Studie zur

Low Level Laser Therapy

Spectra-H lux powered by EASTCON®

Inhalt

Hypothese 3
Wissenschaftliche Ergebnisse zum Nachweis von lokalen Stammzellen 3
Was ist eine Low-Level-Laser-Therapie? 4
Literaturüberblick zu parodontalen Erkrankungen 4
Mikrobiologische Techniken zur subgingivalen Biofilmdiagnostik 5
Klinisch und mikrobiologisch kontrollierte Untersuchungen 6
Mikrobiologische Endpunkte 6
Klinische Endpunkte 7
Ergebnisse 7
Diskussion der Eingangshypothese 8
Schlussfolgerungen 8

Die medizinischen Anwendungsmöglichkeiten der Low-Level-Laser-Therapie (LLLT) in erster Linie im Bereich der Gewebeheilung und entzündlichen Erkrankungen gesucht. Obwohl gegenwärtig wenig molekularbiologisches Wissen und Verständnis dieser Prozesse vorliegt, verdient das Konzept einer nichtinvasiven und nichtthermischen Intervention, die das Potenzial hat, lokale regenerative Prozesse zu modulieren, Aufmerksamkeit. Dies ist vor allem dann der Fall, wenn neue Verfahren zur Aktivierung lokaler Stammzellen gesucht werden, um stammzellbasierte Therapien zu entwickeln.

In diesem Beitrag sollen die Möglichkeiten der Low-Level-Laser-Therapie diskutiert werden, um diese als „photoceutical“ zur Aktivierung von stammzellbasierten lokalen Wachstumsfaktoren, vor allem zur Stimulation der Angiogenese und direkt zur Proliferation von lokalen parodontalen Stammzellen, anzuwenden.

Hypothese

Vor vier Jahren erschien der aufsehenerregende Artikel einer Forschergruppe der Harvard University in dem wissenschaftlich hoch angesehenen Journal Science Translational Medicine unter dem Titel „Photoactivation of Endogenous Latent Transforming Growth Factor–□1 Directs Dental Stem Cell Differentiation for Regeneration“, der erstmalig zeigte, dass die nichtionisierende Low-Level-Laser-Therapie als minimalinvasive Methode verwendet werden kann, um einen endogenen (im Parodont) latent vorhandenen Wachstumsfaktor-Komplex zu aktivieren, den Wachstumsfaktor □1 (TGF-□1), der seinerseits parodontale Stammzellen zu differenzierter parodontaler Geweberegeneration anregt.1 In diesem Fachbeitrag sollen der therapeutische Einsatz der Low-Level-Laser (LLL) im Zusammenhang mit autologen parodontalen Stammzellen, besonders der parodontalen Stammzellen (human periodontal-derived Neural Crest-derived Stem Cells; pNCSCs) aus dem parodontalen Gewebe, sowie deren Mobilisierung unter dem Einfluss der LLLT diskutiert werden.2–4

Wissenschaftliche Ergebnisse zum Nachweis von lokalen Stammzellen

Als Ausgangsmaterial diente parodontales Gewebe, welches mittels mikrochirurgischer, minimalinvasiver Vorgehensweise entnommen wurde.2 Danach wurden die Zellen isoliert und ex vivo expandiert. Als Resultat erhielten wir eine Population von Sphäroid-Kulturen (Abb. 1). Diese, von uns als „Dentosphären“ bezeichneten Sphären, sind selbstadhärente dreidimensionale Zellcluster und ähneln den in Ex-vitro-Kulturen muriner, neuraler Stammzellen beobachteten „Neurosphären“ (Cluster von Neural Crest-derived Stem Cells). Die nachfolgende Charakterisierung der pNCSCs mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ergab die Expression von stammzellrelevanten Markermolekülen, wie Nestin und Sox-2 (Abb. 2a). Diese PCR-Ergebnisse wurden durch Durchflusszytometrie (Abb. 2b) sowie Immunhistochemie (Abb. 2c) verifiziert. Ein weiteres Charakteristikum von Stammzellen ist deren Befähigung zur Differenzierung. Hier konnten wir für die nach unseren Methoden isolierten und expandierten oralen Neural Crest-derived Stem Cells (oNCSCs) zeigen, dass sie in Gegenwart geeigneter Differenzierungsmedien sowohl in die neuronale als auch in die osteogene Linie differenzieren können (Abb. 3). Nach Adhäsion auf Poly-D-Lysin/Laminin-beschichteten Oberflächen und Kultivierung in Gegenwart von „Osteogenic Differentiation Media“ (ODM) für drei Wochen konnten „alkalische Phosphatase“-positive Zellen als

