

AUS DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG
Prof. Dr. Kerstin Galler, Ph. D.
ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE

**ETABLIERUNG EINES PROTOKOLLS ZUR CHAIRSIDE-ISOLIERUNG VON
DENTINMATRIXPROTEINEN**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Moritz Linnebank

2022

AUS DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG
Prof. Dr. Kerstin Galler, Ph. D.
ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE

**ETABLIERUNG EINES PROTOKOLLS ZUR CHAIRSIDE-ISOLIERUNG VON
DENTINMATRIXPROTEINEN**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Moritz Linnebank

2022

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Kerstin Galler, Ph. D.

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Sebastian Hahnel

Tag der mündlichen Prüfung:

21.06.2022

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
2. Literaturverzeichnis	7
2.1. Konventionelle Behandlungsmöglichkeiten der Pulpa.....	7
2.2. Endodontisch genutzte Spülflüssigkeiten und Medikamente	9
2.2.1. Natriumhypochlorid.....	10
2.2.2. Chlorhexidindigluconat	10
2.2.3. Ethylendiamintetraacetat	11
2.2.4. Zitronensäure.....	12
2.2.5. Calciumhydroxid	12
2.3. Prospektive Ansätze in der Endodontie	12
2.3.1. Cell Homing.....	15
2.4. Dentinmatrixproteine	16
2.4.1. Der Wachstumsfaktor TGF- β 1	17
3. Fragestellung und Zielsetzung.....	19
4. Material und Methoden.....	20
4.1. Verwendete Lösungen und Medikamente.....	20
4.2. Verwendete Materialien und Geräte.....	21
4.3. Pilotversuche.....	23
4.4. Versuche im Zahnmodell	24
4.4.1. Probengewinnung bei ISO 25 und ISO 50.....	25
4.4.2. Probengewinnung nach Calciumhydroxideinlage.....	26
4.5. Aufkonzentrierung der gewonnenen Proben.....	26
4.6. Datenauswertung	27
5. Ergebnisse	28
5.1. Pilotversuche.....	28
5.2. TGF- β 1 Freisetzung im Zahnmodell.....	29
5.3. Aufkonzentrierung der Proben.....	30

6.	Diskussion.....	32
6.1.	Wachstumsfaktorlösung im Pilotversuch.....	32
6.2.	Freisetzung von Wachstumsfaktoren im Zahnmodell.....	33
6.3.	Aufkonzentrierung der Proben mittels Zentrifuge	35
6.4.	Bedeutung der Versuche für die regenerative Endodontie.....	36
6.5.	Vorschlag für ein Behandlungsprotokoll zur regenerativen endodontischen Therapie.....	39
7.	Zusammenfassung	40
8.	Literaturverzeichnis	42
9.	Abkürzungsverzeichnis	56
10.	Danksagung.....	58
11.	Lebenslauf	59

1. Einleitung

Der Verlust der eigenen Zähne stellt viele Patienten vor weitreichende Herausforderungen. Diese können funktioneller Natur, zum Beispiel bei der Nahrungsaufnahme, aber auch sozialen oder emotionalen Ursprungs sein (1). Der Erhalt der eigenen Zähne ist somit ein wichtiger Bestandteil der modernen Zahnmedizin.

Eine wichtige Säule im Rahmen der Zahnerhaltung spielt die Endodontie, welche sich mit Erkrankungen der Pulpa, sowie der periapikalen Gewebe beschäftigt.

Wenn Bakterien über eine Eintrittspforte in das Innere eines Zahnes eindringen, können sie dort die Pulpa des Zahnes entzünden. Je nach Schwere und Erscheinungsform der Pulpitis ist es für den Behandler allerdings nicht immer möglich die Pulpa zu erhalten – in diesen Fällen wird eine Wurzelkanalbehandlung eingeleitet (2). Hierbei wird das komplexe Wurzelkanalsystem mechanisch bearbeitet und zusätzlich mit verschiedenen Flüssigkeiten und Medikamenten behandelt. Ziel dieser Maßnahme ist es das infizierte Pulpagewebe zu entfernen und vorhandene Bakterien zu eliminieren. Anschließend wird der behandelte Kanal mit einem synthetischen Material abgefüllt und der Zahn verschlossen.

Dieses Vorgehen hat allerdings einige Nachteile, da man mit der Pulpa einen wichtigen funktionellen Teil des Zahnes entfernt. Endodontisch behandelte Zähne haben somit keine Schmerz- und Reizdetektion und keine Möglichkeit der Immunantwort mehr. Zusätzlich kann ein Zahn ohne Pulpa kein neues Dentin mehr bilden (2).

Im Wissen um diese Problematik wurde nach alternativen Behandlungsmöglichkeiten gesucht. Hierzu gehören auch regenerative Ansätze in der Endodontie, welche das Ziel haben nach der Aufbereitung des Kanalsystems ein neues, pulpaähnliches Gewebe in diesem zu generieren. Diese Therapieansätze beruhen auf dem Wissen über die Zahnentstehung und die biologischen Prozesse, die dabei ablaufen.

Einen zentralen Punkt nehmen hierbei Wachstumsfaktoren ein, welche Stammzellen zur Migration, Differenzierung und Proliferation anregen können und dadurch maßgeblich an der Bildung der Zahngewebe beteiligt sind (3). Wachstumsfaktoren können bei diesem Prozess an das Dentin des Zahnes gebunden und von dort zu einem späteren Zeitpunkt wieder freigesetzt werden (3).

Diese Freisetzung kann unter anderem durch demineralisierende Flüssigkeiten erreicht werden (4), wie sie im Rahmen von endodontischen Behandlungen eingesetzt werden. Die so freigesetzten Faktoren könnten anschließend aufgearbeitet und wieder in den Zahn appliziert werden, um dort Stammzellen zur Bildung von neuem Gewebe anzuregen (2).

Das Ziel dieser Arbeit war es ein Protokoll zu etablieren, mit dessen Hilfe die effiziente Isolierung von Wachstumsfaktoren in der zahnärztlichen Praxis ermöglicht werden kann. In diesem Sinne sollte auch untersucht werden welchen positiven oder negativen Einfluss verschiedene Spülflüssigkeiten und Medikamente auf die Freisetzung von Wachstumsfaktoren ausüben und wie diese optimal eingesetzt werden können.

2. Literaturverzeichnis

2.1. Konventionelle Behandlungsmöglichkeiten der Pulpa

Der Zahn stellt ein komplexes Gebilde dar, welches aus unterschiedlichsten Geweben aufgebaut ist (5). Der Schmelz und das Dentin bilden hierbei die Hartgewebe des Zahnes. Im Inneren des Zahnes findet man die Pulpa, welche aus Blut- und Lymphgefäßen sowie aus Nerv- und Bindegewebe aufgebaut ist (5). Die Pulpa ist eines der am stärksten innervierten und vaskularisierten Gewebe des menschlichen Körpers (6). Die charakteristischen Zellen der Pulpa sind die Odontoblasten, welche eine zentrale Rolle für viele Abläufe und Funktionen des Zahnes spielen, so bilden sie zum Beispiel das Dentin (7). Ausläufer der Odontoblasten, sogenannte Tomes-Fasern, ziehen in kleinen Kanälen (Dentintubuli) durch das Dentin (5). Durch diese enge funktionelle Beziehung beider Gewebe wird oft von einem Pulpa-Dentin-Komplex gesprochen (7). Die Hauptfunktion der Pulpa ist hierbei nicht nur die Bildung des Dentins, sondern auch die nutritive Versorgung von diesem. Ferner ist die Pulpa für die Detektion von Reizen auf den Zahn und die Immunantwort des Zahnes verantwortlich (8).

Als Teilbereich der Zahnmedizin setzt sich die Endodontie mit der Physiologie und Pathologie der Pulpa auseinander. Pathologische Veränderungen der Pulpa resultieren meist aus starken einwirkenden Noxen. Dies können zum Beispiel eindringende Bakterien bei einer Karies (9), aber auch Traumata (10) oder iatrogene Faktoren wie die Präparation eines Zahnes sein (11). Unterschieden wird bei Entzündungen der Pulpa ob sich die Pulpitis reversibel (der Zahn schmerzt bei Reizeinfluss kurzweilig stechend und lokalisierbar) oder irreversibel darstellt (dumpf-pochende, schlecht zu lokalisierende und spontan auftretende Schmerzen) (12). Im Falle einer reversiblen Pulpitis wird die Pulpa vom Zahnarzt nur teilweise entfernt und/oder mit einem Medikament abgedeckt (13). Bei der irreversiblen Pulpitis wird in der Regel die komplette Pulpa entfernt und eine Wurzelkanalbehandlung eingeleitet (14). Je nach Ausgangssituation, Behandler und Qualität der Wurzelkanalbehandlung liegen die Erfolgsraten einer solchen Therapie bei 70 – 97% (15-17). Negative Auswirkungen haben hier vor allem im Wurzelkanal persistierende Bakterien (18-19), welche den Langzeiterfolg der Behandlung signifikant senken können (19).

Als Stand der Technik gilt heute die instrumentelle Aufbereitung des Kanals, entweder maschinell oder mit Handfeilen. Diese werden unter rotierenden oder reziproken Bewegungen in die Wurzelkanäle des Zahnes eingebracht. Die Feilen sollen dabei Gewebereste, Biofilm sowie von Bakterien kontaminiertes Dentin aus dem Kanal entfernen und dem Kanalsystem gleichzeitig eine geeignete Form für die spätere Obturation geben. Zusätzlich wird der Kanal dabei mit verschiedenen Flüssigkeiten gespült, welche die Keimbelastung im Zahn weiter senken sollen (20). Als Spülflüssigkeiten werden heute meist Natriumhypochlorid (NaOCl), Chlorhexidindigluconat (CHX), Ethylendiamintetraacetat (EDTA) und Zitronensäure eingesetzt, oft auch kombiniert in speziellen Abfolgen (21). Diese Art der Aufbereitung wird chemomechanische Aufbereitung genannt. Eine Aktivierung der eingesetzten Flüssigkeiten durch Ultraschall ist dabei jeweils von Vorteil (22). Wenn die Keimlast innerhalb einer Sitzung durch Aufbereitung und Spülung nicht zufriedenstellend gesenkt werden kann (19) werden oft antibakterielle, medikamentöse Zwischeneinlagen (Calciumhydroxid oder Antibiotikapaste) in den Zahn eingebracht und dieser über eine gewisse Zeit bakteriendicht verschlossen (23). Diese Einlagen sollen eine zusätzliche Reduktion der Keimlast erreichen und werden nach ihrer Einwirkzeit wieder aus dem Zahn entfernt. Nach erfolgreicher Aufbereitung des Kanalsystems wird dieses mit einem geeigneten synthetischen Füllmaterial abgefüllt, heute in der Regel Guttapercha mit einem geeigneten Sealer (14) und der Zahn dauerhaft bakteriendicht verschlossen.

Eine gesonderte Behandlungsmethode ist gefragt, wenn es sich bei dem Patienten um ein Kind oder einen jungen Erwachsenen mit noch nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum handelt, da hier die dünnen Dentinwände der Wurzel frakturgefährdet sind und es keinen Apex gibt, an dem man sich bei der Wurzelkanalfüllung orientieren könnte. Hier muss zuerst ein künstlicher Apex (Apexifikation) geschaffen werden, um eine suffiziente Behandlung zu ermöglichen. Dies geschieht meist mit Mineral-Trioxid-Aggregat (MTA) (24,25). Allerdings kommt es bei dieser Behandlungsmethode nicht zur weiteren Entwicklung der Wurzel in Länge oder Dicke (26). Dieser Umstand führt dazu, dass diese Zähne zeitlebens einer größeren Frakturgefahr ausgesetzt sind (26, 27) und ein ungünstiges Verhältnis von Krone zu Wurzel aufweisen.

2.2. Endodontisch genutzte Spülflüssigkeiten und Medikamente

Fundamental für die Apexifikation, als auch für die konventionelle endodontische Behandlung ist die Keimfreiheit des Wurzelkanalsystems. Allerdings ist diese durch den bloßen Einsatz von Feilen nicht gegeben - dies liegt zum einen daran, dass mit Feilen nicht alle Wände der oft komplex gestalteten Kanäle sicher erreicht werden können (28), zum anderen bildet sich bei der Aufbereitung der Kanäle eine Schmierschicht bestehend aus dem anorganischen Abtrag der Feilen (Debris), Geweberesten und Bakterien sowie ihren Beiprodukten, welche sich an die Wände des Kanalsystems anlegt. Diese Schicht kann Dentintubuli und kleinere Seitenkanäle verblocken, sodass in diesen Mikroorganismen verbleiben können. Ferner verhindert sie die exakte Adaption von Füllmaterialien an die Zahnhartsubstanz (29).

Der zusätzliche Einsatz von Spülflüssigkeiten ermöglicht nicht nur das Erreichen von schlecht zugänglichen Bereichen des Wurzelkanalsystems, sondern kann auch die entstehende Schmierschicht auflösen (28). Des Weiteren werden Spülflüssigkeiten auch genutzt, um ein friktionsreduziertes Arbeiten der Feilen im Kanal zu ermöglichen und organische Gewebereste aufzulösen (30). Somit spielen die genutzten Flüssigkeiten, sowie ihre Kombination und Konzentration, eine essentielle Rolle in der Endodontie.

Vor diesem Hintergrund werden verschiedene Anforderungen an die genutzten Flüssigkeiten gestellt. So sollen sie ein breites antimikrobielles Spektrum aufweisen und dabei vorhandene Endotoxine inaktivieren, während sie gleichzeitig nekrotisches Pulpagewebe auflösen und die Bildung bzw. die Anheftung der Schmierschicht verhindern sollen. Daneben sollen sie auf die umliegenden vitalen und gesunden Gewebe nicht toxisch, ätzend oder allergen wirken (30,31). Aufgrund dieser hohen Anforderungen werden die genutzten Substanzen eingeteilt in Flüssigkeiten, die den Kanal vornehmlich desinfizieren (CHX, NaOCl), sowie von Gewebereste befreien (NaOCl) und die Schmierschicht und Debris entfernen sollen (EDTA, Zitronensäure) (32).

