

Aus der Anatomischen Anstalt der
Ludwig-Maximilians-Universität München, Lehrstuhl II
Komm. Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ulrich Welsch



**Mikroskopisch-anatomische Untersuchungen an der Zahnpulpa
vom Hausschwein (*Sus scropha forma domestica*) im Vergleich
mit der Zahnpulpa des Menschen**

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

vorgelegt von
Stephanie Stumpf
aus Bad Tölz

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Ulrich Welsch

.....

Mitberichtserstatter: Prof. Dr. Dr. Matthias Folwaczny

.....

Mitbetreuung durch den

Promovierten Mitarbeiter:

.....

Dekan: Prof. Dr. med., Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1 Ziel der vorliegenden Untersuchung	4
1.2 Übersicht über die Kenntnisse zur Zahnpulpa des Schweines und zum allgemeinen Aufbau der Säugetierzahnpulpa	5
1.2.1 Entwicklung, Aufbau und Struktur der Zähne des Hausschweins	5
1.2.2 Embryonale Zahnentwicklung und Gebissmerkmale beim Schwein	6
1.2.3 Strukturbestandteile des Säugetierzahnes	7
1.2.4 Glykosaminoglykane und Proteoglykane in der Zahnpulpa	10
2. Material und Methoden	12
2.1. Material	12
2.2. Methoden der Lichtmikroskopie	13
2.2.1 Fixierung und Einbettung	13
2.2.2 Färbemethoden	15
a, Hämatoxylin-Eosin-Färbung	15
b, Azanfärbung	15
c, Van Gieson-Färbung	15
d, Silberimprägnation nach Gomori	16
e, Alcianblau-Färbung	17
f, PAS-Färbung	17
g, Elastica-Färbung mit Resorcin-Fuchsin nach Weigert	18
2.3 Nachweis immunhistochemischer Färbungen anhand der Elektronenmikroskopie	19
2.3.1 Fixierung und Einbettung	20
2.3.2 Durchführung der Färbung mit Cupromeronic-Blue (CMB) nach Scott	21
2.3.3 Anfertigung der Semidünnschnitte	23
2.3.4 Anfertigung der Ultradünnschnitte	23

3. Befunde	24
3.1 Lichtmikroskopische Befunde in der Zahnpulpa Schwein.....	24
3.1.1 Ergebnisse mit histologischen Färbungen unter besonderer Berücksichtigung der Fasern in der Bindegewebsmatrix	28
3.1.2 Ergebnisse der histochemischen allgemeinen Kohlenhydratnachweise	35
3.1.3 Ergebnisse der histochemischen Nachweise von Matrixkomponenten	39
3.2 Lichtmikroskopische Befunde in der Zahnpulpa Mensch.....	44
3.2.1 Ergebnisse mit histologischen Färbungen unter besonderer Berücksichtigung der Fasern in der Bindegewebsmatrix.....	48
3.2.2 Ergebnisse der histochemischen allgemeinen Kohlenhydratnachweise	55
3.2.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Nachweise von Matrixkomponenten	59
3.3 Elektronenmikroskopische Befunde	67
3.3.1 Interaktionen von Kollagenfibrillen und Proteoglykanen in der Zahnpulpa des Schweins	67
3.3.2 Vergleich der Interaktionen zwischen Kollagenfibrillen und Proteoglykanen in der Pulpamatrix von Milchzähnen und bleibenden Zähnen beim Hausschwein.....	78
4. Diskussion	79
5. Zusammenfassung	91
Lebenslauf	93
Danksagung.....	94
Literaturverzeichnis	95

1. Einleitung

1.1 Ziel der vorliegenden Untersuchung

Ziel dieser Arbeit ist die vergleichende morphologische Charakterisierung des Bindegewebes - unter besonderer Berücksichtigung der Bindegewebsmatrix - in der Zahnpulpa des Hausschweins und des Menschen auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene. Mit Hilfe verschiedener histologischer, allgemein - histochemischer und immunhistochemischer Methoden sollen die Verteilung und Anordnung verschiedener Matrixkomponenten und speziell die räumliche Beziehung von zwei dominanten Matrixkomponenten, den Kollagenfibrillen und den Proteoglykanen, analysiert werden. Zur Untersuchung wurden Milchzähne und bleibende Zähne des Hausschweins und des Menschen verwendet. Bestimmte Proteoglykane wurden auf elektronenmikroskopischer Ebene mit Hilfe des Farbstoffs „Cupromeronic-Blue“ (CMB) nachgewiesen. Dieser Farbstoff weist sehr ähnliche Eigenschaften wie der Farbstoff Alzianblau auf, ist aber im Transmissionselektronenmikroskop kontrastreicher und daher besonders klar zu erkennen. Die Glykosaminoglykane der Proteoglykane stellen sich nach Bindung des CMB als scharf begrenzte nadelförmige Strukturen dar (Scott, 1988; Scott, 1991; Erlinger, 1995; Orgel et al., 2009).

Die Zahnpulpa ist einerseits von theoretischem Interesse, weil sie a) nicht den mechanischen Druck- und Zugkräften der typischen Bindegewebe ausgesetzt ist, die das Erscheinungsbild dieser Gewebe normalerweise beeinflussen, b) weil ihr histologischer Aufbau und ihr Vorkommen im Inneren einer fast geschlossenen Höhle einzigartig sind (Bargmann, 1977; Drenckhahn, 2008) und c) weil ihr Platz in der Systematik der Bindegewebe umstritten ist, und andererseits von praktischem Interesse, weil sie für die normale Funktion eines vitalen Zahns unentbehrlich ist und weil sie in jüngerer Zeit vermehrt zahnklinische Aufmerksamkeit im Rahmen von Zahntransplantationen erfahren hat.

In der allgemeinen Histologie wird das Zahnpulpagewebe oft einfach als lockeres Bindegewebe beschrieben (z.B. Leonhardt, 1981). Andererseits wird es mit Einschränkungen dem gallertigen Bindegewebe zugeordnet (Bargmann, 1977; Bloom und Fawcett, 1975). Drenckhahn (2008) erwähnt ebenfalls eine entfernte Ähnlichkeit mit dem gallertigen Bindegewebe. Andere Autoren, auch Drenckhahn (2008), weisen auf den mesenchymalen Charakter dieses Bindegewebes hin. Lüllmann-Rauch (2009) betont den Wasserreichtum des Pulpagewebes und nennt es wie Junqueira und Carneiro (2002) „mesenchymartig“, wobei „mesenchymartig“ auf die Ähnlichkeit mit embryonalem Bindegewebe hindeuten soll. Der Unterschied zwischen „gallertig“ und „mesenchymal“ ist allerdings nicht grundsätzlich, sondern nur graduell (Welsch, 2006; Drenckhahn 2008).

Im Rahmen von klinischen Untersuchungen findet die Zahnpulpa speziell bei Studien zu autogenen und allogenen Zahntransplantationen Berücksichtigung (s. z.B. Hrala, 1999; Unno et al., 2009). Besonderes Interesse findet die Regenerationskraft des Bindegewebes der Pulpa (Abdul-Malak, 1999; Sreenath et al., 2003).

In der vorliegenden Studie wird Pulpagewebe von Mensch und Schwein untersucht. Das Gewebe vom Schwein wurde einbezogen, weil das Schwein immer wieder als biologisch relativ menschnahes Versuchstier zu experimentellen Studien herangezogen wird. Eine neuere histologische und histochemische Untersuchung zur Pulpa des Schweines liegt nicht vor.

1.2. Übersicht über die Kenntnisse zur Zahnpulpa des Schweines und zum allgemeinen Aufbau der Säugetierzahnpulpa

Zur Histologie der Zahnpulpa des Menschen liegt eine umfangreiche und leicht zugängliche Literatur vor (z.B. Bargmann, 1977; Drenckhahn, 2008; Galeotti et al., 1990). Untersuchungen zur Pulpa des Schweines sind dagegen selten (Geis-Wellnhofer, 1992; Schnorr, 1989) und detaillierte Studien fehlen. Daher soll im Folgenden eine kurze Übersicht der Kenntnisse zur Zahnpulpa des Schweines gegeben werden.

1.2.1 Entwicklung, Aufbau und Struktur der Zähne des Hausschweins

entsprechen im Wesentlichen dem aller Säugetiere (Bargmann, 1977; Michel, 1972; Schnorr 1989). Spezielle Kennzeichen betreffen die Gestalt und die Höckerbildungen der Krone, speziell der Molaren, die es – auch paläontologisch – leicht machen, einen Schweinezahn zu erkennen; Schweine besitzen bunodonte (vielhöckrige) Zähne (Kemp, 2005). Auch Zahnschmelz und Wurzelzement weisen Besonderheiten auf (Schnorr, 1989). Der Raum im Inneren des Zahnes, die Pulpahöhle, beherbergt das Pulpa-Bindegewebe mit umfangreicher Matrix sowie sensible Nerven und Blutgefäße zur Versorgung des Zahnes.

1.2.2 Embryonale Zahnentwicklung und Gebissmerkmale beim Schwein

Die ersten Anzeichen der embryonalen Zahnentwicklung sind beim Schwein ab einer Scheitel-Steiß-Länge (SSL) von 30mm zu erkennen. Sie beginnt mit der Bildung der Zahnleiste, welche schon im frühen Stadium eine dem Kiefer entsprechende Form aufweist (Schnorr, 1989). Die Zahnleiste sowie der ausgereifte Schmelz entstammen aus dem Ektoderm der Mundbucht, die übrigen Bestandteile des Zahnes sind auf die Neuralleiste zurückzuführen. Die Neuralleiste bildet hier ein Mesenchym, das auch Ekto - Mesenchym genannt wird. Aus der Schmelzleiste entwickelt sich das Schmelzorgan, das sich von einer Zahnknospe, über eine Zahnkappe schließlich zu einer Zahnglocke differenziert. Zugleich mit der Entwicklung des Schmelzorgans, welches den epithelialen Anteil der Zahnanlage repräsentiert, entwickeln sich aus zellreichem und verdichtetem, determiniertem Ektomesoderm („Mesenchym“) die Zahnpapille und das Zahnsäckchen. Schmelzorgan, Zahnpapille und das Zahnsäckchen bilden den Zahnkeim (Schroeder, 2000). Die Zahnkeime entwickeln sich in Verbindung mit der Zahnleiste. In dem Maße, wie der Zahnkeim und der entsprechende Kieferabschnitt sich vergrößern, verlängert sich auch die Zahnleiste (Schroeder, 2000).

Die Zahnleiste wird später bis auf ihre Reste, die Ersatzzahnleiste, abgebaut und die Schmelzorgane setzen sich immer mehr von ihr ab. Aus der Ersatzzahnleiste entwickeln sich später die bleibenden Zähne, die sogenannten Ersatzzähne. Die Anlagen der Ersatzzähne befinden sich lingual der Milchzähne. Alle Säugetiere besitzen ein heterodontes Gebiss, d. h. ein Gebiss mit verschiedenen Zahntypen. Das Säugetiergebiss liegt in zwei Zahngenerationen vor: den Milchzähnen und den Ersatzzähnen.

Der am einfachsten strukturierte Zahn des Schweinegebisses beider Generationen ist der haplodonte Zahn. Er ist gekennzeichnet durch eine einfache konische oder abgeflachte Krone. Haplodont sind die Schneidezähne (Incisivi) und die Eckzähne (Canini).

Eine weitaus aufwendigere Struktur weisen die Backenzähne mit mehreren z.T. hohen Höckern auf. Diese Zähne werden als bunodont bezeichnet. Um eine Systematik des Gebisses beschreiben zu können werden Zahnformeln benutzt. Die Schneidezähne (Incisivi = I) des bleibenden Schweinegebisses werden in der vergleichenden Anatomie von mesial ausgehend in der Abfolge als I1, I2 und I3, die Eckzähne (Canini) als C, die Prämolaren als P1, P2, P3, P4 und die Molaren als M1, M2, M3 aufgeführt.

Für die Kennzeichnung der Milchzähne schreibt man hinter das jeweilige Zahnsymbol ein d (deciduous). Man bildet eine Linie und schreibt über den Strich die Zähne des Oberkiefers, unter den Strich die Zähne des Unterkiefers.

Milchgebiss: oben 3Id 1Cd 3 Pd
 unten 3Id 1 Cd 3 Pd

Der Zahnwechsel beginnt im Alter von 6 bis 9 Monaten mit Id 3 und Cd.

Permanentes Gebiss: oben 3I 1C 4P 3M
 unten 3I 1C 4P 3M

1.2.3 Strukturbestandteile des Säugetierzahnes

Die Schmelzbildner (Adamantoblasten = Ameloblasten) scheiden bei allen Säugetieren anfangs eine proteinhaltige Matrix aus, in die Hydroxylapatit eingelagert wird, das Prismenstrukturen aufbaut, und sich so zum reifen **Schmelz** differenziert. Dieser Prozess ist vor allem bei Nagetieren und Mensch untersucht worden, grundlegende Arbeiten gehen auf Leblond und Warshawsky (1979) zurück. Die während der Mineralisation stattfindende Kristallisation von anorganischen Kalzium-Phosphat-Verbindungen und das anschließende Wachstum der Kristalle werden als präeruptive Schmelzreifung bezeichnet (Hellwig, 2003). Zirka 96% des Schmelzes bestehen aus solchen anorganischen Komponenten. Der Zahnschmelz besitzt nach seiner Fertigstellung keinen zellulären Reparaturmechanismus, gilt aber in seiner ausgereiften Form als die härteste Substanz des Körper des Menschen und anderer Säugetiere.

Ultrastrukturell besteht der Zahnschmelz aus hexagonalen länglichen Apatitkristallen, die sich in der Seitenansicht als kleine Nadeln darstellen. Eine Einheit von vermutlich ca. hunderttausend Apatitkristallen bildet ein Schmelzprisma. Aufgrund des helikalen Verlaufs dieser Schmelzprismen treten im Durchlicht polarisationsoptische Phänomene wie die Hunter-Schreger-Streifung auf.

Die Retzius-Streifen stellen die individuell verschiedenen Arbeits- und Ruhephasen der Ameloblasten während der Schmelzbildung dar, und sind den Jahresringen eines Baumes vergleichbar. Sie lassen sich im Durchlichtmikroskop erkennen und stellen meist hypomineralisierte Bereiche dar.

Bei frisch durchgebrochenen Zähnen befindet sich noch das Schmelzoberhäutchen (Cuticula dentis) auf der Oberfläche der Krone. Das Häutchen besteht aus Resten des Epithels der Schmelzbildung und ist sehr widerstandsfähig. Beim Kauen wird es aber schnell abradiert und es bildet sich dann das sogenannte erworbene Schmelzoberhäutchen (acquired pellicle).

Das **Zahnbein (Dentin)** des Säugetierzahnes besteht im Allgemeinen zu 70 % aus anorganischem Material, was bedeutet, dass es nicht dieselbe Härte wie der Schmelz besitzt. Die organische Matrix des Dentins besteht zu 91-92% aus Kollagen und 8-9% aus nichtkollagener Grundsubstanz

(Schroeder, 2000). Der Kollagentyp ist fast ausschließlich vom Typ I. Die Aminosäurezusammensetzung des Kollagens in bleibenden Zähnen unterscheidet sich nur unwesentlich von der des Kollagens in fetalen Milchzähnen (Schroeder, 2000).

Glykosaminoglykane - und unter ihnen bevorzugt Chondroitinsulfat (Harlamb und Messer 1996) - spielen wahrscheinlich eine große Rolle bei der Dentinmineralisation. Dentin ist ein lebendes mineralisiertes Gewebe, das von Odontoblasten gebildet wird. Das Dentin umschließt die Pulpahöhle in dem sich die Nerven und Blutgefäße zur Versorgung des Zahnes befinden. Dentin besteht also aus einer verkalkten Bindegewebsmatrix und den vorwiegend radiär orientierten, mit Seitenzweigen versehenen Odontoblastenfortsätzen, die in entsprechend angeordneten Dentinkanälchen liegen (Michel, 1972).

Man unterteilt das Dentin, von innen nach außen betrachtet, in folgende Schichten:

1. hypomineralisiertes Prädentin, an der Grenze zur Pulpa
2. mineralisiertes Zwischendentin
3. zirkumpulpaes Dentin
4. weniger stark mineralisiertes Manteldentin
5. die Dentinkanälchen sind von peritubulärem Dentin umgeben. Intertubuläres Dentin trennt die Dentinkanälchen voneinander (Hellwig, 2003)

Anders als der Schmelz vermag das Dentin sich Reparaturmechanismen zu unterziehen. Dentin, welches bis zum Abschluss des Wurzelwachstums entsteht, heißt Primärdentin. Das anschließend regulär gebildete Dentin heißt Sekundärdentin. Erfolgen entsprechende Reize auf das Gewebe, wie z.B. Abnutzung, Abkautung oder Karies, kann Tertiärdentin (Reizdentin) gebildet werden.

Der im unteren Bereich des Zahnes vorkommende Wurzelzement stellt eine dünne Lage dar, die sich über das Dentin legt (Faserzement) und die eng mit Faserzügen der Wurzelhaut verbunden ist. Gebildet wird der Zement aus sogenannten Zementozyten.

Die **Zahnpulpa** ist, zufolge Untersuchungen vor allem bei Ratte und Mensch, ein stark vaskularisiertes, spezialisiertes Bindegewebe und wird fast allseitig von Dentin umschlossen (Bargmann, 1977; Drenckhahn, 2008; Schroeder, 2000). Sie ist ektomesodermaler Herkunft, d.h. sie entstammt Neuralleistengewebe, und geht aus der Zahnpapille hervor. Die Pulpahöhle läßt sich in ein Kronenkavum und in Wurzelkanäle unterteilen. Im Pulpabindegewebe befinden sich Zellen und eine interzelluläre Matrix u.a. mit retikulären Fasern, Oxytalanfasern und Proteoglykanen (Schroeder, 2000). Die Zellen lassen sich verschiedenen Typen zuweisen: Odontoblasten, Fibroblasten, Ersatzzellen und Abwehrzellen, z.B. Makrophagen und Lymphozyten. Schroeder (2000) beschreibt bei der Ratte besondere Ersatzzellen als die Vorstufen der Odontoblasten.

Der Aufbau des Pulpagewebes ist in Milchzähnen wie in bleibenden Zähnen nach bisherigen Untersuchungen an Mensch und Ratte identisch. Die Wurzelpulpa führt zum größten Teil die großen Gefäße und Nerven während in der Kronenpulpa ein feines Netz peripherer Gefäße und Nerven vorliegt. Die größte Zellpopulation in der Pulpa bilden die mesenchymalen Fibroblasten. Sie sind flach und spindelartig gestaltet, haben einen großen ovalen Kern und zahlreiche, zum Teil lange zytoplasmatische Fortsätze, die mit den benachbarter Fibroblasten z.T. über gap junctions und einfache Haftkontakte in Kontakt stehen (Schroeder, 2000). Die Fibroblasten sind für die Produktion der Matrixkomponenten, vor allem Glykoproteine und Glykosaminoglykane (Harlamb und Messer, 1996) sowie auch der retikulären Fasern, zuständig. Die verschiedenen Fasertypen sind in eine sehr wasserreiche und gelartige Grundsubstanz eingelagert, die Glykosaminoglykane (insbesondere Chondroitinsulfate und Hyaluronan) und Glykoproteine enthält.

Von der Pulpamatrix des Menschen ist bekannt, dass das Pulpagewebe der Frontzähne des Menschen mehr Kollagenfasern als das der Prämolaren und Molaren enthält, in der Wurzelpulpa sind die Fasern dichter gepackt als in der Kronenpulpa (Bargmann, 1977). Die totale Menge der kollagenen Fasern der Kronenpulpa bleibt nach dem 20. Altersjahr konstant (Schroeder, 2000).

Schroeder (2000) konnte bei Ratte und Mensch feststellen, dass sich überwiegend Kollagenfasern vom Typ-III und ein geringer Anteil an Typ-I- Kollagen in der Pulpa befinden. Typ-III-Kollagenfasern entsprechen den retikulären Fasern der Histologie (Leonhardt, 1981).

Die Kollagenfibrille ist im Elektronenmikroskop quergestreift und ähnelt einem Strichcodemuster, das sich mit einer Periodik von 63 nm wiederholt (Scott, 1991). Die Dicke einer Fibrille beträgt häufig 40-70 nm. Glykoproteine umgeben speziell die Kollagen-Typ-III- Fibrillen, was vermutlich zum Teil für farbbasierte Nachweise eine Rolle spielt.

Die Kollagenfibrillen sind in der Pulpa des Menschen in der Umgebung von Blutgefäßen und Nerven konzentriert und lassen sonst kein spezielles Anordnungsmuster erkennen (Weindl, 2005).

Für diese Arbeit sind die Kollagentypen I und III wichtig. Das Typ-I-Kollagen liegt als Heterotrimer (zwei α_1 (I) und eine α_2 (I) Proteinketten) vor und bildet relativ dicke Fibrillen, die größere unverzweigte Fasern aufbauen (Kühn, 1987; Mayne und Burgeson, 1987)

Das Typ-III-Kollagen liegt als Homotrimer (drei gleiche α_1 (III) Proteinketten) vor und bildet zarte Fibrillen, die feine verzweigte Fasern aufbauen (Kühn, 1987).

1.2.4 Glykosaminoglykane und Proteoglykane in der Zahnpulpa

Proteoglykane sind Makromoleküle die zum größten Anteil aus Zuckerstrukturen (bis zu 94%), den Glykosaminoglykanen, und nur zu einem kleinen Anteil aus Protein bestehen, letzteres wird „Core-Protein“ genannt. Glykosaminoglykane (GAGs) sind lineare Polysaccharidketten aus repetitiven Disaccharideinheiten. Sie treten über o-glykosidische oder n-glykosidische Bindungen mit dem Core-Protein in eine Verbindung. Lediglich das Hyaluronan (= Hyaluronsäure) tritt nicht mit einem Core-Protein in Kontakt. Jedes dieser Disaccharide besitzt mindestens einen Carboxyl- und/oder einen Sulfatrest, die dem Glykosaminoglykan den polyanionischen, stark sauren Charakter verleihen. Aufgrund dieser Tatsache binden die Glykosaminoglykane kationische (basische) Farbstoffe. Die Makromoleküle können anhand ihrer Eigenschaften sehr gut Wasser und Kationen binden, und somit die Permeabilität im Extrazellularraum beeinflussen (Löffler und Petrides, 1998; Löffler, 2001). Die in dieser Untersuchung immunhistochemisch nachgewiesenen sulfatierten Glykosaminoglykane der Zahnpulpa sind Chondroitin -6- Sulfat und Dermatansulfat. Dazu kommt das kollagenassoziierte Decoran. In die Synthese der Glykosaminoglykane sind neben einer Sulfotransferase sechs verschiedene Glykosyltransferasen eingebunden, die auf die Ausgangssubstrate UDP-Monosaccharide und aktiviertes Sulfat zurückgreifen (Linneman und Kühl, 1999; Balduini et al., 1992).

Synthetisiert werden die Glykosaminoglykane in der Zahnpulpa von Fibroblasten (Bartold et al., 1995). In anderen Geweben werden sie auch von Chondrozyten, Osteoblasten und glatten Muskelzellen gebildet.

Die Synthese der Proteoglykane findet intrazellulär am rauen endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat statt. Sie werden mit Hilfe eines vesikulären Transports ausgeschleust und sind als Polyanionen befähigt, im Gewebe größere Mengen an Wasser zu binden (Drenckhahn, 2008).

Das Hyaluronan (= Hyaluronsäure) besteht aus N – Acetylglucosamin und Glucuronsäure und ist ein besonders langes Fadenmolekül mit einer Kettenlänge von mehreren 10000 Zuckereinheiten.

Die Glucuronsäure ist für den polyanionischen Charakter der Hyaluronsäure verantwortlich. Die Hyaluronsäure ist über ein „Linker-Protein“ mit zahlreichen Proteoglykanen verknüpft. Sie ist stark wasserbindend und bildet dadurch eine visköse, gelartige Matrix (Drenckhahn, 2008).

Decoran ist ein Proteoglykan, das als Seitenketten Dermatan-sulfat und Chondroitin-6-Sulfat trägt, und das in einer Periodizität von ungefähr 60 nm den Kollagenfibrillen angelagert ist (Scott, 2007). Decoran ist ein kleines Proteoglykan dem verschiedene Funktionen zugeschrieben werden: 1) es übt wahrscheinlich einen regulatorischen Effekt auf die Genese der Kollagenfibrillen aus, 2) es soll am Remodeling von Kollagenfibrillenbündeln, z.B. denen des parodontalen Ligaments, beteiligt sein, und 3) wurde eine Beteiligung an der Dentinmineralisation nachgewiesen (Matheson et al., 2005; Sreenath et al., 2003). Aufgrund der geringen Größe des Decorans ist es diesem Proteoglykan auch möglich, sich mit anderen Proteoglykanen zusammenzulagern, um somit größere Aggregate zu formieren. (Harlamb und Messer, 1996). Die Lokalisation des Decorans in der Zahnpulpa des Schweins ist – neben anderem - Gegenstand der vorliegenden Untersuchung. Der Abbau der Proteoglykane vollzieht sich mit Hilfe von Proteinasen im extrazellulären Bereich. Intrazellulär erfolgt der Abbau hingegen nach Aufnahme der Zuckerstrukturen durch Hydrolasen im Lysosom.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Das Untersuchungsmaterial dieser Studie ist 1) Schweinezähnen entnommen, die aus dem Schlachthof München stammen. Zur Untersuchung wurden 16 Milchzähne („Milchmolaren“) von Hausschweinen (*Sus scrofa forma domestica*) im Alter von 5 -6 Monaten und 19 bleibende Zähne (Prämolaren und Molaren) von Hausschweinen im Alter von 1,5 Jahren herangezogen. 2) Pulpagewebe von 8 Ersatzzähnen (Prämolaren und Molaren) erwachsener Menschen, das extrahierten pulpagesunden Zähnen der Zahnklinik der Universität München entstammt.

Frisch geschlachteten Schweinen wurden die Zähne mit einer Zange extrahiert und anschließend behutsam aufgebrochen. Das freigelegte Pulpagewebe wurde vorsichtig aus der Pulpahöhle entnommen und sofort in die Fixierungslösung überführt. Zusätzlich wurden aufgebrochene Zähne mit Pulpagewebe in situ in die Fixierungslösung eingelegt, um Zerrungsartefakte, die bei Entnahme des Pulpagewebes auftreten können, auszuschließen. Ähnlich wurde mit dem Pulpagewebe der extrahierten Zähne des Menschen verfahren.

2.2 Methoden der Lichtmikroskopie

2.2.1 Fixierung und Einbettung

Das Gewebe wird nach 3 Stunden Fixierung in einer Formalinlösung sorgfältig präpariert. Anschließend ca. 30 Minuten unter fließendem Wasser gespült und in einem Stück eingebettet. Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte des 24-stündigen Einbettungsprozesses beschrieben.

