized polyethylene glycol film: XPS characterization and L929 cell proliferation tests. *Acta Biomater.* 2008;4(6):1745-51.

21. Serrano MC, Pagani R, Peña J, Portolés MT. Transitory oxidative stress in L929 fibroblasts cultured on poly(epsilon-caprolactone) films. *Biomaterials*. 2005;26(29):5827-34.
22. Faria G, Cardoso CR, Larson RE, Silva JS, Rossi MA. Chlorhexidine-induced apoptosis or necrosis in L929 fibroblasts: A role for endoplasmic reticulum stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;234(2):256-65.
23. Nordin M, Wieslander A, Martinson E, Kjellstrand P. Effects of exposure period of acetylsalicylic acid, paracetamol and isopropanol on L929 cytotoxicity. *Toxicol In Vitro*. 1991;5(5-6):449-50.
24. Taniguchi T, Shimizu M, Nakamura H, Hirabayashi T, Fujino H, Murayama T. Hydrogen peroxide-induced arachidonic acid release in L929 cells; roles of Src, protein kinase C and cytosolic phospholipase A2alpha. *Eur J Pharmacol*. 2006;546(1-3):1-10.
25. Roelofs B, Tidball A, Lindborg AE, TenHarmsel A, Vander Kooy TO, Louters LL. Acute activation of glucose uptake by glucose deprivation in L929 fibroblast cells. *Biochimie*. 2006;88(12):1941-6.
26. HE S. *Orale Strukturbiologie*. Stuttgart: Thieme; 2000.
27. Hellwig E KJ, Attin T. *Einführung in die Zahnerhaltung - Prüfungswissen Kariologie, Endodontologie und Parodontologie*. Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag; 1995.
28. Alley BS, Kitchens GG, Alley LW, Eleazer PD. A comparison of survival of teeth following endodontic treatment performed by general dentists or by specialists. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;98(1):115-8.
29. Tilashalski KR, Gilbert GH, Boykin MJ, Shelton BJ. Root canal treatment in a population-based adult sample: differences in patient factors and types of teeth treated between endodontists and general dentists. *Community Dent Health*. 2006;23(1):21-5.
30. Cheung GS, Chan TK. Long-term survival of primary root canal treatment carried out in a dental teaching hospital. *Int Endod J*. 2003;36(2):117-28.
31. Cheung GS. Survival of first-time nonsurgical root canal treatment performed in a dental teaching hospital. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;93(5):596-604.
32. Sharma R, Srivastava A. Radiographic evaluation of dental age of adults using Kvaal's method. *J Forensic Dent Sci*. 2010;2(1):22-6.
33. Zhang C, Hou BX, Zhao HY, Sun Z. Microbial diversity in failed endodontic root-filled teeth. *Chin Med J (Engl)*. 2012;125(6):1163-8.
34. Moritz A BF, Goharkhay K, Schoop U. *Orale Lasertherapie: Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin; 2006*.
35. Willershausen B, Kasaj A, Willershausen I, Zahorka D, Briseño B, Blettner M, et al. Association between chronic dental infection and acute myocardial infarction. *J Endod*. 2009;35(5):626-30.
36. Stashenko P, Yu SM, Wang CY. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J Endod*. 1992;18(9):422-6.
37. Poertzel E, Petschelt A. [Bacteria in the root canal wall of gangrenous pulp]. *Dtsch Zahnärztl Z*. 1986;41(8):772-7.
38. Katz A, Tamse A, Kaufman AY. Tooth length determination: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1991;72(2):238-42.
39. Gutmann JL, Leonard JE. Problem solving in endodontic working-length determination. *Compend Contin Educ Dent*. 1995;16(3):288, 90, 93-4 passim; quiz 304.
40. Ahmad IA. Rubber dam usage for endodontic treatment: a review. *Int Endod J*. 2009;42(11):963-72.
41. H. D. *Endodontie, Praxis der Zahnheilkunde*. München: Urban & Fischer Verlag; 2001.

42. McComb D, Smith DC, Beagrie GS. The results of in vivo endodontic chemomechanical instrumentation--a scanning electron microscopic study. *J Br Endod Soc.* 1976;9(1):11-8.
43. Kandaswamy D, Venkateshbabu N. Root canal irrigants. *J Conserv Dent.* 2010;13(4):256-64.
44. Basrani B. Irrigation in endodontic treatment. *Alpha Omegan.* 2011;104(1-2):18-25.
45. Marending M, Luder HU, Brunner TJ, Knecht S, Stark WJ, Zehnder M. Effect of sodium hypochlorite on human root dentine--mechanical, chemical and structural evaluation. *Int Endod J.* 2007;40(10):786-93.
46. Neelakantan P, Varughese AA, Sharma S, Subbarao CV, Zehnder M, De-Deus G. Continuous chelation irrigation improves the adhesion of epoxy resin-based root canal sealer to root dentine. *Int Endod J.* 2012;45(12):1097-102.