2.2.1. Natriumhypochlorid

Natriumhypochlorid (NaOCl) wurde bereits im ersten Weltkrieg von Dakin als Antiseptikum für infizierte Wunden genutzt (33). Bereits zu dieser Zeit wurde experimentiert, wie man die Flüssigkeit am besten ansetzt und verdünnt, sodass sie nekrotisches Gewebe auflöst, vitales Gewebe aber nicht zu stark irritiert (33,34). Einige Jahre später, Anfang der 1920er Jahre, wurde NaOCl in die Zahnmedizin eingeführt und etablierte sich für die endodontische Behandlung schnell zum Goldstandard (35). Eine Frage, die sich früh stellte, war die der geeignetsten Konzentration des Hypochlorids und vor allem ob höhere Konzentrationen als die von Dakin vorgeschlagenen 0,5% nötig wären. Bei Erhöhung der Konzentration auf 5% zeigte sich allerdings keine erhöhte Desinfektionswirkung (36,37). Im Gegenteil steigert man mit der Konzentration auch die Toxizität der Flüssigkeit (38), sowie die Schwächung des Dentins und damit die des ganzen Zahnes (39). So werden heute Konzentrationen zwischen 0,5% und 5% angeraten, wobei in der Regel auf eine Konzentration zwischen den beiden Werten verwiesen wird (31). Anders als über die Konzentration kann man aber die Wirksamkeit von Hypochlorid durch Erwärmen der Flüssigkeit (40-42), eine verlängerte Einwirkzeit (43) und verschiedene Aktivierungsmethoden, beispielsweise mittels Ultraschall, (44) erhöhen. Natriumhypochlorid gilt bis heute als Goldstandard zur Desinfektion, da dieses Agens nicht nur ein breites antimikrobielles Spektrum aufweist, sondern auch gewebeauflösende Eigenschaften besitzt. Zusätzlich kann es Endotoxine inaktivieren (43). Es sollte jedoch darauf geachtet werden, dass kein Hypochlorid im Rahmen der endodontischen Behandlung überpresst wird, sprich nach periapikal gelangt, da es dort eine Gewebelyse mit begleitenden starken Schmerzen, Einblutung und Schwellungen verursachen kann (45).

2.2.2. Chlorhexidindigluconat

Eine weitere, häufig zur Desinfektion genutzte Spülflüssigkeit ist das Chlorhexidindigluconat (CHX). Dieses wird vor allem im Bereich des Biofilmanagements, zum Beispiel in der Parodontologie und Chirurgie genutzt (46).

Die eingesetzte Konzentration in diesen Bereichen entspricht in der Regel 0,2%. Im Gegensatz dazu wird CHX in der Endodontie überwiegend als 2%ige Lösung genutzt (47). Auch beim CHX zeigt sich eine positive Beeinflussung der Wirksamkeit durch Erwärmen der Flüssigkeit (48). CHX hat den Vorteil, dass es sich durch elektrostatische Bindung an Zahnoberflächen anlagert (49) und von dort über längere Zeit in die Umgebung abgegeben wird (50).

CHX besitzt allerdings ähnlich zum NaOCl toxische Eigenschaften, so wirkt es in Konzentrationen von 2% irritierend auf Hautgewebe (51). Ein großer Nachteil von CHX ist seine fehlende gewebeauflösende, endotoxininaktivierende Wirkung und seine eingeschränkte Wirksamkeit gegen gramnegative Bakterien (52), vor allem unter dem Aspekt, dass man bei Infektionen des Wurzelkanals häufig anaerobe gramnegative Bakterien auffindet (53). Unter diesen Gesichtspunkten scheint CHX eher ungeeignet als alleinige Desinfektionsspülung. Zusätzlich ist bei der Verwendung von NaOCl in Kombination mit CHX Vorsicht geboten, da bei Kontakt von NaOCl mit CHX ein orange-braunes Präzipitat ausfällt, welches unter dem Verdacht steht, das kanzerogene 4-Chlor-Anilin zu enthalten (54,55). Ferner scheint das Präzipitat das Eindringen der Spüllösung in die Dentintubuli zu verschlechtern (56).

2.2.3. Ethylendiamintetraacetat

Ethylendiamintetraacetat (EDTA) ist ein sechs-zähliger Komplexbildner und kann mit Kationen mit einer Ladungszahl von mindestens 2+ sehr stabile Chelatkomplexe bilden. So kann es Kalzium aus dem Dentin lösen und dieses demineralisieren. Dies geschieht bei der Aufbereitung eines Kanals in der Regel bis in eine Tiefe von 30 µm (57,58). Wie bereits oben beschrieben wird EDTA zu eben solchen Zwecken endodontisch genutzt, meist in einer Konzentration von 17%. Zwar zeigt es keine guten antimikrobiellen Eigenschaften (59), es ist jedoch hoch wirksam in der Entfernung von Debris (60). EDTA wirkt allerdings auch zytotoxisch auf umliegendes, vitales Gewebe (58,61). Zusätzlich kann EDTA durch seine demineralisierenden Eigenschaften Wachstumsfaktoren aus Dentin lösen (siehe 2.3 und 2.3.1).

2.2.4. Zitronensäure

Zitronensäure wird in der Endodontie genau wie EDTA zur Demineralisation und zur Lösung von Debris genutzt (60). Die Konzentration liegt dabei meist bei 10 - 20%. Die demineralisierende Wirkung ergibt sich bei der Zitronensäure zum einen aus ihrem niedrigen pH-Wert und zum anderen durch ihre Möglichkeit der Komplexbildung (62). Ebenso wie EDTA kann Zitronensäure somit Wachstumsfaktoren aus dem Dentin lösen (siehe 2.3 und 2.3.1).

2.2.5. Calciumhydroxid

Calciumhydroxid (CaOH_2) wird häufig als temporäre medikamentöse Einlage in Zähnen verwendet und wirkt durch einen hohen pH-Wert antibakteriell. Der pH-Wert beträgt in der Regel pH 12,5 und entsteht dadurch, dass sich Calciumhydroxid in wässriger Umgebung in Calcium und Hydroxyl-Ionen aufspaltet (63). Die bakterizide Wirkung ergibt sich vermutlich durch Zerstörung der Zellmembran und DNS der Bakterien sowie durch Proteindenaturierung (63).

Des Weiteren ist CaOH_2 wirksam gegen Endotoxine (64) und denaturiert proinflammatorische Zytokine und Neuropeptide (65). Dies sorgt für eine verminderte Entzündungsreaktion des Körpers (65). Zusätzlich besitzt CaOH_2 die Fähigkeit nekrotisches Gewebe aufzulösen (66). Im Vergleich zu anderen Medikamenten zur temporären Füllung von Wurzelkanälen stört CaOH_2 nicht die Freisetzung von Wachstumsfaktoren (67). Dies könnte daran liegen, dass es durch Spülung nahezu vollständig aus dem Kanal entfernt werden kann (68).

2.3. Prospektive Ansätze in der Endodontie

Obwohl der Einsatz von speziellen Spülflüssigkeiten, sowie von medikamentösen Einlagen der konventionellen Endodontie zu sehr guten Erfolgsquoten verhilft (15-17), hat dieses Vorgehen doch einige Nachteile. Demnach erfüllt in Zähnen, die mit synthetischem Material abgefüllt wurden, keine Pulpa mehr ihre Funktionen. Somit reagiert der Zahn nicht mehr sensorisch und eine Immunantwort bleibt ebenso aus wie die Dentinneubildung (69,70).

Um diese Problematiken herum wurden bereits in den 50er und 60er Jahren des 20. Jahrhunderts alternative Herangehensweisen erarbeitet. Die Grundmaxime des dichten und festen Verschlusses des Kanalsystems mit Hilfe eines synthetischen Materials wurde dabei in Frage gestellt. Dies geschah erstmals durch Engel (71) und Matsumiya & Kitamura, (72) welche die von ihnen behandelten Zähne mit einer resorbierbaren Paste füllten. Auf diese Arbeiten bezog sich auch Nygaard–Ostby in seinen wegweisenden Arbeiten der 60er und 70er Jahre (73,74). Nygaard bereitete die von ihm behandelten Zähne chemomechanisch auf und füllte sie daraufhin nur koronal mit Guttapercha ab. Im apikalen Teil des Zahnes wurde eine Blutung provoziert, sodass hier ein Blutkoagel entstand. Nachdem die Zähne nach einiger Zeit extrahiert worden waren, wurde in einigen neu gebildetes Gewebe, Hartgewebsanlagerungen und auch neue Vaskularisation gefunden. Nygaard beschrieb seine Beobachtungen nüchtern als „Gewebebildung“ (74). Erst Anfang der 2000er Jahre erfuhr diese Behandlungsmethode neue Aufmerksamkeit durch die Arbeiten von Banchs et al. (75) und Iwaya et al. (76). Beide wandten die Ideen Nygaards auf Zähne mit noch nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum an. In beiden publizierten Fällen setzte sich das Wachstum der Zahnwurzel nach der Behandlung fort – sowohl Banchs als auch Iwaya nannten ihre Beobachtungen „Revaskularisation“ (75,76). Alternativ wurde die oben genannte Technik auch als „regenerative Endodontie“ (77) oder als „Revitalisierung von Zähnen“ (78) bezeichnet, grundlegend beschreiben aber alle Bezeichnungen dieselbe Herangehensweise.

Wo diese Behandlungsalternative vor 60 Jahren noch eine unkonventionelle Idee war, hat diese heute bereits Einzug in die angewandte Praxis gefunden. Bereits 2013 hat die American Association of Endodontists (AAE) ein Positionspapier unter dem Titel „Regenerative Endodontics“ (79) veröffentlicht. 2016 zog die European Society of Endodontology (ESE) nach und veröffentlichte ein Positionspapier zur „Revitalisierung“ (78). Beide Veröffentlichungen beziehen sich dabei auf die Behandlung von Zähnen mit nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum.

Diese sehen nach gründlicher Anamnese, klinischer Untersuchung und Aufklärung vor, dass der zu behandelnde Zahn zuerst endodontisch zugänglich gemacht wird. Anschließend werden im Kanal befindliche Gewebereste mit geeigneten Instrumenten entfernt. Bei diesem, wie auch bei den späteren Schritten, sollten die dünnen und filigranen Kanalwände nicht manipuliert werden.

Nach der Entfernung des Gewebes wird der Zahn mit NaOCl 1,5 - 3%ig (20 ml, 5 min), NaCl (5 ml) und EDTA 17%ig (20 ml) gespült. Daraufhin wird der Zahn mit einer Antibiotikapaste oder Calciumhydroxid abgefüllt und bakterien dicht verschlossen. Der zweite Teil der Behandlung schließt nach 2 - 4 Wochen an und sieht zuerst die Entfernung der Einlage mit EDTA 17%ig vor (20 ml, 5 min), bevor wieder mit 5 ml NaCl nachgespült wird. Nachdem der Kanal getrocknet worden ist wird durch gezielte Überinstrumentierung ein Einbluten in den Kanal herbeigeführt. Nach der Bildung eines stabilen Blutkoagels wird dieses zunächst mit einer Kollagenmatrix, dann mit einem hydraulischen Silikazement und optional mit einem lichthärtenden Glasionomer- oder Kalziumhydroxidzement bedeckt, bevor der Zahn adhäsiv verschlossen wird (78).

Die Revitalisierung wird bereits seit einigen Jahren klinisch angewandt und stellt eine Alternative zur Apexifikation dar. Vergleicht man die Erfolgsquoten beider Techniken so zeigt sich, dass die Überlebensrate der Zähne bei beiden Methoden bei 97% liegt, wobei bei der Apexifikation 94,6% und bei der Revitalisation 91,3% der klinischen Symptome und röntgenologischen Veränderungen ausheilen (80). Zusätzlich setzte sich das Wurzelwachstum der revitalisierten Zähne in 79% der Fälle fort (80). Allerdings fehlen Studien zu dieser Thematik mit größeren Versuchsgruppen und über längere Zeiträume.

Gegenstand der Forschung ist derzeit außerdem die Übertragung des Revitalisierungskonzeptes auf Zähne mit bereits abgeschlossenem Wurzelwachstum. Hierfür wurden verschiedene Vorschläge eingebracht. Die meisten gehen dabei mit der Verwendung von Stammzellen einher (autolog, allogon oder xenogen), welche im Labor aufbereitet und dann in einer geeigneten Matrix oder eingebettet in ein Polymergerüst, mit oder ohne Signalmolekülen, in den Wurzelkanal eingebracht werden (77,81). Nakashima et al. haben 2017 erfolgreich in der ersten klinischen Anwendung mit Stammzellen fünf Zähne mit autologen pulpalen Stammzellen revitalisiert (82). Der Handhabung von aufbereiteten Stammzellen stehen in der Praxis aber oft ethische, ökonomische und technische Hürden im Weg.

2.3.1. Cell Homing

Um den aufwendigen Weg der Stammzellisolierung und -kultivierung im Labor zu umgehen wurde das Cell Homing für die Pulparegeneration vorgeschlagen.

Das Cell Homing beschreibt hierbei ein Vorgehen in situ, das heißt, dass keine Zellen entnommen werden und aufbereitet werden müssen. Dabei macht man sich die natürliche Heilungsfähigkeit des Körpers zum Vorteil, indem man Stammzellen durch spezielle bioaktive Substanzen zur Migration an den gewünschten Ort anregt (83,84). Hierfür benötigt man auf der einen Seite eine geeignete Matrix, in welche die Stammzellen problemlos einwandern können und in der sich neues Gewebe formen kann (85). Auf der anderen Seite braucht man bioaktive Faktoren welche die Stammzellen zur Migration, Proliferation und zur Differenzierung anregen (85,86). Diese Faktoren stellen in der Regel spezielle Proteine und Wachstumsfaktoren dar, welche zum Beispiel aus dem Blut über Platelet-Rich-Fibrin (87), aber auch aus dem Zahn extrahiert werden können (86). So wurden bereits einige verschiedene Konzepte für das Cell Homing für die Pulparegeneration vorgeschlagen, zum Verständnis dieser Arbeit möchte ich aber nun kurz den Ansatz unserer Arbeitsgruppe beschreiben.

Den Ausgangspunkt stellt bei dieser Überlegung das Dentin dar. Aus diesem sollen durch die Spülung bei der endodontischen Aufbereitung des Zahnes Wachstumsfaktoren gewonnen werden. Gegenstand der Forschung ist hierbei die Frage, welches Spülprotokoll dafür am besten geeignet erscheint. Gute wachstumsfaktorlösende Eigenschaften scheinen vor allem EDTA (86,88) und Zitronensäure (89,90) durch ihre Demineralisationseigenschaften zu besitzen. Zitronensäure scheint dabei ein höheres Dekalzifizierungspotential zu besitzen als EDTA (91). Fraglich ist, ob Zitronensäure dadurch auch mehr Wachstumsfaktoren aus dem Zahn löst, da zu dieser Thematik sowohl Veröffentlichungen vorliegen, die für die erhöhte Wachstumsfaktorfreisetzung durch Zitronensäure sprechen (89,90), als auch solche die das Gegenteil berichten (67). Förderlich für die Wachstumsfaktorfreisetzung scheint in jedem Fall eine Aktivierung der Spülflüssigkeit im Kanal durch Ultraschall zu sein (92).

Die so gewonnenen Faktoren sollen im nächsten Schritt aufkonzentriert und von der Spülflüssigkeit befreit werden in der sie gelöst sind, da diese womöglich negative Auswirkungen auf die Migration und Differenzierung von Stammzellen haben könnte (93,94). Dies könnte zum Beispiel durch Zentrifugation geschehen. Wurden die Wachstumsfaktoren aus dem Zahn gelöst und aufbereitet, werden diese in einer geeigneten Kollagenmatrix in den Zahn appliziert (70,85). Bisher wurden verschiedene Cell Homing Ansätze im Labor sowie im Tierversuch untersucht. So konnte in Versuchen mit in Mäusen transplantierten Zähnen die Bildung von pulpaähnlichem Gewebe in den Proben beobachtet werden (95,96).