Tabelle 1: Einbettung

Lösung Nr.	Medium	Dauer
1	70% Ethanol	2 h
2	70% Ethanol	2 h
3	70% Ethanol	2 h
4	80% Ethanol	2 h
5	96% Ethanol	2 h
6	100% Ethanol	2 h
7	100% Ethanol	2 h
8	Xylol	2 h
9	Xylol	2 h
10	Xylol	2 h
11	Paraffin	2 h
12	Paraffin	2 h

Nach 24 Stunden werden die paraffindurchtränkten Proben der letzten Flüssigkeit entnommen und in Formen mit frisch erwärmtem Paraffin gelegt. Nach dem Erkalten zu einem festen Block werden

am Mikrotom 4 µm dünne Schnitte mit einer Mikrotomeinmalklinge angefertigt und auf Objektträgern aufgefangen.

Da es sich bei Paraffin um ein Fett handelt und die hier verwendeten Färbelösungen allesamt wasserlöslich sind, muß im nächsten Schritt das Entparaffinieren und eine Hydrierung durchgeführt werden.

Tabelle 2: Entparaffinieren

Lösung Nr.	Medium	Dauer
1	Xylol	5 Min.
2	Xylol	5 Min.
3	Xylol, Alkohol	5 Min.
4	100% Alkohol	5 Min.
5	100% Alkohol	2 Min.
6	96% Alkohol	2 Min.
7	80% Alkohol	2 Min.
8	70% Alkohol	2 Min.
9	destilliertes Wasser	2-10 Min.

2.2.2 Färbemethoden

Die Färbemethoden beruhen im Wesentlichen auf den Angaben von Romeis (1989).

a, Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) gilt als die standardisierte Übersichtsfärbung in der Histologie. Der basische Hämatoxylinbestandteil färbt vor allem die Zellkerne blau, der saure Eosinbestandteil markiert das Zytoplasma und die extrazellulären Fasern rot.

Die Färbung wird wie folgt durchgeführt.

1. Tauchbad der Objektträger in Hämatoxylin für etwa 10 Minuten
2. Objektträger ca. 10 Minuten bläuen in fließendem Wasser
3. Tauchbad der Objektträger in Eosin für etwa 2-5 Minuten
4. Dehydrierung, Xylol, eindecken mit DPX

b, Azan-Färbung

Diese Färbemethode ist eine Trichromfärbung. Kollagene Fasern sind tiefblau, Kerne leuchtend rot und das Zytoplasma blaßrosa bis schwach bläulich.

1. Bad der Objektträger in Azokarmin für ca. 10 Min. bei 56°C im Brutschrank
2. Abspülen der Objektträger mit Aqua dest.
3. Anfärben mit Anilinalkohol für einige Sekunden (Differenzierung)
4. Stoppen der Reaktion mit essigsauerm Alkohol
5. Abspülen der Objektträger mit Aqua dest.
6. Beizen des Bindegewebes mit Phosphowolframsäure mind. 45 Min.
7. Abspülen der Objektträger mit Aqua dest.
8. Dehydrierung, Xylol, eindecken mit DPX

c, van Gieson-Färbung

Auch diese Färbemethode ist eine Trichromfärbung. Die Kerne werden mit einem Farblack schwarzbraun, das Bindegewebe wird leuchtend rot, Gliagewebe und Muskulatur werden gelb angefärbt.

1. Tauchbad der Objektträger in Weigert's Eisenhämatoxylin für 1-2 Min.
2. Objektträger in fließendem Leitungswasser 10 Min. spülen
3. Abtrocknen der Schnitte mit Filterpapier

4. Tauchbad in Pikiofuchsinlösung für 1 Min.
5. Anschließendes abschleudern der Farblösung
6. Kurzes Spülen in 96% Ethanol
7. Dehydrierung, Xylol, eindecken mit DPX

d, Silberimprägnation nach Gomori

Mit dieser Methode lassen sich zuverlässig, schnell und mit gut reproduzierbaren Ergebnissen retikuläre Fasern nachweisen. Bei der Herstellung der ammoniakalischen Silbernitratlösung wird das Fontanasche Prinzip des Rückfiltrierens verwendet, um den optimalen Ammoniakgehalt besser zu treffen.

Aus der Metallsalzlösung lagern sich die Silberionen auf dem vorbehandelten Gewebe ab.

Anschließend werden diese Ionen zu metallischem Silber reduziert und schwärzen dadurch die retikulären Fasern (= Kollagen III). Typische kollagene Fasern vom Typ I werden rötlichbraun dargestellt.

1. Oxidieren in 0,5% Kaliumpermanganatlösung für 2 Min.
2. Spülen in Leitungswasser für 5 Min.
3. Reduktion des überschüssigen Kaliumpermanganats in 2% Kaliumdisulfitlösung für 1 Min.
4. Nochmaliges Spülen in Leitungswasser 5 Min.
5. Sensibilisieren in 2% Eisenammoniumsulfatlösung für 1 Min.
6. Auswaschen in Leitungswasser für 5 Min., dann in 2 Portionen Aqua dest. für je 2 Min.
7. Eintauchen in Silbernitratlösung für 1 Min.
8. 7 Sekunden spülen in Aqua dest. Die Spüldauer bestimmt die Imprägnation. Ist sie zu kurz, fällt die Imprägnation zu dicht aus, ist sie zu lange, umgekehrt.
9. Reduktion (damit Ausfall des Silbers) in 4,5% gepuffertem Formalin für 5 Min.
10. Spülen in Leitungswasser für 5 Min.
11. Tönen der kollagenen Fasern in 0,1% Goldchloridlösung für 25 Min. (retikuläre Fasern bleiben schwarz)
12. Nochmals kurz spülen in Aqua dest.
13. Reduktion des überschüssigen Goldchlorids in 2% Kaliumdisulfitlösung für 1 Min.
14. Komplette Imprägnation fixieren in 1% Natriumthiosulfatlösung für 1 Min.
15. Abschließendes Spülen in Leitungswasser für 5 Min.
16. Dehydrierung, Xylol, eindecken in DPX

e, Alcianblau-Färbung (Histochemie)

Die folgenden beiden Methoden (Alcianblaufärbung und PAS-Färbung) gehören zu den histochemischen Färbungen. Sie dienen der Darstellung verschiedener Komponenten der extrazellulären Matrix, die größere Kohlehydratanteile besitzen (Proteoglykane, Glykoproteine, siehe auch Scott, 1985).

Die Stärke der Anfärbbarkeit des Präparates mit Alcianblau hängt stark vom pH-Wert der Färbelösung ab. Bei sehr sauren pH-Werten färben sich nur stark sulfatierte Glykosaminoglykane und Proteoglykane in bläulicher Farbe. Bei weniger sauren pH-Werten auch alle anderen Glykosaminoglykane. Die Zellkerne sind ungefärbt, können aber mit Kernechtrot rot angefärbt werden. Für diese Arbeit werden die pH-Werte 1 und 2,5 verwendet. In den unten stehenden Tabellen werden die einzelnen Arbeitsschritte dieser Färbemethode aufgeführt.

Alcianblau-Färbung bei pH 1

1. Einstellen der entparaffinierten Schnitte in 0,1 M HCl für 2 Minuten
2. Einstellen der Schnitte in 1% Alcianblaulösung in 0,1 M HCl über Nacht
3. Spülen in destilliertem Wasser für 1 Minute
4. Gegenfärbung der Schnitte für 3 – 5 Minuten in Kernechtrot
5. Nochmaliges Spülen in destilliertem Wasser
6. Dehydrierung, eindecken in DPX

Alcianblau-Färbung bei pH 2,5

1. Einstellen der entparaffinierten Schnitte in 3% Essigsäure für 2 Minuten
2. Einstellen der Schnitte in 1% Alcianblaulösung in 3% Essigsäure über Nacht
3. Spülen in destilliertem Wasser für 1 Minute
4. Gegenfärbung der Schnitte für 3 -5 Minuten mit Kernechtrot
5. Nochmaliges Spülen in destilliertem Wasser
6. Dehydrierung, eindecken in DPX

f, PAS-Färbung (Histochemie)

Bei dieser Färbemethode werden Polysaccharide und Glykoproteine rot angefärbt. Deren Glykolgruppen müssen zuerst mit Perjodsäure zu Aldehyden reagieren, die sich dann mit fuchsin-schwefeliger Säure durch Bildung eines roten Farbstoffes nachweisen lassen (Romeis, 1989).

1. Oxidation in 1%iger Perjodsäure für ca. 10 Minuten
2. Abspülen der Objektträger ca. 1 Min. mit Aqua dest.

3. Bad der Objektträger ca. 3-5 Min. in Schiff'schem Reagenz
4. Abspülen der Objektträger ca. 1 Min. mit Sulfitwasser
5. Abspülen der Objektträger ca. 10 Min. mit Wasser
6. Gegenfärbung mit Hämalaun ca. 30 Sek.
7. Bläuen des Gewebes in fließendem Wasser ca. 10 Min.

Nach der Färbung werden alle Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert.

Tabelle 3: Dehydrierung

Lösung	Dauer
destilliertes Wasser	5 Min.
70% Alkohol	2 Min.
80% Alkohol	2 Min.
96% Alkohol	2 Min.
100% Alkohol	2 Min.
100% Alkohol	2 Min.
Xylol, Alkohol	5 Min.
Xylol	5 Min.
Xylol	5 Min.

g, Elastica-Färbung mit Resorcin-Fuchsin nach Weigert

Bei dieser Färbemethode bindet sich der stark saure Beizfarbstoff Resorcinfuchsin an die elastischen Fasern und stellt diese dunkelvioletts dar.

1. Bad der Objektträger aus 80% Ethanol kommend für 20 Min. in Resorcinfuchsinlösung
2. Auswaschen der überschüssigen Farbe unter fließendem Leitungswasser für 1 Min.
3. Differenzieren in HCl-Alkohol unter mikroskopischer Kontrolle (elastische Fasern erscheinen violett auf zart rosa Grund)

4. 100% Ethanol, Xylol, eindecken in DPX

2.3 Nachweis immunhistochemischer Färbungen anhand der Elektronenmikroskopie

Die Behandlung der Schnitte für die immunhistochemischen Reaktionen erfolgt mit der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex).

Diese Methode basiert auf der Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin, vier Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden. Es werden drei Reagenzien gebraucht. Das erste ist ein Primärantikörper, spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet. Der Sekundärantikörper, der an den ersten binden kann, ist mit Biotin konjugiert. Das dritte Reagenz ist ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex. Die freien Bindungsstellen des Avidinmoleküls ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Das Enzym Peroxidase – und damit das gesuchte Antigen – wird mit einem geeigneten Chromogen (AEC-Komplex oder DAB) sichtbar gemacht.

Für die Reaktionen in dieser Arbeit wurde der ABC-Kit Histostain plus der Firma Zymed verwendet.

1. Nach der Paraffinentfernung und Rehydrierung der Schnitte erfolgt eventuell (je nach Antikörper) die Antigen-Demaskierung mittels Mikrowelle (3x5 Min. bei ca. 600 W in Citratpuffer pH 6,0) oder Enzymbehandlung, wenn erforderlich
2. Spülen der Schnitte in PBS (Phosphatpuffer) für 10 Min.
3. Endogene Peroxidase-Blockierung für 15 Min. in 3% H₂O₂
4. Spülen in PBS für 10 Min.
5. Blockierung der Schnitte in Normalserum mit Blockierungslösung A für 10 Min. (verhindert unspezifische Hintergrundfärbung)
6. Antikörper in Verdünnung mit PBS und Reaktionszeit je nach Spezifität
7. Spülen in PBS für 3x5 Min.
8. Biotinisierte sekundäre Antikörper = Lösung B aus Kit für 10 Min.
9. Spülen in PBS für 3x5 Min.
10. Avidin-Biotin-Komplex = Enzym-Konjugat C aus Kit für 10 Min.
11. Spülen für 3x5 Min. in PBS
12. Aufbringen des Chromogens (DAB oder AEC-Komplex) für ca. 10 Min.
13. Gegenfärbung der Schnitte für einige Sekunden in Mayers Hämalaun

14. Dehydrierung, Xylol, eindecken mit DPX der Schnitte, die mit dem Chromogen DAB behandelt wurden, eindecken in Aquatex aus Wasser der Schnitte, die mit dem Chromogen AEC-Komplex behandelt wurden.

Dokumentation

Die histologischen und histochemischen Präparate wurden auf Diafilm fotografiert, die Diapositive wurden eingescannt.

Es wurden folgende Antikörper für diese Arbeit verwendet:

Chondroitin-6-Sulfat der Firma ICN in der Verdünnung von 1:100 mit Chondroitinase-Vorbehandlung von 1 Stunde bei 37°C

Dermatansulfat der Firma Seikagaku in der Verdünnung 1:10 ohne Vorbehandlung

S-100 der Firma Zymed unverdünnt ohne Vorbehandlung

Neurofilamente-Protein-Cocktail (NFPC) der Firma Biotrend 1:200 verdünnt ohne Vorbehandlung

Decorin der Firma Santa Cruz in der Verdünnung 1:50 mit Mikrowellenvorbehandlung

Kollagen I der Firma ICN in der Verdünnung 1:10 mit Mikrowellenvorbehandlung

Kollagen III von der Firma Acris in der Verdünnung 1:50 mit Mikrowellenvorbehandlung

Fibronectin der Firma ICN in der Verdünnung 1:5 mit Mikrowellenvorbehandlung

2.3.1 Fixierung und Einbettung

1. Fixierung des Gewebes für ca. 3 Stunden in 3,5% Glutaraldehyd (GA) in 0,1 M Sörensen-Phosphatpuffer (pH 7,4) und anschließende Überführung in 1% phosphatgepufferten GA für 15 Stunden
2. 2 x 20 Minuten waschen in Sörensenpuffer
3. Kontrastierung und Nachfixierung für 2 Stunden in 2% Osmiumtetroxid verdünnt in destilliertem Wasser
4. 2 x 20 Minuten waschen in Sörensenpuffer
5. Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe : 2 x 20 Minuten in 30, 50, 70, 90% Ethanol 2 x 20 Minuten in 100% Ethanol 1 x 20 Minuten in 100% Ethanol auf Molekularsieb
6. 2 x 20 Minuten Propylenoxid

7. Überführung in Araldit-Propylenoxydgemisch 1 : 1 mit 3% Härter; über Nacht offen stehen lassen
8. Überführung in reines Aralditgemisch mit 2% Härter für ca. 6 Stunden
9. Ausbettung in Kapseln in reines Aralditgemisch mit 2% Härter
(Aralditgemisch: 52% Araldit, 48% DDSA + Härter)
10. 48 Stunden Polymerisierung des Araldits bei 60°C

2.3.2 Durchführung der Färbung mit Cupromeronic – Blue (CMB), nach Scott (1988)

Mit Hilfe dieser Methode werden Glykosaminoglykane (GAG) als Zuckerkomponenten von Proteoglykanen selektiv gefärbt und können als elektronendichte, nadelförmige Präzipitate im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden. Diese Präzipitate repräsentieren wahrscheinlich das jeweilige Proteoglykanmolekül komplett.

Arbeitsmethode:

1. Fixierung des Gewebes für ca. 4 Stunden in 3,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Sörensen-Phosphatpuffer (pH 7,4) und anschließende Überführung in 1% Glutaraldehyd
2. 3 x 10 Minuten Waschen in 0,2 M Azetatpuffer pH 5,6 + 1% GA
3. Färbung über Nacht in 1% CMB+0,3 M MgCl₂ + 2,5% GA
4. 6-8 Stunden Waschen auf Rüttler mit häufigem Azetatpufferwechsel (+0,06 M MgCl₂ + 1% GA) ; die beiden letzten Male ohne GA
5. 1 Stunde Nachfärbung in 0,5% NaW₀₄ in Azetatpuffer
6. Färbung über Nacht in 0,5% NaW₀₄ in 30% Ethanol
7. Dehydrierung und weitere Bearbeitung (Einbettung) wie unter 2.3.1 Arbeitsmethode ab Punkt 5 beschrieben

Tabelle 4: Chemikalien für die Elektronenmikroskopie

25% Glutaraldehyd	E. Merck, Darmstadt
4% Osmiumtetroxid	Polysciences, Inc., Warrington (USA)
Ethanol pro analysi	E. Merck, Darmstadt
1,2 Propylenoxid	E. Merck, Darmstadt
Araldit CY 212	Serva, Heidelberg
2-Dodeceny succinic acid anhydride (DDSA)	Serva, Heidelberg
2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol	Serva, Heidelberg
Natriumacetat-Trihydrat ($\text{CH}_3\text{COONa}_3\text{H}_2\text{O}$)	E. Merck, Darmstadt
Cupromeronic Blue (CMB)	Aldrich Chemie, Taufkirchen
Natrium-Wolframsäure-Dihydrat (Na_2WO_4)	Fluka Chemie, Taufkirchen
Essigsäure pro analysi	E. Merck, Darmstadt
Uranylacetat pro analysi	E. Merck, Darmstadt
Blei(II)-nitrat pro analysi	E. Merck, Darmstadt

2.3.3 Anfertigung der Semidünnschnitte

Die auspolymerisierten Präparate werden mit einer Rasierklinge zugetrimmt.

Beim Schneiden mit einem Glasmesser am Mikrotom OmU3 erhält man Semidünnschnitte von ca. 500 - 1000 nm Schnittdicke. Sie werden auf einen Glasobjektträger gebracht und bei ca. 60°C getrocknet, bevor sie mit Toluidinblau gefärbt werden. Diese Schnitte dienen der Orientierung und helfen bei der Zuordnung der späteren Ultradünnschnitte.

2.3.4 Anfertigung der Ultradünnschnitte

Nach Anfertigung der Semidünnschnitte wird der zu untersuchende Bereich mit der Rasierklinge pyramidenförmig zugetrimmt. Mit einem Diamantmesser erstellt man am Mikrotom ca. 60-90 nm dicke Schnitte, die dann mit Kupfernetzen (150 Maschen) aufgefangen werden.

Die optische Kontrolle der Schnittdicke erfolgt über die grau-silbrige bis matt-goldene Färbung der Schnitte.

Die Kontrastierung der mit CMB behandelten Ultradünnschnitte erfolgt 40 Minuten bei Zimmertemperatur mit alkoholischer Uranylacetatlösung.

Die mit Osmium behandelten Ultradünnschnitte werden bei Zimmertemperatur 40 Minuten mit alkoholischer Uranylacetatlösung und anschließend 3 Minuten mit Bleicitrat nach Reynolds kontrastiert.

Dokumentation

Die angefertigten Ultradünnschnitte werden im Elektronenmikroskop Philips CM 10 analysiert. Typische Regionen wurden auf Kodak electron Negativmaterial fotografiert.

Die Abzüge der Negative werden in der Dunkelkammer von Hand entwickelt, vergrößert und vervielfältigt.

3. Befunde

3.1 Lichtmikroskopische Befunde in der Zahnpulpa Schwein

Allgemeines

Es zeigte sich, dass mit der gewählten Methodik keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Zähnen der 1. und 2. Zahngeneration und zwischen den Zähnen von Ober- und Unterkiefer feststellbar waren. Falls es dennoch solche Unterschiede gibt, müssten moderne quantitative Methoden eingesetzt werden, um diese sicher zu erfassen. Die Zahnpulpa des Schweins besteht bei Milch- und Dauerzähnen aus einem zell- und matrixreichen Bindegewebe, das zwar morphologische Ähnlichkeiten mit embryonalem Mesenchym aufweist, aber deutlich lockerer strukturiert und matrixreicher ist als die Zahnpapille von Föten. Die Zellen (Fibroblasten) in der Zahnpapille sind nicht nur durch mehr, sondern auch durch faserreichere Matrix voneinander getrennt (Abb.1). Die Matrix besteht überwiegend aus „amorpher“ Grundsubstanz und faserigen Anteilen. Letztere sind besonders reich entwickelt in der Umgebung von Blutgefäßen. In das Bindegewebe eingelagert sind kleine Arterien, Arteriolen, Blutkapillaren, Venolen und kleine Venen. Außerdem sind Lymphgefäße und Nerven regelmäßig vorkommender Bestandteil dieses Bindegewebes. Der Gefäßreichtum dieses Gewebes ist groß, wurde aber nicht quantitativ erfasst.

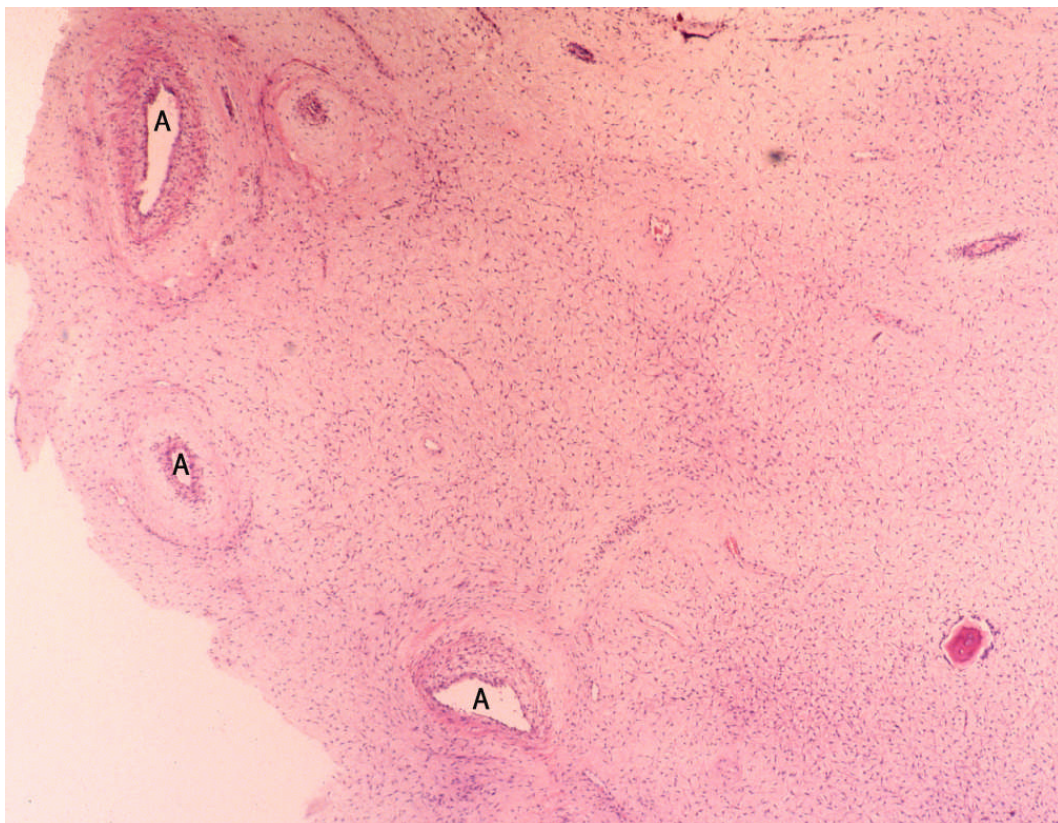


Abb. 1 Zahnpulpa Schwein, Übersicht mit größeren Arterien (A). Färbung HE, Vergr. 45fach

Zellen

Die Bindegewebszellen sind fast ausschließlich sternförmige Fibroblasten, deren Kern oval oder rundlich und relativ dunkel ist (Abb. 1, 2, 3, 4). In der Peripherie der Pulpa sind die Fibroblasten etwas zahlreicher als weiter innen (Abb. 5, 9). Oft findet sich in der Peripherie eine etwas verdichtete Lage von 4 – 5 Fibroblasten, von denen die ganz außen liegende Schicht die Odontoblasten repräsentiert, eine zellarme Weilsche Zone ist nur mit Mühe und unscharf abzugrenzen. Der Zytoplasmasaum der Fibroblasten ist etwas breiter als bei den Fibroblasten der Pulpa des Menschen und sendet einige schlanke Fortsätze aus, die unterschiedlich lang sind und die mit entsprechenden Fortsätzen benachbarter Zellen in Kontakt stehen (Abb. 3, 5). Ihr Zytoplasma lässt lichtmikroskopisch keine strukturellen Besonderheiten erkennen; es ist eosinophil, hat aber einen leicht violetten Einschlag, was auf hinreichende Anteile an rauem endoplasmatischem Retikulum und Ribosomen hindeutet. Im Azan-Präparat färbt sich das Zytoplasma, auch in den Fortsätzen rot an (Abb. 9, 10), was für die Existenz eines gut entwickelten Zytoskeletts spricht. Freie Zellen sind sehr selten, ganz vereinzelt wurden Lymphozyten und Makrophagen beobachtet.