Nachweis einer osteogenen Differenzierung gezeigt werden. Der Nachweis erfolgte mit FastRed. Der Proof of Principle für diese durch die parodontalen Stammzellen (pNCSCs) getriggerte parodontale Regeneration und Knochenneubildung erfolgte im standardisierten Tiermodell, wobei als Modellsystem die athymische Ratte ausgewählt wurde. Hierzu wurden die pNCSCs auf einem zellspezifischen Trägermaterial in einen formkongruenten Knochen- bzw. parodontalen Defekt an dem ersten Rattenmolaren in der Mandibula transplantiert. Auf der Kontrollseite erfolgte die Applikation des zellspezifischen Trägermaterials ohne die parodontalen Stammzellen. Die histologische Analyse von transplantierten Tieren in einer Zeitreihe bis zu acht Wochen nach der Operation zeigte eine Neuorganisation von Knochen- bzw. parodontalen Gewebestrukturen. So konnte neu formierter Knochen und neues parodontales Ligament histologisch nachgewiesen werden. Das parodontale Ligament zeigte eine teils horizontale und teils schräg verlaufende Anordnung der Fasern (Abb. 4a und b). Neu gebildetes Zement konnte in der experimentellen Kerbe histologisch nachgewiesen werden.

Was ist eine Low-Level-Laser-Therapie?

Auf der Suche nach einer effizienteren und vor allem atraumatischeren Technik zur Bearbeitung der Wurzeloberflächen wurde der Einsatz der Low-Level-Laser (auch als Diodenlasersysteme bekannt) als weitere Alternative für die Therapie der erkrankten Parodontien untersucht.5–8 Der Diodenlaser besitzt mit einer Wellenlänge von 680 bis 980 nm ein ähnliches Absorptionsspektrum wie der Nd:YAG-Laser. Der Unterschied besteht in seiner thermischen Wirkungsweise. Aufgrund dieses antibakteriellen Effekts der Laserstrahlung ist die LLLT (vor allem 810 nm) sowohl bei der Parodontitis- als auch bei der Periimplantitistherapie eingesetzt und untersucht worden, kann aber nicht die bakteriell infizierten Ablagerungen auf der Wurzeloberfläche entfernen.4,9–15 Beim Einsatz der LLLT wurden aus histologischer Sicht keine signifikanten Beschädigungen im Bindegewebe, in der Pulpa oder im Knochen festgestellt. Voraussetzung für solche Ergebnisse war die Verwendung der LLLT als Photodynamische Therapie (PDT) unter Berücksichtigung eines „therapeutic windows“ des verwendeten Photosensitizers.16

Literaturüberblick zu parodontalen Erkrankungen

Parodontale Erkrankungen stellen infektiöse Erkrankungen, bewiesen durch die bahnbrechenden Untersuchungen von Loe et al. (1986) und Page (1999), des Zahnhalteapparats dar, die durch eine Destruktion des Parodonts, inklusive des parodontalen Faserapparates, des Zements, des Alveolarknochens und der Gingiva gekennzeichnet sind (Abb. 5).17,18 Die marginale Parodontitis ist eine opportunistische Infektion (Abb. 6), die durch ein überwiegend gramnegatives, anaerobes Keimspektrum hervorgerufen wird, das eine chronische Entzündung des Zahnhalteapparates verursacht.19 Als Folge der persistierenden Entzündung ist der fortschreitende Verlust von parodontalem Gewebe und Attachment zu beobachten. Ausgehend von epidemiologischen Studien liegt die Prävalenz der chronischen marginalen Parodontitis der erwachsenen Bevölkerung über 35 Jahren in Deutschland bei circa 40 bis 45 Prozent, wobei circa 53 Prozent dieser Altersgruppe an einer mittelschweren und circa 21 Prozent an einer schweren Form der Parodontitis leiden. Aber auch bei 15-jährigen Jugendlichen konnten bereits mittelschwere (circa 13 Prozent) sowie schwere (circa ein Prozent) Formen der Parodontitis beobachtet werden. Bei älteren