2.4. Dentinmatrixproteine

Obligat für diese Überlegungen sind die aus dem Dentin gewonnen und zur Behandlung eingesetzten Dentinmatrixproteine. Diese sind bereits bei der Entstehung des Zahnes unerlässlich und determinieren nicht nur die Bildung von Schmelz und Dentin, sondern greifen schon zu Beginn der Zahnbildung ein. Durch ihre Einwirkung auf den Ort der Bildung der Zahnknospen und deren anschließende Entwicklung nehmen sie daher großen Einfluss auf das spätere Schema der Dentition: die Zahnanzahl, Zahnform, die Größe der Zähne etc. (97,98). Diese Signalmoleküle besitzen in ihrer aktiven Form eine kurze Halbwertszeit, allerdings können sie bei der Zahnbildung an die Matrix des Dentins gebunden werden und bei der Mineralisierung des Dentins in diesem eingeschlossen werden (99,100). Die Bindung an die Matrix des Dentins erfolgt vor allem an Proteoglykanen und Glykoproteinen über eine glykosidische Bindung (101). Wachstumsfaktoren können aber auch an Kollagen (102) oder an spezifische Bindungsproteine (103) binden.

Die fixierten Moleküle werden so bei der Mineralisation des Zahnes ähnlich einem Insekt in einem Bernstein präserviert. Die Besonderheit besteht nun darin, dass diese Faktoren, anders als das Insekt, nachdem sie aus dem Dentin gelöst wurden, wieder in ihrer ursprünglichen Funktionalität hergestellt werden können.

Unterschieden werden diese bioaktiven Signalmoleküle dadurch ob sie phosphoryliert sind oder nicht (104). In der Gruppe der phosphorylierten Moleküle sind vor allem die small-integrin binding ligand N-linked glykoproteins (SIBLINGs) für die Thematik dieser Arbeit interessant, welche durch Initiation und Inhibition in die Steuerung von Mineralisationsprozessen eingreifen und so eine entscheidende Rolle bei der Dentinreifung einnehmen (105-107). Ein häufig genannter Vertreter der Gruppe der SIBLINGs ist das Dentin-Matrix-Protein-1 (DMP-1). Dieses ist auch an der Differenzierung von Stammzellen zu odontoblastenähnlichen Zellen beteiligt (108).

In der Gruppe der nicht-phosphorylierten Moleküle sind vor allem die Wachstumsfaktoren zu nennen. In diese Gruppe fallen die transforming growth factors (TGFs), fibroblast growth factors (FGFs), insulin like growth factors (IGFs), bone morphogenetic proteins (BMPs) und vascular endothelial growth factors (VEGFs) (109-111). Wachstumsfaktoren haben dabei vielfältige Einflüsse auf die Zahnentwicklung, so zum Beispiel in der Proliferation, Migration und Differenzierung von Stammzellen (112-114), der Bildung von Tertiärdentin (115) und der Bildung von neuen Blutgefäßen und somit der Vaskularisation des Zahnes (FGF, VEGF) (110,116). FGF-2 scheint zusätzlich in Kombination mit anderen Wachstumsfaktoren die Möglichkeit zu besitzen diese in ihrer Aktivität zu verstärken (117). Die Wirkung der Wachstumsfaktoren erfolgt dabei über die Bindung an einen membranständigen Rezeptor und eine folgende intrazelluläre Kaskade, welche schließlich zur Aktivierung oder Deaktivierung von Genen im Zellkern führt (118). So können sie Zellen und ihre Differenzierung bereits in sehr geringen Konzentrationen beeinflussen, entweder positiv über Proliferation oder negativ über Apoptose (119,120).

2.4.1. Der Wachstumsfaktor TGF- β 1

Die oben bereits genannte Gruppe der TGFs wird weiter aufgeteilt in die TGF- α und die TGF- β -Familie, wobei zu letzterer 33 verschiedene Proteine gezählt werden (zu dieser Gruppe gehören auch 10 BMPs) (121-123). Für die Thematik dieser Arbeit ist vor allem TGF- β 1 interessant, da dieses Protein Einfluss auf die Angiogenese, Hämatopoese und die Regulation des Immunsystems (124,125) ausübt. Neben den anderen oben genannten Faktoren scheint TGF- β 1 eine herausragende Rolle in der Differenzierung von Stammzellen zu Odontoblasten zu spielen (117).

In diesem Zusammenhang ist er auch mit der Bildung von extrazellulärer Matrix (126) und somit der Bildung von Dentin assoziiert. Dies zeigt sich vor allem bei direkten Überkappungen der Pulpa, bei denen freigesetztes TGF- β 1 nachweislich durch eine Erhöhung der Zellproliferation und -migration die Bildung von Tertiärdentin fördert (115,127,128). Zusätzlich wirkt TGF- β 1 regulierend auf inflammatorische Prozesse im Rahmen der Wundheilung (119). Diese Attribute machen dieses Protein zu einem zentralen Faktor in der möglichen Revitalisierung von Zähnen.

Obwohl man, wie oben beschrieben, eine große Anzahl verschiedener bioaktiver Moleküle im Dentin nachweisen kann, dominiert TGF- β 1 nicht nur quantitativ, sondern nimmt auch in seiner Funktion eine zentrale Rolle ein (129). Auch wenn die Einflüsse von Dentinmatrixproteinen auf Zellen und das Immunsystem wahrscheinlich auf ein komplexes Zusammenspiel von verschiedensten Faktoren zurückzuführen ist, so erscheint es dennoch möglich TGF- β 1 als Referenzprotein zu bestimmen und zu quantifizieren.

3. Fragestellung und Zielsetzung

Bei der endodontischen Behandlung eines Zahnes wird dieser im Sinne der chemomechanischen Aufbereitung nicht nur mit Feilen bearbeitet, sondern auch mit desinfizierenden und dekalzifizierenden Spüllösungen behandelt. Viele der herkömmlich verwendeten Lösungen können Wachstumsfaktoren aus dem Dentin lösen.

Durch die Auswahl geeigneter Spülflüssigkeiten, deren Aktivierung und das Einhalten definierter Einwirkzeiten kann die Quantität der aus dem Dentin gelösten Wachstumsfaktoren möglicherweise gesteigert werden. Wünschenswert wäre es auch, im Rahmen regenerativer endodontischer Verfahren die aus dem Kanal gewonnenen Wachstumsfaktoren weiter aufzukonzentrieren.

Ausgehend von diesen Überlegungen sollten in verschiedenen Versuchen folgende Fragestellungen untersucht werden:

- I. Welchen Einfluss haben verschiedene Spüllösungen, Calciumhydroxid und die Aufbereitungsgröße des Kanals auf die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus dem Dentin?
- II. Können Wachstumsfaktoren mit Hilfe der Zentrifugation effizient aufkonzentriert werden?
- III. Kann aus den Ergebnissen ein Protokoll etabliert werden, welches als Leitschiene für den Transfer der Cell Homing-Überlegungen vom Labor in die Praxis fungieren kann?

Um diese Fragen zu beantworten wurden verschiedene, ausgewählte Spüllösungen auf Dentinscheiben und in aufbereiteten Wurzelkanälen von extrahierten Zähnen auf ihre wachstumsfaktorfreisetzende Kapazität getestet. Als Referenzfaktor wurde TGF- β 1 in den gewonnenen Proben quantifiziert. Ferner wurde getestet ob die Zentrifugation ein geeignetes Mittel zur Aufkonzentrierung der Proben darstellt.

4. Material und Methoden

4.1. Verwendete Lösungen und Medikamente

- Natrium-EDTA (EDTA Disodium Salt 2-hydrate, 141669.0914 / AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Calciumdinatrium-EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid calcium disodium salt, ED2SC-1KG / SIGMA® Life Science, St. Louis, MO, USA)
- Zitronensäure (Citric acid monohydrat, 1.00244.0500 / Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumhydroxid (Sodium hydroxide – pellets S/4920/60 / Fisher Scientific UK, Loughborough, UK)
- PBS (9,55 g/L, L 182-05 = Dubecco-PBS ohne Ca²⁺, Mg²⁺ / Biochrome GmbH, Berlin, Deutschland)
- Natriumhypochlorit (Hypochlorit Dentallösung 5,25% / Speiko GmbH, Münster, Deutschland)
- Chlorhexidin (Chlorhexidindigluconat-Lösung 2% / UKR Apotheke, Regensburg, Deutschland)
- Chloramin-T Lösung 0,5% (Chloramin-T trihydrate, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Schwefelsäure (Schwefelsäure 95 - 97%, 30743-1L / Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA)
- Tween® 20 (Polysorbat 20, Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA)
- Calciumhydroxid (UltraCal XS / Ultradent Products GmbH, Köln, Deutschland)
- TGF Standard (Recombinant Human TGF-β1, 100-21-10UG / Peprotech® Inc., Rocky Hill, NJ, USA)
- BCA Standard (Rinderserum-Albumin 2 mg/ml, P0914 / Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

4.2. Verwendete Materialien und Geräte

- Acrodisc® Spritzenfilter mit Supor® Membran (1,2 / 0,45 / 0,2 µm), Pall Corporation, Port Washington, NY, USA)
- ELISA Kit (Human TGF-β1 Quantikine® ELISA Kit DB100B/ P168486 / R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)
- ELISA Multiwellplatten (Clear Microplate, DY990 / R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)
- 96-Multiwellplatten (655 101 / Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- 48-Multiwellplatten (677 180 / Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- Photometer (Tecan Infinite® F 200 / Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz)
- Photometer-Software (Magellan® 7.1 / Tecan group Ltd., Männedorf, Schweiz)
- PRISM 8 Statistik-Software (GraphPad Software, San Diego, USA)
- Kühlschrank (MediLine LKUexv 1610 Index 24C / Liebherr, Kempten, Deutschland)
- Gefrierschrank (Forma Scientific 923 -86°C Freezer / Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Kyroröhrchen (CRYO.S®, 2 ml, PP / Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich)
- Skalpelle (FEATHER® Standard Einwegskalpelle Fig. 11 / Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan)
- Paladur® (Haereus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland)
- Innenlochsäge (Leitz SP1600 / Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- Pipetten (Eppendorf Research plus Pipetten / Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland)
- Reaktionsgefäße (Eppendorf Safe-Lock Tubes / Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Orbitalschüttler (Miniature Shaker KM 2 / Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland)
- Minishaker (PSU-2T / SIA Biosan, Riga, LVA)

- Glasbehälter (DURAN® Laborglasflaschen / DURAN Group, Wertheim, Deutschland)
- Polystyrol Röhrchen (Sterilin® 7 ml-Bijou Behälter aus Polystyrol / Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Impressionsmaterial (silaplast Futur / Detax GmbH & Co. KG, Ettlingen, Deutschland)
- Kerr-Feilensystem (K-Files ISO 8, 10, 15, 20 / VDW GmbH, München, Deutschland)
- Reciproc-Feilensystem (NiTi-Files Reciproc® / VDW GmbH, München, Deutschland)
- Reciproc-Einheit (Dentsply X-Smart® plus Endomotor / Dentsply Sirona Inc., York, PA, USA)
- Ultraschallaufsätze (Ultrasonic Tip IRRI® S21/25 / 906015 / VDW GmbH, München, Deutschland)
- Ultraschalleinheit (VDW Ultra® Ultraschallgenerator / VDW GmbH, München, Deutschland)
- Papierspitzen (ROEKO Papierspitzen weiss / Coltene-Whaledent GmbH & Co. KG, Langenau, Deutschland)
- Spritzen (Plastipak™ Luer Lok Syringe / BD, Franklin Lakes, NJ, USA)
- Kanülen (Endokanülen, 27G 0,4 x 23 mm / 190307 / Transcodent, Kiel, Deutschland)
- Inkubator (C150 / Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland)
- Zentrifugalfilter (Amicon Ultra 0,5 ml 3kDa (R7NA76703), Amicon Ultra 0,5 ml 10kDa (R7PA87160) / Merck Millipore Ltd., Billerica, MA, USA)
- Zentrifuge (Rotina 420 R / Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland)
- Diamantschleifkörper (Komet® Dental / Gebr. Brasseler GmbH, Lemgo, Deutschland)
- Schwingmühle (Mixer Mill MM 200 / RETSCH® GmbH, Haan, Deutschland)
- Waage (BP 3100 S / Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
- Magnetrührer (RET / IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)

4.3. Pilotversuche

Als Methode zur Quantifizierung von TGF- β 1 wurde für die folgenden Experimente der Sandwich-Enzym-linked Immunosorbent Essay (Sandwich-ELISA) genutzt. Bei diesem Verfahren wird TGF über einen Erstantikörper an eine Multiwellplatte gebunden. Anschließend bindet an das TGF ein zugegebener Detektionsantikörper, welcher eine enzymatische Farbreaktion mit sichtbarem Farbumschlag katalysiert (Verarbeitung nach Gebrauchsanweisung des genutzten TGF-ELISA-Sets). Der Farbumschlag wurde in diesen Experimenten mit einem Infinite F200, betrieben durch die Software Magellan 7.1 photometrisch vermessen. Die Messung geschah bei 450 nm, zusätzlich wurde eine Referenzmessung bei 540 nm durchgeführt.

Da in den folgenden Versuchen verschiedene Spüllösungen zum Einsatz kamen, musste zunächst ein Protokoll etabliert werden, mit welchem unabhängig von der verwendeten Spüllösung genaue Konzentrationswerte im ELISA ermittelt werden können. Hierzu wurden einige Pilotversuche unternommen bei denen verschiedene Zusätze und pH-Werte im ELISA getestet wurden. Auf Grundlage der Ergebnisse wurden die Proben in den Folgeexperimenten mit bovinem Serumalbumin (BSA, Endkonzentration 1%) versetzt, um die Antigen-Antikörper-Bindung zu erleichtern. Die in den Versuchen genutzte Zitronensäure wurde vor der Vermessung im ELISA stets auf pH 6,4 eingestellt.

Zusätzlich wurde ein Pilotversuch unternommen, in dem geklärt werden sollte, welche dekalzifizierende Spüllösung die meisten Wachstumsfaktoren aus Dentin lösen kann. Verglichen wurden hier Natrium-EDTA 10 Gew.-%, Calciumdinitrium-EDTA 10 Gew.-%, Zitronensäure 10 Gew.-% und Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS).

Die Wachstumsfaktoren wurden dabei aus 200 μ m dicken Dentinscheiben mit einem Durchmesser von 6 mm gewonnen, welche mit einem Innenlochsägemikrotom aus kariesfreien, humanen Zähnen hergestellt wurden. Die Lagerung der Zähne, sowie der Scheiben geschah bei 4°C in 0,5%iger Chloramin-T Lösung.