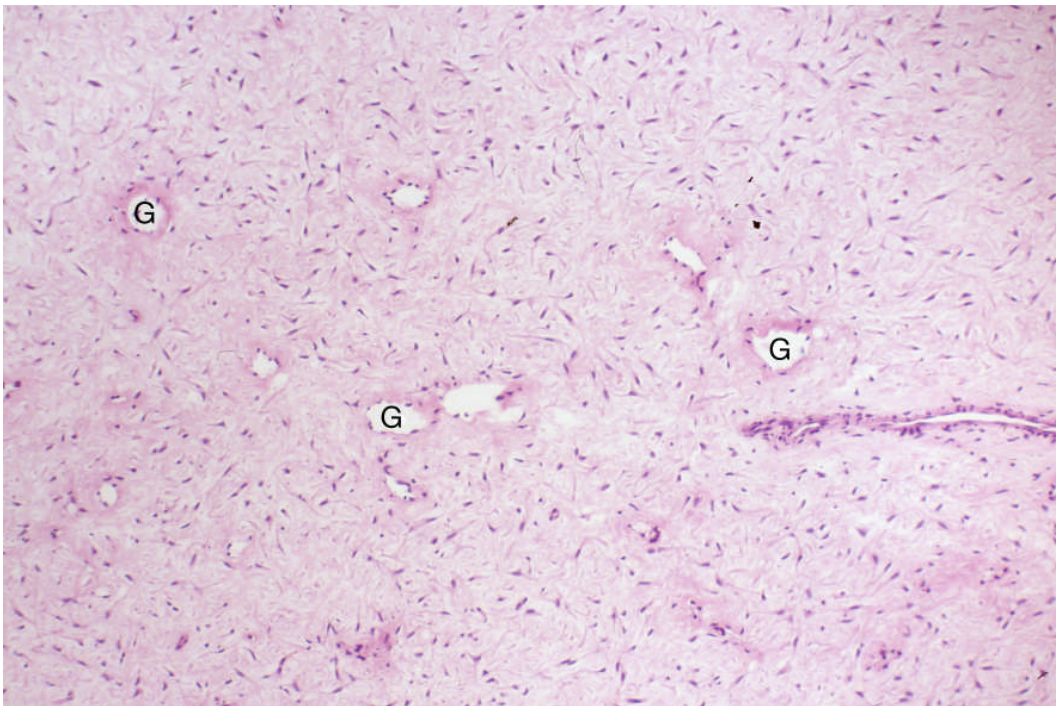


Abb. 2 Zahnpulpa Schwein, Zentrale Region mit zahlreichen kleinen Blutgefäßen (G)

Färbung HE, Vergr. 120fach

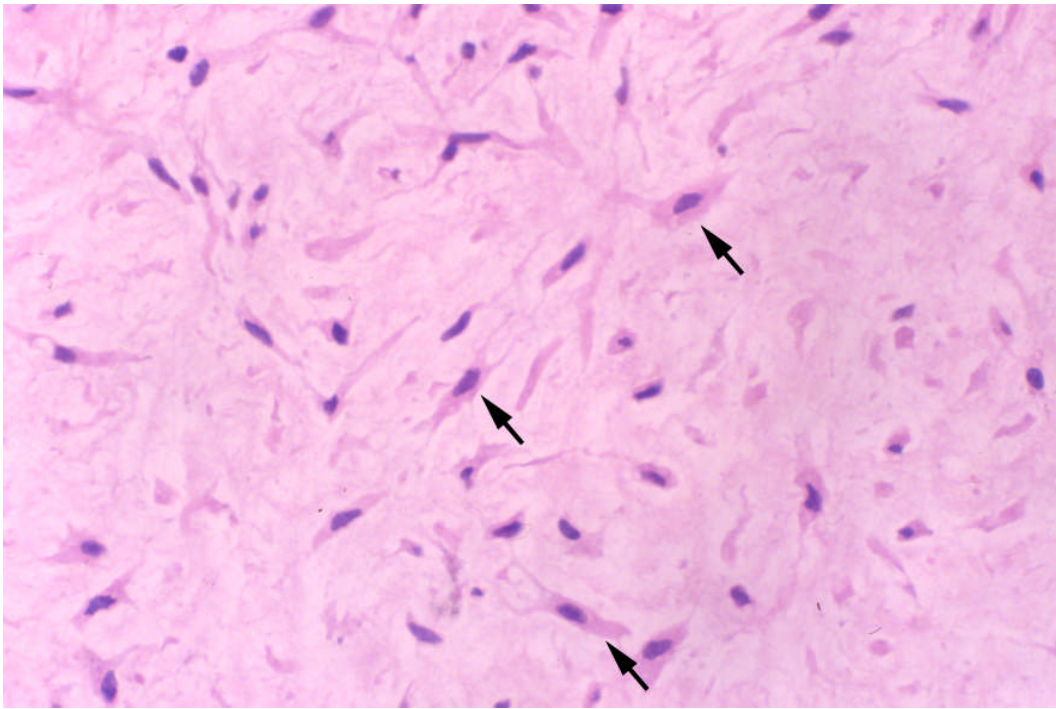


Abb. 3 Zahnpulpa Schwein, Fibroblasten (Pfeile) im zentralen Bereich der Pulpa, Färbung HE, Vergr. 450fach

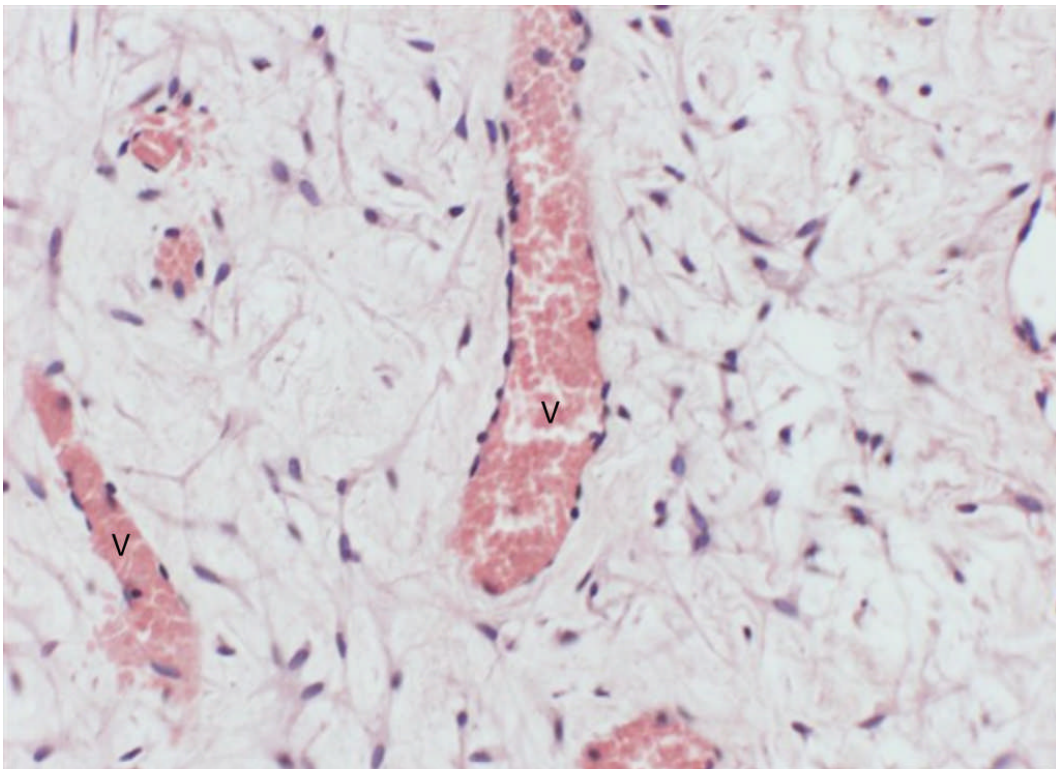


Abb. 4 Zahnpulpa Schwein, Zentralregion mit postkapillären Venolen (V), Färbung HE, Vergr. 450fach

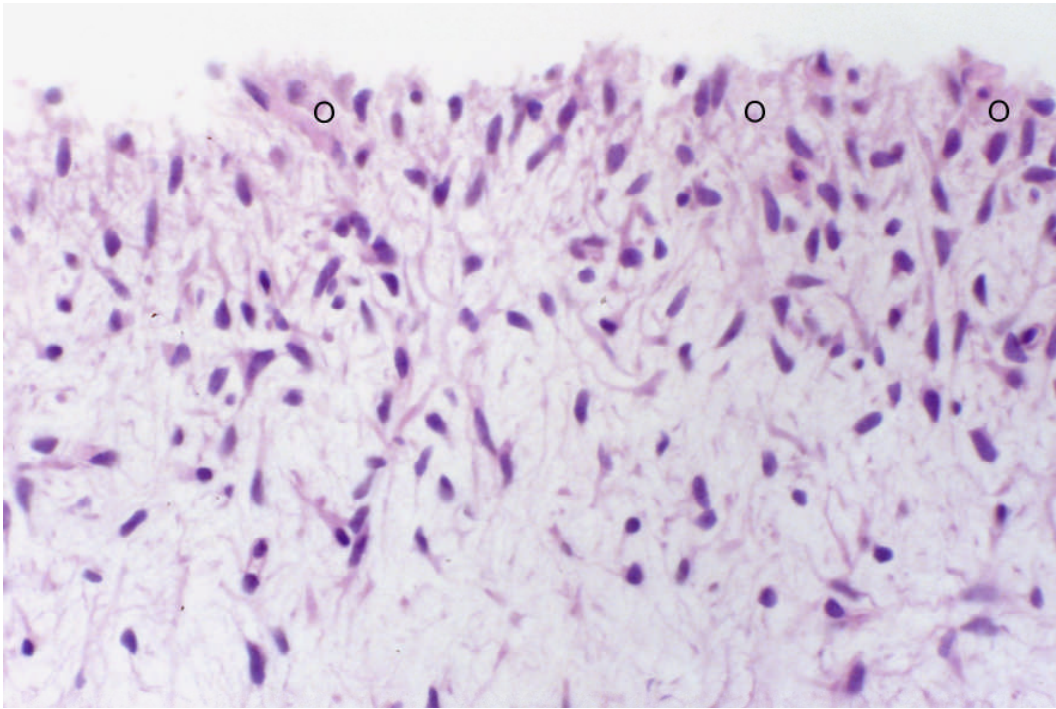


Abb. 5 Zahnpulpa Schwein, Peripherie mit Odontoblasten (O), Prädentin und Dentin (oberer Bildrand) haben sich vom Pulpagewebe abgelöst und fehlen daher auf dem Präparat. Färbung HE, Vergr. 450fach

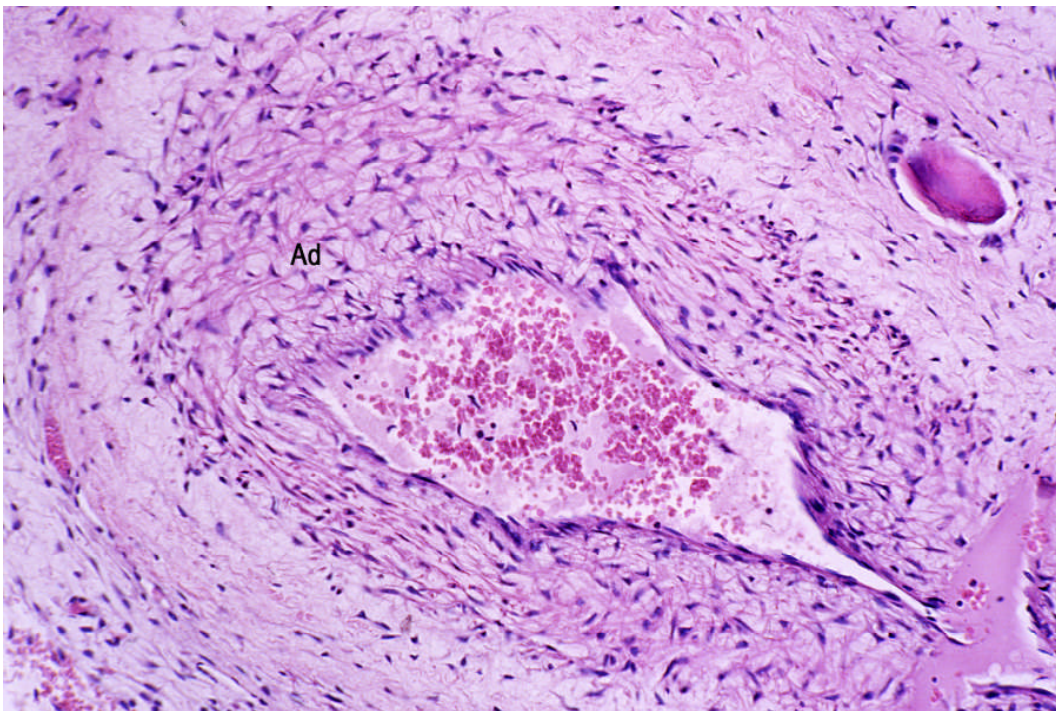


Abb. 6 Zahnpulpa Schwein, Arterie mit zell- und kollagenfaserreicher Wand, vermutlich der Adventitia (Ad). Färbung HE, Vergr. 250fach

Gefäße

Arterien und Arteriolen werden in der vorliegenden Untersuchung aufgrund unterschiedlicher Größe und Wanddicke unterschieden (Abb. 1, 2, 6, 8, 9, 11). Die Media der dicksten beobachteten Arterien der Pulpa besitzt 3 Schichten glatter Muskelzellen. Die Mehrzahl der Gefäße sind Arteriolen mit nur einer Muskelschicht. Außerhalb der Media findet sich die schon erwähnte auffallend zell- und kollagenreiche Adventitia (Abb. 6). Venen besitzen nur eine lückenhafte Schicht glatter Muskulatur, die postkapillaren Venolen haben gar keine Muskulatur in ihrer Wand (Abb. 4). Die Wand der Lymphgefäße (Abb. 7) besitzt lediglich ein zartes Endothel. Ein weiteres Kriterium für die Diagnose Lymphgefäß sind die oft gefaltete Wand, das oft kollabierte Lumen und das Fehlen von Erythrozyten im Lumen. Größere Lymphgefäße sind manchmal nicht eindeutig von postkapillären Venolen zu unterscheiden, wenn diese keine Erythrozyten enthalten.

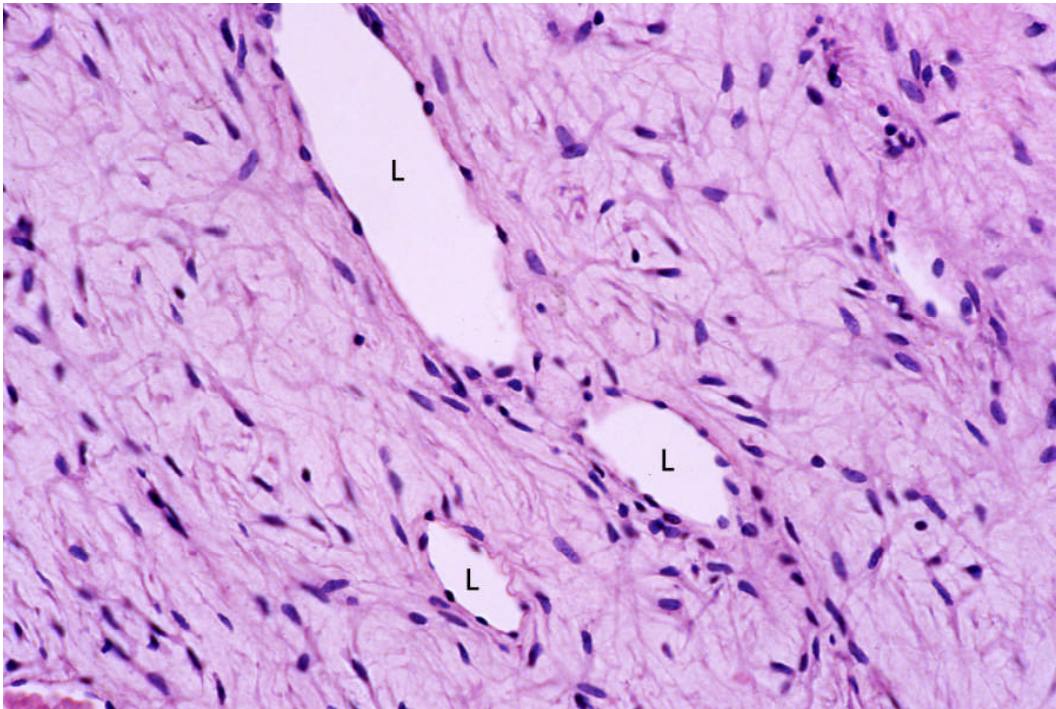


Abb. 7 Zahnpulpa Schwein, wahrscheinlich Lymphgefäße (L). Färbung HE, Vergr. 450fach

3.1.1 Ergebnisse mit histologischen Färbungen unter besonderer Berücksichtigung der Fasern in der Bindegewebsmatrix

Im **HE-Präparat** sind Bindegewebsfasern fast nur in der Wand der Blutgefäße und als schmaler Mantel von Nerven erkennbar (Abb.1, 2, 6). Diese Fasern sind kräftig rot und relativ dick, es handelt sich um Kollagenfasern, die vorwiegend aus Kollagen vom Typ I aufgebaut sind, was durch den immunhistochemischen Nachweis vom Kollagen Typ I bestätigt wird.

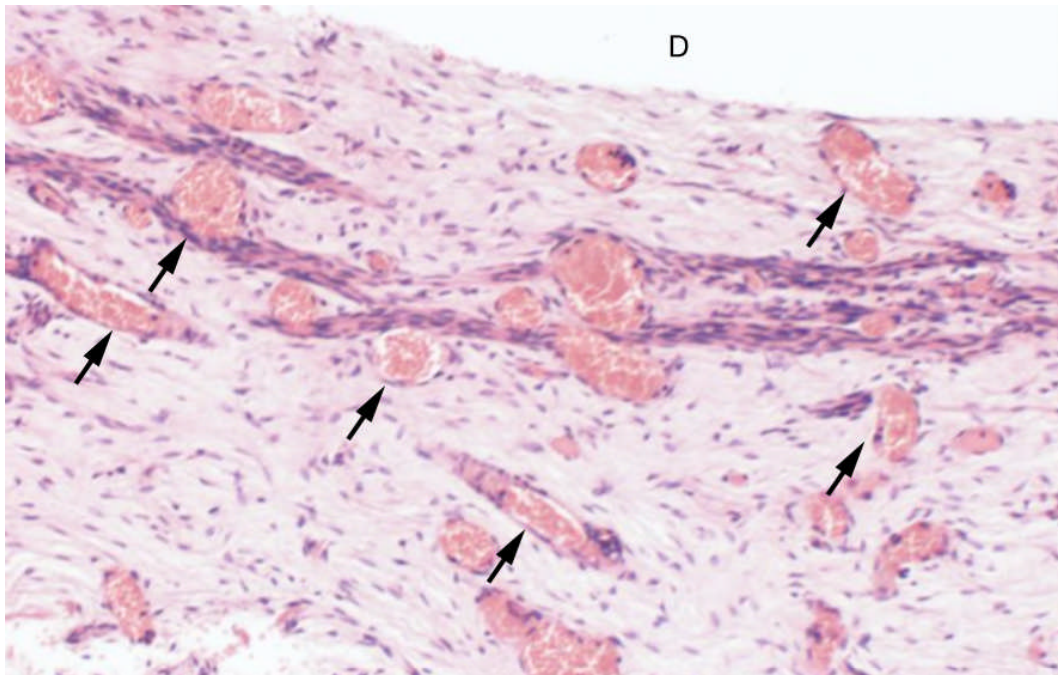


Abb. 8 Zahnpulpa Schwein, Nähe Wurzelkanal, auffallend sind die zahlreichen Blutgefäße (Pfeile); das Dentin (D, oben) hat sich glatt vom Pulpagewebe abgelöst, Färbung HE, Vergr. 120fach

Diese Kollagenfasern lassen sich in identischer Lokalisation noch eindeutiger mithilfe der **Azan-** und **Van-Gieson-Färbung** nachweisen. Diese Färbungen zeigen relativ viele Kollagenfasern im Bereich der Wurzelkanäle im adulten Gebiß. Im Azan- und van Gieson-Präparat kommt eine überraschend kräftige Adventitia der Arterien und Arteriolen aus Kollagenfasern sehr deutlich zur Darstellung (Abb. 9, 13).

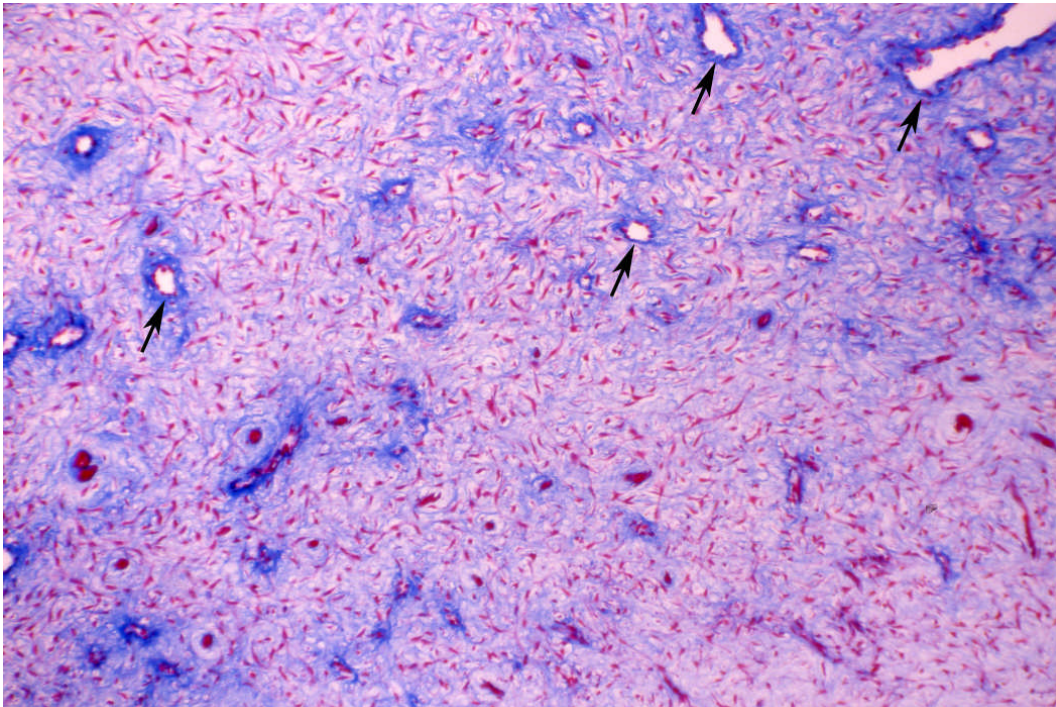


Abb. 9 Zahnpulpa Schwein, Übersicht, auffallend sind wieder die zahlreichen Blutgefäße (Pfeile), die nur rechts oben markiert sind, Färbung Azan, Vergr. 120fach

Die Azanfärbung zeigt zusätzlich im Bereich der gesamten Pulpa ein dichtes feines Fasergeflecht, in das die Fibroblasten eingelagert sind (Abb. 10). Dieses Geflecht ist in der Peripherie der Pulpa oft noch reicher entwickelt als im Zentrum (Abb. 10). Auf einzelnen Präparaten gab es jedoch keinen Unterschied hinsichtlich der Kollagenmenge im Zentrum und in der Peripherie (Abb. 11). Die Azanfärbung zeigt auch den Kollagengehalt im Prädentin und Dentin (Abb. 12).

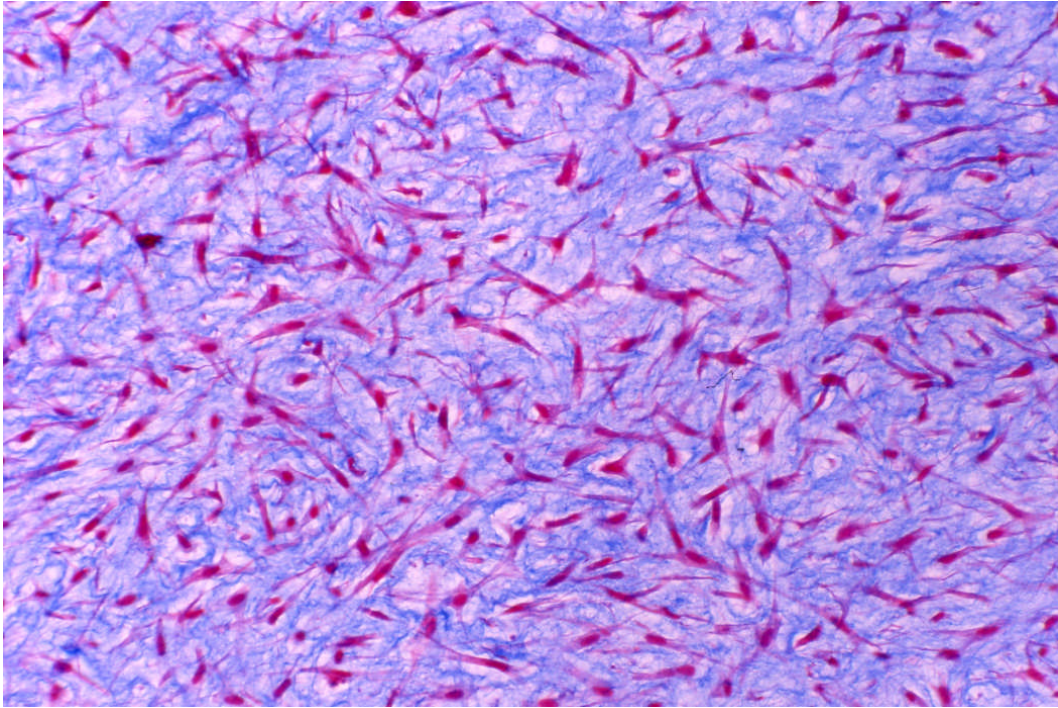


Abb. 10 Zahnpulpa Schwein, dichtgelagerte Fibroblasten (rot) am Rande der Pulpa in einer Matrix mit vielen feinen Kollagenfasern, Färbung Azan, Vergr. 250fach

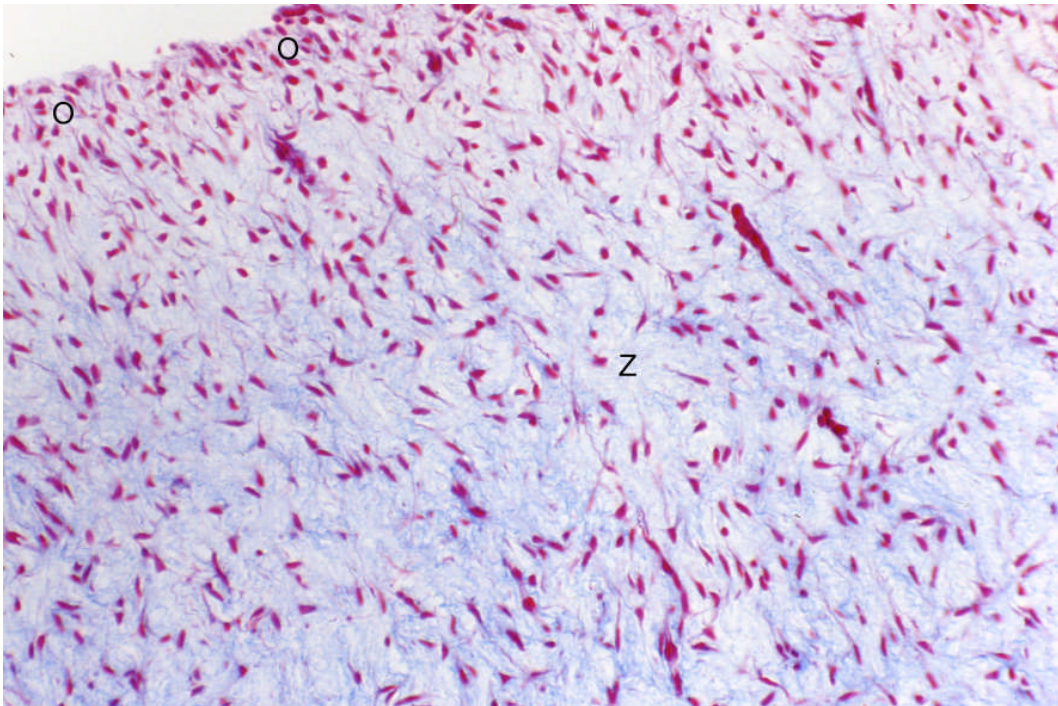


Abb. 11 Zahnpulpa Schwein, Übersicht mit Odontoblasten (O) in der Peripherie, Z: Zentrum der Zahnpulpa. Färbung Azan, Vergr. 250fach