Menschen (Senioren) weist fast jeder zweite Patient entzündlich-destruktive Veränderungen (mittelschwer/schwer) des Zahnhalteapparates auf.20 Diese Untersuchungsergebnisse werden von epidemiologischen Erhebungen der American Academy of Periodontology bestätigt, die circa 57 Prozent aller Zahnverluste der marginalen Parodontitis im Verhältnis zu anderen Ursachen zuweisen.21 Die jährlichen Behandlungskosten belaufen sich in Deutschland auf etwa 500 Millionen Euro.22 Diese Zahl beinhaltet keine Therapiekosten für mit marginaler Parodontitis mittelbar und unmittelbar assoziierte Krankheitsbilder, wie Diabetes, Erkrankungen des kardiovaskulären Systems sowie des Respirationstrakts.23 Daraus lässt sich ableiten, dass die chronisch marginale Parodontitis gesundheitspolitisch einen hohen Kostenfaktor für Krankenkassen und andere Versicherungsträger darstellt. Innerhalb dieser Therapiekosten nimmt die antiinfektiöse konservative Parodontaltherapie den höchsten Anteil zur Behandlung der chronischen marginalen Parodontitis in Anspruch. Durch eine kausale Therapie (Abb. 7) kann eine Progression der Erkrankung verhindert werden.24 Daher ist die subgingivale Biofilmkontrolle das primäre Ziel der konservativen Parodontaltherapie, die auf eine Zerstörung des subgingivalen Biofilms sowie eine Minimierung der parodontopathogenen Keime abzielt.25 Durch Scaling und Wurzelglättung können Konkremente, bakterielle Biofilme und Endotoxine effektiv von den Wurzeloberflächen entfernt werden. Instrumentierungsarten sind Hand- sowie Schall- bzw. Ultraschallscaling.26–20 Der Einsatz der maschinellen Scalingsysteme hat sich in Übereinstimmung mit den Untersuchungen auch deshalb etabliert, weil dadurch eine für das zahnärztliche Behandlungsteam leichtere, weniger ermüdende und effizientere Reinigung der Wurzeloberflächen ermöglicht wird.26,27 Verschiedene Lasersysteme, technisch unterschiedlich aufgebaut, mit verschiedenen Arbeitsweisen und unterschiedlichen Wellenlängen fanden in der konservativen PAR-Therapie Verwendung. In diesem Beitrag soll ausschließlich die Wirkungsweise des Diodenlasers auf die parodontalen Stammzellen diskutiert werden.

Mikrobiologische Techniken zur subgingivalen Biofilmdiagnostik

Eine moderne mikrobiologische Diagnostik spielt in einem risikofaktororientierten parodontalen Therapiekonzept eine große Rolle.30 Dafür stehen eine Vielzahl von verschiedenen Diagnostikmethoden zur Verfügung, die alle Vor- und Nachteile beim Einsatz als patientenspezifische Untersuchungsmethoden haben.31–34 Eine kleine Gruppe anaerober Bakterien, von der Gruppe um Socransky 1997 erstmalig umfassend klassifiziert, ist hochgradig assoziiert mit der chronischen marginalen Parodontitis (Abb. 8).35 Im Mittelpunkt der gegenwärtigen parodontologischen Forschung stehen dabei Keime der Bacteroidaceae-Familie, die als besondere Merkmale Endotoxine (Lipopolysaccharid) und Ceramide produzieren. Besonders diese Bakterienfamilie ist deshalb in der Lage, die Exprimierung von proinflammatorischen (entzündungsfördernden) Mediatoren, z. B. Prostaglandine (vorrangig PGE2) sowie Interleukine (vorrangig Il-1) und Tumornekrosefaktor □, auszulösen. Der subgingivale Biofilm wird durch einen spezifischen Aufbau charakterisiert. In seinem subgingivalen Biofilm-Modell (Abb. 9) sieht Kolenbrander (2012) diese Spezies als sogenannte „late colonizers“ an, die sich auf den darunter liegenden Schichten der bakteriellen Akkumulation der Wurzeloberfläche in Form einer Ko-Aggregation aufbringen.36 Dies lässt vermuten, dass die räumliche Anordnung der Spezies auf subgingivalen Oberflächen im Biofilm durch festgelegte Formen der vor allem durch die von der Kolenbrander-Gruppe untersuchten bakteriellen Ko-Adhäsion und Ko-Aggregation bestimmt wird. Dabei ändert sich