Vor der Verarbeitung wurden die Dentinscheiben in 600 µl PBS für 10 min auf einem Orbitalschüttler (150 min^{-1}) gewaschen. Dieser Vorgang wurde zweimal durchgeführt. Die Dentinscheiben wurden daraufhin in ein mit 500 µl NaOCl 5,25% befülltes Well für 5 min auf dem Orbitalschüttler (150 min^{-1}) platziert und anschließend analog zum ersten Schritt in PBS gewaschen. Hiernach wurden die Scheiben in ein Well mit 200 µl der entsprechenden Spüllösung (Na-EDTA 10Gew.-%, NaCa-EDTA 10Gew.-%, Zitronensäure 10Gew.-% oder PBS) gegeben und 10 min bei 470 min^{-1} auf einem Minishaker geschwenkt. Die gewonnenen Proben wurden in ein Eppendorf-Cup überführt und bei -80°C eingefroren. Die TGF-Konzentration der Proben wurde zu einem späteren Zeitpunkt mittels ELISA bestimmt.

Die Ergebnisse von diesem Versuch zeigten, dass Na-EDTA 10Gew.-% signifikant mehr TGF- β 1 aus den Scheiben lösen konnte als die anderen eingesetzten Spüllösungen, sodass dieses in den Folgeversuchen zur Lösung von Wachstumsfaktoren genutzt wurde.

4.4. Versuche im Zahnmodell

Um die Freisetzung von Wachstumsfaktoren realistischer darzustellen wurde ein Versuchsprotokoll etabliert, nach welchem Zähne ähnlich dem klinischen Vorgehen aufbereitet und gespült wurden. So sollte in diesem Experiment untersucht werden welchen Einfluss Natriumhypochlorid (NaOCl), Chlorhexidindigluconat (CHX), Kochsalzlösung (NaCl), Calciumhydroxid (CaOH_2) und der Kanaldurchmesser auf die Freisetzung von Dentinmatrixproteinen haben. Hierzu wurden 36 kariesfreie, einwurzelige Zähne aus den Beständen des Labors ausgewählt. Die Lagerung der Zähne geschah in Schott-Duran Behältern in Chloramin-T (0,5%) bei 4°C .

Die ausgewählten Zähne wurden daraufhin von okklusal trepaniert, um den Wurzelkanal zugänglich zu machen. Anschließend wurde ein initialer Gleitpfad mit Kerr-Feilen bis ISO 20 auf Arbeitslänge (1 mm vor Apex) präpariert. Der Kanal wurde bei der Aufbereitung und nach Feilenwechseln regelmäßig mit NaCl-Lösung 0,9% gespült.

Zur verbesserten Handhabung der Proben und um potentielle Verluste der Spülflüssigkeit über das Foramen apicale zu verhindern, wurden die Zähne in Polystyrol-Behältern mit SilaPlast Impressionsmaterial fixiert.

Zur weiteren Lagerung der vorbereiteten Zähne wurde ein mit NaCl 0,9% getränktes Wattepellet in die Trepanationsöffnung gelegt, um die Austrocknung der Zähne zu verhindern (Lagerung bei 4°C).

Da dargestellt werden sollte, wie sich der Durchmesser des Wurzelkanals aber auch die Anwendung von CaOH₂ auf die Freisetzung von Dentinmatrixproteinen auswirkt, wurden drei Probeentnahmezeitpunkte festgelegt (nach Aufbereitung auf ISO 25, ISO 50 und Calciumhydroxideinlage).

4.4.1. Probengewinnung bei ISO 25 und ISO 50

Zunächst wurden die Zähne maschinell mit RECIPROC Blue ISO 25 .08 taper Feilen weiter aufbereitet. Dabei wurden die Kanäle regelmäßig, gemäß den Empfehlungen von VDW mit 0,9%iger NaCl-Lösung gespült.

Je nach zugeteilter Gruppe durchliefen die Zähne unterschiedliche Spüldurchgänge:

Gruppe	Erster Spüldurchgang	Zweiter Spüldurchgang
1. NaCl	-	20 ml Na-EDTA 10%, 5 min
2. NaOCl	20 ml NaOCl 1,5%, 5 min	20 ml Na-EDTA 10%, 5 min
3. CHX	20 ml CHX 2%, 5 min	20 ml Na-EDTA 10%, 5 min

Tabelle 1: Spülprotokoll der ersten Charge

Zwischen und nach den Spüldurchgängen wurden die Zähne mit passenden Papierspitzen getrocknet. Zur Generierung der Proben wurde erneut Na-EDTA 10%ig in die Kanäle eingefüllt und mit einem VDW Ultraschallaufsatz für 20 Sekunden aktiviert. Die aktivierte Spülflüssigkeit wurde anschließend mit einer Spritze (0,4 x 23 mm Kanüle) aufgezogen und gesammelt. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis ein Probenvolumen von 100 µl erreicht wurde. Die gewonnenen Proben wurden bis zur Vermessung im ELISA bei -80°C eingefroren.

Direkt nach der Aufbereitung auf ISO 25 geschah die Weiterverarbeitung für die zweite Probenentnahme. Genutzt wurden hierfür RECIPROC Blue ISO 50 .05 taper Feilen, ebenfalls mit zusätzlicher NaCl 0,9% Spülung. Nach der weiterführenden Aufbereitung wurden die Kanäle mit Papierspitzen getrocknet und daraufhin mit 20 ml EDTA 10%ig für 5 min gespült und erneut getrocknet. Analog zum ersten Durchgang wurden anschließend 100 µl ultraschallaktivierte Na-EDTA Lösung 10%ig gesammelt, die Lagerung geschah bei -80°C.

4.4.2. Probengewinnung nach Calciumhydroxideinlage

Nach dem Sammeln der vorherigen Proben wurden die Kanäle erneut mit Papierspitzen getrocknet. Daraufhin wurde Calciumhydroxid-Paste (Ultracal) im Sinne einer medikamentösen Einlage in die Kanäle eingebracht. Die Applikation der Paste geschah dabei mit einer dünnen Kanüle (0,4 x 23 mm), sodass die aufbereiteten Kanäle im Ganzen gefüllt werden konnten. Auf der Einlage wurde ein in NaCl-Lösung (0,9%) getränktes Wattepellet platziert. Diese Einlage wurde 72 Stunden im Zahn belassen (100% Luftfeuchtigkeit, 37°C, 5% CO₂). Infolgedessen wurde die Paste unter Ultraschallaktivierung mit EDTA 10%ig entfernt und die Kanäle anschließend getrocknet. Zuletzt wurden für die dritte Probenentnahme, analog zum vorherigen Vorgehen, wieder 100 µl aktivierte 10%ige EDTA Lösung gewonnen.

4.5. Aufkonzentrierung der gewonnenen Proben

Zusätzlich zur Gewinnung der Proben sollte untersucht werden wie sich in EDTA gelöste TGF weiter aufkonzentrieren lässt.

Zunächst wurde für diesen Versuch eine TGF-β₁ Lösung mit einer Konzentration von 100 pg/ml hergestellt. Hierzu wurden der Schmelz, das Zement und anhaftende Bindegewebe von extrahierten humanen Molaren entfernt und diese anschließend in einer Schwingmühle für 90 s bei 25 s⁻¹ gemahlen, bis ein Pulver entstand. Von diesem Pulver wurden 10 g in 15 ml EDTA 10%ig gelöst und anschließend für 30 min unter Kühlung auf einem Rotationsschüttler (250 min⁻¹) platziert.

Das nun im EDTA gelöste TGF wurde mittels Zentrifugation und durch eine absteigende Filtrierungskette (1,2 µm, 0,45 µm, 0,2 µm) aus der Lösung gewonnen. Anschließend wurden die Proben mehrmals in 3000 Dalton Cutoff Filtern unter mehrmaliger Zugabe von PBS zentrifugiert, um das zelltoxische EDTA gegen ein physiologisches Agens zu tauschen (86). Für diesen Versuch wurden Lösungen mit einer TGF Konzentration von 100 pg/ml in PBS hergestellt. Diese Konzentration orientiert sich dabei an den vorangegangenen Versuchen und soll eine klinisch realistische Ausbeute an TGF darstellen.

Von dieser Lösung wurden je 500 µl in Filter mit einem Cut-off bei 3000 und 10000 Dalton Molekulargewicht gegeben und anschließend in einer Kühlzentrifuge bei 21°C und 13000 min⁻¹ (14000 x g) zentrifugiert. Aus beiden Filtern wurden je Durchlauf Proben nach 3, 6, 9, 12, 15 und 18 Minuten generiert. Insgesamt wurden drei Durchläufe durchgeführt, sodass für beide Filter für alle Entnahmezeitpunkte drei Proben generiert wurden.

4.6. Datenauswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit der Software PRISM 8 für macOS. Die grafische Darstellung der Daten wurde ebenfalls mit PRISM 8 durchgeführt. Berechnet und grafisch dargestellt wurden der Median sowie die 25%- und 75%-Perzentilen. Die statistische Analyse erfolgte mittels nichtparametrischer Mann-Whitney-Tests bei einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ (130).

5. Ergebnisse

5.1. Pilotversuche

In der Abbildung 1 sind die Ergebnisse des Dentinsscheibenexperiments graphisch dargestellt. In diesem Versuchsaufbau wurden Dentinscheiben nach einer Vorbehandlung mit NaOCl 5,25% für 10 Minuten in verschiedenen Spüllösungen auf einem Minishaker geschwenkt. Die Quantifizierung des hierdurch freigesetzten Wachstumsfaktors TGF- β 1 erfolgte mittels ELISA.

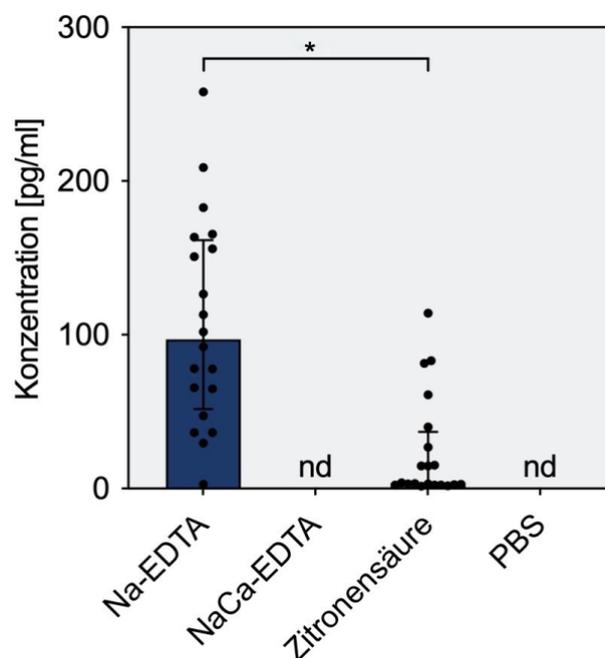


Abbildung 1: Freisetzungsprofil von TGF- β 1 nach Anwendung verschiedener Spüllösungen, abgebildet sind die Einzelmesswerte (20 je Spüllösung), Mediane sowie 25%- und 75%-Perzentilen. Signifikante Unterschiede wurden mit „*“ gekennzeichnet.

Es konnte gezeigt werden, dass es signifikante Unterschiede im Freisetzungsprofil der verschiedenen eingesetzten Spüllösungen gibt. So konnten NaCa-EDTA 10%ig und PBS nicht nachweisbar TGF- β 1 aus den Dentinscheiben lösen. Na-EDTA 10%ig konnte signifikant mehr TGF aus den Dentinscheiben freisetzen als die eingesetzte Zitronensäure 10%ig. Des Weiteren fallen starken Divergenzen innerhalb der einzelnen Gruppen auf.

Aufgrund der signifikant erhöhten Freisetzung von TGF- β 1 durch Na-EDTA wurde dieses in den Folgeversuchen als demineralisierende Lösung angewendet.

5.2. TGF-β1 Freisetzung im Zahnmodell

In der Abbildung 2 sind die Ergebnisse des Experiments graphisch dargestellt. Hier wurden verschiedene desinfizierende Spüllösungen auf ihre TGF-β1-lösenden Kapazitäten untersucht. Die Flüssigkeiten wurden dabei aus Wurzelkanälen gewonnen, welche sukzessive weiter aufbereitet wurden. Ferner wurden Proben nach einer Einlage mit Calciumhydroxid gewonnen. Alle generierten Proben wurden in diesem Experiment durch Ultraschall aktiviert. Die Quantifizierung von TGF-β1 geschah mittels ELISA.

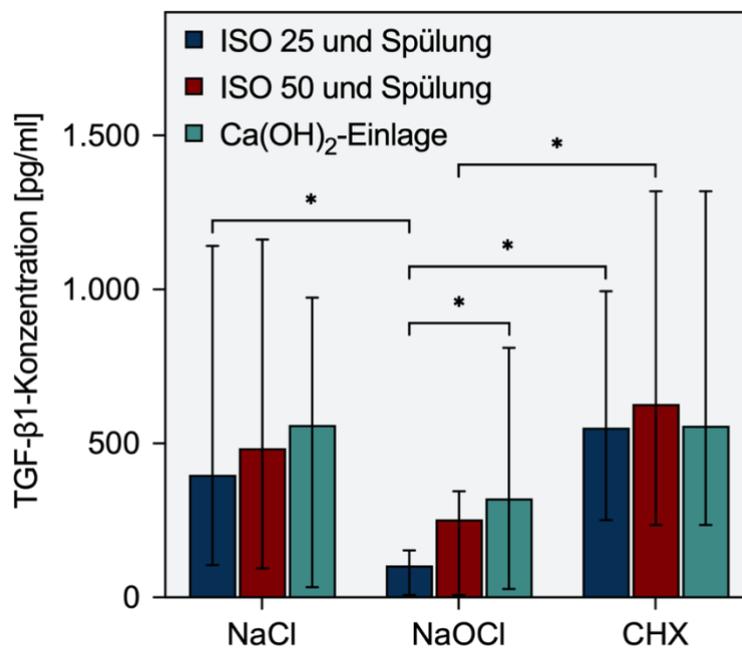


Abbildung 2: Freisetzungsprofil verschiedener Spüllösungen bei unterschiedlichen Aufbereitungsgrößen und nach Ca(OH)₂ Einlage (n=12). Dargestellt sind Mediane sowie 25%- und 75%-Perzentilen. Signifikante Unterschiede wurden mit „*“ gekennzeichnet.

Anhand der Graphik ist zu erkennen, dass sich die Freisetzungsprofile der einzelnen Spüllösungen signifikant unterscheiden. Am wenigsten TGF-β1 konnte in diesem Aufbau aus den mit NaOCl (1,5%) gespülten Kanälen gewonnen werden. Sowohl im Vergleich zu NaCl (0,9%) als auch zum CHX (2%) war die Freisetzung bei ISO 25 signifikant erniedrigt. Vergleicht man CHX und NaOCl so zeigt sich, dass CHX sowohl bei ISO 25 als auch bei ISO 50 signifikant mehr TGF-β1 aus den Zähnen lösen konnte.

Ferner lässt sich ein Einfluss sowohl der Aufbereitungsgröße (dem Kanaldurchmesser) als auch der Verwendung von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ als medikamentöse Einlage auf die Wachstumsfaktorfreisetzung erkennen. Die weitere Aufbereitung auf ISO 50 führte bei allen Gruppen zu vermehrter Wachstumsfaktorfreisetzung. Eine Einlage mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ führte nur in der NaCl und NaOCl Gruppe zu vermehrter Freisetzung, im Falle von CHX wurde nach Einlage weniger TGF- β 1 gewonnen.