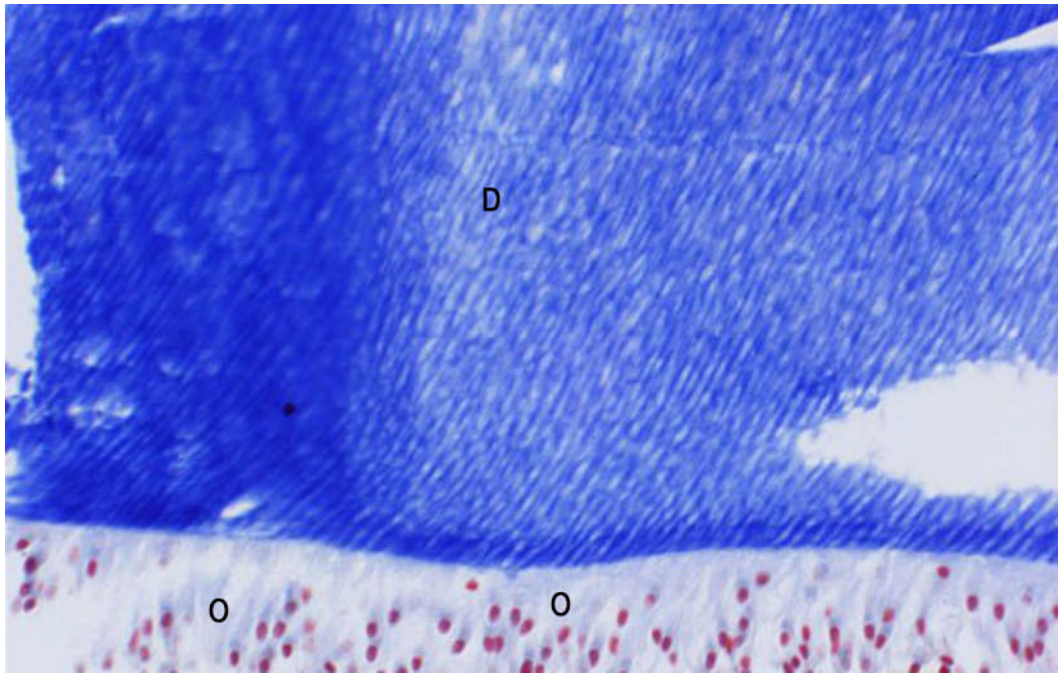


Abb. 12 Zahnpulpa Schwein, Peripherie, D: Dentin, O: Odontoblasten. Färbung Azan, Vergr. 250fach

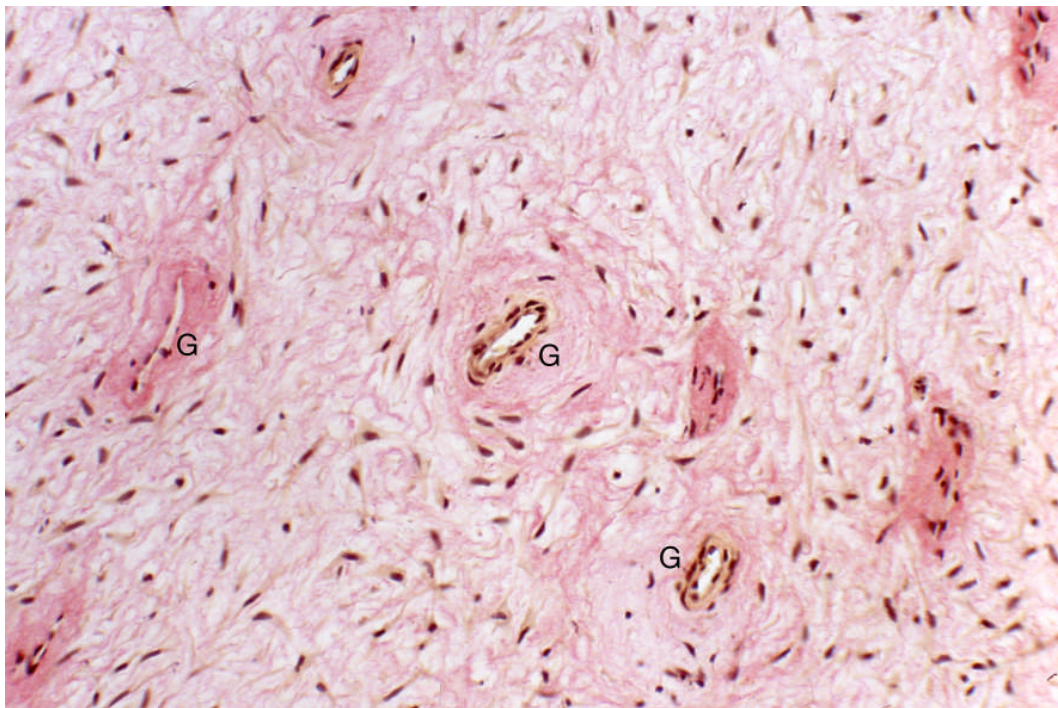


Abb. 13 Zahnpulpa Schwein, zahlreiche Blutgefäße (G), die meistens von einem dichten, rotgefärbten Mantel aus Kollagenfasern umgeben sind, Färbung van Gieson, Vergr. 120fach

Dieser dichte Filz aus feinen Fasern zeigt sich z. T. auch im **Versilberungspräparat nach Gomori** (Abb. 14), in dem diese Fasern schwarz gefärbt sind. Sie finden sich auch in der Media kleiner Arterien und im Endoneurium kleiner Nerven. Interessant ist, dass die Versilberung, die retikuläre

Fasern (Typ-III-Kollagen) nachweist, viel weniger Fasern anfärbt, als die Azanfärbung, die ebenfalls retikuläre Fasern nachweist.

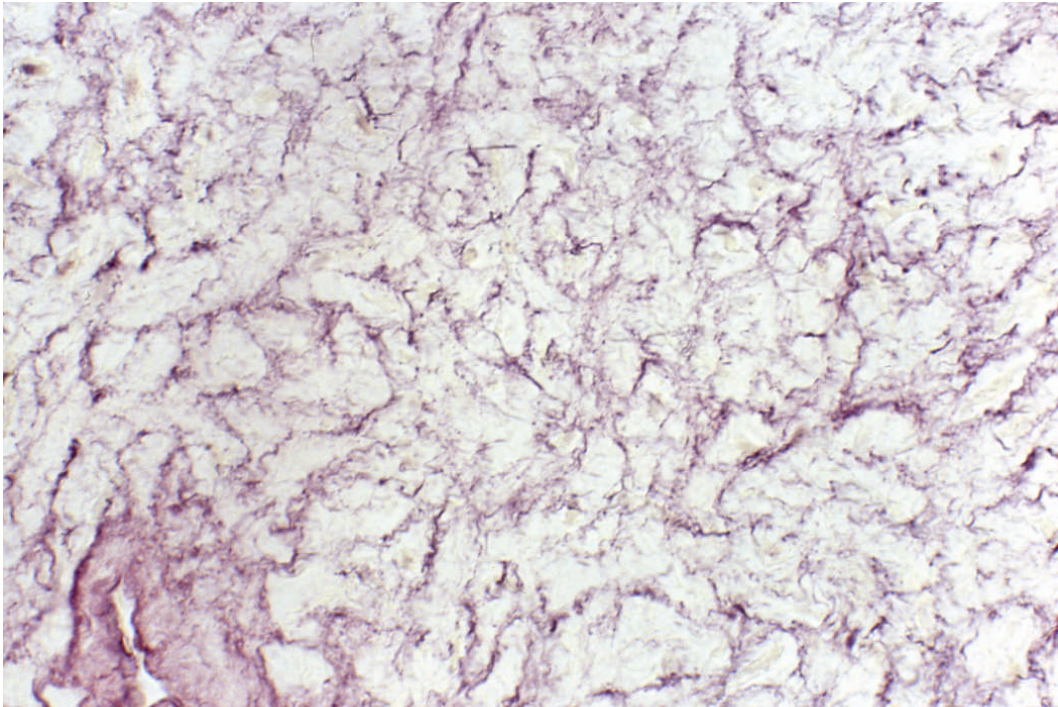


Abb. 14 Zahnpulpa Schwein, retikuläre Fasern. Die retikulären Fasern sind feine schwarz gefärbte Strukturen, deren Zahl aber geringer ist als im Azan- und van Gieson-Präparat und als im Kollagen III-Präparat, Versilberung nach Gomori, Vergr. 450fach

Immunhistochemisch zeigt der Nachweis von Kollagen Typ III ein feines Fasernetz, dessen Dichte ungefähr dem der feinen retikulären Fasern im Azan-Präparat entspricht. Eindeutige **elastische Fasern** lassen sich nur in der Wand der Blutgefäße darstellen.

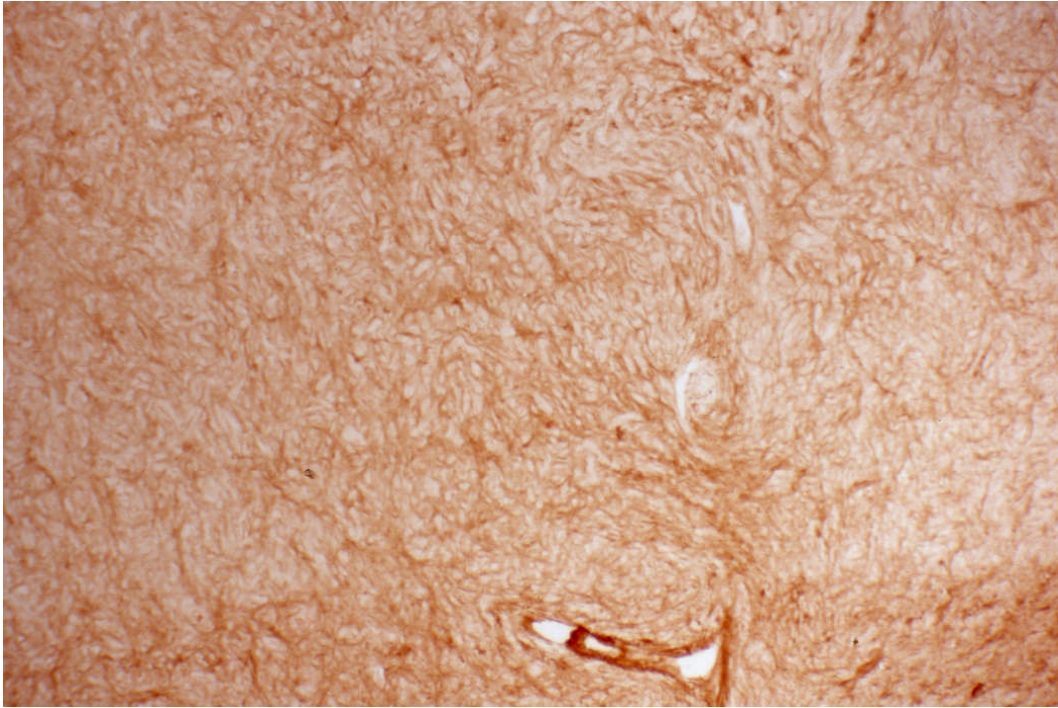


Abb. 15 Zahnpulpa Schwein, Nachweis von Kollagen III, es wird ein dichtes Netz aus feinen Fasern erkennbar, Vergr. 120fach

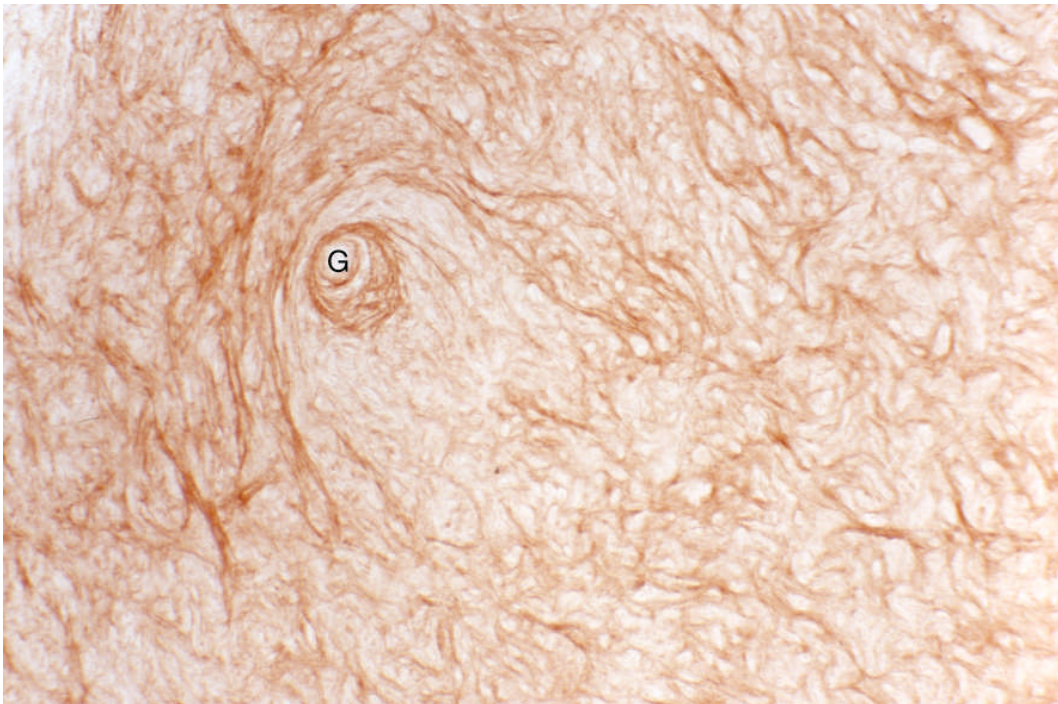


Abb. 16 Zahnpulpa Schwein, Nachweis von Kollagen III. Die Kollagen III-positiven Fasern bilden ein unterschiedlich dichtes Grundgerüst in der Pulpa, das in der Umgebung von Gefäßen (G) verdichtet ist, Vergr. 250fach

3.1.2 Ergebnisse der histochemischen allgemeinen Kohlenhydratnachweise

Alcianblau bei pH 2,5

Alcianblau färbt bei dem gewählten pH-Wert die gesamte Matrix der Pulpa kräftig an. Oft ist das Zentrum der Pulpa etwas schwächer gefärbt als die Peripherie. Bei höherer Vergrößerung zeigt sich, dass Alcianblau in zwei morphologischen Reaktionstypen auftritt. Einmal färben sich feine Fasern, zum anderen färbt sich die amorphe Matrix. Die größeren Blutgefäße werden innen von einem sehr kräftig und weiter außen von einem relativ schwach angefärbten Hof umgeben. Ganz vereinzelt lassen sich mit dieser Methodik kräftig blau gefärbte Mastzellen beobachten.

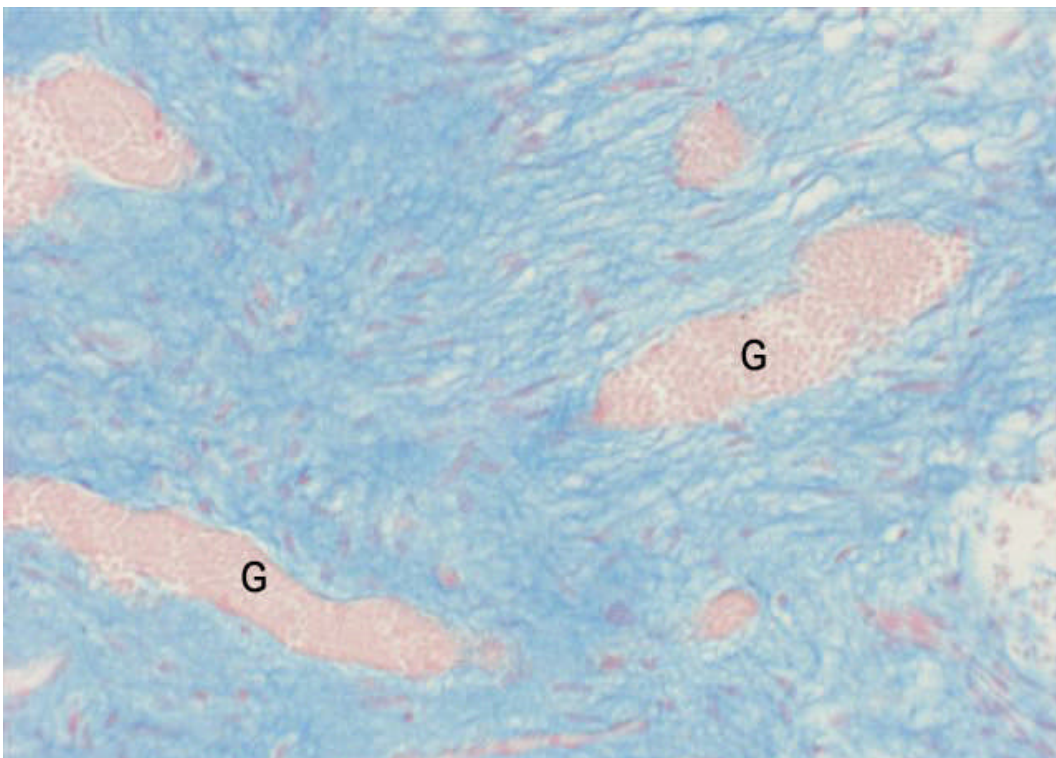


Abb. 17 Zahnpulpa Schwein, Färbung mit Alcianblau pH 2,5, weist die (blau gefärbten) anionischen Matrixkomponenten nach, die hier im Bindegewebe Glykosaminoglykane sind. G: Blutgefäße. Gegenfärbung mit Kernechtrot, Vergr. 250fach

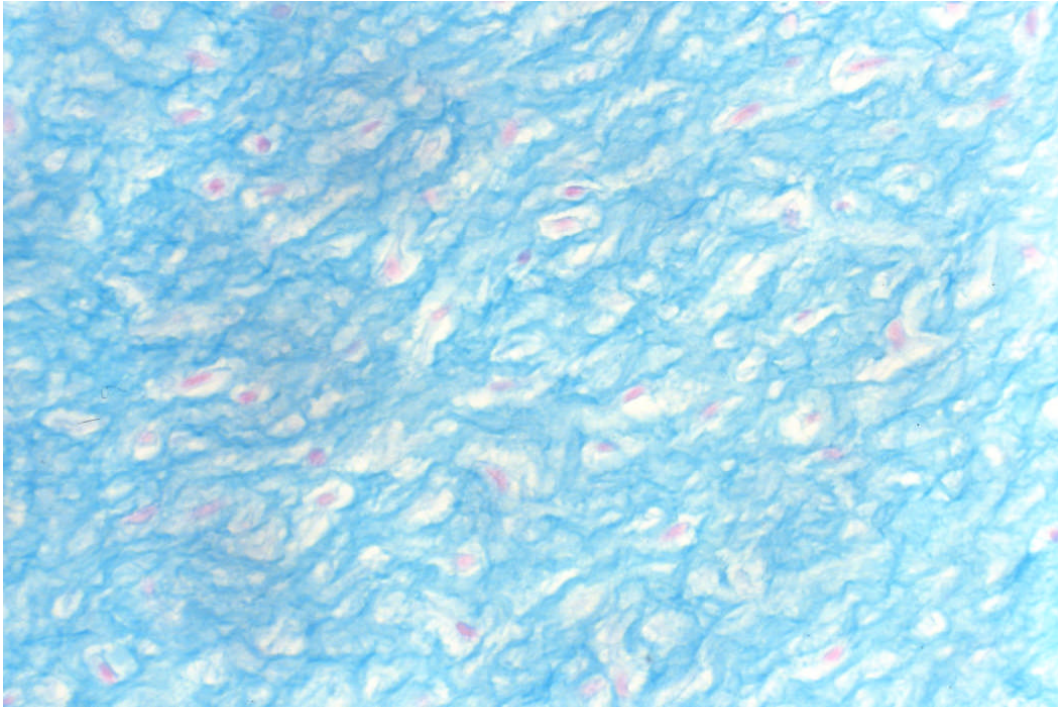


Abb. 18 Zahnpulpa Schwein, Färbung Alcianblau pH 2,5, der blaue Farbstoff weist die Glykosaminoglykane der Matrix nach. Auffällig ist ein vermutlich artefizieller heller Hof um die Fibroblasten, deren Kern rot gefärbt wurde, Vergr. 450fach

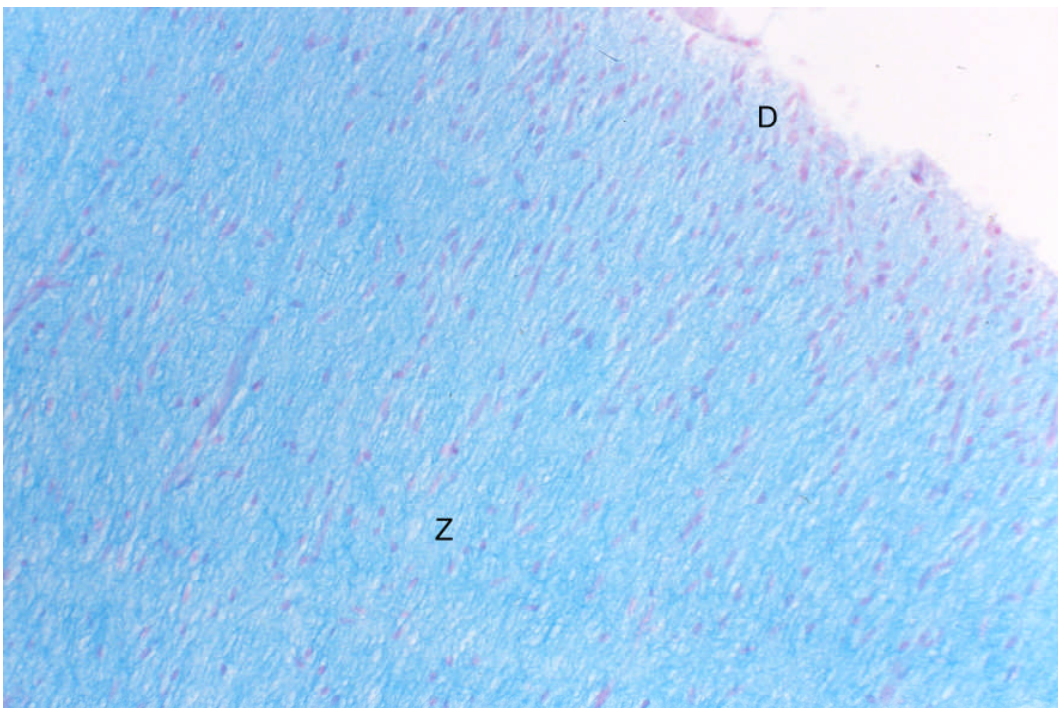


Abb. 19 Zahnpulpa Schwein, Färbung Alcianblau pH 2,5, Übersicht, D: Peripherie, Z: Zentrum der Pulpa, die Blaufärbung ist in der Peripherie und im Zentrum der Pulpa annähernd gleich, Vergr. 250fach

Alcianblau bei pH 1

Die Farbintensität des Alcianblau ist bei pH 1 kaum schwächer als bei pH 2,5 und ähnelt letzterer somit weitgehend.

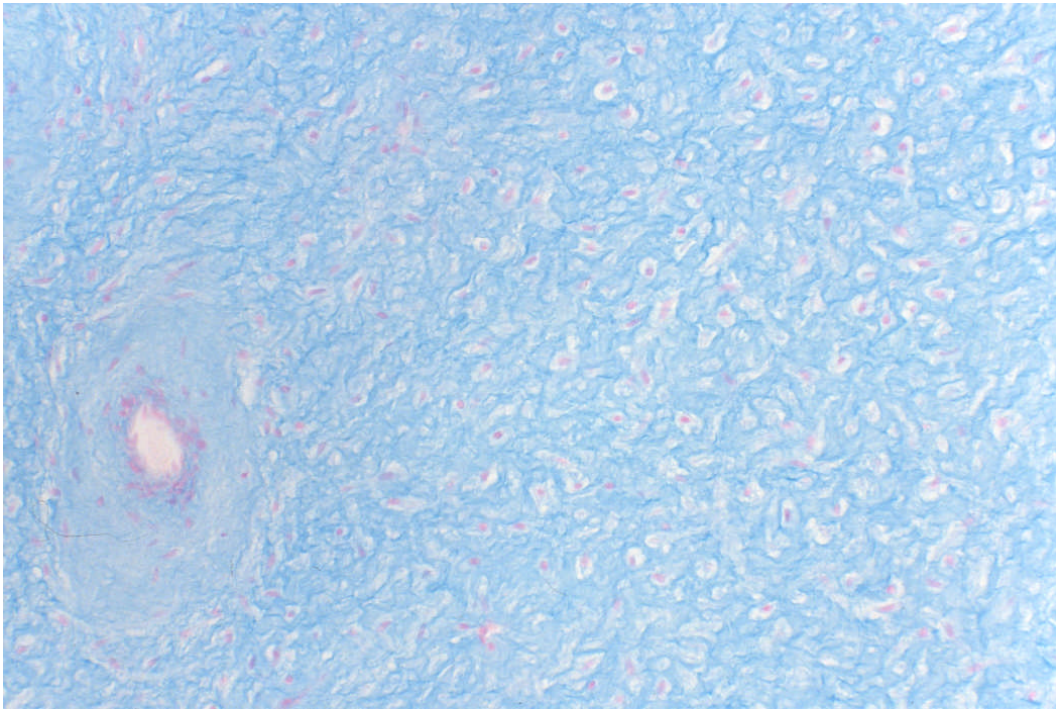


Abb. 20 Zahnpulpa Schwein, Färbung Alcianblau pH 1, die Intensität der Färbung ist sehr ähnlich der bei der Färbung bei pH 2,5 (Abb. 19), Vergr. 250fach

Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion)

Beim Schwein färbt sich in der Zahnpulpa, wie beim Menschen, die amorphe Matrix schwach violett an. Außerdem kommen feinfaserige Strukturen zur Darstellung. Die Wände der kleinen Arterien färben sich mittelstark an.

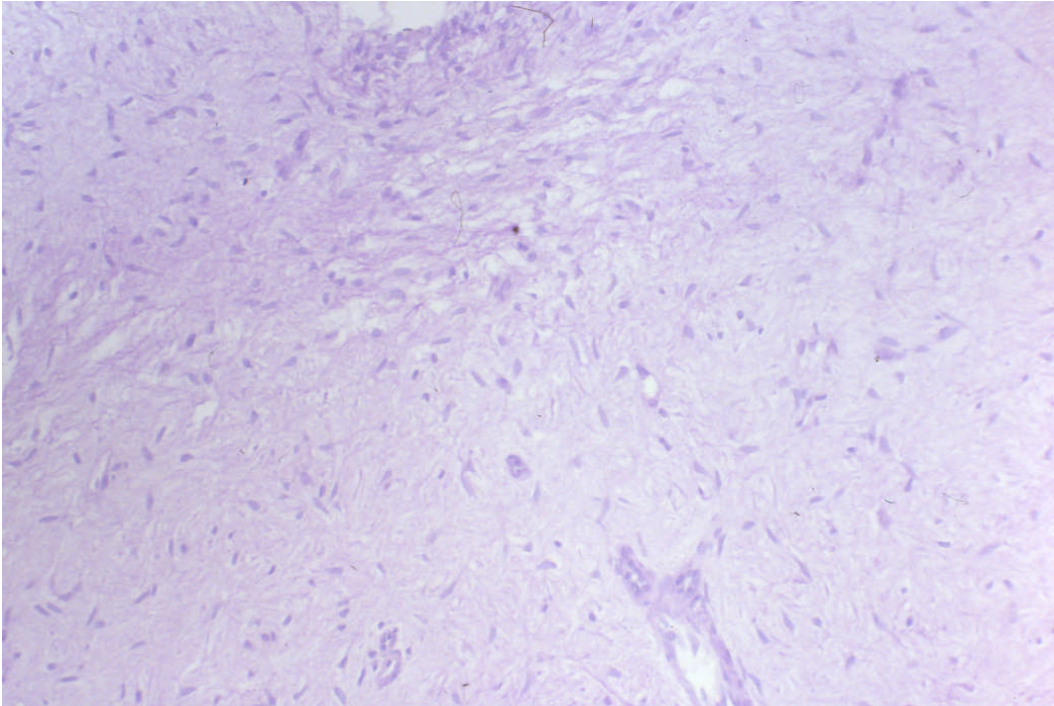


Abb. 21 Zahnpulpa Schwein, PAS-Färbung. Die PAS-Färbung färbt die Matrix schwach bis mäßig stark an, für die Färbung sind zum erheblichen Teil die feinen Kollagenfasern (= retikulären Fasern) verantwortlich, Vergr. 250

3.1.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Nachweise von Matrixkomponenten

Decoran

Das Decoran lässt sich in mittelstarker Anfärbung in der gesamten Matrix nachweisen. Morphologisch lässt es kaum Faserstrukturen erkennen, mitunter ist auch das Zytoplasma der Fibroblasten angefärbt.