die räumliche Organisation bei Beginn der Biofilmbildung entlang der Substratoberfläche, und die Pionierkeime leisten offensichtlich den größten Beitrag zu dieser Gemeinschaft. Der Multispezies- Biofilm auf der Wurzeloberfläche zeigt, wie wichtig die Oberflächenmorphologie und die chemische Zusammensetzung der Wurzeloberflächen für die Kommunikation („Signaling“, „Quorum Sensing“) zwischen den genetisch verschiedenen Organismen innerhalb des subgingivalen Biofilms sind. Es ist heute unbestritten, dass in Übereinstimmung mit den grundlegenden Untersuchungen von Slots et al. (1984) und Socransky et al. (1991, 1998) anaerobe Leitkeime maßgeblich an der Initiation und Fortleitung parodontaler Entzündungsprozesse beteiligt sind.37–40 Es handelt sich im Wesentlichen um gramnegative Arten wie Aggregatibacter (früher Actinobacillus) actinomycetemcomitans (A.a.), Tannerella for- sythia (T.f.), Porphyromonas gingivalis (P.g.) sowie Prevotella intermedia (P.i.). Diese Bakterienarten (Abb. 8) sind ausgestattet mit einer Vielzahl von Pathogenitätsfaktoren (Phagozytose-Resistenz, Kollagenasen, Proteasen, Toxine), durch die der Abbau des parodontalen Stützgewebes und des Alveolarknochens bewirkt wird (Tab. 1).

Klinisch und mikrobiologisch kontrollierte Untersuchungen

Es sind eine Reihe von publizierten Untersuchungen verfügbar, die eine Effizienzbewertung von verschiedenen Lasersystemen in der nichtchirurgischen Parodontitistherapie durchführen und unterschiedliche klinische und mikrobiologische Effektivitätsergebnisse vorlegen.40–46 In unserer Studie wurden alle Untersuchungen nach dem in Tabelle 2 dargestellten Zeitplan durchgeführt. Die bakteriologischen Untersuchungen erfolgten vor der Basisuntersuchung, unmittelbar nach der therapeutischen Intervention, sechs Wochen und drei Monate nach der therapeutischen Intervention durch die selektive Detektion der parodontopathogenen Markerbakterien mittels Bindung von Gensonden (Hybridisierung).47 Die subgingivale Probeentnahme erfolgte mit sterilen endodontischen Papierspitzen nach Slots (1986).31 Molekularbiologische Tests, wie der in unseren Untersuchungen verwendete iai PadoTest 4·5® des Instituts für Angewandte Immunologie (IAI, Schweiz), benutzen als Sonden synthetische kleine DNAs komplementär zu den ribosomalen RNAs, um Bakterien (wie Aggregatibacter actinomycetemcomitans [A.a.], Bacteroides forsythus [B.f.], Porphyromonas gingivalis [P.g.], Treponema denticola [T.d.]) zu analysieren. Das Institut gibt eine Sensitivität des iai PadoTest 4·5® mit 104 Bakterien an. So stellt diese Anzahl die untere Nachweisgrenze dieses Tests dar, unter welcher ein Nachweis von Bakterien-DNS nicht möglich ist. Deswegen bedeutet ein negatives Testergebnis nicht unbedingt ein Fehlen dieser Bakterien. Weiterhin stellt die Gesamtkeimzahl (Total Bacterial Load, TBL) einen guten Indikator für die parodontale Infektion dar. Ribosomale RNA-Gene (Sonden) werden auch zur Taxonomie und Identifikation von Bakterien in der mikrobiologischen Forschung eingesetzt.