5.3. Aufkonzentrierung der Proben

In Abbildung 3 sind die Einflüsse der Zentrifugation (13000 min^{-1}) im 3000 und 10000 Dalton Cutoff Filter auf Konzentrationen und Volumina der eingesetzten Proben graphisch dargestellt.

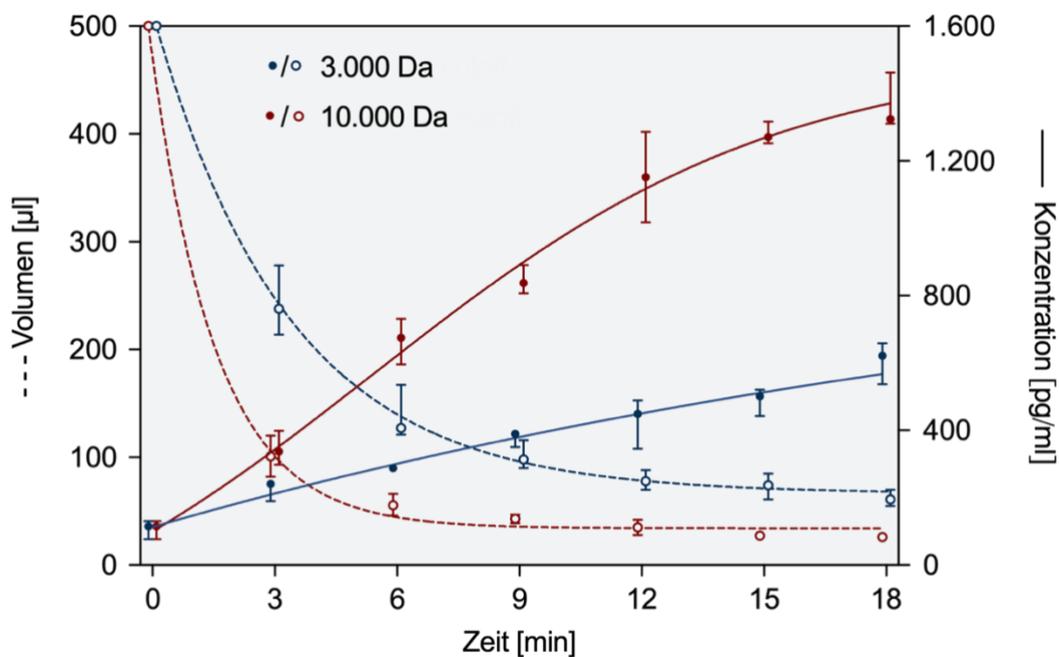


Abbildung 3: Probenvolumen und TGF- β 1 Konzentration in Abhängigkeit von der Zentrifugationsdauer (Zentrifugation im 3000 oder 10000 Dalton Cutoff Amicon Filter). Dargestellt sind Mediane, sowie 25%- und 75%- Perzentilen ($n=3$).

Aus der Graphik ist zu entnehmen, dass die Zentrifugation im 10000 Dalton Filter zu kleineren Endvolumina, bei gleichzeitig erhöhter Konzentration in den Proben führt. Der 10000 Dalton Filter konzentriert die Proben so nach maximaler Zentrifugationszeit (18 min) mehr als doppelt so stark auf wie der 3000 Dalton Filter.

Gleichzeitig nimmt das Probenvolumen im 10000 Dalton Filter stärker ab, bis es nach 6 bis 9 Minuten ein Plateau bei ungefähr 50 μ l erreicht, welches auf das Totvolumen der Filter zurückzuführen ist. Die Kurve des 3000 Dalton Filters flacht im Vergleich erst zwischen 12 und 18 Minuten merklich ab.

6. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von verschiedenen, endodontisch genutzten Spüllösungen und von Calciumhydroxid als medikamentöse Einlage auf die Freisetzung von Wachstumsfaktoren untersucht. Als repräsentativer Faktor wurde TGF- β 1 ausgewählt und quantifiziert. Sowohl in den Pilotversuchen als auch im Modell, in welchem Wurzelkanäle extrahierter Zähne aufbereitet wurden, kam es zu starken Schwankungen zwischen den einzelnen Zähnen im Hinblick auf die Wachstumsfaktorfreisetzung. Ursächlich könnte die individuelle Zusammensetzung des Dentins und seiner Bestandteile bei den einzelnen Probenkörpern (Zähnen) sein. Ein Grund könnte hier die vermehrte Verkalkung des Dentins mit zunehmendem Alter der Patienten (beim Zeitpunkt der Extraktion der Versuchszähne) darstellen (131) oder aber auch die Anzahl und Größe der angeschnittenen Dentintubuli, da diese je nach Abstand zur Pulpa in Durchmesser und Menge variieren können (14).

6.1. Wachstumsfaktorlösung im Pilotversuch

In diesem Versuchsaufbau sollte geklärt werden welche dekalzifizierende Spüllösung am besten geeignet erscheint, um Wachstumsfaktoren aus Dentin zu lösen. Eingesetzt wurden zu diesem Zweck Natrium-EDTA, Calciumdinatrium-EDTA und Zitronensäure, jeweils 10Gew.-%. Zusätzlich sollte dargestellt werden ob es möglich erscheint auch mit PBS Wachstumsfaktoren zu lösen.

Na-EDTA konnte in diesem Versuchsaufbau die meisten Wachstumsfaktoren aus den eingesetzten Dentinscheiben lösen. Calciumdinatrium-EDTA lieferte keine messbare Lösung an Faktoren. Dieser Umstand erscheint logisch, da EDTA mit seinem physiologischen pH-Wert von 7 vor allem als Komplexbildner demineralisiert. So geschieht die Demineralisation durch das Herauslösen und Komplexieren von Ca^{2+} Kationen aus dem Dentin. Setzt man bereits mit Kationen gesättigtes EDTA (Calciumdinatrium-EDTA) ein, so kann dies das Dentin nicht mehr in vollem Umfang dekalzifizieren und so auch weniger oder keine Wachstumsfaktoren lösen. Im Gegensatz dazu konnte die eingesetzte Zitronensäure Faktoren lösen, allerdings signifikant vermindert, im Vergleich zum Natrium-EDTA.

Zitronensäure kann sowohl über ihren niedrigen pH-Wert (ca. 1,7), sowie eingestellt auf physiologischere pH-Werte als Komplexbildner Dentin demineralisieren (32). Obwohl Zitronensäure gute Demineralisationseigenschaften zeigt (132) konnten in diesem Experiment keine große Menge an Wachstumsfaktoren in diesem Agens nachgewiesen werden. Dies könnte ebenfalls dem sauren pH-Wert geschuldet sein, welcher die Wachstumsfaktoren zu destabilisieren scheint. Für Vertreter der FGF-Familie beispielsweise ist bekannt, dass diese schon bei einem pH-Wert von 5 an Stabilität verlieren (14). PBS konnte in diesem Versuchsaufbau keine Wachstumsfaktoren zu lösen.

Unter diesen Gesichtspunkten lässt sich schlussfolgern, dass sowohl die Demineralisation des Dentins als auch die Stabilität der Wachstumsfaktoren wichtige Aspekte für die Lösung von Wachstumsfaktoren darstellen. So scheint das pH neutrale Na-EDTA besser geeignet zur Wachstumsfaktorlösung als die saure Zitronensäure.

6.2. Freisetzung von Wachstumsfaktoren im Zahnmodell

Mit dem ex vivo Versuch an extrahierten Zähnen sollte die klinische Realität einer endodontischen Behandlung besser dargestellt werden als dies in den Pilotversuchen möglich war. Hierzu wurden Wurzelkanäle an extrahierten Zähnen aufbereitet und gespült. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass nur in der Endodontie gebräuchliche Spüllösungen und Medikamente genutzt wurden, ebenso wurden klinisch relevante Spül- und Aktivierungszeiten eingehalten. In diesem Aufbau wurde aufgrund der Ergebnisse aus den Pilotversuchen Na-EDTA (nachfolgend nur als EDTA bezeichnet) als demineralisierende Lösung eingesetzt. Es sollte untersucht werden wie sich verschiedene Spüllösungen und verschiedene Aufbereitungsgrößen auf die Freisetzung von Wachstumsfaktoren auswirken. Zur Aktivierung der Proben wurde in diesem Aufbau Ultraschall genutzt, da dies bereits in anderen Versuchsmodellen zu vermehrter Freisetzung von Wachstumsfaktoren führte (92).

Es fällt auf, dass die Menge an freigesetztem TGF- β 1 mit zunehmendem Kanaldurchmesser in allen Gruppen zunimmt. Dies kann über die Zunahme der zur Wachstumsfaktorlösung beitragenden Kanaloberfläche erklärt werden.

Einen zusätzlichen Effekt könnte hier allerdings auch die Zugangskavität haben, da auch aus dem hier freigelegten Dentin potentiell Wachstumsfaktoren extrahiert werden können. Die Zugabe von EDTA in der ersten Charge (ISO 25) könnte so zu einer Veränderung der Mikrostruktur des Dentins geführt haben, sprich die Schmierschicht der Kavitätenpräparation entfernt und damit die Dentinoberfläche freigelegt haben, sodass die EDTA Spülung in der zweiten Charge (ISO 50) zu einer effektiveren Wachstumsfaktorlösung führte.

Betrachtet man die eingesetzten Spülflüssigkeiten, so fällt die starke Divergenz in der TGF- β 1 Freisetzung zwischen dem eingesetzten CHX und NaOCl auf. Im Falle von NaOCl wurde bereits in anderen Veröffentlichungen berichtet, dass es die Freisetzung von Wachstumsfaktoren möglicherweise behindern könnte (133). Eine verminderte Quantität an freigesetzten Proteinen konnte auch in diesen Versuchen beobachtet werden. Diese hängt wahrscheinlich mit dem schädlichen Einfluss zusammen, den das oxidative NaOCl auf die Wachstumsfaktoren hat. Einige Veröffentlichungen berichten in diesem Sinne von einer Elimination der schädlichen NaOCl-Einflüsse durch vermehrtes Spülen mit EDTA (32,133). Leider ist in diesem Versuchsaufbau nicht eindeutig zu klären, ob die vermehrte Wachstumsfaktorfreisetzung der NaOCl-gespülten Zähne im zweiten Spüldurchgang auf die weitere Aufbereitung der Zähne oder das zusätzliche Spülen mit EDTA zurück zu führen ist. Allerdings erreichen die mit NaOCl behandelten Zähne selbst nach mehrmaligem Spülen mit EDTA, weiterer Aufbereitung des Kanales und nach dem Einbringen einer medikamentösen Einlage nicht die Wachstumsfaktorfreisetzung, die ein mit NaCl gespülter Zahn bereits in der ersten Charge generierte. Es ist darauf zu achten, dass NaOCl, wie in diesem Aufbau eingesetzt, ungefähr 0,15 mm tief in das Dentin penetriert (134). Dieses penetrierte Dentin wird nicht in jedem Fall durch eingesetztes EDTA abgetragen, da dies nur ca. 0,03 mm tief in das Dentin eindringt (135).

Auffallend in diesem Versuchsaufbau ist, dass CHX im Vergleich zum NaOCl deutlich mehr Wachstumsfaktoren aus den Zähnen lösen konnte. Ursächlich könnte hierfür der leicht saure pH-Wert der CHX-Lösung (pH 5) sein, welcher zwar die Zahnhartsubstanz demineralisiert, die gelösten Proteine aber nicht in großem Maße destabilisiert. Dies begründet warum aus den Zähnen, die mit CHX gespült wurden, mehr TGF- β 1 gewonnen werden konnte als aus den Zähnen, die mit NaCl gespült wurden (32).

Abschließend ist noch hervorzuheben, dass eine medikamentöse Einlage die freigesetzte Menge an TGF- β 1 sowohl für NaCl-, als auch für NaOCl-Spülungen erhöht, nicht aber für Zähne, welche mit CHX behandelt wurden. Diese Tatsache könnte mit der elektrostatischen Bindung von CHX zur Zahnhartsubstanz zusammenhängen (136,137). So könnte das anhaftende CHX eventuell die Wirkung der medikamentösen Einlage negativ beeinflusst haben.

6.3. Aufkonzentrierung der Proben mittels Zentrifuge

Zur Aufkonzentrierung der gewonnenen Proben wurden Filter mit einem Cut-off bei 3000 und 10000 Dalton verwendet. Die Proben im 10000 Dalton Filter wurden durch die Zentrifugation auf kleinere Volumina reduziert, bei gleichzeitig erhöhter TGF- β 1 Konzentration, was durch das kleinere Totraumvolumen und die geringere Permeabilität der 10000 Dalton Filter zu erklären ist. In diesem Experiment konnte so gezeigt werden, dass bereits nach 10-minütiger Zentrifugation im 10000 Dalton Filter das Probenvolumen um mehr als das zehnfache gesenkt werden konnte (500 μ l auf ca. 40 μ l), bei gleichzeitig starker Aufkonzentration der TGF- β 1 Menge (125 pg/ml auf ca. 900 pg/ml). So erscheint der 10000 Dalton Filter besser geeignet zur effizienten und schnellen Aufkonzentrierung der Proben. Auch die durch dieses Protokoll erreichte Menge an TGF- β 1 scheint ausreichend zu sein, da die optimale Konzentration für die Differenzierung von Stammzellen derzeit mit 500 pg/ml angegeben wird (86).

Die für die Aufkonzentrierung nötige Zentrifuge stellt bei diesen Experimenten das einzige Arbeitsgerät dar, welches man in der Regel nicht in einer Zahnarztpraxis findet. Allerdings werden Zentrifugen in manchen Praxen bereits zur Gewinnung von Platelet-Rich-Fibrin eingesetzt und würden auch bei Neuanschaffung keinen großen finanziellen Aufwand darstellen (auch im Vergleich zu anderer Medizintechnik).

Die Zentrifugation ist somit ein einfaches und probates Mittel, um die mit der Spüllösung gewonnenen Wachstumsfaktoren weiter zu konzentrieren. Es ist allerdings zu beachten, dass in diesem Versuch nicht geklärt wurde, wie hoch die Konzentration von EDTA nach Filtrierung der Proben ist. Dies erscheint besonders wichtig, da EDTA einen zytotoxischen Effekt auf Stammzellen hat (93,94) und somit ein Einbringen von Proben mit Rest-EDTA vermutlich die Erfolgchancen einer regenerativen Behandlung schmälern würde. Weitere Studien zur Zytotoxizität von filtrierten Proben wären wünschenswert.

6.4. Bedeutung der Versuche für die regenerative Endodontie

Aus den vorangegangenen Experimenten kann man einige wertvolle Erkenntnisse für die Etablierung eines Protokolls zur Chairside-Isolierung von Wachstumsfaktoren gewinnen. So zeigt sich, dass es nicht nur von großer Bedeutung ist, dass die eingesetzten Spülflüssigkeiten Wachstumsfaktoren aus dem Zahn lösen können, sondern auch dass diese keine destabilisierende oder gar toxische Wirkung aufweisen. Es zeigte sich, dass sowohl Zitronensäure als auch NaOCl in diesem Hinblick kritisch zu bewerten sind.