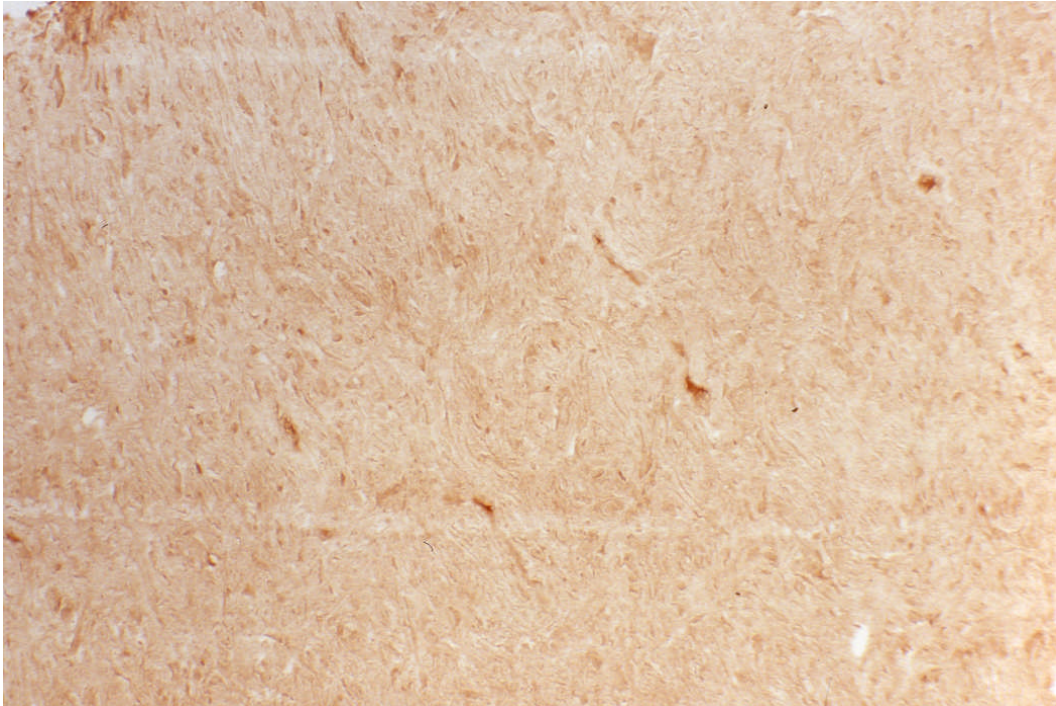


Abb. 22 Zahnpulpa Schwein, immunhistochemischer Nachweis des Decorans. Die Matrix färbt sich diffus und feinfaserig an, Vergr. 250 fach

Fibronectin

Fibronectin färbt die Matrix schwach bis mittelstark an, klare morphologische Strukturen sind nicht erkennbar, jedoch können kleine Areale, vermutlich perizelluläre Zonen, stärker gefärbt sein als die amorphe Matrix. Die Blutgefäße sind von einem auffallend fibronectinarmen Mantel umhüllt. Die Färbeintensität ist peripher im Bereich der Odontoblasten stärker als im Zentrum der Pulpa.

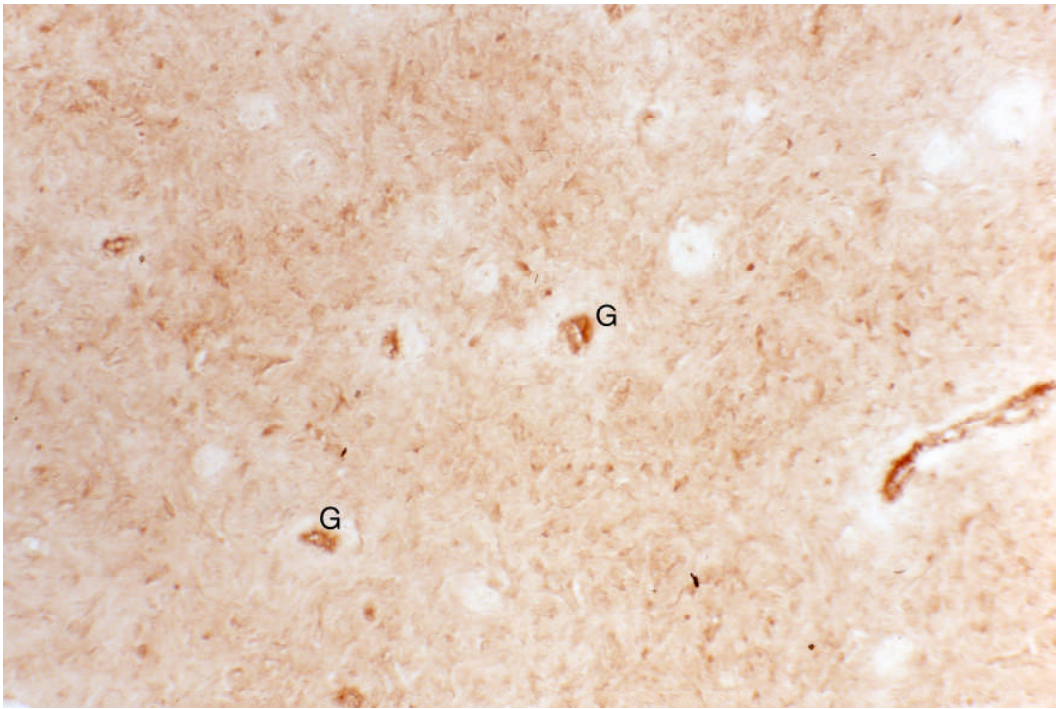


Abb. 23 Zahnpulpa Schwein, immunhistochemischer Nachweis des Fibronectins. Das Färbeergebnis ist differenziert und schwer zu interpretieren, die Wand der Blutgefäße (G) ist kräftig gefärbt, der faserreiche Hof dagegen nur sehr schwach, im typischen Pulpagewebe ist die Färbung schwach bis mäßig stark, Vergr. 250fach

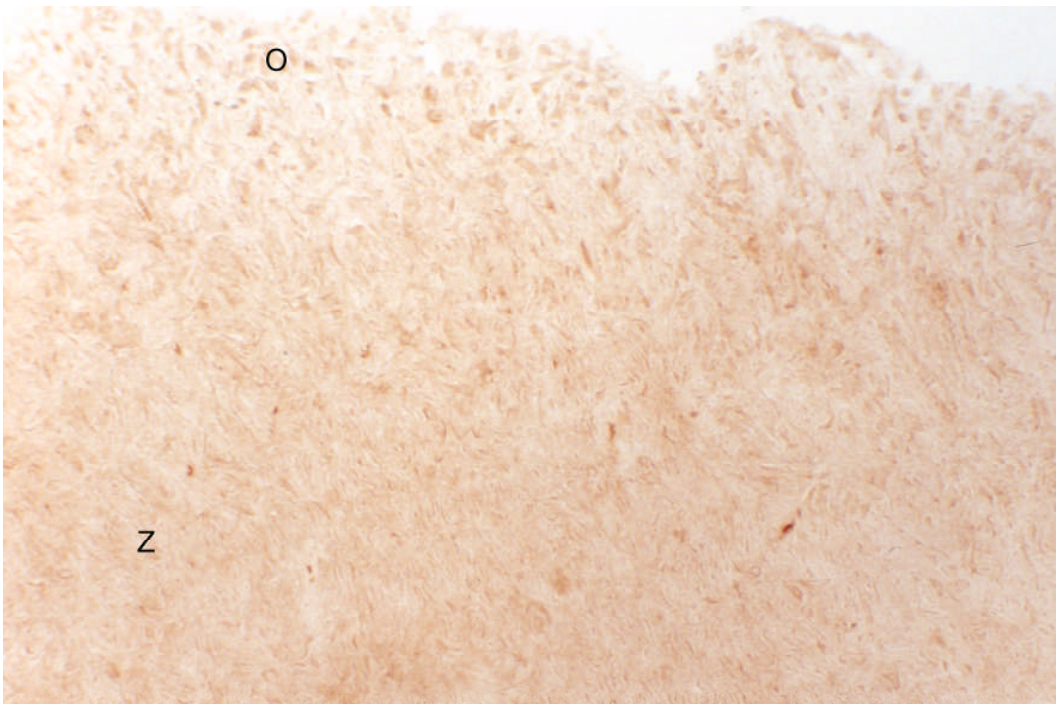


Abb. 24 Zahnpulpa Schwein, immunhistochemischer Nachweis des Fibronectins, im Odontoblastenbereich (O) wird der Umriss der Zellen deutlich, im Zentrum dominiert ein eher diffus-feinfaseriges Erscheinungsbild des Nachweises, Vergr. 250fach

Chondroitin-6-sulfat

Der Nachweis des Chondroitin-6-sulfats färbt die Bindegewebsmatrix schwach bis mittelstark an, verbreitet ist eine netzförmige Faserstruktur erkennbar.

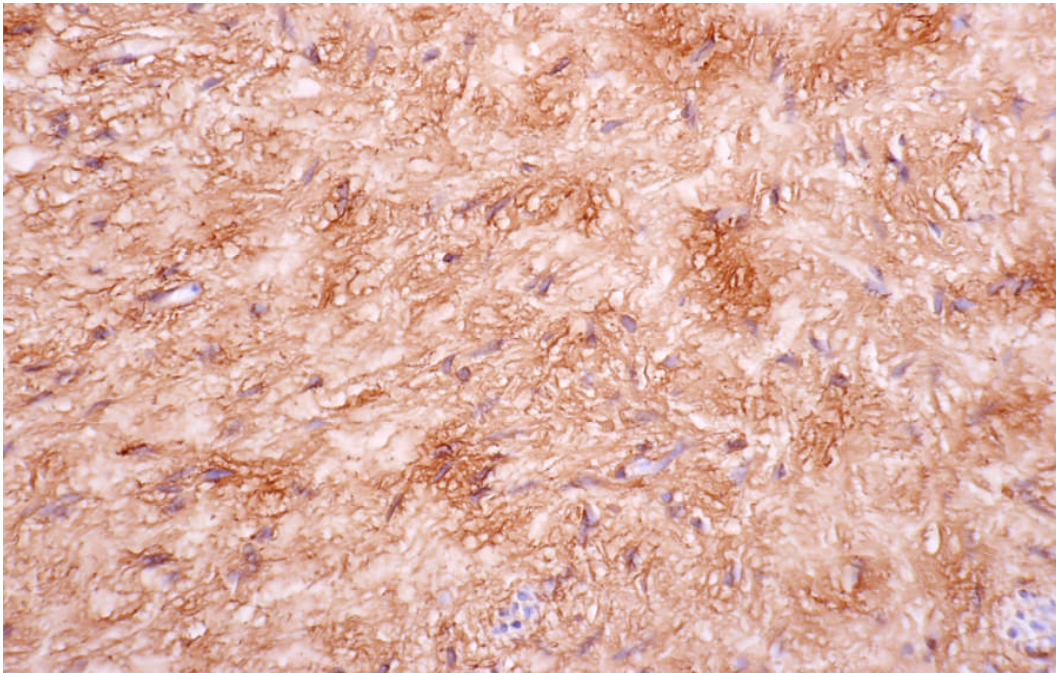


Abb. 25 Zahnpulpa Schwein, immunhistochemischer Nachweis des Chondroitin-6-sulfats. Der Reaktionsausfall ist unterschiedlich stark und oft faserig, u.U. sind hier große Hyaluronan-Aggregan-Komplexe dargestellt, in der Umgebung auch kleiner Blutgefäße, der Reaktionsausfall ist verhältnismäßig kräftig. Vergr. 450fach

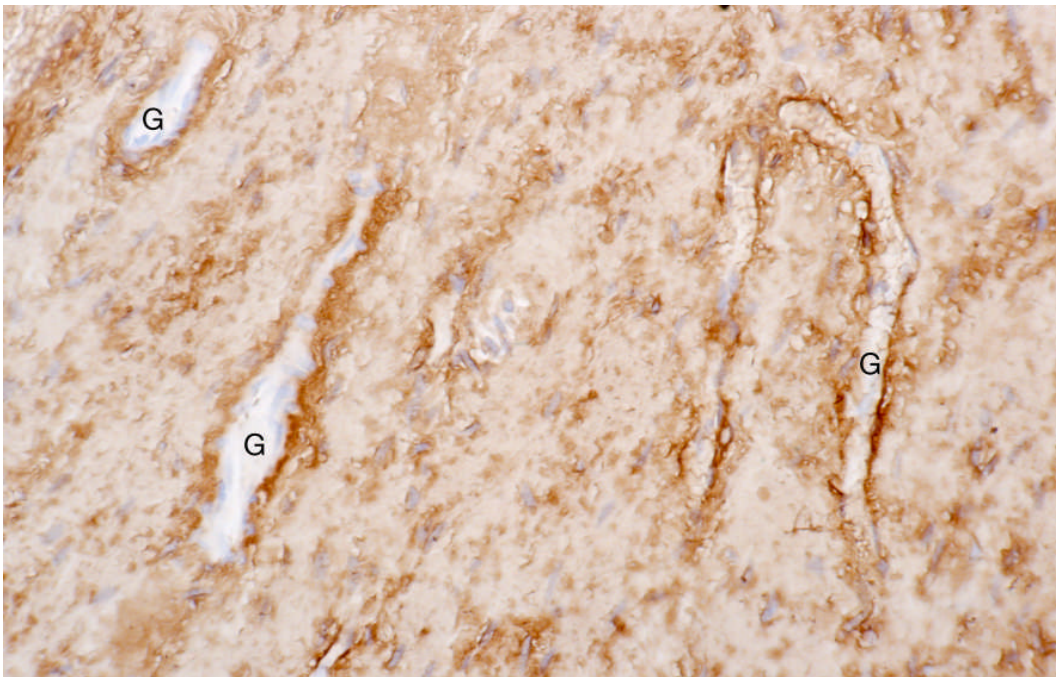


Abb. 26 Zahnpulpa Schwein, immunhistochemischer Nachweis des Chondroitin-6-sulfats, der Reaktionsausfall ist in der Wand der Blutgefäße (G) besonders kräftig, Vergr. 450fach

Dermatansulfat

Beim Dermatannachweis färbt sich die Matrix ganz schwach an, z. T. treten faserige Strukturen hervor. Auch die Fibroblasten färben sich schwach an.

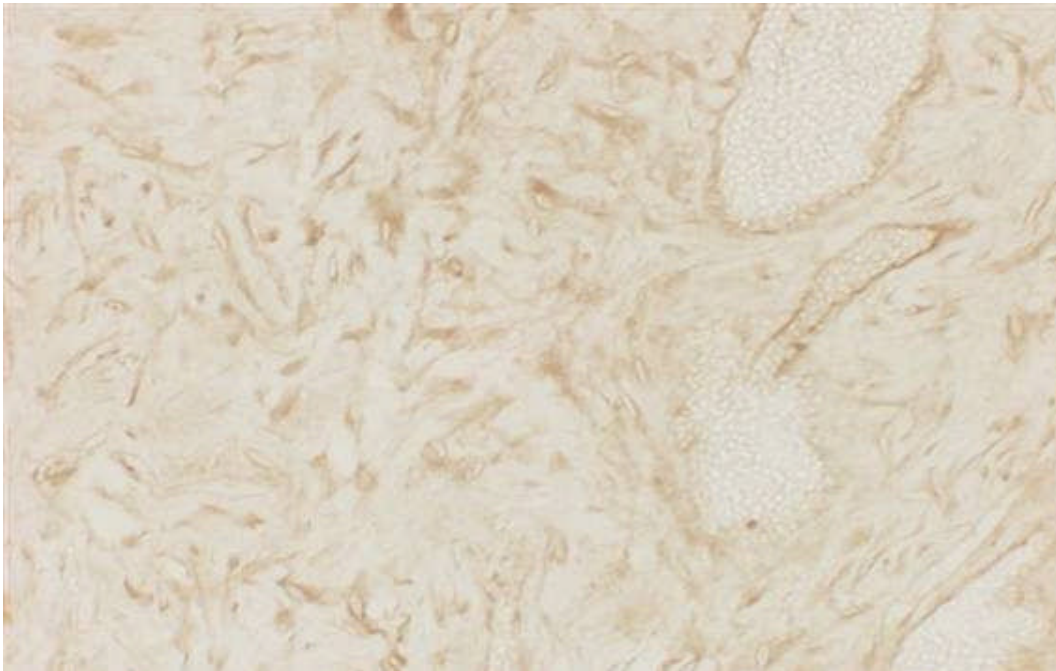


Abb. 27 Zahnpulpa Schwein, immunhistochemischer Nachweis des Dermatansulfats. Der Nachweis fällt generell schwächer aus als der des Chondroitinsulfats und ist in der Umgebung von Gefäßen und Fibroblasten etwas kräftiger als in der zellfreien Matrix, Vergr. 450fach

S-100

S-100 markiert beim Schwein kleine und größere Nerven, deren Zahl durchgängig niedriger zu sein scheint als beim Menschen, was aber vermutlich auf einem Zufall beruht, da keine Schnittserien untersucht wurden. Auffällig ist, dass beim Schwein auch die Fibroblasten im Zentrum der Pulpa mit dem S-100-Antikörper reagieren (Abb. 28), wobei unklar bleibt, ob es sich dabei um eine unspezifische Kreuzreaktion handelt.

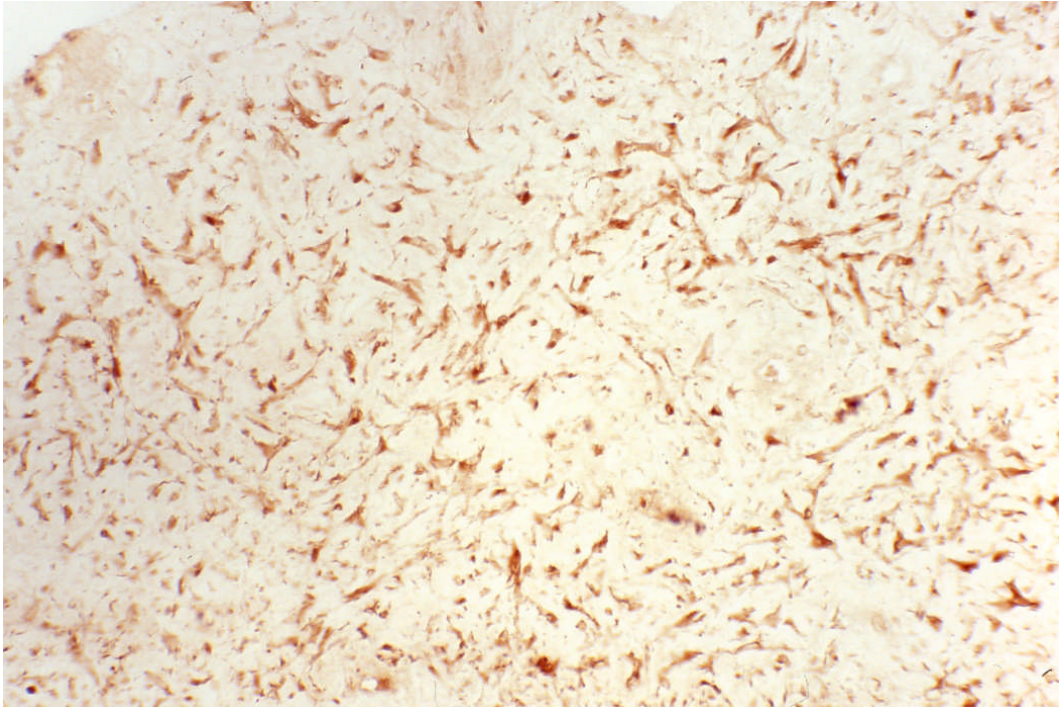


Abb. 28 Zahnpulpa Schwein, immunhistochemischer Nachweis des S-100 Proteins, das hier deutlich die Fibroblasten markiert, Vergr. 250fach

Neurofilamente (NFPC)

Der eingesetzte Antikörper gegen Neurofilamente weist sehr deutlich Nerven in der Pulpa nach, auch Einzelfasern.

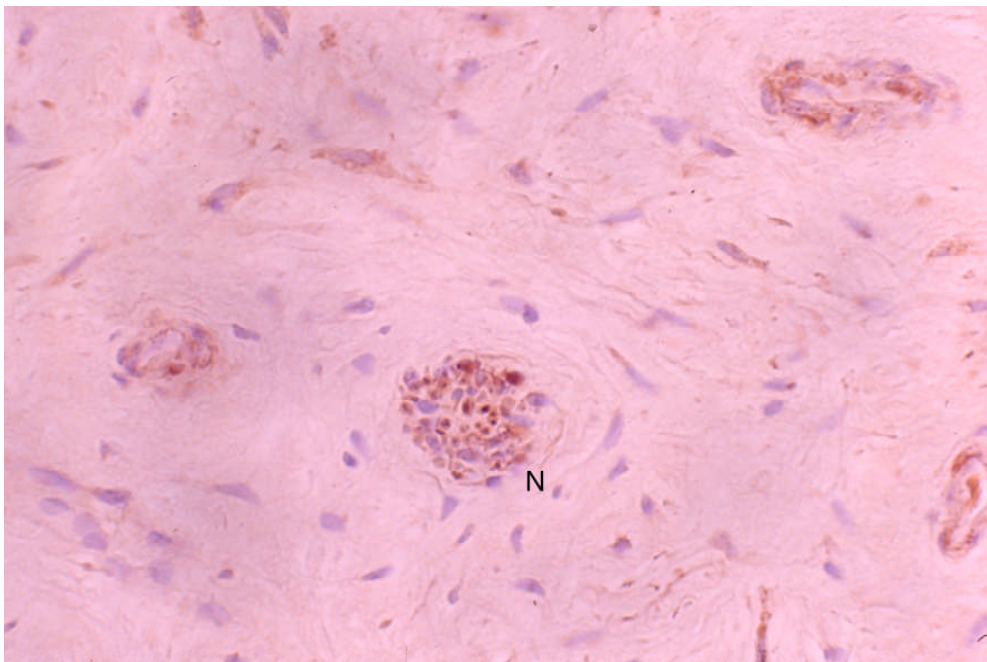


Abb. 29 Zahnpulpa Schwein, immunhistochemischer Nachweis der Neurofilamente in Nerven (N) und feinen Fasern in der Wand von Arteriolen (A), Vergr. 450fach

Kollagen I

Mit dem Kollagen I Antikörper reagieren relativ kräftig Fasern in der Umgebung der Gefäße, und zusätzlich feine Fasern in der gesamten Matrix der Pulpa.

Kollagen III

In der gesamten Pulpa reagieren feine Fasern schwach bis mittelstark positiv. In der Umgebung von Blutgefäßen fällt die Reaktion etwas kräftiger aus (Abb. 15, 16).

Milch- und Ersatzzähne unterscheiden sich hinsichtlich der erzielten Färbeergebnisse des Pulpagewebes nicht. Beim Milchgebiß ist jedoch der Matrixraum etwas weiter als beim Ersatzzahn und die Matrixfasern sind zarter und weniger zahlreich.

3.2 Lichtmikroskopische Befunde in der Zahnpulpa Mensch

Allgemeines

Die menschliche Pulpahöhle besteht ganz ähnlich wie die des Schweines, aus einem mesenchymähnlichen Bindegewebe, das Nerven und viele kleine Blutgefäße enthält. Die kleinen Arterien und die Arteriolen besitzen eine relativ kräftige Adventitia aus Kollagen vom Typ I.