47. Lotfi M, Vosoughhosseini S, Saghiri MA, Zand V, Ranjkesh B, Ghasemi N. Effect of MTAD as a final rinse on removal of smear layer in ten-minute preparation time. *J Endod.* 2012;38(10):1391-4.
48. Kamberi B, Bajrami D, Stavileci M, Omeragiq S, Dragidella F, Koçani F. The Antibacterial Efficacy of Biopure MTAD in Root Canal Contaminated with *Enterococcus faecalis*. *ISRN Dent.* 2012;2012:390526.
49. Whitworth J. Sealer selection: a considered approach. *Endod Prac.* 1999;2(3):31-8.
50. Anumula L, Kumar S, Kumar VS, Sekhar C, Krishna M, Pathapati RM, et al. An Assessment of Antibacterial Activity of Four Endodontic Sealers on *Enterococcus faecalis* by a Direct Contact Test: An In Vitro Study. *ISRN Dent.* 2012;2012:989781.
51. Saha S, Samadi F, Jaiswal JN, Ghoshal U. Antimicrobial activity of different endodontic sealers: an in vitro evaluation. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2010;28(4):251-7.
52. Iványi I, Gyurkovics M, Várnagy E, Rosivall L, Fazekas A. [Comparison of guttapercha points of different brands]. *Fogorv Sz.* 2008;101(2):65-9.
53. Amditis C, Blackler SM, Bryant RW, Hewitt GH. The adaptation achieved by four root canal filling techniques as assessed by three methods. *Aust Dent J.* 1992;37(6):439-44.
54. Cozean C, Arcoria CJ, Pelagalli J, Powell GL. Dentistry for the 21st century? Erbium:YAG laser for teeth. *J Am Dent Assoc.* 1997;128(8):1080-7.
55. N G. *Lasertherapie in der zahnärztlichen Praxis-Die Anwendungen unterschiedlicher Lasertypen in ihren jeweiligen Spezialgebieten: Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin; 1999.*
56. Radloff PDW. *Laser in Wissenschaft und Technik. Spektrum Akademischer Verlag; 2010.*
57. Meire MA, Coenye T, Nelis HJ, De Moor RJ. Evaluation of Nd:YAG and Er:YAG irradiation, antibacterial photodynamic therapy and sodium hypochlorite treatment on *Enterococcus faecalis* biofilms. *Int Endod J.* 2012;45(5):482-91.
58. Schiffner U, Cachovan G, Bastian J, Sculean A, Eick S. In vitro activity of photoactivated disinfection using a diode laser in infected root canals. *Acta Odontol Scand.* 2014;72(8):673-80.
59. Bornstein ES. Why wavelength and delivery systems are the most important factors in using a dental hard-tissue laser: a literature review. *Compend Contin Educ Dent.* 2003;24(11):837-8, 41, 43 passim; quiz 48.
60. Ogita M, Tsuchida S, Aoki A, Satoh M, Kado S, Sawabe M, et al. Increased cell proliferation and differential protein expression induced by low-level Er:YAG laser irradiation in human gingival fibroblasts: proteomic analysis. *Lasers Med Sci.* 2014.
61. Kaiwar A, Usha HL, Meena N, Ashwini P, Murthy CS. The efficiency of root canal disinfection using a diode laser: in vitro study. *Indian J Dent Res.* 2013;24(1):14-8.
62. Moritz A, Gutknecht N, Goharkhay K, Schoop U, Wermisch J, Sperr W. In vitro irradiation of infected root canals with a diode laser: results of microbiologic, infrared spectrometric, and stain penetration examinations. *Quintessence Int.* 1997;28(3):205-9.

63. He LB, Shao MY, Tan K, Xu X, Li JY. The effects of light on bleaching and tooth sensitivity during in-office vital bleaching: a systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2012;40(8):644-53.
64. Blatz MB. Laser therapy may be better than topical desensitizing agents for treating dentin hypersensitivity. *J Evid Based Dent Pract.* 2012;12(3 Suppl):229-30.
65. Liu Y, Hsu CY, Teo CM, Teoh SH. Subablative Er:YAG laser effect on enamel demineralization. *Caries Res.* 2013;47(1):63-8.
66. Tavares JG, Eduardo CeP, Burnett LH, Boff TR, de Freitas PM. Argon and Nd:YAG lasers for caries prevention in enamel. *Photomed Laser Surg.* 2012;30(8):433-7.
67. Geraldo-Martins VR, Lepri CP, Palma-Dibb RG. Influence of Er,Cr:YSGG laser irradiation on enamel caries prevention. *Lasers Med Sci.* 2013;28(1):33-9.
68. Said Yekta S, Vohn R, Ellrich J. Cerebral activations resulting from virtual dental treatment. *Eur J Oral Sci.* 2009;117(6):711-9.