Natriumhypochlorid

Im Falle des NaOCl ist ein Ersatz durch eine anderweitige desinfizierende Spüllösung nicht ohne weiteres möglich. Dies liegt vor allem daran, dass NaOCl ein breites antimikrobielles Spektrum besitzt, es in der Lage ist nekrotisches Gewebe aufzulösen und Endotoxine zu inaktivieren (38). Unterlässt man die Spülung mit NaOCl und greift nur auf CHX als alleinige desinfizierende Lösung zurück läuft man Gefahr, dass Bakterien oder Gewebereste im Kanal verbleiben. Diese könnten zu einem späteren Zeitpunkt zu einer bakteriellen Rekolonialisierung des Wurzelkanalsystems und somit einem Scheitern der Behandlung als Ganzes führen.

Eine wichtige Frage beim Einsatz von NaOCl ist die Wahl einer geeigneten Konzentration. So wird in mehr als einem Drittel der publizierten Literatur NaOCl in einer Konzentration von 5 - 6% angewandt, in zwei Drittel der Fälle in einer Konzentration von 3% und nur in einem Prozent der Fälle von 1% (138).

Natriumhypochlorid in höheren Konzentrationen setzt nicht nur die Überlebenswahrscheinlichkeit der Stammzellen der apikalen Papille signifikant herab (139,140), sondern hat auch negative Effekte auf die Bildung einer odontoblasten-ähnlichen Schicht auf der behandelten Dentinoberfläche (141). Dieser Effekt konnte nicht auf Flächen beobachtet werden, welche zusätzlich mit EDTA behandelt wurden (139,141). Der Nutzen eines Nachspülens mit EDTA wird zusätzlich bestärkt durch den positiven Einfluss von EDTA auf das Überleben, die Migration und die Differenzierung von apikalen Stammzellen (140,141). Es ist also anzuraten, auf die positiven desinfizierenden Aspekte des Natriumhypochlorids nicht gänzlich zu verzichten, dieses allerdings vor allem bei der initialen Aufbereitung des Zahnes in moderater Konzentration einzusetzen. So wird im Rahmen von regenerativen Behandlungen bereits von der AAE und ESE empfohlen nur bei den initialen Aufbereitungsgrößen mit NaOCl zu spülen (78,79).

Chlorhexidindigluconat

Chlorhexidindigluconat besitzt nur eine beschränkte Wirksamkeit gegen bestimmte Bakterienstämme. Weiterhin kann es keine nekrotische Gewebereste auflösen und kommt so nicht als alleinige, desinfizierende Spülung in Frage (142). In mehreren Studien wies CHX als Zusatzspülung des Wurzelkanals allerdings positive Ergebnisse auf (75,143,144). Zu beachten ist allerdings, dass CHX die Überlebenswahrscheinlichkeit von Stammzellen signifikant herabsetzt (140,145). Die Toxizität von CHX auf Stammzellen kann jedoch durch L-alpha-Lecithin deutlich gesenkt werden (145). Zusätzlich bewirkt es durch seine elektrostatische Bindung an die Zahnhartsubstanz auch eine verminderte Adhäsion von Zellen an das Dentin, sodass auch hier ein Nachspülen mit EDTA angeraten wird (146). Die vorangegangenen Versuche zeigen, dass ein Spülen des Kanals mit CHX die Wachstumsfaktorfreisetzung erhöhen kann. Dies ist wahrscheinlich auf den leicht sauren Charakter von CHX zurück zu führen, welches zwar die Zahnhartsubstanz demineralisiert, aber nicht die Wachstumsfaktoren schädigt (32). Allerdings sollte der Kanal anschließend nochmals mit EDTA gespült und/oder weiter aufbereitet werden, um die negativen Effekte von CHX auf die Zelladhäsion zu minimieren. Ferner sollte die CHX Spülung in moderater Weise erfolgen, sodass es zu keiner Schädigung der apikalen Stammzellen kommt.

Ethylendiamintetraacetat

Wie bereits beschrieben hat sich (Natrium-)EDTA in den durchgeführten Experimenten als demineralisierende Spüllösung der Wahl herausgestellt. Dies wird durch zahlreiche positive Berichte in der Fachliteratur und Empfehlungen namhafter endodontischer Fachgesellschaften unterstützt (78,79,88,92). Die positiven Aspekte beziehen sich dabei auf die wachstumsfaktorfreisetzende Kapazität des EDTAs selbst und auf seine Eigenschaften als Nachspülung (s. o.).

Calciumhydroxid

Calciumhydroxideinlagen werden häufig mit Erfolg in der klinisch angewandten regenerativen Endodontie verwendet (142-149). Diese Einlagen haben nicht nur einen positiven Effekt auf das Überleben und die Proliferation von apikalen Stammzellen (139,150), sondern können auch zu einer vermehrten Freisetzung von Wachstumsfaktoren beitragen (151). Zusätzlich bietet eine Calciumhydroxid-Einlage einen zusätzlichen antimikrobiellen Effekt (152,153).

Positiv bei wasserbasierten Calciumhydroxidpasten ist zudem, dass sie leicht und weitgehend rückstandsfrei aus dem Kanal wieder entfernt werden können (154,155), sodass sie keinen negativen Einfluss auf die anschließenden Spülungen und die Zelladhäsion haben. Zusammengefasst bringt Calciumhydroxid so einige klare Vorteile bei der regenerativen Behandlung mit sich, was noch einmal dadurch bestärkt wird, dass es bereits von den amerikanischen und europäischen endodontischen Fachverbänden zur Revitalisierung empfohlen wurde (78,79).

6.5. Vorschlag für ein Behandlungsprotokoll zur regenerativen endodontischen Therapie

Die in dieser Arbeit gesammelten Erkenntnisse können Anstöße für ein Protokoll zur Chairside-Isolierung von Wachstumsfaktoren geben. Folgendes Protokoll leitet sich aus den oben genannten Ergebnissen der Versuche ab:

Erster Behandlungsschritt:

- Trepanation des Zahnes und initiale Aufbereitung unter ausreichender Spülung mit NaOCl 1,5%
- Weitere Aufbereitung des Zahnes unter schonender Chlorhexidin- oder Kochsalzspülung
- Temporäre Wurzelkanalfüllung mit Calciumhydroxid und bakteriendichter Verschluss des Zahnes

Zweiter Behandlungsschritt:

- Entfernen der temporären Wurzelfüllung durch ultraschallaktivierte EDTA-Spülung 10%
- Sammeln von 100 µl Spüllösung durch erneutes Einbringen von EDTA 10% samt 30 Sekunden Ultraschallaktivierung
- Die gesammelte Lösung in einen 10000 Dalton Cutoff Filter geben und mit 400 µl destilliertem Wasser verdünnen, anschließend 6 Min. bei 13000 min⁻¹ zentrifugieren
- Weiterverarbeitung der filtrierten Lösung zum Einbringen in den Wurzelkanal

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss verschiedener demineralisierender und desinfizierender Spüllösungen, sowie von Calciumhydroxid als medikamentöse Einlage auf die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus dem Wurzelkanaldentin untersucht. Hintergrund der Untersuchung ist die übergeordnete Frage, wie in einem klinischen Setting ausreichend Wachstumsfaktoren gewonnen werden können, um diese in einem regenerativen Behandlungsansatz einsetzen zu können. Hierzu wurden mehrere, in der Endodontie gebräuchliche Spüllösungen auf Dentinscheiben und in aufbereiteten Wurzelkanälen extrahierter Zähne eingesetzt und anschließend das in ihnen gelöste TGF- β 1 mittels ELISA quantifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass Natrium-EDTA einen deutlichen Vorteil in der Freisetzung von TGF- β 1 gegenüber Zitronensäure aufweist. Dies liegt wahrscheinlich vor allem am niedrigen pH-Wert der Zitronensäure, welcher die Denaturierung der Wachstumsfaktoren bewirken kann. Das pH-neutrale EDTA scheint somit besser geeignet zur Wachstumsfaktorfreisetzung.

Die getesteten desinfizierenden Spüllösungen Chlorhexidin und Natriumhypochlorid zeigen deutlichen Einfluss auf die Wachstumsfaktorfreisetzung, wobei CHX die Menge an freigesetzten Faktoren erhöht und NaOCl diese erniedrigt. Ursächlich hierfür erscheint das oxidative Verhalten des Natriumhypochlorids, welches einen negativen Einfluss auf die Wachstumsfaktoren zu haben scheint. CHX dahingegen unterstützt mit seinem moderat sauren pH-Wert von 5 zwar die Demineralisation des Dentins, sodass mehr Wachstumsfaktoren in Lösung gehen können, destabilisiert diese aber im gleichen Zuge nicht. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Calciumhydroxideinlage die Wachstumsfaktorfreisetzung aus Zähnen, welche mit NaOCl desinfiziert wurden, steigern konnte. Dies galt allerdings nicht für CHX-gespülte Zähne, hier wurde die Menge an freigesetzten Faktoren nach Einlage reduziert.

Allgemein kann aus dieser Studie geschlossen werden, dass ein zentraler Punkt die Wahl der geeigneten Spüllösung und dessen Wirken auf Wachstumsfaktoren ist, wobei vor allem der pH-Wert (Zitronensäure, CHX) und der oxidative Charakter (NaOCl) der verschiedenen Flüssigkeiten einen erheblichen Einfluss nimmt. Allerdings kann man bei der Desinfektion und der Säuberung des Kanals nicht gänzlich auf den Einsatz von NaOCl verzichten, sodass dieses in geringer Konzentration zu Beginn der regenerativen Behandlung eingesetzt werden sollte.

So sollte ein, im Gegensatz zur herkömmlichen Endodontie, abgewandeltes Desinfektionsprotokoll angewandt werden, welches das anfängliche Spülen mit Natriumhypochlorid in moderater Konzentration sowie den Einsatz einer Calciumhydroxideinlage vorsieht. Gegebenenfalls kann zusätzlich behutsam mit Chlorhexidin gespült werden.

Für die weitere Verarbeitung der gewonnenen Wachstumsfaktoren konnte gezeigt werden, dass die Zentrifugation ein schnelles und effizientes Mittel zur Aufkonzentrierung der Faktoren darstellt.

8. Literaturverzeichnis

1. Saintrain, M. V. D. L., & De Souza, E. H. A. (2012). Impact of tooth loss on the quality of life. *Gerodontology*, 29(2):632-636.
2. Galler, K. (2013). Möglichkeiten und Grenzen der Pulparegeneration. *Zahnmedizin Up2date*, 7(06):517-527.
3. Goldberg, M., & Smith, A. J. (2004). Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: A biological basis for repair and tissue engineering. In *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*; 15(1):13-27.
4. Atesci, A. A., Avci, C. & Tuglu, M. (2020). Effect of Different Dentin Conditioning Agents on Growth Factor Release, Mesenchymal Stem Cell Attachment and Morphology. *Journal of Endodontics*;46(2):200-208.
5. Lüllmann-Rauch, R., *Histologie*, Thieme Verlag, 2003.
6. Hargreaves, K.M., Seltzer and Bender's *Dental Pulp*, 2. Auflage, Quintessence Publishing Co, Inc, 2012.
7. Couve, E., Osorio, R., & Schmachtenberg, O. (2013). The amazing odontoblast: Activity, autophagy, and aging. In *Journal of Dental Research*; 82(9):765-772.
8. Yu, C., Abbott, P. V., An overview of the dental pulp: Its functions and responses to injury. In *Australian Dental Journal*; 52(1):4-16.
9. Bjørndal, L. (2008). The Caries Process and Its Effect on the Pulp: The Science Is Changing and So Is Our Understanding. In *Journal of Endodontics*; 34(7):2-5.
10. Feiglin, B., Dental pulp response to traumatic injuries – A retrospective analysis with case reports, In *Endodontics and Dental Traumatology*, 12(1):1-8.
11. Stanley, H. R. (1961). Traumatic capacity of high-speed and ultrasonic dental instrumentation. *Journal of the American Dental Association* (1939), 63(6):749-766.
12. Yu, C. Y., & Abbott, P. V. (2018). Pulp microenvironment and mechanisms of pain arising from the dental pulp: From an endodontic perspective. In *Australian Endodontic Journal*; 44(2):82-98.
13. Duncan, H. F., Galler, K. M., Tomson, P. L., Simon, S., El-Karim, I., Kundzina, R., Krastl, G., Dammaschke, T., Fransson, H., Markvart, M., Zehnder, M., & Bjørndal, L. (2019). European Society of Endodontology position statement: Management of deep caries and the exposed pulp. *International Endodontic Journal*; 52(7):923-934.

14. Lehmann, K.M., Zahnärztliche Propädeutik, Deutscher Zahnärzterverlag, 2009.
15. Salehrabi, R., & Rotstein, I. (2004). Endodontic treatment outcomes in a large patient population in the USA: An epidemiological study. *Journal of Endodontics*; 30(12):846-850.
16. Dammaschke, T., Steven, D., Kaup, M., & Ott, K. H. R. (2003). Long-term survival of root-canal-treated teeth: A retrospective study over 10 years. *Journal of Endodontics*; 29(10):638-643.
17. Kojima, K., Inamoto, K., Nagamatsu, K., Hara, A., Nakata, K., Morita, I., Nakagaki, H., & Nakamura, H. (2004). Success rate of endodontic treatment of teeth with vital and nonvital pulps. a meta-analysis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*; 97(1):95-99.
18. Sundqvist, G., Figdor, D., Persson, S., & Sjögren, U. (1998). Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*; 85(1):86-93.
19. Sjögren, U., Figdor, D., Persson, S., & Sundqvist, G. (1997). Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal*; 30(5):297-306.
20. Dioguardi, M., Di Gioia, G., Illuzzi, G., Laneve, E., Cocco, A., & Troiano, G. (2018). Endodontic irrigants: Different methods to improve efficacy and related problems. In *European Journal of Dentistry*; 12(3):459–466.
21. Poletto, D., Poletto, A. C., Cavalaro, A., Machado, R., Cosme-Silva, L., Garbelini, C. C. D., & Hoepfner, M. G. (2017). Smear layer removal by different chemical solutions used with or without ultrasonic activation after post preparation. *Restorative Dentistry & Endodontics*; 42(4):324-331.
22. Cunningham, W. T., Martin, H., & Forrest, W. R. (1982). Evaluation of root canal débridement by the endosonic ultrasonic synergistic system. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*; 53(4):401-404.
23. Hülsmann, M., Adler, C., Schmidt A.K., (2015). Die Entfernung der temporären Wurzelkanaleinlage. *ZMK*; 31(5):329-336.
24. Parirokh, M., & Torabinejad, M. (2010). Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review-Part III: Clinical Applications, Drawbacks, and Mechanism of Action. In *Journal of Endodontics*; 36(3):400-413.