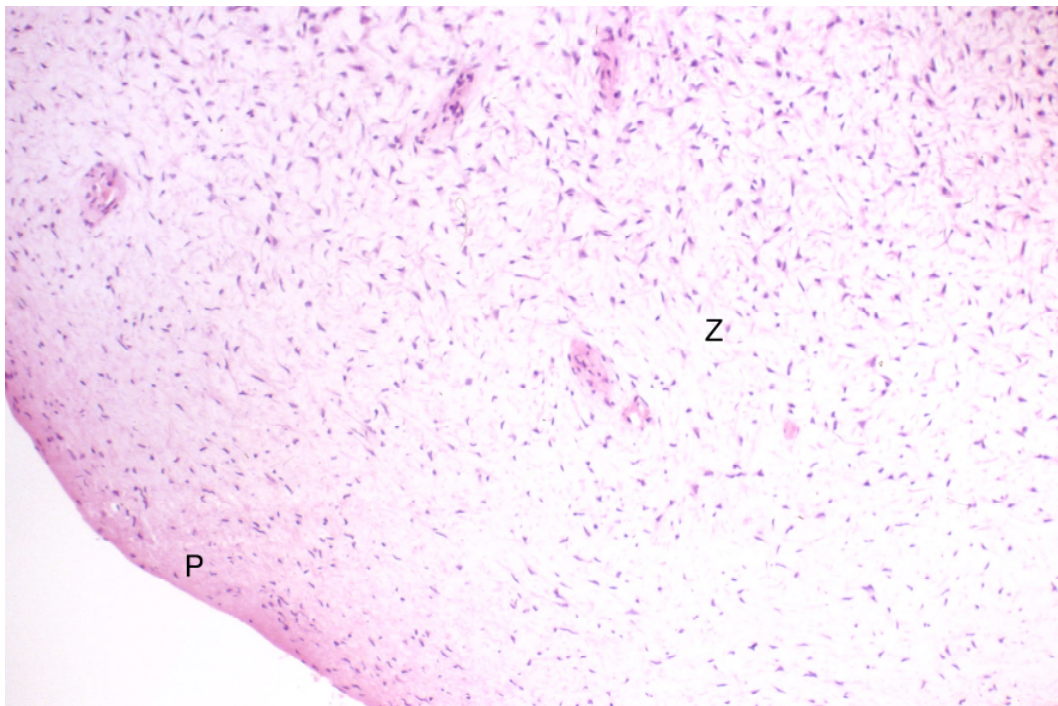


Abb. 30 Zahnpulpa Mensch, Übersicht, Peripherie (P) und Zentrum (Z) der Pulpa sind abgebildet. In der Peripherie sind rot gefärbte Fasern häufiger als im Zentrum, in diesem Präparat sind keine typischen Odontoblasten ausgebildet. Färbung HE, Vergr. 45fach

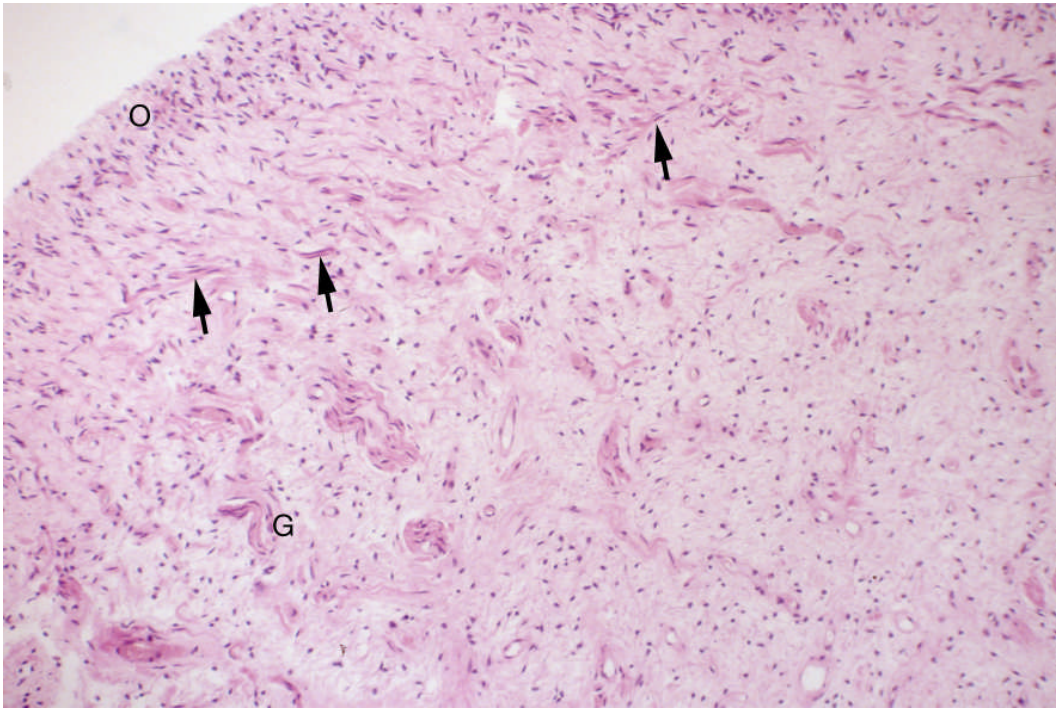


Abb. 31 Zahnpulpa Mensch, Übersicht, O: Odontoblasten, G: Arteriolen; in der Peripherie treten kleine rot gefärbte Kollagenfaserbündel auf (Pfeile), Färbung HE, Vergr. 120fach

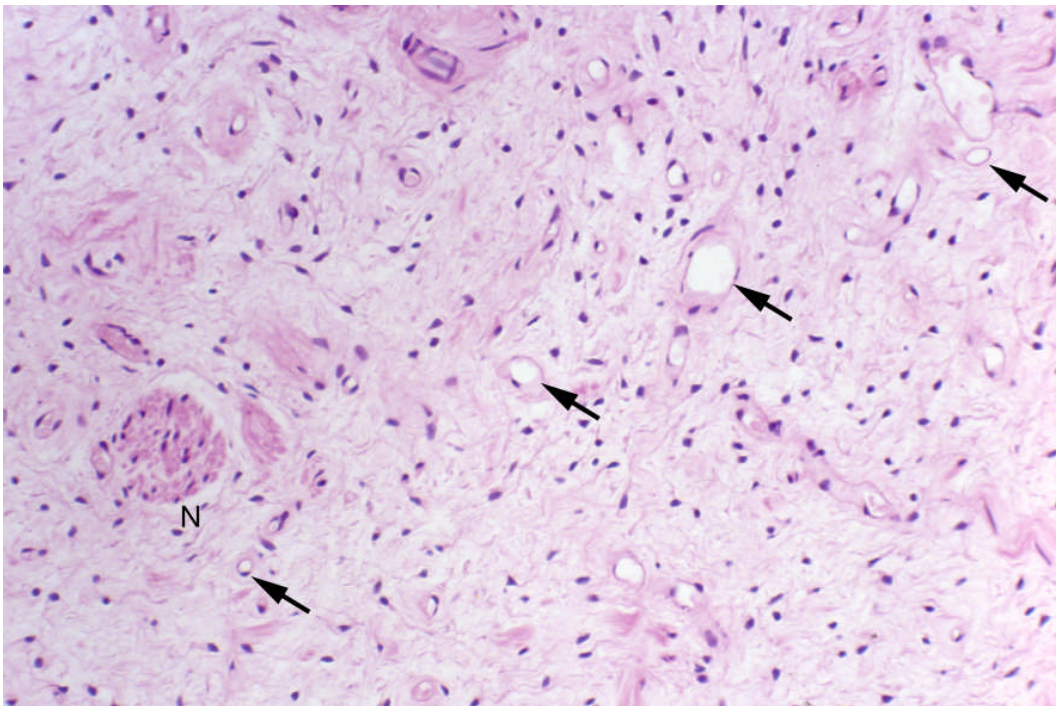


Abb. 32 Zahnpulpa Mensch, Nachweis zahlreicher kleiner Gefäße (Pfeile, einschließlich vieler Kapillaren) und eines größeren Nerven (N), Färbung HE, Vergr. 250fach

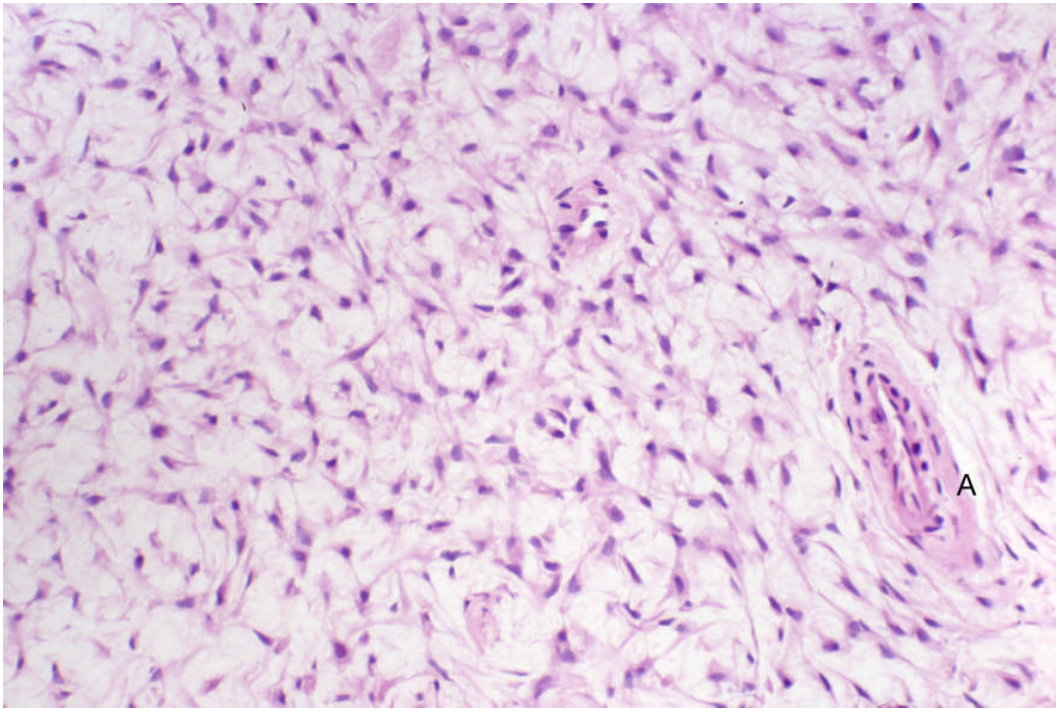


Abb. 33 Zahnpulpa Mensch, Übersicht mit dem dichten dreidimensionalen Netzwerk aus Fibroblasten, die Matrix erscheint überwiegend homogen hell. A: Arteriole, Färbung HE, Vergr. 250fach

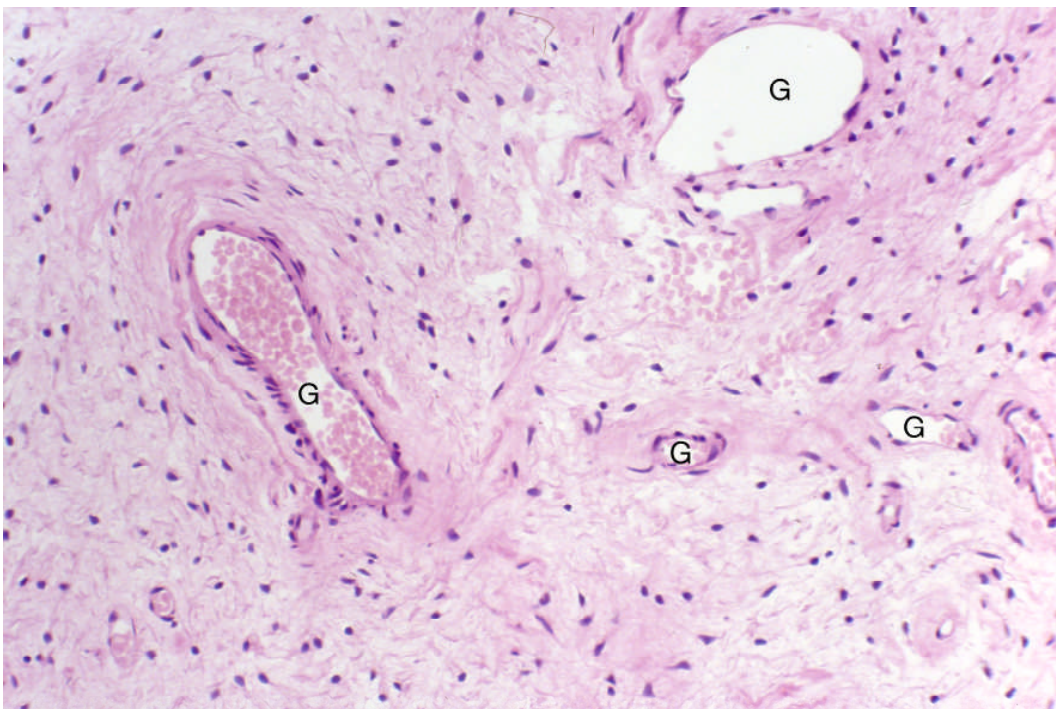


Abb. 34 Zahnpulpa Mensch, Region im Zentrum der Pulpa mit größeren und kleineren Gefäßen (G) und relativ locker verteilten Fibroblasten, Färbung HE, Vergr. 250fach

Zellen

Die Zellen des Pulpagewebes sind fast ausschließlich schlanke Fibroblasten mit relativ hellem Kern und zwei oder drei dünnen Zellausläufern, die sich mit den Ausläufern benachbarter Zellen berühren. Die Zahl dieser Zellen unterscheidet sich im Zentrum und in der Peripherie der Pulpa; im Zentrum sind sie spärlicher als in der Peripherie, wo sie recht zahlreich sind und fast epithelähnliche Formationen bilden können, was ganz außen, im Bereich der Odontoblasten am auffälligsten ist. Die Kerne dieser peripheren Zellen, zu denen auch die Odontoblasten gehören, sind heller und rundlicher als im Zentrum. Der Unterschied hinsichtlich der Zellzahl zwischen Zentrum und Peripherie ist beim Menschen viel deutlicher als beim Schwein. Das Zytoplasma der peripheren Fibroblasten und ihre Fortsätze sind breiter. Freie Zellen sind im untersuchten Gewebe sehr selten.

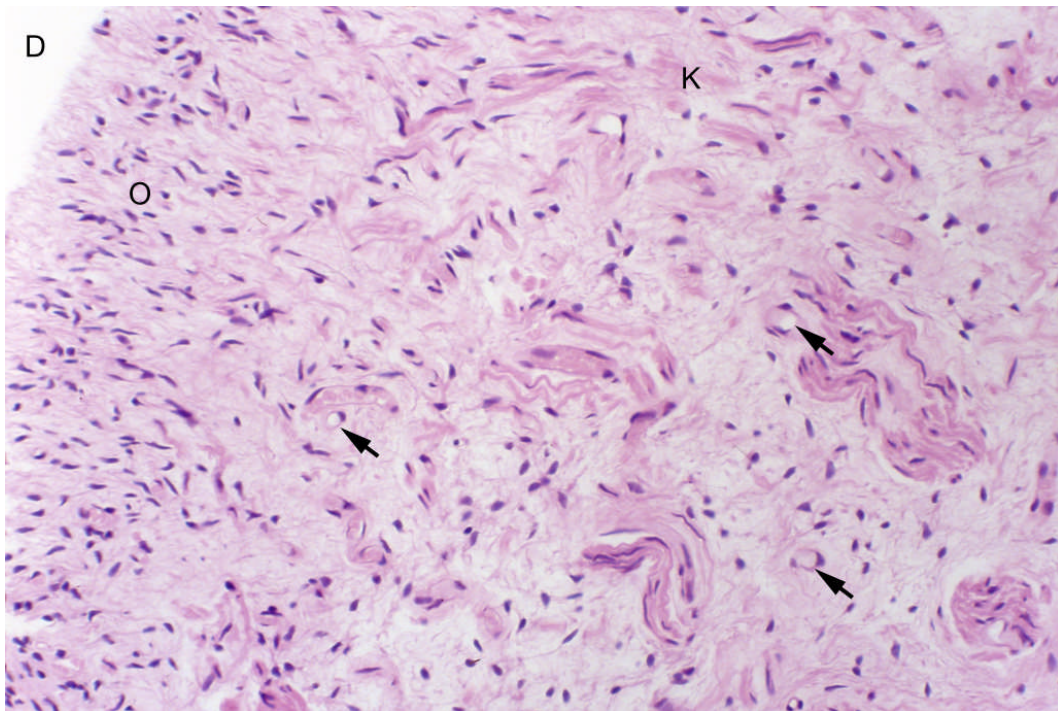


Abb. 35 Zahnpulpa Mensch, Randbezirk der Pulpa mit Odontoblasten (O), Gefäßen (Pfeile), Kollagenfaserbündeln (K) und Nerven, das Pulpagewebe hat sich vom Dentin (D, linke obere Ecke) abgelöst, Färbung HE, Vergr. 250fach

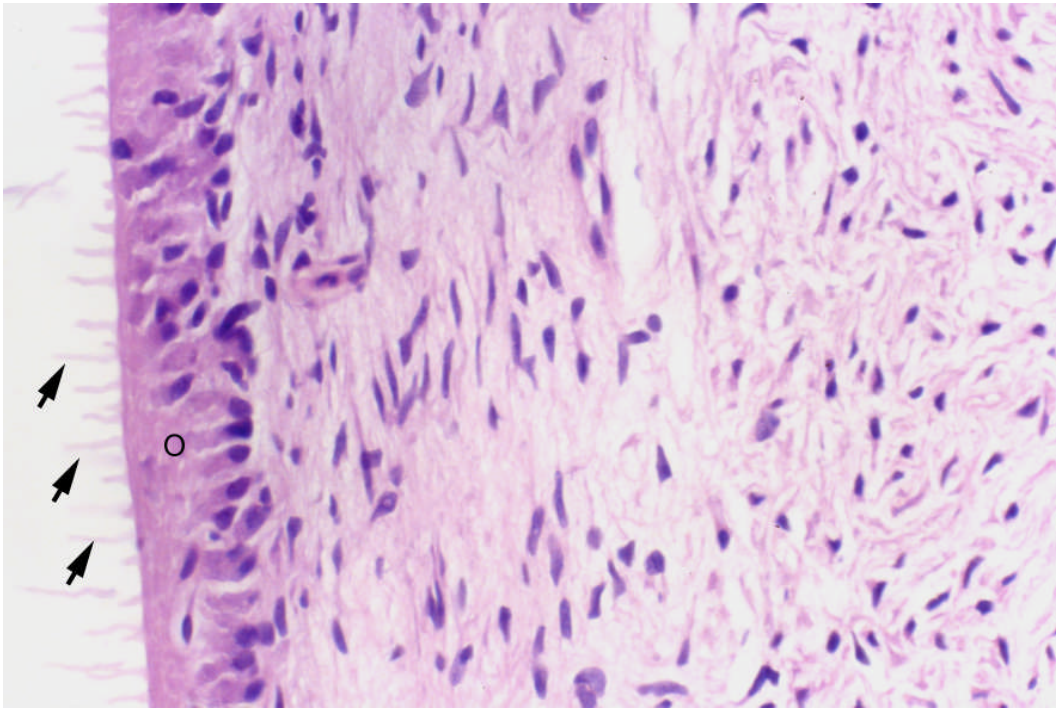


Abb. 36 Zahnpulpa Mensch, Randregion der Pulpa mit Odontoblasten (O), von denen Tomessche Fortsätze ausgehen (Pfeile). Die Matrix unter den Odontoblasten ist etwas dichter und faserreicher als im Zentrum; die Fibroblasten der Peripherie sind etwas größer als im Zentrum, Färbung HE, Vergr. 450fach

3.2.1 Ergebnisse mit histologischen Färbungen unter besonderer Berücksichtigung der Fasern in der Bindegewebsmatrix

Fasern

Die Matrix ist recht umfangreich und besteht überwiegend aus Grundsubstanz und aus kräftigen und zarten Kollagenfasern. Elastische Fasern ließen sich nur in der Wand der kleinen Blutgefäße nachweisen. Die kräftigen Kollagenfasern, die sich auch in der Adventitia der Arterien und Arteriolen finden, bestehen vor allem aus **Kollagen Typ I** und färben sich kräftig mit der **Azan-** und **van Gieson-Färbung**.

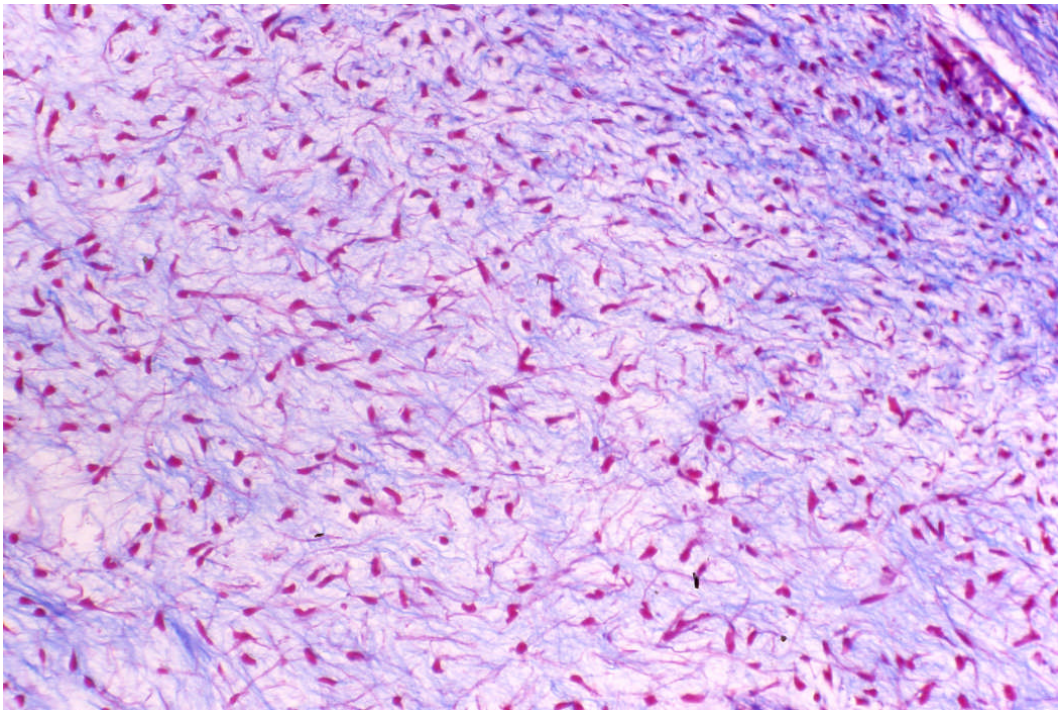


Abb. 37 Zahnpulpa Mensch, Übersicht mit Verteilung der Fibroblasten (rot) und der feinen Kollagenfasern (blau), rechts oben: Randregion der Pulpa mit dichterem Kollagenfasergerüst, Färbung Azan, Vergr. 250fach

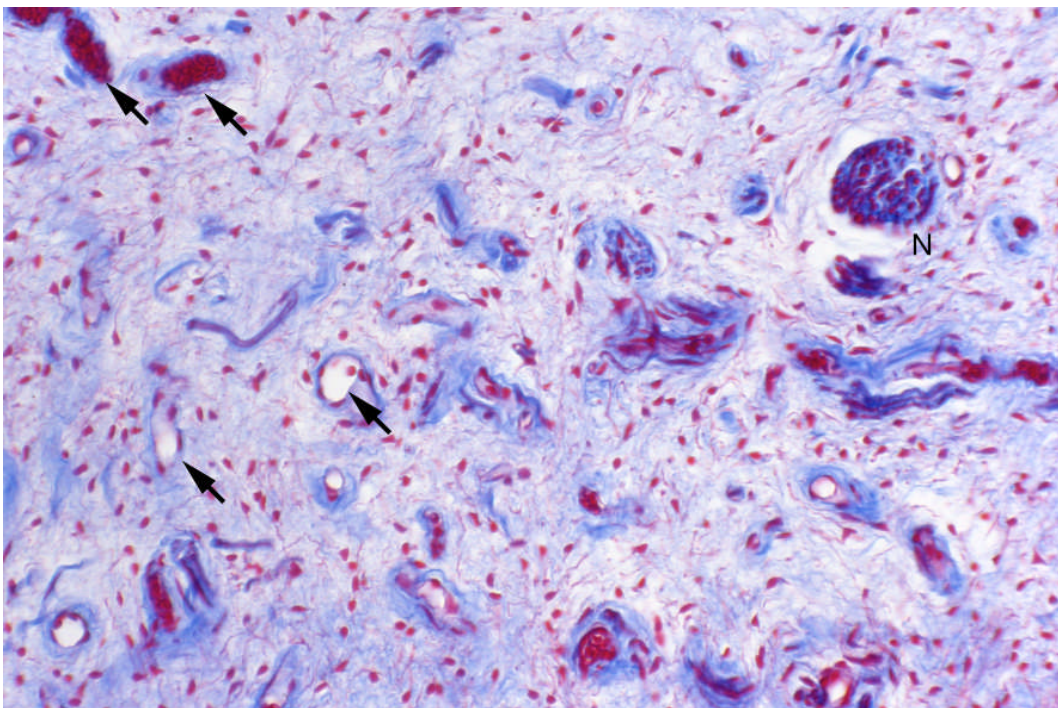


Abb. 38 Zahnpulpa Mensch, gefäßreiche Region, die Gefäße (Pfeile) sind von einer auffallenden Kollagenmanschette (blau) umgeben. N: Nerv, Färbung Azan, Vergr. 250fach

Sie treten in Form kleiner Bündel auch in der Pulpaperipherie und in den Wurzelkanälen auf. Die zarten Kollagenfasern sind **retikuläre Fasern** und lassen sich auch gut mit **Azanfärbung** und im Vergleich mit anderen Geweben weniger befriedigend mit der **Versilberung nach Gomori** nachweisen.