69. Takamori K, Furukawa H, Morikawa Y, Katayama T, Watanabe S. Basic study on vibrations during tooth preparations caused by high-speed drilling and Er:YAG laser irradiation. *Lasers Surg Med.* 2003;32(1):25-31.
70. Mirsasaani SS, Atai MM, Hasani-Sadrabadi MM. Photopolymerization of a dental nanocomposite as restorative material using the argon laser. *Lasers Med Sci.* 2011;26(5):553-61.
71. Cassoni A, Rodrigues JA. Argon laser: a light source alternative for photopolymerization and in-office tooth bleaching. *Gen Dent.* 2007;55(5):416-9.
72. Mdinaradze N. Laser therapy in treatment of generalized parodontitis. *Georgian Med News.* 2006(134):94-6.
73. Sculean A, Schwarz F, Berakdar M, Romanos GE, Arweiler NB, Becker J. Periodontal treatment with an Er:YAG laser compared to ultrasonic instrumentation: a pilot study. *J Periodontol.* 2004;75(7):966-73.
74. Mârțu S, Amălinei C, Tatarciuc M, Rotaru M, Potârniche O, Liliac L, et al. Healing process and laser therapy in the superficial periodontium: a histological study. *Rom J Morphol Embryol.* 2012;53(1):111-6.
75. Silva Garcez A, Núñez SC, Lage-Marques JL, Jorge AO, Ribeiro MS. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102(4):e93-8.
76. Yao N, Zhang C, Chu C. Effectiveness of photoactivated disinfection (PAD) to kill *enterococcus faecalis* in planktonic solution and in an infected tooth model. *Photomed Laser Surg.* 2012;30(12):699-704.
77. Bassir SH, Moslemi N, Jamali R, Mashmouly S, Fekrazad R, Chiniforush N, et al. Photoactivated disinfection using light-emitting diode as an adjunct in the management of chronic periodontitis: a pilot double-blind split-mouth randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2013;40(1):65-72.
78. Trindade AC, De Figueiredo JA, Steier L, Weber JB. Photodynamic Therapy in Endodontics: A Literature Review. *Photomed Laser Surg.* 2015;33(3):175-82.
79. Sahar-Helft S, Slutzky-Goldberg I, Moshonov J, Stabholtz A, Jacobovitz M, Tam A, et al. Synergistic effect of Er:YAG laser irradiation in combination with chlorhexidine on the viability of *Enterococcus faecalis*: an in vitro study. *Photomed Laser Surg.* 2011;29(11):753-8.
80. Mehrvarzfar P, Saghiri MA, Asatourian A, Fekrazad R, Karamifar K, Eslami G, et al. Additive effect of a diode laser on the antibacterial activity of 2.5% NaOCl, 2% CHX and MTAD against *Enterococcus faecalis* contaminating root canals: an in vitro study. *J Oral Sci.* 2011;53(3):355-60.
81. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol.* 2011;731:237-45.

82. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*. 1993;303(2):474-82.
83. Martin NC, Pirie AA, Ford LV, Callaghan CL, McTurk K, Lucy D, et al. The use of phosphate buffered saline for the recovery of cells and spermatozoa from swabs. *Sci Justice*. 2006;46(3):179-84.
84. Brown MA, Wallace CS, Anamelechi CC, Clermont E, Reichert WM, Truskey GA. The use of mild trypsinization conditions in the detachment of endothelial cells to promote subsequent endothelialization on synthetic surfaces. *Biomaterials*. 2007;28(27):3928-35.
85. Heng BC, Liu H, Ge Z, Cao T. Mechanical dissociation of human embryonic stem cell colonies by manual scraping after collagenase treatment is much more detrimental to cellular viability than is trypsinization with gentle pipetting. *Biotechnol Appl Biochem*. 2007;47(Pt 1):33-7.
86. Wang H, Wang F, Tao X, Cheng H. Ammonia-containing dimethyl sulfoxide: an improved solvent for the dissolution of formazan crystals in the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. *Anal Biochem*. 2012;421(1):324-6.
87. Basrani B, Lemonie C. Chlorhexidine gluconate. *Aust Endod J*. 2005;31(2):48-52.
88. Gomes BP, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Ferraz CC. Chlorhexidine in endodontics. *Braz Dent J*. 2013;24(2):89-102.
89. Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;92(4):446-50.
90. Hidalgo E, Dominguez C. Growth-altering effects of sodium hypochlorite in cultured human dermal fibroblasts. *Life Sci*. 2000;67(11):1331-44.
91. Ferriello V, Faria MR, Cavalcanti BN. The effects of low-level diode laser treatment and dental pulp-capping materials on the proliferation of L929 fibroblasts. *J Oral Sci*. 2010;52(1):33-8.
92. Dietz ER. Tooth morphology: a review of the basics. *Dent Assist*. 1990;59(5):22-5.