Mikrobiologische Endpunkte

Für jeden Patienten wurde eine gepoolte Probe pro Untersuchungszeitraum erstellt. Der semiquantitativen Auswertung konnte eine absolute Anzahl der Keime zugeordnet werden.47 Die Nachweisgrenze des Testverfahrens lag bei 104 Keimen. Insgesamt konnte durch den Test keine Serotypisierung von Ag- gregatibacter actinomycetemcomitans (a, b oder c) vorgenommen werden. Aus diesem Grund konnten keine qualitativen Aussagen zur Virulenz und einer zu erwartenden parodontalen Erkrankungswahrscheinlichkeit oder -aktivität bzw.

eines zu erwartenden Attachmentverlusts aufgrund einer Prävalenz von Aggregatibacter actinomycetemcomitans getroffen werden. Für die kategorialen Daten der mikrobiologischen Untersuchungen wurden Häufigkeitstabellen oder Kreuztabellen mit Häufigkeiten erzeugt (deskriptive Statistik). Die induktive Auswertung erfolgt über den exakten Test nach Fisher (für 2x2 Tabellen) und über den Chi2-Test für mehr als zwei kategoriale Ausprägungen. Für die stetigen Daten der mikrobiologischen Untersuchungen wurden Mediane, Quartile und der Mittelwert für die deskriptive Statistik erzeugt. Als grafische Unterstützung wurden Boxplots angefertigt. Die induktive Auswertung erfolgte über den Wilcoxon-Test (auch für die Differenzen zwischen zwei Zeiträumen). Die statistisch signifikanten p-Werte sind gelb markiert. Untersucht wurden die Ergebnisse für die vier parodontalen Markerkeime Aggregatibacter actinomycetemcomitans (A.a.), Tannerella forsythia (T.f.), Porphyromonas gingivalis (P.g.), Treponema denticola (T.d.) und zusätzlich für die Gesamtzahl der Markerkeime (TBL); die Angabe erfolgte jeweils in x 106 Erreger pro bakterieller Untersuchung.

Klinische Endpunkte

Die Auswertung der klinischen Endpunkte erfolgte für die kategoriale Größe Blutung auf Sondierung (BOP) mit Fisher- oder Chi2-Test und für die stetigen Größen Sondierungstiefen (STM), klinisches Attachmentniveau (CAL) und gingivale Rezession (GR) mit dem Wilcoxon-Test. Für jeden klinischen Endpunktparameter wurden folgende Auswertungen durchgeführt: Auswertung zur Baseline-Messung (t1) Auswertung zur Messung sechs Wochen nach Intervention (t3) Auswertung zur Messung drei Monate nach Intervention (t4) Differenzvergleich der Messung sechs Wochen nach Intervention zur Baseline-Messung (t3–t1) Differenzvergleich der Messung drei Monate nach Intervention zur Messung unmittelbar nach Intervention (t4–t1)

Alle statistischen Tests wurden mit dem Statistikprogramm SPSS durchgeführt.