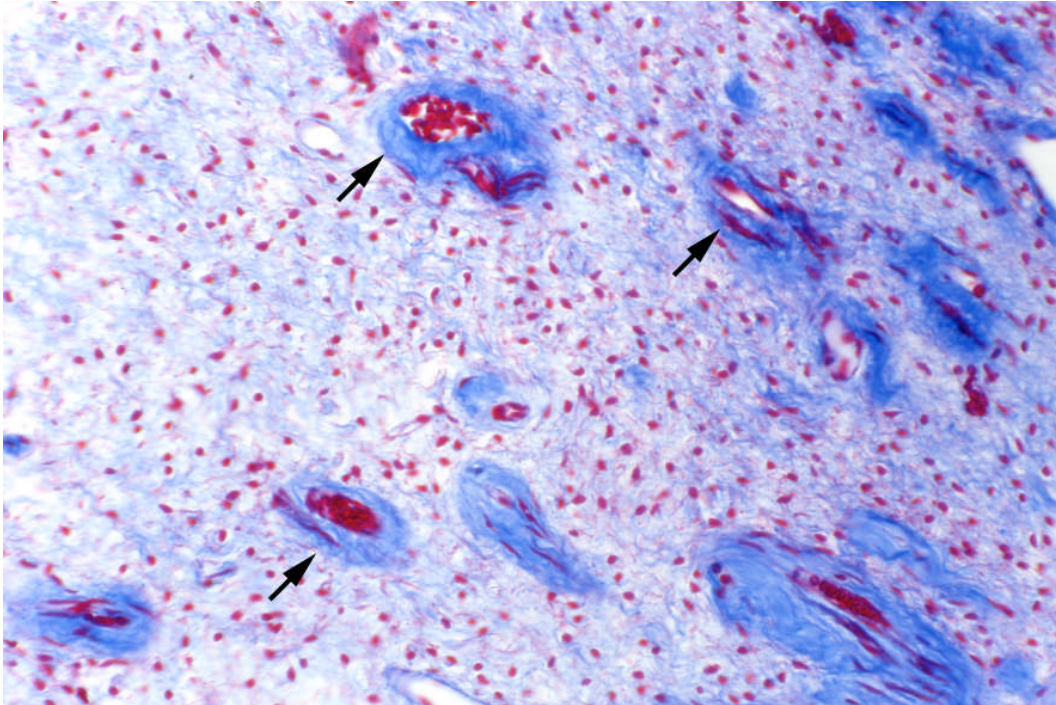


Abb. 39 Zahnpulpa Mensch, zentral gelegene Region der Pulpa mit kollagenreichen Manschetten um die Blutgefäße (Pfeile), Färbung Azan, Vergr. 250fach

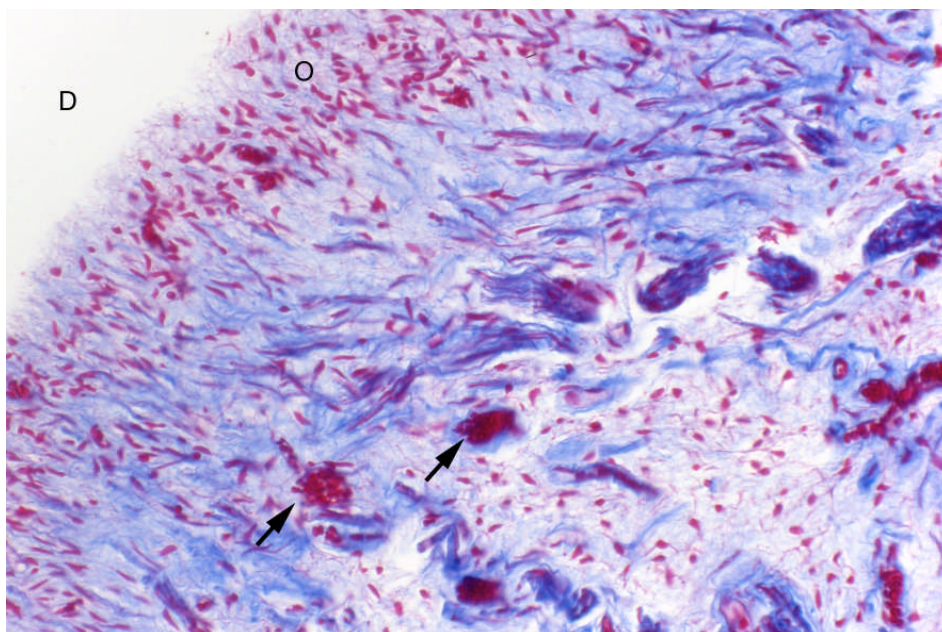


Abb. 40 Zahnpulpa Mensch, Randzone der Pulpa mit Odontoblasten (O) und kollagenfaserreicher Matrix. Pfeile: Gefäße, D: abgelöstes Dentin, Färbung Azan, Vergr. 250fach

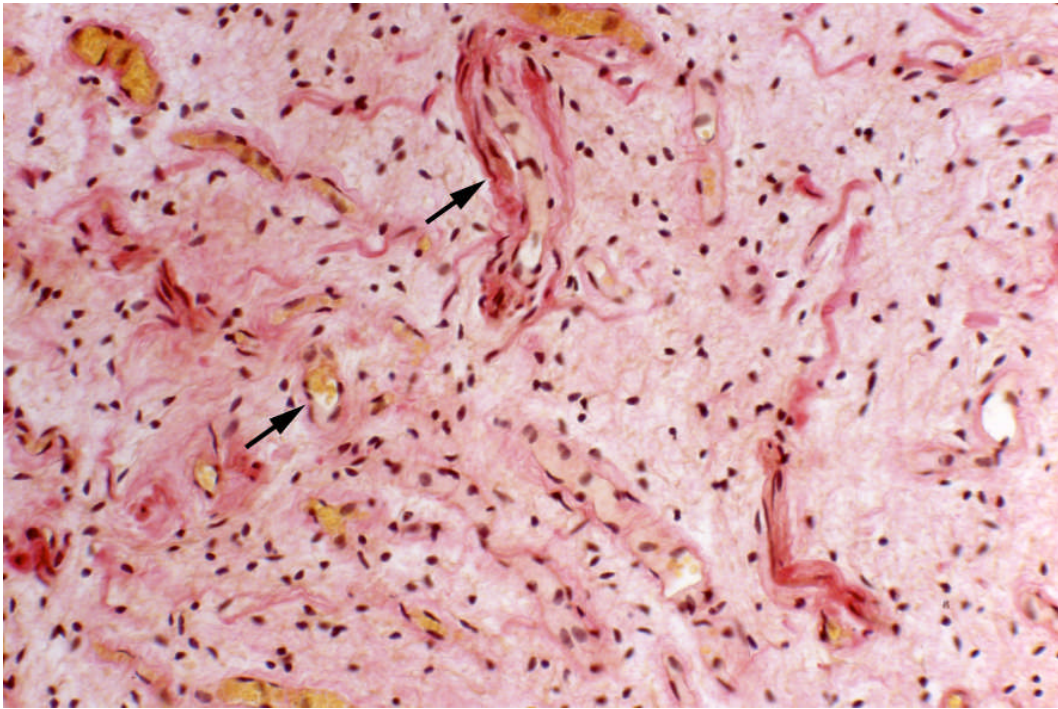


Abb. 41 Zahnpulpa Mensch, in der Umgebung der Gefäße (Pfeile) dominieren gröbere dicht gelagerte Kollagenfasern (rot) in der Matrix findet sich ein feines Gespinnst zarter Kollagenfasern (rosa-rot), Färbung Van Gieson, Vergr. 250fach

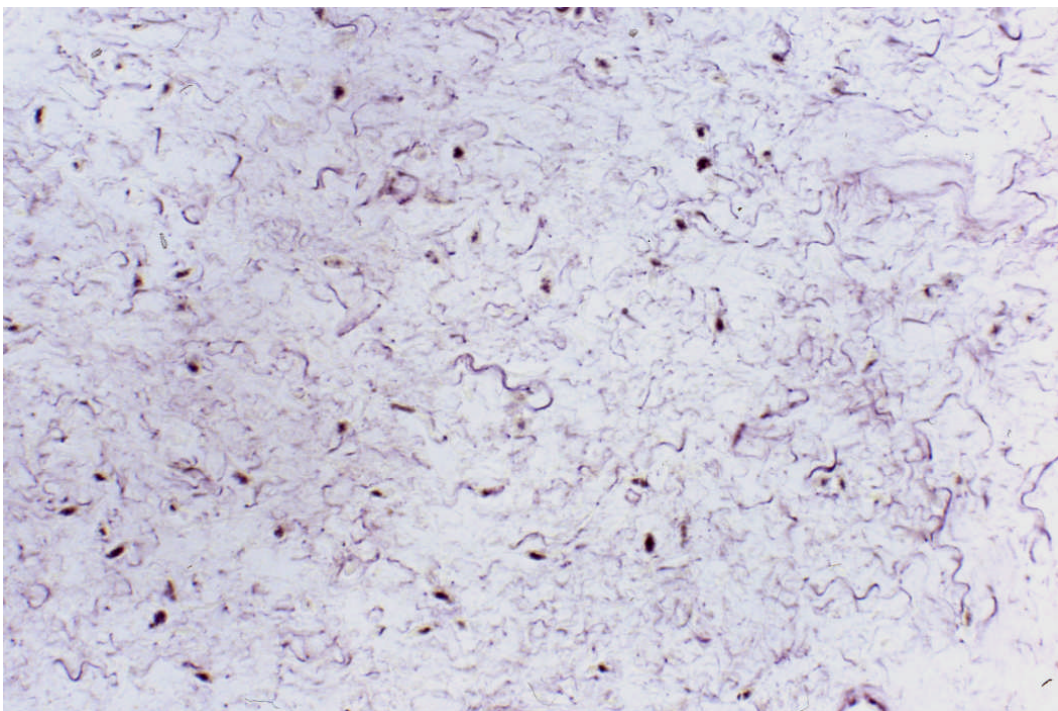


Abb. 42 Zahnpulpa Mensch, Versilberung nach Gomori, diese Färbung weist retikuläre Fasern nach, im Pulpagewebe kommen aus nicht bekannten Gründen nur auffallend wenige solcher Fasern zur Darstellung, Vergr. 450fach

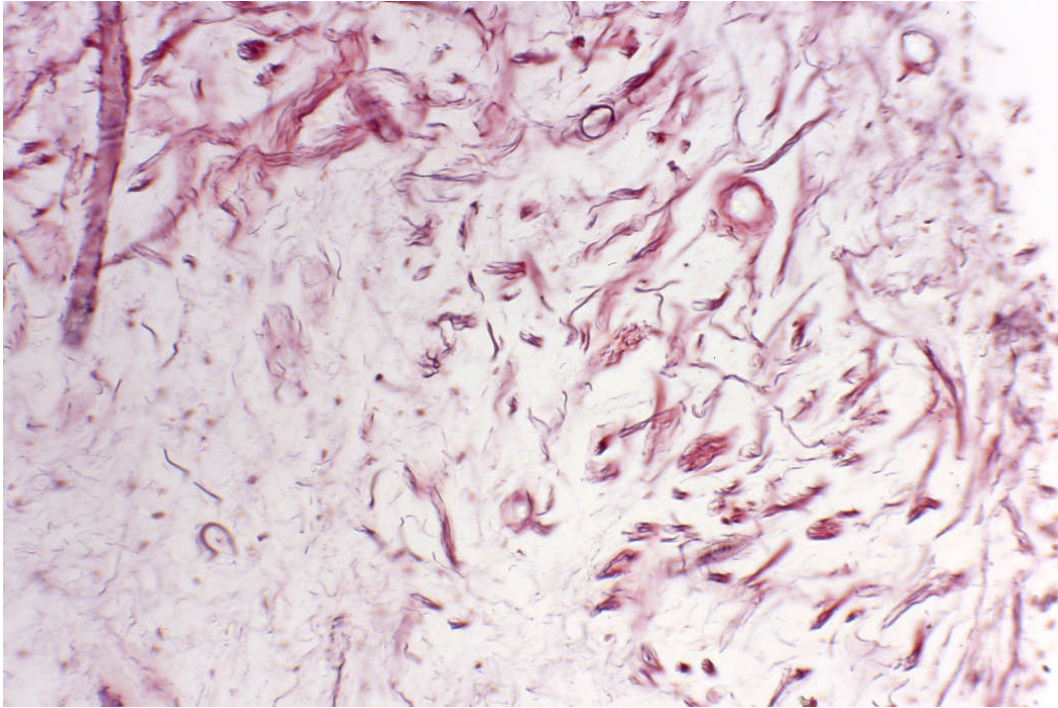


Abb. 43 Zahnpulpa Mensch, Versilberung nach Gomori, schwarz: feine retikuläre Fasern, braun: größere Kollagenfasern (Typ I Kollagen), Vergr. 250fach

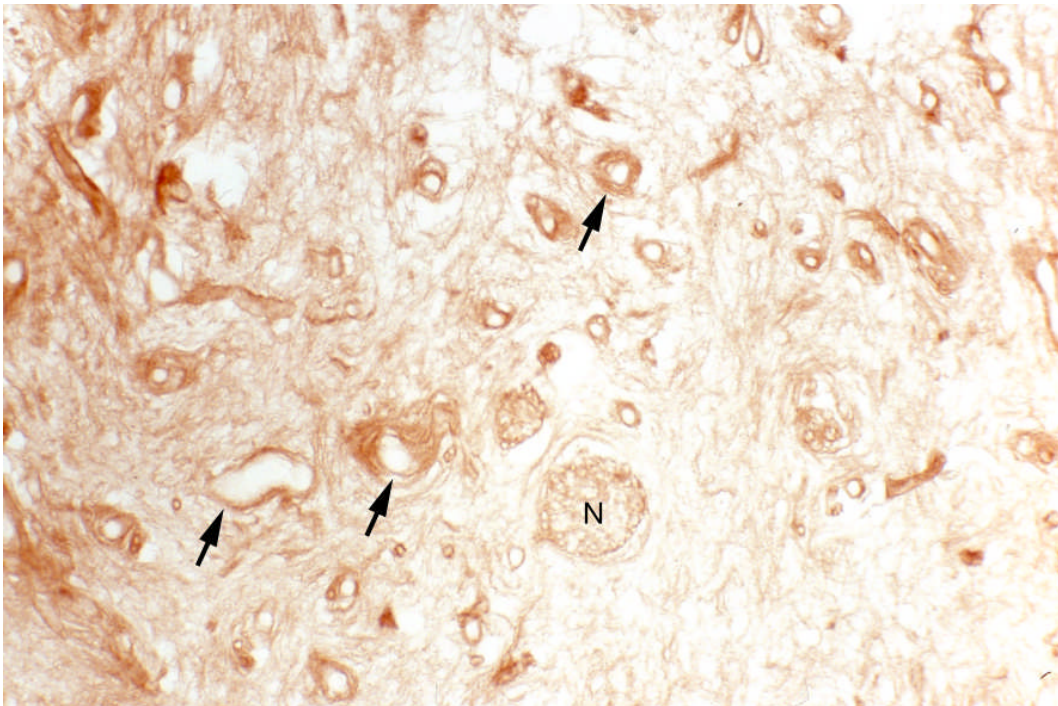


Abb. 44 Zahnpulpa Mensch, immunhistochemischer Nachweis von Kollagen Typ I, die Blutgefäße (Pfeile) und Nerven (N) sind hauptsächlich von Fasern aus Kollagen vom Typ I umgeben, in der übrigen Matrix zeigt der Kollagen Typ I Nachweis nur ein bloss-gefärbtes zartes feines Netz, Vergr. 250fach

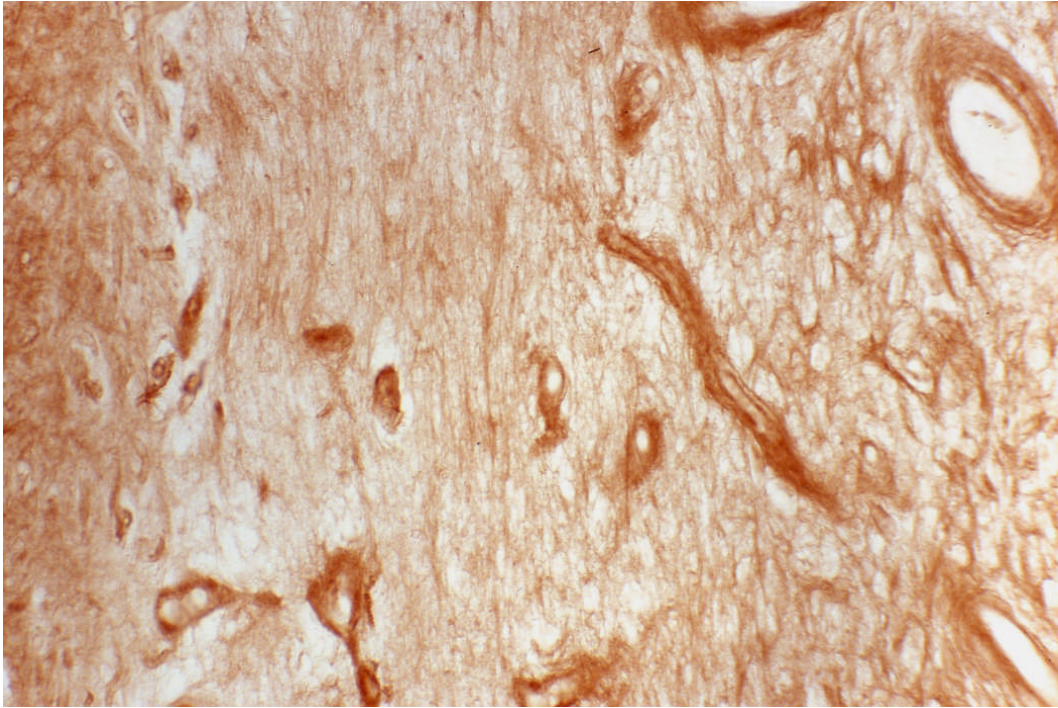


Abb. 45 Zahnpulpa Mensch, immunhistochemischer Nachweis von Kollagen Typ I, das Kollagen vom Typ I ist in der ganzen Pulpa verbreitet, ist aber am Pulparand (links im Bild) und perivaskulär konzentriert, Vergr. 250fach

Die retikulären Fasern bestehen überwiegend aus Kollagen Typ III und bilden sowohl im Azan- als auch im Kollagen-III-Präparat einen dichten feinfaserigen Filz, dessen dünne Fasern im Versilberungspräparat offensichtlich nicht angefärbt sind. Im Bindegewebe finden sich kleine Arterien, zahlreiche Arteriolen, Kapillaren, Venolen und kleine Venen. Außerdem sind regelmäßig Nerven und Lymphgefäße nachweisbar. Unter der peripheren Zellschicht der Pulpa sind Blutkapillaren besonders zahlreich. Die Nerven enthalten auch myelinisierte Fasern.

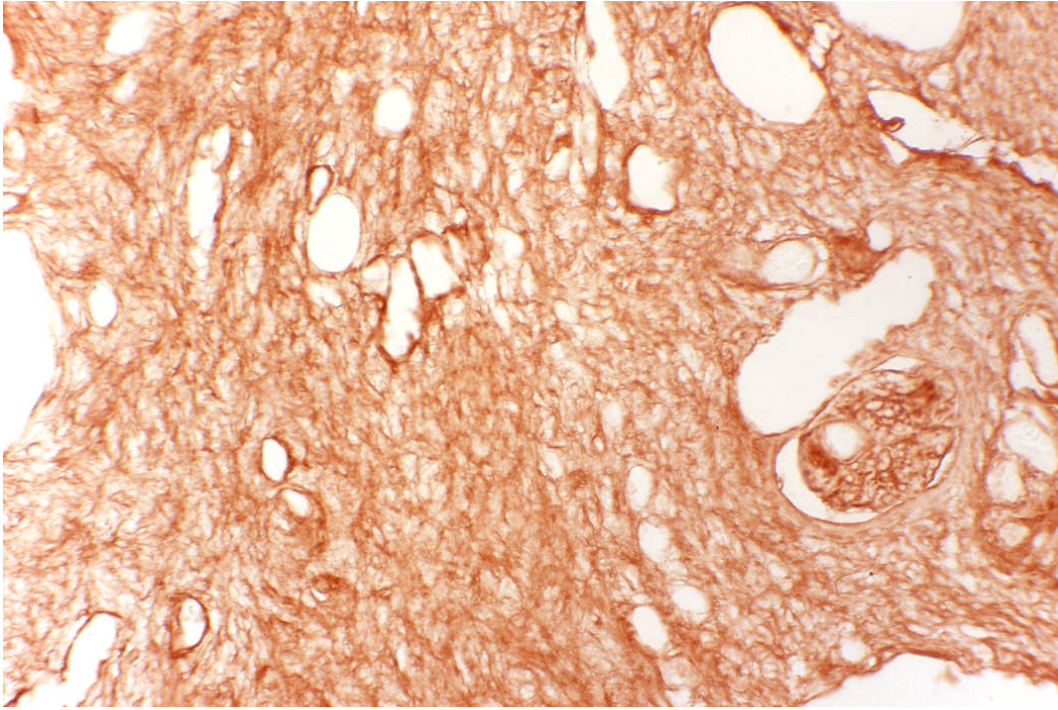


Abb. 46 Zahnpulpa Mensch, immunhistochemischer Nachweis von Kollagen Typ III, das Kollagen vom Typ III bildet ein dichtes Netzwerk in der Matrix der gesamten Pulpa, Vergr. 450fach

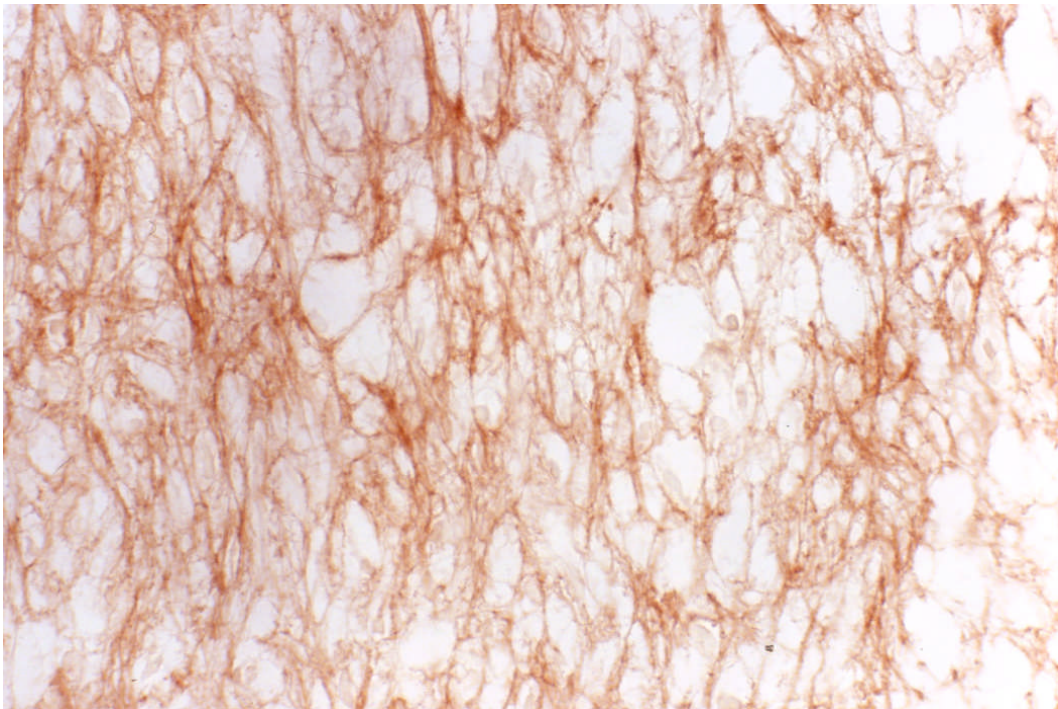


Abb. 47 Zahnpulpa Mensch, immunhistochemischer Nachweis von Kollagen Typ III, höhere Vergrößerung des Kollagen Typ III Netzwerks im Zentrum der Pulpa, Vergr. 450fach

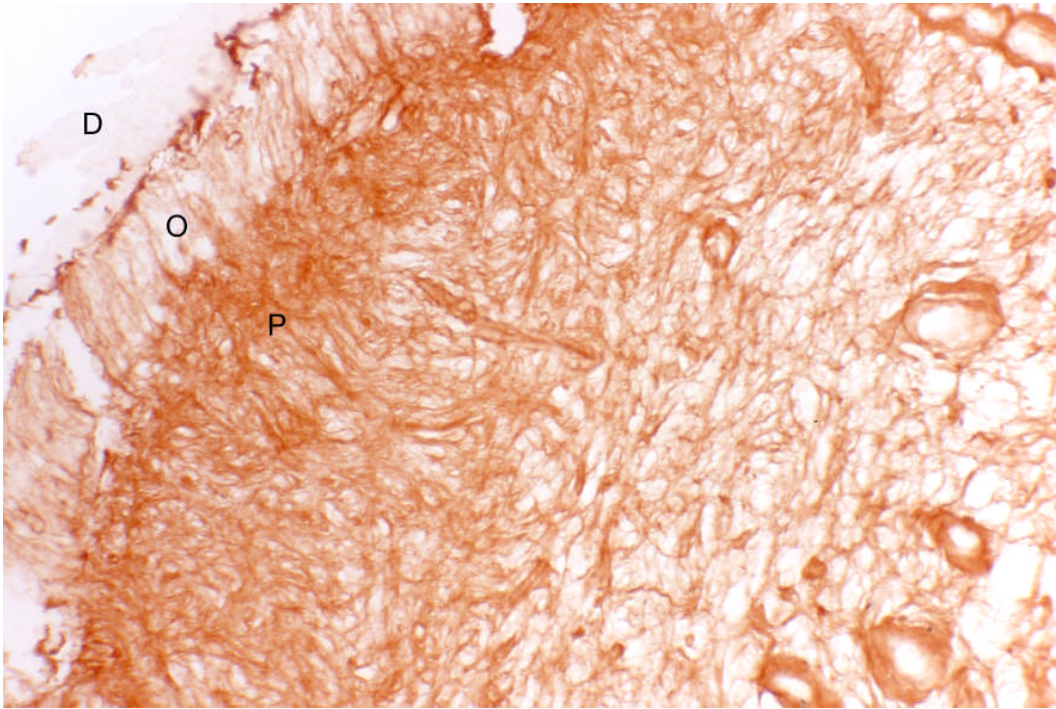


Abb. 48 Zahnpulpa Mensch, immunhistochemischer Nachweis von Kollagen Typ III, das Kollagen vom Typ III bildet ebenso wie das vom Typ I in der Peripherie (P) der Pulpa ein dichtes Netz, in der unmittelbaren Odontoblastenzone (O) kommt dieses Kollagen nur spärlich vor. D: abgelöstes Dentin, Vergr. 450fach

3.2.2 Ergebnisse der histochemischen allgemeinen Kohlenhydratnachweise

Alcianblau pH 2,5

Beim Menschen färbt sich die Matrix der Pulpa mit Alcianblau bei pH 2,5 kräftig an. Hohe Vergrößerungen zeigen wie in der Pulpa des Schweins auch hier einen feinen Faserfilz und homogene Areale in der amorphen Grundsubstanz. Generell ist die Peripherie stärker angefärbt als das Zentrum. Ziemlich kräftig ist oft eine Zone unterhalb der zellreichen Peripherie angefärbt. Dort wo im Schnitt Dentin erhalten geblieben ist, ist erkennbar, dass auch die Auskleidung der Dentinkanälchen positiv angefärbt ist. Die Blutgefäße sind alle von einem kräftig gefärbten Mantel Alcianblau-positiven Materials umgeben; selten sind intensiv gefärbte Mastzellen nachweisbar.