25. Bonte, E., Beslot, A., Boukpepsi, T., & Lasfargues, J. J. (2015). MTA versus Ca(OH)₂ in apexification of non-vital immature permanent teeth: a randomized clinical trial comparison. *Clinical Oral Investigations*; 19(6):1381–1388.
26. Nagy, M. M., Tawfik, H. E., Hashem, A. A. R., & Abu-Seida, A. M. (2014). Regenerative potential of immature permanent teeth with necrotic pulps after different regenerative protocols. *Journal of Endodontics*; 40(2):192-198.
27. Cvek, M. (1992). Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha. A retrospective clinical study. *Dental Traumatology*; 8(2):45-55.
28. Paqué, F., Balmer, M., Attin, T., & Peters, O. A. (2010). Preparation of Oval-shaped Root Canals in Mandibular Molars Using Nickel-Titanium Rotary Instruments: A Micro-computed Tomography Study. *Journal of Endodontics*; 36(4):703-707.
29. Violich, D. R., & Chandler, N. P. (2010). The smear layer in endodontics - A review. In *International Endodontic Journal*; 43(1):2-15.
30. Löst, C. (2006). Quality guidelines for endodontic treatment: Consensus report of the European Society of Endodontology. In *International Endodontic Journal*; 39(12):921-930.
31. Zehnder, M. (2006). Root Canal Irrigants. In *Journal of Endodontics*; 32(5):389-398.
32. Galler, K. M., Buchalla, W., Hiller, K. A., Federlin, M., Eidt, A., Schiefersteiner, M., & Schmalz, G. (2015). Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin. *Journal of Endodontics*; 41(3):363-368.
33. Dakin, H. D. (1915). On the use of certain antiseptic substances in the treatment of infected wounds. *British Medical Journal*; 2:318.
34. Austin, J. H., & Taylor, H. D. (1918). Behavior of hypochlorite and of chloramine-t solutions in contact with necrotic and normal tissues in vivo. *Journal of Experimental Medicine*; 27(5):627–633.
35. Crane, A. B., *A Practical Root Canal Technique*, Lea & Febiger, Philadelphia, 1920.
36. BYSTRÖM, A., & SUNVQVIST, G. (1985). The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *International Endodontic Journal*; 18(1):35-40.

37. Cvek, M., Nord, C. E., & Hollender, L. (1976). Antimicrobial effect of root canal débridement in teeth with immature root. A clinical and microbiologic study. *Odontologisk Revy*, 27(1):1-10.
38. Spangberg, L., Engström, B., & Langeland, K. (1973). Biologic effects of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*; 36(6):856-871.
39. Sim, T. P. C., Knowles, J. C., Ng, Y. L., Shelton, J., & Gulabivala, K. (2001). Effect of sodium hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain. *International Endodontic Journal*; 34(2):120-132.
40. Cunningham, W. T., & Joseph, S. W. (1980). Effect of temperature on the bactericidal action of sodium hypochlorite endodontic irrigant. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*; 50(6):569-571.
41. Sirtes, G., Waltimo, T., Schaetzle, M., & Zehnder, M. (2005). The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. *Journal of Endodontics*; 31(9):669-671.
42. Kamburis, J. J., Barker, T. H., Barfield, R. D., & Eleazer, P. D. (2003). Removal of organic debris from bovine dentin shavings. *Journal of Endodontics*; 29(9):559-561.
43. Spratt, D. A., Pratten, J., Wilson, M., & Gulabivala, K. (2001). An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *International Endodontic Journal*; 34(4):300-307.
44. Martin, H. (1976). Ultrasonic disinfection of the root canal. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*; 42(1):92-99.
45. Penna, K. J., & Neshat, K. (2001). Cervicofacial subcutaneous emphysema after lower root canal therapy. *The New York State Dental Journal*, 67(5):28-29.
46. Addy, M., & Moran, J. M. (1997). Clinical indications for the use of chemical adjuncts to plaque control: Chlorhexidine formulations. *Periodontology 2000*; 15(1):52- 54.
47. Zamany, A., Safavi, K., & Spångberg, L. S. W. (2003). The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*; 96(5):578-581.
48. Evanov, C., Liewehr, F., Buxton, T. B., & Joyce, A. P. (2004). Antibacterial efficacy of calcium hydroxide and chlorhexidine gluconate irrigants at 37°C and 46°C. *Journal of Endodontics*; 30(9):653-657.

49. Rölla, G., Loe, H., & Rindom Schiøtt, C. (1970). The affinity of chlorhexidine for hydroxyapatite and salivary mucins. *Journal of Periodontal Research*; 5(2):90-95.
50. Parsons, G. J., Patterson, S. S., Miller, C. H., Katz, S., Kafrawy, A. H., & Newton, C. W. (1980). Uptake and release of chlorhexidine by bovine pulp and dentin specimens and their subsequent acquisition of antibacterial properties. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*; 49(5):455-459.
51. Foulkes, D. M. (1973). Some toxicological observations on chlorhexidine. *Journal of Periodontal Research*; 12:55-60.
52. Hennessey, T. D. (1973). Some antibacterial properties of chlorhexidine. *Journal of Periodontal Research*; 8:61-67.
53. Sundqvist, G. (1994). Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*; 78(4):522-530.
54. Basrani, B. R., Manek, S., Mathers, D., Fillery, E., & Sodhi, R. N. S. (2010). Determination of 4-Chloroaniline and Its Derivatives Formed in the Interaction of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine by Using Gas Chromatography. *Journal of Endodontics*; 36(2):312-314.
55. Boehncke, A., Kielhorn J., Könnecker G., Pohlenz-Michel, C., Mangelsdorf, I. (2003), 4-Chloroaniline. World Health Organization, Geneva.
56. Bui, T. B., Baumgartner, J. C., & Mitchell, J. C. (2008). Evaluation of the Interaction between Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Gluconate and its Effect on Root Dentin. *Journal of Endodontics*; 34(2):181-185.
57. Thompson, J. M., Agee, K., Sidow, S. J., McNally, K., Lindsey, K., Borke, J., Elsalanty, M., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2012). Inhibition of endogenous dentin matrix metalloproteinases by ethylenediaminetetraacetic acid. *Journal of Endodontics*; 38(1):62-65.
58. Serper, A., Calt, S., Dogan, A. L., Guc, D., Ozçelik, B., & Kuraner, T. (2001). Comparison of the cytotoxic effects and smear layer removing capacity of oxidative potential water, NaOCl and EDTA. *Journal of Oral Science*; 43(4):233-238.
59. Patterson, S. S. (1963). In vivo and in vitro studies of the effect of the disodium salt of ethylenediamine tetra-acetate on human dentine and its endodontic implications. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*; 16(1):83-103.
60. Zehnder, M., Schmidlin, P., Sener, B., & Waltimo, T. (2005). Chelation in root canal therapy reconsidered. *Journal of Endodontics*; 31(11):817-820.

61. Koulaouzidou, E. A., Margelos, J., Beltes, P., & Kortsaris, A. H. (1999). Cytotoxic effects of different concentrations of neutral and alkaline EDTA solutions used as root canal irrigants. *Journal of Endodontics*; 25(1):21-23.
62. Yamaguchi, M., Yoshida, K., Suzuki, R., & Nakamura, H. (1996). Root canal irrigation with citric acid solution. *Journal of Endodontics*; 22(1):27-29.
63. Siqueira, J. F., & Lopes, H. P. (1999). Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: A critical review. In *International Endodontic Journal*; 32(5): 361- 369.
64. Safavi, K. E., & Nichols, F. C. (1994). Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *Journal of Endodontics*; 20(3):127- 129.
65. Khan, A. A., Sun, X., & Hargreaves, K. M. (2008). Effect of Calcium Hydroxide on Proinflammatory Cytokines and Neuropeptides. *Journal of Endodontics*; 34(11):1360- 1363.
66. Zehnder, M., Grawehr, M., Hasselgren, G., & Waltimo, T. (2003). Tissue-dissolution capacity and dentin-disinfecting potential of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*; 96(5):608-613.
67. Galler, K. M., Buchalla, W., Hiller, K. A., Federlin, M., Eidt, A., Schiefersteiner, M., & Schmalz, G. (2015). Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin. *Journal of Endodontics*; 41(3):363-368.
68. Berkhoff, J. A., Chen, P. B., Teixeira, F. B., & Diogenes, A. (2014). Evaluation of triple antibiotic paste removal by different irrigation procedures. *Journal of Endodontics*; 40(8):1172-1177.
69. Farges, J. C., Alliot-Licht, B., Renard, E., Ducret, M., Gaudin, A., Smith, A. J., & Cooper, P. R. (2015). Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. In *Mediators of Inflammation*; 15:230251.
70. Schmalz, G., Widbiller, M., & Galler, K. M. (2020). Clinical Perspectives of Pulp Regeneration. *Journal of Endodontics*; 46(9),161-174.
71. Engel, H. (1950). Die Behandlung infizierter Wurzelkanäle und Granulome nach der Methode von Walkhoff; vergleichend röntgenologisch-histologische Untersuchungen. *Schweizerische Monatsschrift für Zahnheilkunde = Revue Mensuelle Suisse d'odonto-Stomatologie / SSO*, 60(11).

72. Matsumiya, S., Kitamura, M. (1960). Histo-pathological and histo-bacteriological studies of the relation between the condition of sterilization of the interior of the root canal and the healing process of periapical tissues in experimentally infected root canal treatment. *Bull. Tokyo dent. Coll.*; 1:1-19.
73. Östby, B. N. (1961). The role of the blood clot in endodontic therapy an experimental histologic study. *Acta Odontologica Scandinavica*; 19(3–4):323-353.
74. NYGAARD-ÖSTBY, B., & HJORTDAL, O. (1971). Tissue formation in the root canal following pulp removal. *European Journal of Oral Sciences*; 79(3):333-349.
75. Banchs, F., & Trope, M. (2004). Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: New treatment protocol? *Journal of Endodontics*; 30(4):196- 200.
76. Iwaya, S. I., Ikawa, M., & Kubota, M. (2001). Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dental Traumatology*; 17(4):185-187.
77. Murray, P. E., Garcia-Godoy, F., & Hargreaves, K. M. (2007). Regenerative Endodontics: A Review of Current Status and a Call for Action. *Journal of Endodontics*; 33(4):377-390.
78. Galler, K. M., Krastl, G., Simon, S., Van Gorp, G., Meschi, N., Vahedi, B., & Lambrechts, P. (2016). European Society of Endodontology position statement: Revitalization procedures. *International Endodontic Journal*; 49(8):717-723.
79. AAE Position Statement: Scope of Endodontics: Regenerative Endodontics. (2013). *Journal of Endodontics*; 39(4):561-563.
80. Torabinejad, M., Nosrat, A., Verma, P., & Udochukwu, O. (2017). Regenerative Endodontic Treatment or Mineral Trioxide Aggregate Apical Plug in Teeth with Necrotic Pulps and Open Apices: A Systematic Review and Meta-analysis. In *Journal of Endodontics*; 43(11):1806-1820.
81. Iohara, K., Imabayashi, K., Ishizaka, R., Watanabe, A., Nabekura, J., Ito, M., Matsushita, K., Nakamura, H., & Nakashima, M. (2011). Complete pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of CD105+ stem cells with stromal cell-derived factor-1. *Tissue Engineering - Part A*; 17(15–16):1911-1920.
82. Nakashima, M., Iohara, K., Murakami, M., Nakamura, H., Sato, Y., Arijji, Y., & Matsushita, K. (2017). Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study. *Stem Cell Research and Therapy*; 8(1):61.

83. Adam, C. (2012). Endogenous musculoskeletal tissue engineering – A focused perspective. *Cell and Tissue Research*; 347(3):489-499.
84. Ko, I., Lee, S. J., Atala, A., & Yoo, J. (2013). In situ tissue regeneration through host stem cell recruitment. *Experimental and Molecular Medicine*; 45:e57.
85. Galler, K. M., & Widbiller, M. (2014). Cell-Free Approaches for Dental Pulp Tissue Engineering. *Journal of Endodontics*; 46(9),143-149.
86. Widbiller, M., Eidt, A., Lindner, S. R., Hiller, K. A., Schweikl, H., Buchalla, W., & Galler, K. M. (2018). Dentine matrix proteins: isolation and effects on human pulp cells. *International Endodontic Journal*; 51:278-290.
87. Naik, B., Karunakar, P., Jayadev, M., & Rahul, M. (2013). Role of Platelet rich fibrin in wound healing: A critical review. *Journal of conservative dentistry*; 16(4):284-293.
88. Galler, K. M., Widbiller, M., Buchalla, W., Eidt, A., Hiller, K. A., Hoffer, P. C., & Schmalz, G. (2016). EDTA conditioning of dentine promotes adhesion, migration and differentiation of dental pulp stem cells. *International Endodontic Journal*; 49(6):581- 590.
89. Ivica, A., Zehnder, M., Mateos, J. M., Ghayor, C., & Weber, F. E. (2019). Biomimetic Conditioning of Human Dentin Using Citric Acid. *Journal of Endodontics*; 45(1):45-50.
90. Chae, Y., Yang, M., & Kim, J. (2018). Release of TGF- β 1 into root canals with various final irrigants in regenerative endodontics: an in vitro analysis. *International Endodontic Journal*; 51(12):1389-1397.
91. Machado-Silveiro, L. F., González-López, S., & González-Rodríguez, M. P. (2004). Decalcification of root canal dentine by citric acid, EDTA and sodium citrate. *International Endodontic Journal*; 37(6):365-369.
92. Widbiller, M., Eidt, A., Hiller, K. A., Buchalla, W., Schmalz, G., & Galler, K. M. (2017). Ultrasonic activation of irrigants increases growth factor release from human dentine. *Clinical Oral Investigations*; 21(3):879–888.
93. Serper, A., Calt, S., Dogan, A. L., Guc, D., Ozçelik, B., & Kuraner, T. (2001). Comparison of the cytotoxic effects and smear layer removing capacity of oxidative potential water, NaOCl and EDTA. *Journal of Oral Science*; 43(4):233-238.
94. Koulaouzidou, E. A., Margelos, J., Beltes, P., & Kortsaris, A. H. (1999). Cytotoxic effects of different concentrations of neutral and alkaline EDTA solutions used as root canal irrigants. *Journal of Endodontics*; 25(1):21-23.