Ergebnisse

Die mikrobiologischen Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Sechs Wochen nach der Behandlung zeigte sich die Konzentration des Keims A. actinomycetemcomitans (A.a.) auf 0 reduziert und erreichte drei Monate postoperativ wieder fast den Ausgangswert (0,03). Die drei anderen Spezies (P.g., T.f., T.d., TBL) erreichten jeweils Konzentrationen von 0,87; 0,69; 1,22; 48,81 x 106. Die mikrobiologische Situation drei Monate nach der Behandlung zeigte eine Besiedelung für alle vier Keime auf geringerem Niveau als im Ausgangsbefund. Der Einfluss der Therapie auf die Bakterienprävalenz, gegliedert nach statistischer Signifikanz, ist aus der Tabelle 4 ersichtlich. Die mikrobiologischen Ergebnisse zeigten eine signifikante Wirkung der LLLT auf die Reduktion der parodontopathogenen Keime in den ersten sechs Wochen nach Behandlung mit einer nachhaltigen Keimreduktion nach drei Monaten. Nach der LLLT verbesserten sich das BOP, die STM und der CAL (verglichen zum Ausgangsbefund) nach sechs Wochen und drei Monaten (Tab. 5). Bei keinem der Untersuchungsteilnehmer traten postoperative Wundheilungsstörungen wie Infektionen oder Abszesse auf.

Diskussion der Eingangshypothese

Die in der vorliegenden mikrobiologischen Studie an ein- und mehrwurzeligen Zähnen durchgeführte LLLT erlaubte eine direkte Effizienzbewertung, den subgingivalen Biofilm zu beeinflussen. Zur Bestimmung der Effektivität wurde der nach Behandlung auf den Wurzeloberflächen verbleibende Anteil an subgingivalem Biofilm mikrobiologisch bestimmt. Die hierzu durchgeführte DNA-Analyse der untersuchten bakteriellen Spezies zeigte eine unvollständige Entfernung des subgingivalen Biofilms nach LLLT. Der Diodenlaser wurde in unserer Studie im kontinuierlichen Modus mit einheitlicher Leistungseinstellung verwendet, wobei die Glasfaserstärke 360 µm betrug (Leistungsdichte: 1.96–3.93 x 105 W/cm2). Jede Wurzeloberfläche wurde auf jeder Seite für 15 Sekunden bearbeitet. Diese Behandlungszeit hat sich anhand unserer klinischen Erfahrung als effizient erwiesen. Im Vergleich mit den in einer Ex- vitro-Studie präsentierten histologischen Ergebnissen zeigen unsere klinischen Ergebnisse, dass die Behandlung des parodontalen Weichgewebes mit dem Diodenlaser (810 nm) offensichtlich zu einer vollständigen Entfernung des inneren Saumepithels in der Tasche führt. Außerdem konnten wir einen zusätzlichen antiinflammatorischen Effekt des Diodenlasers zeigen, der zur Regeneration des zerstörten parodontalen Gewebes führte, und damit wird offensichtlich neues Knochenwachstum stimuliert. Dieser Effekt trat ein, obwohl während einer LLLT nachweislich kein Konkrementabtrag durchgeführt wird, sondern nur die dargestellte Beeinflussung der bakteriellen Kontamination eintritt.

Schlussfolgerungen

Im Rahmen der vorliegenden mikrobiologischen und klinischen Studie konnte nachgewiesen werden, dass es durch die Anwendung der Low-Level-Laser-Therapie bei Patienten mit parodontaler Entzündung zu einer signifikanten Reduktion der klinischen Entzündungszeichen kommt. Der mikrobiologische Untersuchungsteil zeigt, dass mittels LLLT auch eine signifikante Suppression der untersuchten parodontalpathogenen Spezies gelingt und damit eine klinisch wirksame Dekontamination der Wurzeloberflächen erreicht werden konnte. Die Reduktion der bakteriellen DNA-Menge der untersuchten anaeroben Biofilmbakterien über alle Untersuchungszeiträume nach der konservativen PAR-Therapie unter Verwendung von LLLT steht damit in einem engen Zusammenhang mit den deutlich reduzierten Entzündungszeichen (antiinflammatorischer Effekt) und der daraus folgenden parodontalen Regeneration. Diese parodontale Regeneration ist offensichtlich auf die durch die LLLT aktivierten parodontalen Stammzellen zurückzuführen. Die vollständige Literatur ist beim Verfasser erhältlich.

Die Studie wurde unter https://www.zwp-online.info veröffentlicht.

Die Autoren sind:

- Univ.-Prof. Dr. Dr. Wolf-Dieter Grimm, M.Sc., emeritus
- Dr. med. dent. Marco Alexander Vukovic

Spectra-H lux powered by EASTCON