95. Suzuki, T., Lee, C. H., Chen, M., Zhao, W., Fu, S. Y., Qi, J. J., Chotkowski, G., Eisig, S. B., Wong, A., & Mao, J. J. (2011). Induced migration of dental pulp stem cells for in vivo pulp regeneration. *Journal of Dental Research*; 90(8):1013-1018.
96. Kim, J. Y., Xin, X., Moioli, E. K., Chung, J., Lee, C. H., Chen, M., Fu, S. Y., Koch, P. D., & Mao, J. J. (2010). Regeneration of dental-pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing. *Tissue Engineering - Part A*; 16(10):3023-3031.
97. Tucker, A., & Sharpe, P. (2004). The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. In *Nature Reviews Genetics*; 5:499–508.
98. Zhang, Y. D., Chen, Z., Song, Y. Q., Liu, C., & Chen, Y. P. (2005). Making a tooth: Growth factors, transcription factors, and stem cells. In *Cell Research*; 15(5):301–316
99. Goldberg, M., Septier, D., Lecolle, S., Chardin, H., Quintana, M. A., Acevedo, A. C., Gafni, G., Dillouya, D., Vermelin, L., Thonemann, B., Schmalz, G., Bissila-Mapahou, P., & Carreau, J. P. (1995). Dental mineralization. *International Journal of Developmental Biology*; 39(1):93-110.
100. Linde, A., & Goldberg, M. (1994). Dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*; 34:365-372.
101. Baker, S. M., Sugars, R. V., Wendel, M., Smith, A. J., Waddington, R. J., Cooper, P. R., & Sloan, A. J. (2009). TGF- β /Extracellular matrix interactions in dentin matrix: A role in regulating sequestration and protection of bioactivity. *Calcified Tissue International*; 85(1):66–74.
102. Paralkar, V. M., Vukicevic, S., & Reddi, A. H. (1991). Transforming growth factor β type 1 binds to collagen IV of basement membrane matrix: Implications for development. *Developmental Biology*; 143(2):303-308.
103. Arai, T., Busby, W., & Clemmons, D. R. (1996). Binding of insulin-like growth factor (IGF) I or II to IGF-binding protein-2 enables it to bind to heparin and extracellular matrix. *Endocrinology*; 137(11):4571–4575.
104. Goldberg, M., Kulkarni, A. B., Young, M., & Boskey, A. (2011). Dentin: Structure, composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience - Elite*; 3(2):711-735.
105. He, G., Dahl, T., Veis, A., & George, A. (2003). Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1. *Nature Materials*; 2(8):552–558.
106. Suzuki, S., Sreenath, T., Haruyama, N., Honeycutt, C., Terse, A., Cho, A., Kohler, T., Müller, R., Goldberg, M., & Kulkarni, A. B. (2009). Dentin sialoprotein

- and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biology*; 28(4):221- 229.
107. Hunter, G. K., & Goldberg, H. A. (1993). Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 90(18):8562-8565.
 108. Almushayt, A., Narayanan, K., Zaki, A. E., & George, A. (2006). Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Therapy*; 13(7):611–620.
 109. Finkelman, R. D., Mohan, S., Jennings, J. C., Taylor, A. K., Jepsen, S., & Baylink, D. J. (1990). Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF-beta in human dentin. *J Bone Miner Res*; 5(7):717-723.
 110. Zhang, R., Cooper, P. R., Smith, G., Nör, J. E., & Smith, A. J. (2011). Angiogenic activity of dentin matrix components. *Journal of Endodontics*; 37(1):26-30.
 111. Zhang, J., Liu, X., Yu, W. & Zhang, Y (2016). Effects of human vascular endothelial growth factor on reparative dentin formation. *Molecular Medicine Reports*;13(1):705-712.
 112. Casagrande, L., Demarco, F. F., Zhang, Z., Araujo, F. B., Shi, S., & Nör, J. E. (2010). Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *Journal of Dental Research*; 89(6):603-608.
 113. Begue-Kirn, C., Smith, A. J., Ruch, J. V., Wozney, J. M., Purchio, A., Hartmann, D., & Lesot, H. (1992). Effects of dentin proteins, transforming growth factor β 1 (TGF β 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. *International Journal of Developmental Biology*; 36(4):18-28.
 114. Howard, C., Murray, P. E., & Namerow, K. N. (2010). Dental pulp stem cell migration. *Journal of Endodontics*; 36(12):1963-1966.
 115. Kalyva, M., Papadimitriou, S., & Tziafas, D. (2010). Transdentinal stimulation of tertiary dentine formation and intratubular mineralization by growth factors. *International Endodontic Journal*; 43(5):382-392.
 116. Mullane, E. M., Dong, Z., Sedgley, C. M., Hu, J. C. C., Botero, T. M., Holland, G. R., & Nör, J. E. (2008). Effects of VEGF and FGF2 on the revascularization of severed human dental pulps. *Journal of Dental Research*; 87(12):1144-1148.
 117. He, H., Yu, J., Liu, Y., Lu, S., Liu, H., Shi, J., & Jin, Y. (2008). Effects of FGF2 and TGF β 1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Cell Biology International*; 32(7):827-834.

118. Massagué, J. (2000). How cells read TGF- β signals. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. European Association for Cardio-Thoracic Surgery; 1(3):169-178.
119. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., & Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. In *Wound Repair and Regeneration*; 16(5):585-601.
120. Smith, A. J., & Lesot, H. (2001). Induction and regulation of crown dentinogenesis: Embryonic events as a template for dental tissue repair? *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*; 12(5):425-437.
121. Horbelt, D., Denkis, A., & Knaus, P. (2012). A portrait of Transforming Growth Factor β superfamily signalling: Background matters. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*; 44(3):469-474.
122. Poniatowski, L. A., Wojdasiewicz, P., Gasik, R., & Szukiewicz, D. (2015). Transforming growth factor beta family: Insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. In *Mediators of Inflammation*; 2015(6):137823.
123. Singh, B., & Coffey, R. J. (2014). From wavy hair to naked proteins: The role of transforming growth factor alpha in health and disease. In *Seminars in Cell and Developmental Biology*; 28:12-21.
124. Bierie, B., & Moses, H. L. (2006). TGF β : the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nature Reviews Cancer*; 6(7):506–520.
125. Schuster, N., & Krieglstein, K. (2002). Mechanisms of TGF- β -mediated apoptosis. In *Cell and Tissue Research*; 307(1):1–14.
126. Schmalz, G., Widbiller, M., & Galler, K. M. (2017). Signaling Molecules and Pulp Regeneration. *Journal of Endodontics*; 43(9):7-11.
127. Sloan, A. J., & Smith, A. J. (1999). Stimulation of the dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor- β isoforms 1-3 in vitro. *Archives of Oral Biology*; 44(2):149-156.
128. Melin, M., Joffre-Romeas, A., Farges, J. C., Couble, M. L., Magloire, H., & Bleicher, F. (2000). Effects of TGF β 1 on dental pulp cells in cultured human tooth slices. *Journal of Dental Research*; 79(9):1689-1696.
129. Smith, A. J., Scheven, B. A., Takahashi, Y., Ferracane, J. L., Shelton, R. M., & Cooper, P. R. (2012). Dentine as a bioactive extracellular matrix. In *Archives of Oral Biology*; 57(2):109-121

130. Miller RG. Simultaneous statistical interference. New York: McGraw-Hill; 1981.
131. Carrigan, P. J., Morse, D. R., Furst, M. L., & Sinai, I. H. (1984). A scanning electron microscopic evaluation of human dentinal tubules according to age and location. *Journal of Endodontics*, 10(8):359-363.
132. Yamaguchi, M., Yoshida, K., Suzuki, R., & Nakamura, H. (1996). Root canal irrigation with citric acid solution. *Journal of Endodontics*; 22(1):27-29.
133. Diogenes, A. R., Ruparel, N. B., Teixeira, F. B., & Hargreaves, K. M. (2014). Translational science in disinfection for regenerative endodontics. *Journal of Endodontics*, 40(4):52-57.
134. Zou, L., Shen, Y., Li, W., & Haapasalo, M. (2010). Penetration of Sodium Hypochlorite into Dentin. *Journal of Endodontics*, 36(5):793-796.
135. Thompson, J. M., Agee, K., Sidow, S. J., McNally, K., Lindsey, K., Borke, J., Elsalanty, M., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2012). Inhibition of endogenous dentin matrix metalloproteinases by ethylenediaminetetraacetic acid. *Journal of Endodontics*; 38(1):62-65.
136. Rølla, G., Løe, H., & Rindom Schiøtt, C. (1970). The affinity of chlorhexidine for hydroxyapatite and salivary mucins. *Journal of Periodontal Research*; 5(2):90-95.
137. Parsons, G. J., Patterson, S. S., Miller, C. H., Katz, S., Kafrawy, A. H., & Newton, C. W. (1980). Uptake and release of chlorhexidine by bovine pulp and dentin specimens and their subsequent acquisition of antibacterial properties. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*; 49(5):455-459.
138. Diogenes, A., Henry, M. A., Teixeira, F. B., & Hargreaves, K. M. (2013). An update on clinical regenerative endodontics. *Endodontic Topics*, 28(1):2-23.
139. Martin, D. E., De Almeida, J. F. A., Henry, M. A., Khaing, Z. Z., Schmidt, C. E., Teixeira, F. B., & Diogenes, A. (2014). Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. *Journal of Endodontics*, 40(1):51-55.
140. Trevino, E. G., Patwardhan, A. N., Henry, M. A., Perry, G., Dybdal-Hargreaves, N., Hargreaves, K. M., & Diogenes, A. (2011). Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. *Journal of Endodontics*, 37(8):1109-1115.
141. Galler, K. M., D'Souza, R. N., Federlin, M., Cavender, A. C., Hartgerink, J. D., Hecker, S., & Schmalz, G. (2011). Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *Journal of Endodontics*, 37(11):1536-1541.

142. Hennessey, T. D. (1973). Some antibacterial properties of chlorhexidine. *Journal of Periodontal Research*; 8:61-67.
143. Shin, S. Y., Albert, J. S., & Mortman, R. E. (2009). One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: A case report. In *International Endodontic Journal* 42(12):1118-1126.
144. Petrino, J. A., Boda, K. K., Shambarger, S., Bowles, W. R., & McClanahan, S. B. (2010). Challenges in Regenerative Endodontics: A Case Series. *Journal of Endodontics*,36(3):536-541.
145. Widbillier, M., Althumairy, R. I., & Diogenes, A. (2019). Direct and Indirect Effect of Chlorhexidine on Survival of Stem Cells from the Apical Papilla and Its Neutralization. *Journal of Endodontics*, 45(2):156-160.
146. Ring, K. C., Murray, P. E., Namerow, K. N., Kuttler, S., & Garcia-Godoy, F. (2008). The Comparison of the Effect of Endodontic Irrigation on Cell Adherence to Root Canal Dentin. *Journal of Endodontics*, 34(12):1474-1479.
147. Cehreli, Z. C., Isbitiren, B., Sara, S., & Erbas, G. (2011). Regenerative endodontic treatment (revascularization) of immature necrotic molars medicated with calcium hydroxide: A case series. *Journal of Endodontics*, 37(9):1327-1330.
148. Chen, M. Y. H., Chen, K. L., Chen, C. A., Tayebaty, F., Rosenberg, P. A., & Lin, L. M. (2012). Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures. *International Endodontic Journal*, 45(3):294-305.
149. Cotti, E., Mereu, M., & Lusso, D. (2008). Regenerative Treatment of an Immature, Traumatized Tooth With Apical Periodontitis: Report of a Case. *Journal of Endodontics*, 34(5):611-616.
150. Althumairy, R. I., Teixeira, F. B., & Diogenes, A. (2014). Effect of dentin conditioning with intracanal medicaments on survival of stem cells of apical papilla. *Journal of Endodontics*, 40(4):521-525.
151. Graham, L., Cooper, P. R., Cassidy, N., Nor, J. E., Sloan, A. J., & Smith, A. J. (2006). The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. *Biomaterials*; 27(14):2865-2873
152. Byström, A., Claesson, R., & Sundqvist, G. (1985). The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Dental Traumatology*, 1(5):170-175.

153. Estrela, C., Sydney, G. B., Bammann, L. L., & Felipe Júnior, O. (1995). Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. In *Brazilian dental journal*, 6(2):85-90.
154. Berkhoff, J. A., Chen, P. B., Teixeira, F. B., & Diogenes, A. (2014). Evaluation of triple antibiotic paste removal by different irrigation procedures. *Journal of Endodontics*; 40(8):1172-1177.
155. Farhad Mollashahi, N., Saberi, E., & Karkehabadi, H. (2016). Evaluation of cytotoxic effects of various endodontic irrigation solutions on the survival of stem cell of human apical papilla. *Iranian Endodontic Journal*, 11(4):293-297.

9. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AAE	American Association of Endodontics
BMP	Bone Morphogenic Protein
Ca(OH) ₂	Calciumhydroxid
CHX	Chlorhexidin(digluconat)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMP	Dentin-Matrix-Protein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
ESE	European Society of Endodontology
Fa.	Firma
FGF	Fibroblast Growth Factor
IGF	Insulin-like Growth Factor
K	Tausend
L	Liter
LPS	Lipopolysaccharide
min	Minute
min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mol	Stoffmengeneinheit
NaCl	Natriumchlorid
Na-EDTA	Dienatrium-ethylendiamintetraacetat
NaCa-EDTA	Calciumdinatrium-ethylendiamintetraacetat
NaOCl	Natriumhypochlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
pg	Pikogramm
PIGF	Placenta Growth Factor
SCAP	Stammzellen der dentalen apikalen Papille
SIBLINGS	small-integrin-binding ligand-N-linked-glykoproteins
Std.	Standard
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
x g	relative Zentrifugalkraft
Zs	Zitronensäure

10. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Kerstin Galler für das Überlassen dieses interessanten Themas und die stets freundliche Unterstützung bei der Umsetzung von diesem bedanken. Ferner danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. Matthias Widbiller, für die fachlich kompetente Unterstützung, seinen Einsatz für mich und two great papers (89,90). Mein Dank gilt auch dem UKR und seinen Verantwortlichen für die Bereitstellung der Labore, sowie der Maschinen und Verbrauchsmaterialien.

Einen besonderen Dank möchte ich für Melanie „Lady“ Wölflick und Andreas „Andi“ Rosendahl aussprechen, da sie mir nicht nur mit Rat und Tat bei den Experimenten zur Seite standen, sondern auch für stets willkommene humoristische, gustatorische und musikalische Abwechslung zwischen den Versuchen und privat zu haben waren.

Auch möchte ich David Besold danken, der immer gerne ausgeholfen hat, wenn die Zeit mal etwas knapp wurde und mit dem der Einstieg in das wissenschaftliche Arbeiten sehr viel Spaß gemacht hat.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken. Für die stete Unterstützung in allen Lebenssituationen, ihr offenes Ohr, den Spaß und besonders für die motorische Früherziehung, sowie die Diktate, ohne die ich nicht die Treppen zum Labor in menschenwürdiger Geschwindigkeit hinaufgekommen wäre und diese Arbeit nicht verständlich hätte formulieren können.

Zuletzt danke ich allen meinen Freunden und den Menschen, die mich auf meinem Lebensweg begleitet haben, ohne die ich nicht so wäre wie ich heute bin (...und bestimmt auch keine Doktorarbeit schreiben würde).

11. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Moritz Linnebank
Geburtsdatum / -ort: 17.03.1996 / Hamm (Westf.)
Staatsangehörigkeit: deutsch

Beruflicher Werdegang

seit 10/2020 Assistenz Zahnarzt in der Praxis Dr. med. dent. Heidi Baier

Hochschulausbildung

2015 - 2020 Studium der Zahnmedizin an der Universität Regensburg
Universitätsstr. 31, 93053 Regensburg
07/2020 Staatsexamen und Approbation als Zahnarzt

Schulbildung

2002 - 2006 Lambertus Grundschule Walstedde
Böcken 20, 48317 Drensteinfurt
2006 - 2014 Gymnasium Hammonense
Adenauerallee 2, 59065 Hamm