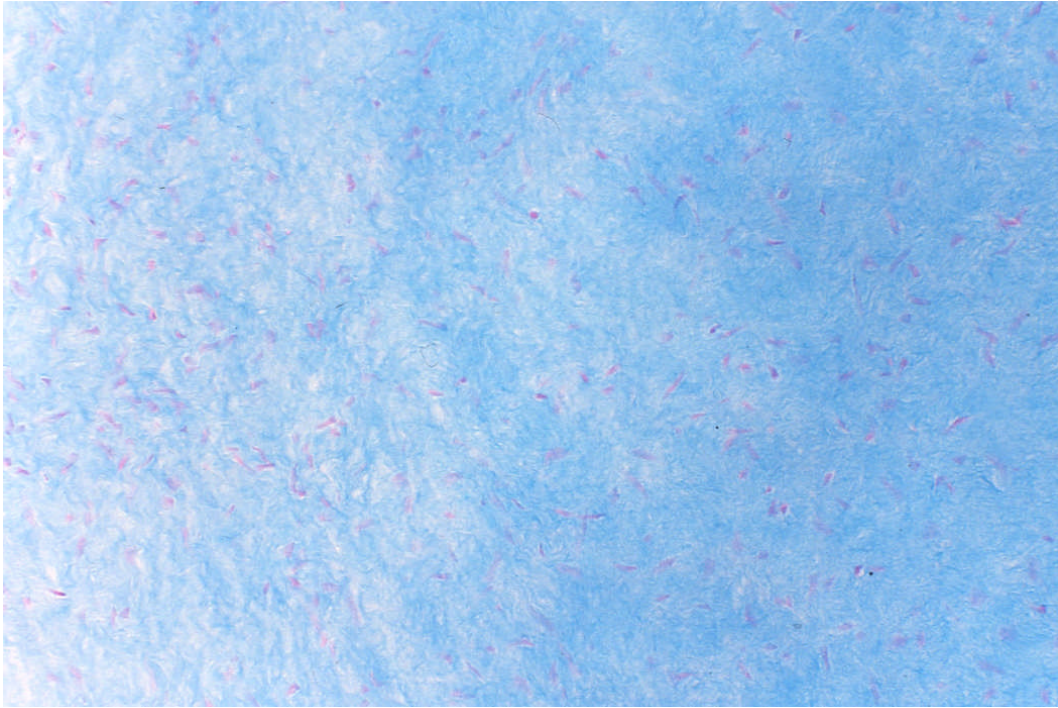


Abb. 49 Zahnpulpa Mensch, Färbung mit Alcianblau pH 2,5, Nachweis von Glykosaminoglykanen, die blau gefärbt sind und die einen wesentlichen Teil der Matrix ausmachen, Vergr. 250fach

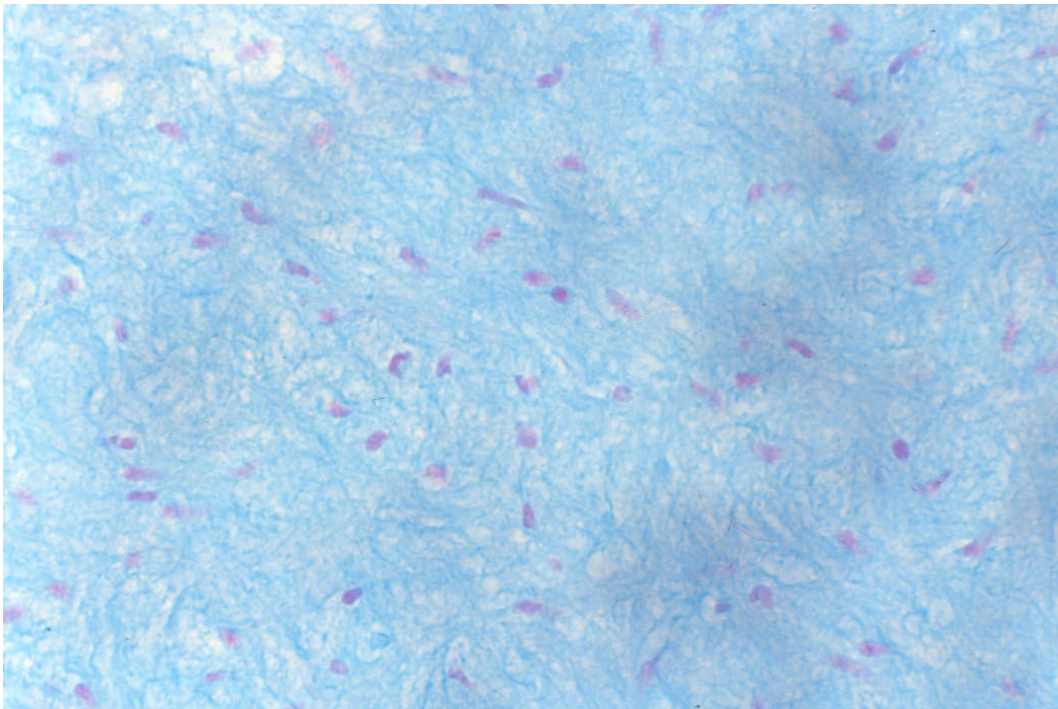


Abb. 50 Zahnpulpa Mensch, Färbung mit Alcianblau pH 2,5, bei höherer Vergrößerung zeigt sich, dass auch feinfädige Strukturen angefärbt sind, u.U. Proteoglykane an der Oberfläche von Kollagenfibrillen, Vergr. 450fach

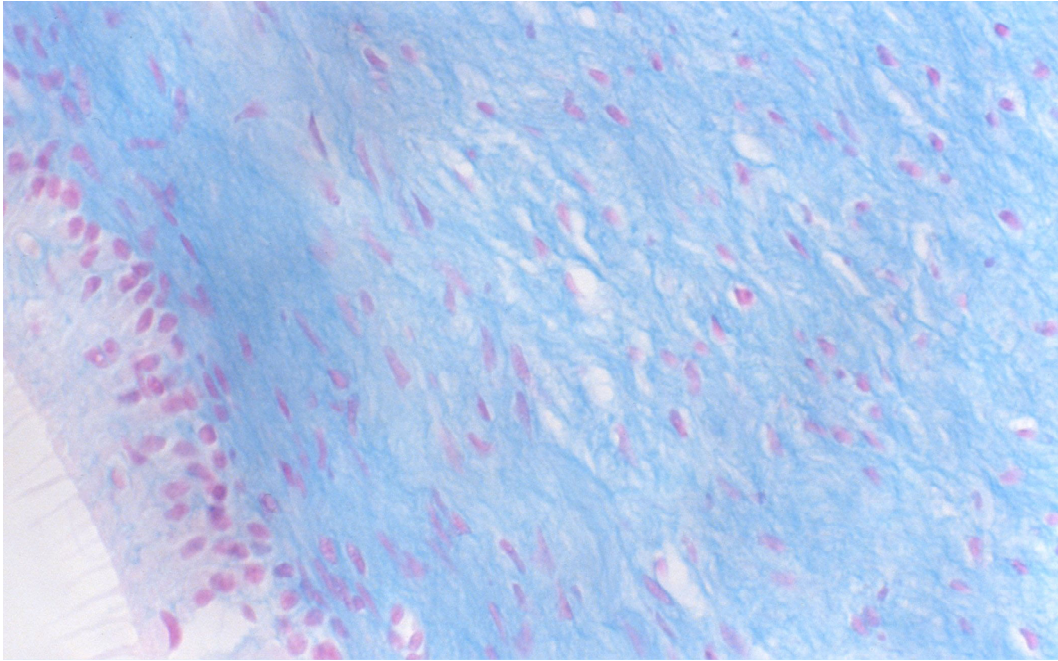


Abb. 51 Zahnpulpa Mensch, Färbung mit Alcianblau pH 2,5, Randregion der Pulpa mit Odontoblasten. Die Zone der Odontoblasten färbt sich relativ stark an. Vergr. 450fach

Alcianblau pH 1

Beim Menschen fällt die Färbung der Matrix mit Alcianblau bei pH 1 meistens ähnlich kräftig aus wie bei pH 2,5, obwohl die Farbintensität in manchen Präparaten erkennbar schwächer ist als bei pH 2,5 (s. Abb. 52).

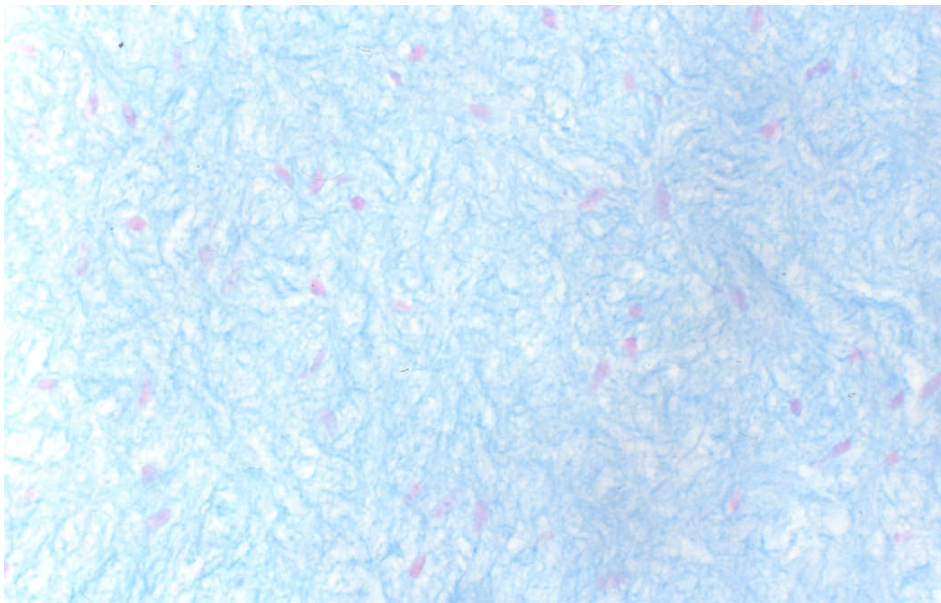


Abb. 52 Zahnpulpa Mensch, Färbung mit Alcianblau pH 1, die Farbreaktion ist im vorliegenden Präparat relativ schwach, Vergr. 450fach

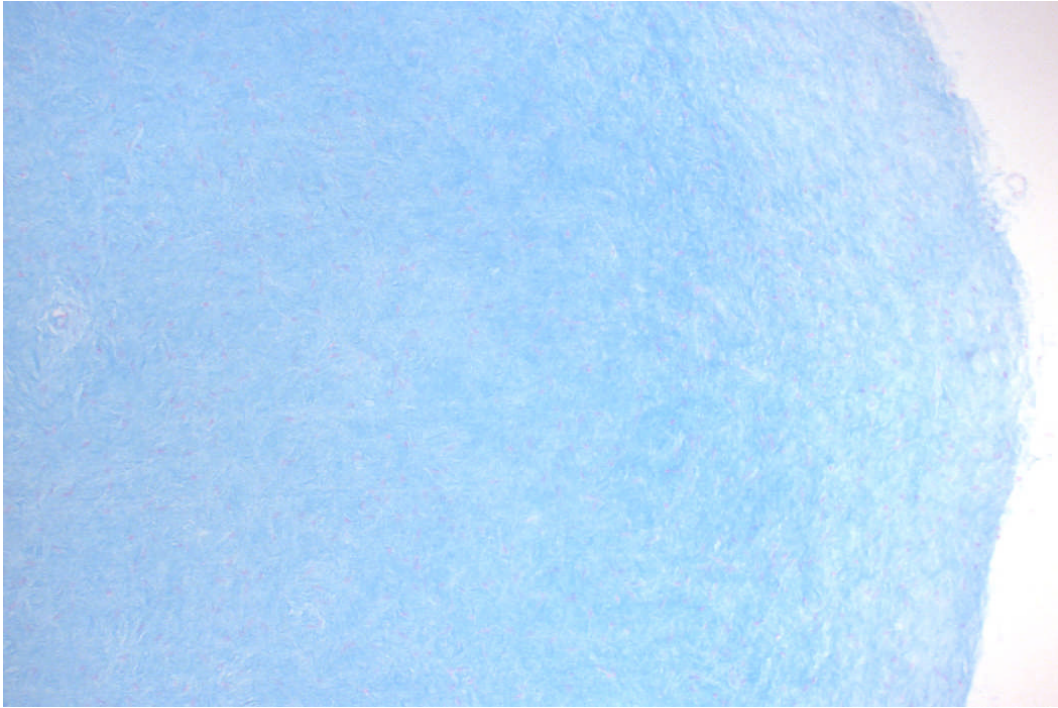


Abb. 53 Zahnpulpa Mensch, Färbung mit Alcianblau pH 1, im vorliegenden Fall fällt der Farbton relativ kräftig aus, Vergr. 120fach

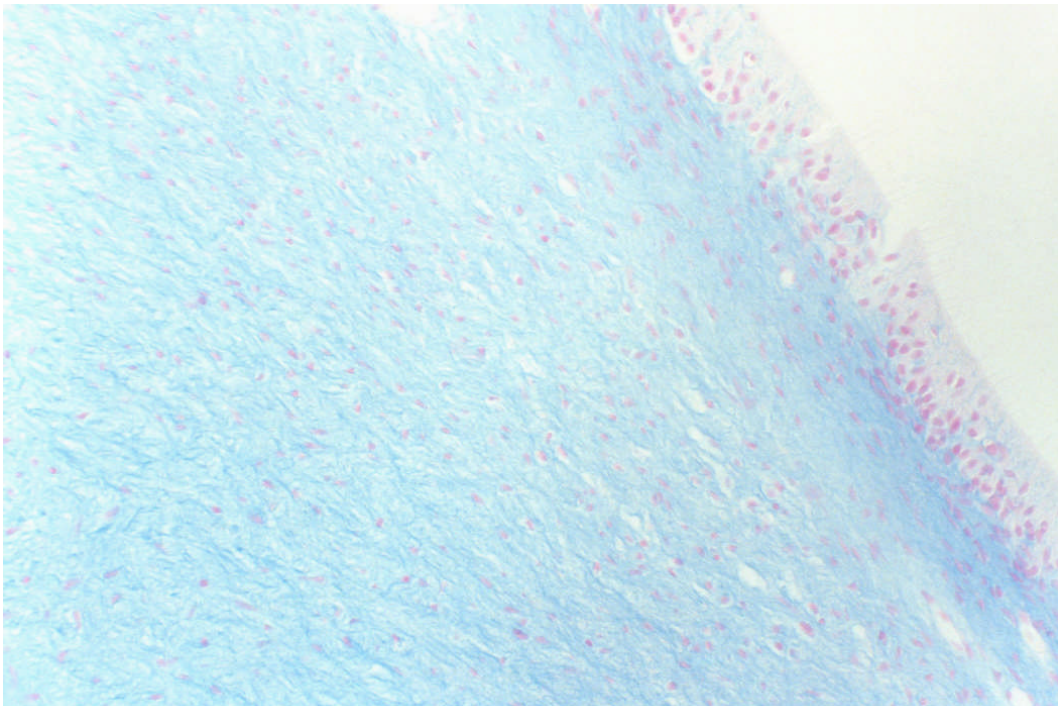


Abb. 54 Zahnpulpa Mensch, Färbung mit Alcianblau, pH 1, die Zone unter den Odontoblasten ist etwas stärker angefärbt als das Gewebe weiter im Innern der Pulpa, Vergr. 250fach

Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion)

PAS färbt in der Pulpa sehr schwach die amorphe Grundsubstanz, sowie etwas kräftiger feinfasrige Strukturen in der Matrix zwischen den Fibroblasten an. Zum Teil waren auch Zytoplasmaareale in den Fibroblasten fleckförmig angefärbt.

3.2.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Nachweise von Matrixkomponenten

Decorin (= Decoran)

Decoran färbt ein dichtes feines Fasernetz in der gesamten Pulpa. Die Adventitia der Arterien und Arteriolen ist besonders kräftig angefärbt. Im Bereich der peripheren zellichten Zone ist das Decoran nur schwach nachweisbar.

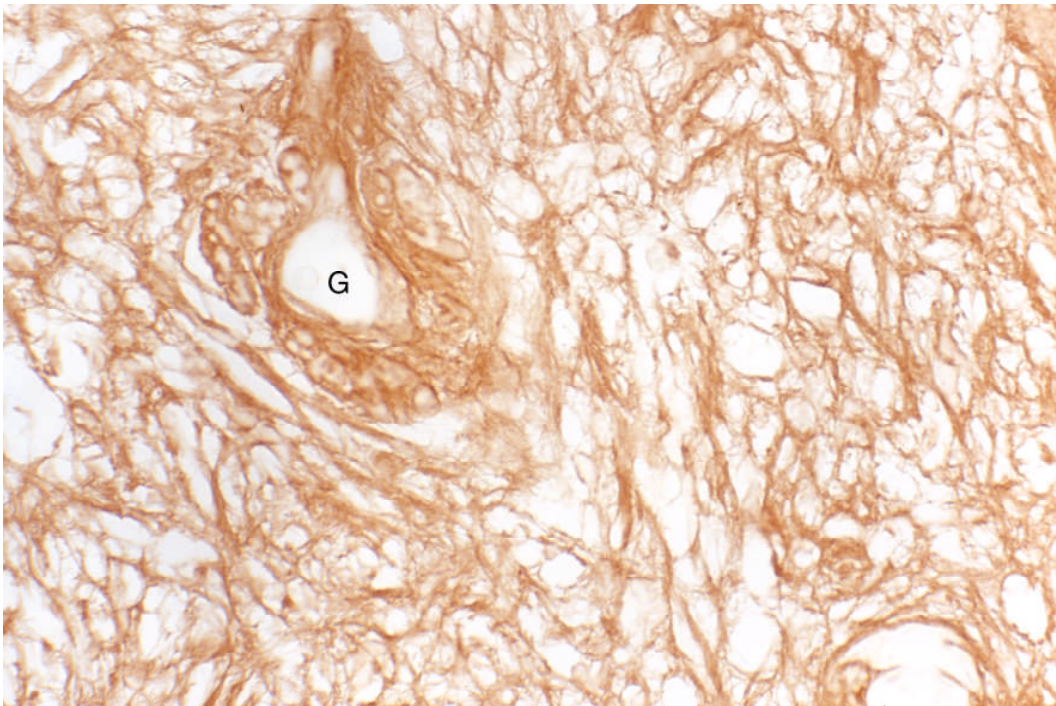


Abb. 55 Zahnpulpa Mensch, Zentrum der Pulpa, immunhistochemischer Nachweis des Decorans eines Proteoglykans, das mit der Oberfläche der Kollagenfibrillen (sowohl mit Typ I- als auch mit Typ III-Kollagen) assoziiert ist. G: Gefäß, Vergr. 450fach

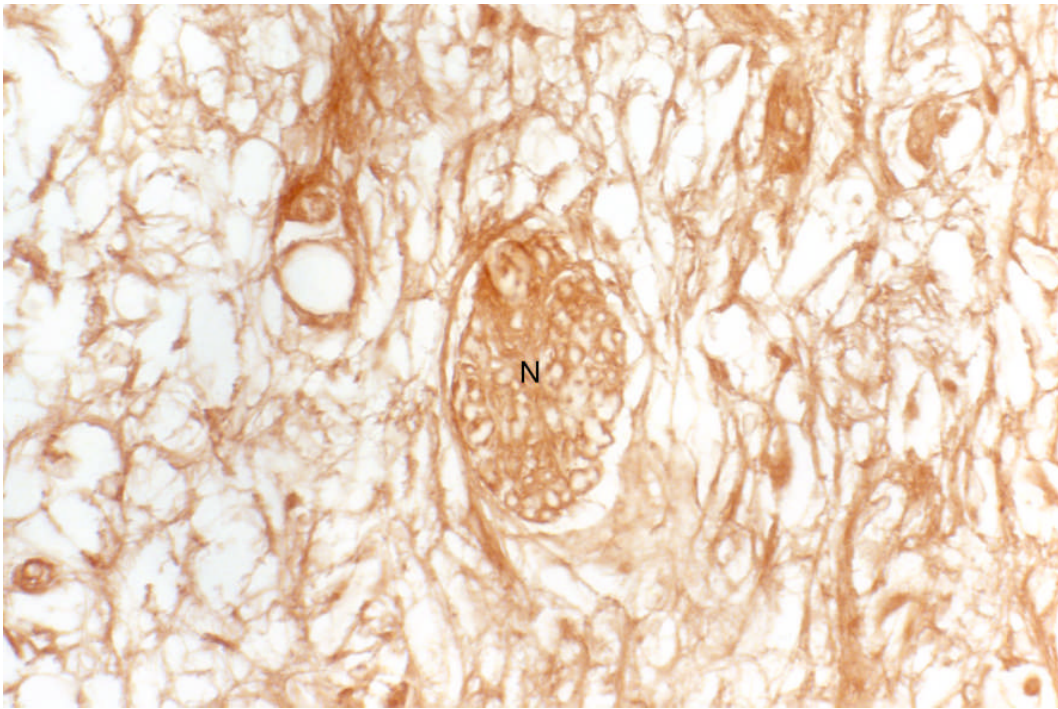


Abb. 56 Zahnpulpa Mensch, immunhistologischer Nachweis des Decorans an Kollagenstrukturen eines Nerven (N) und an Kollagen der zentralen Pulpa, Vergr. 450fach

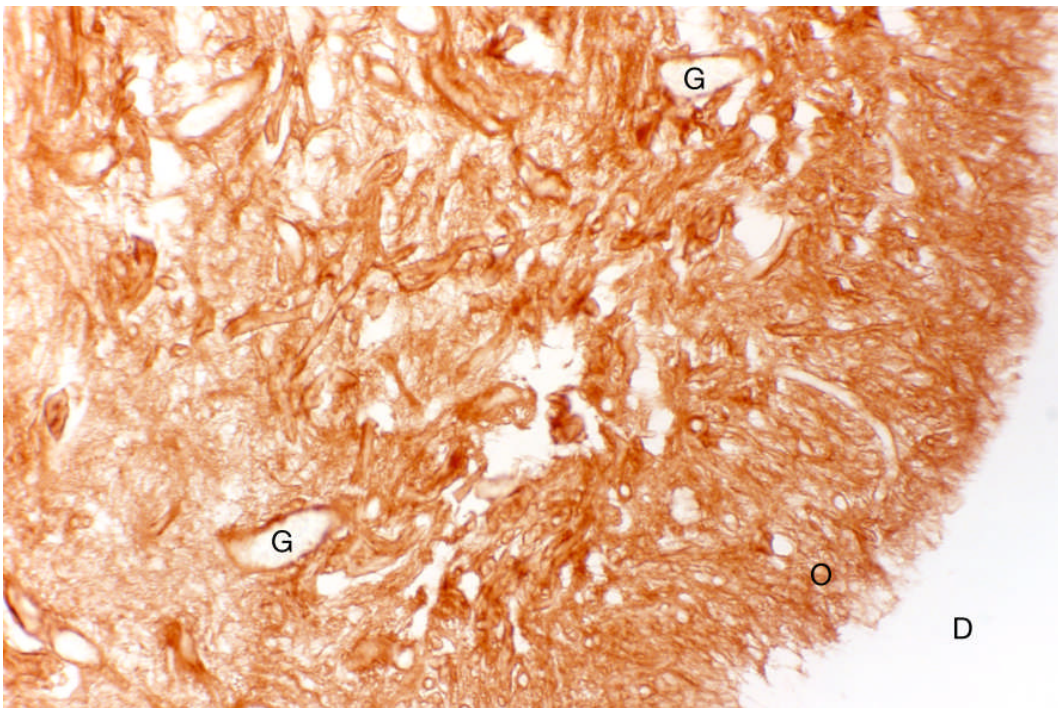


Abb. 57 Zahnpulpa Mensch, immunhistochemischer Nachweis des Decorans in der Randzone der Pulpa, wo die Färbereaktion kräftig ausfällt, auch im Bereich der Odontoblasten (O), kräftig reagieren auch die Wände von Blutgefäßen (G). D:Region des Dentins, Vergr. 250fach

Dermatansulfat

Der Nachweis des Dermatansulfats fällt schwach aus, meistens ist dieses Glykosaminoglykan an feinen Faserstrukturen lokalisiert.

Chondroitin-6-sulfat

Dieses Glykosaminoglykan kommt in der ganzen Zahnpulpa verbreitet vor und kann sowohl homogen, als auch feinfaserig verteilt sein.

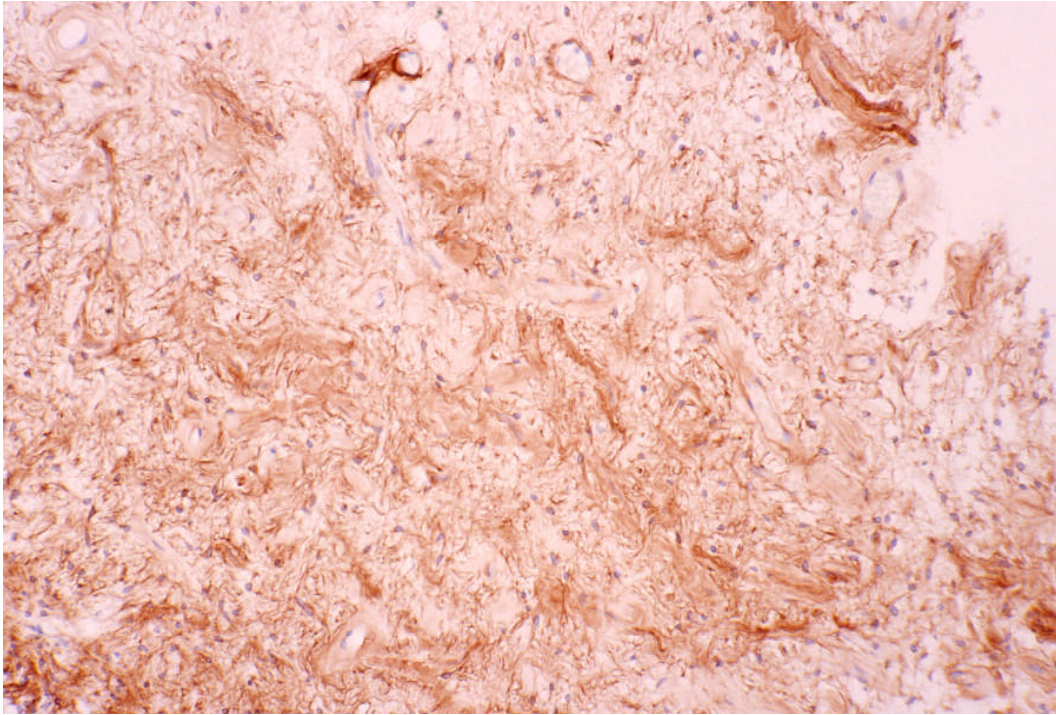


Abb. 58 Zahnpulpa Mensch, immunhistochemischer Nachweis des Chondroitin-6-sulfats, die Morphologie der Farbreaktion fällt oft feinfädig aus, Vergr. 250fach

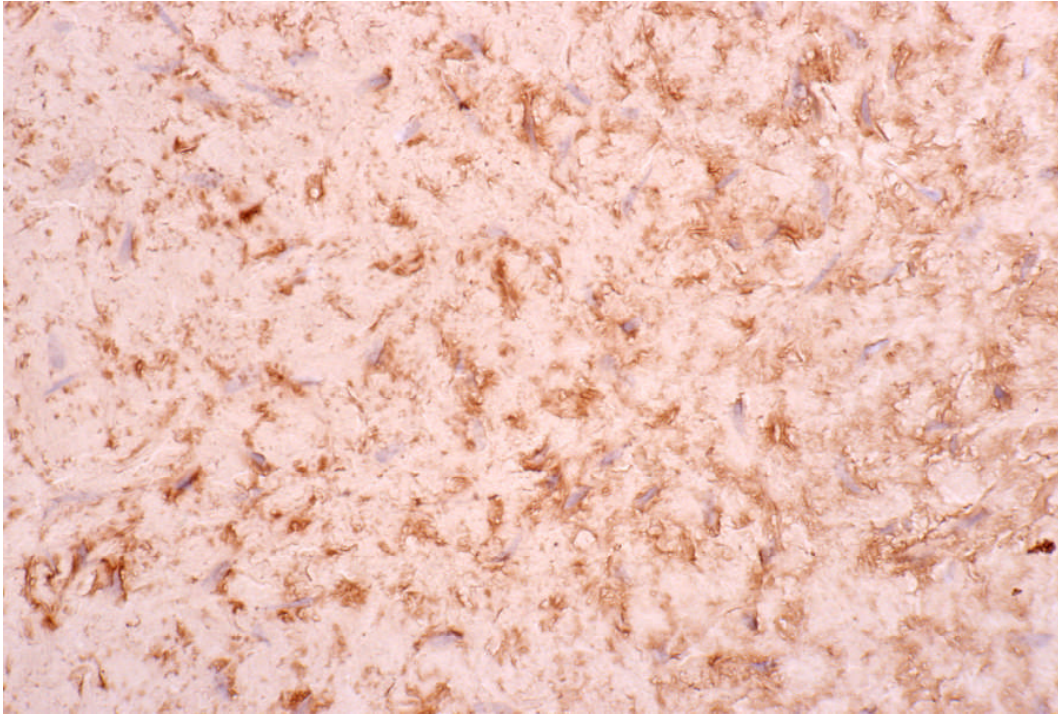


Abb. 59 Zahnpulpa Mensch, immunhistochemischer Nachweis des Chondroitin-6-sulfats im Zentrum der Pulpa; relativ intensiv färbt sich die Umgebung kleiner Blutgefäße an, Vergr. 450fach

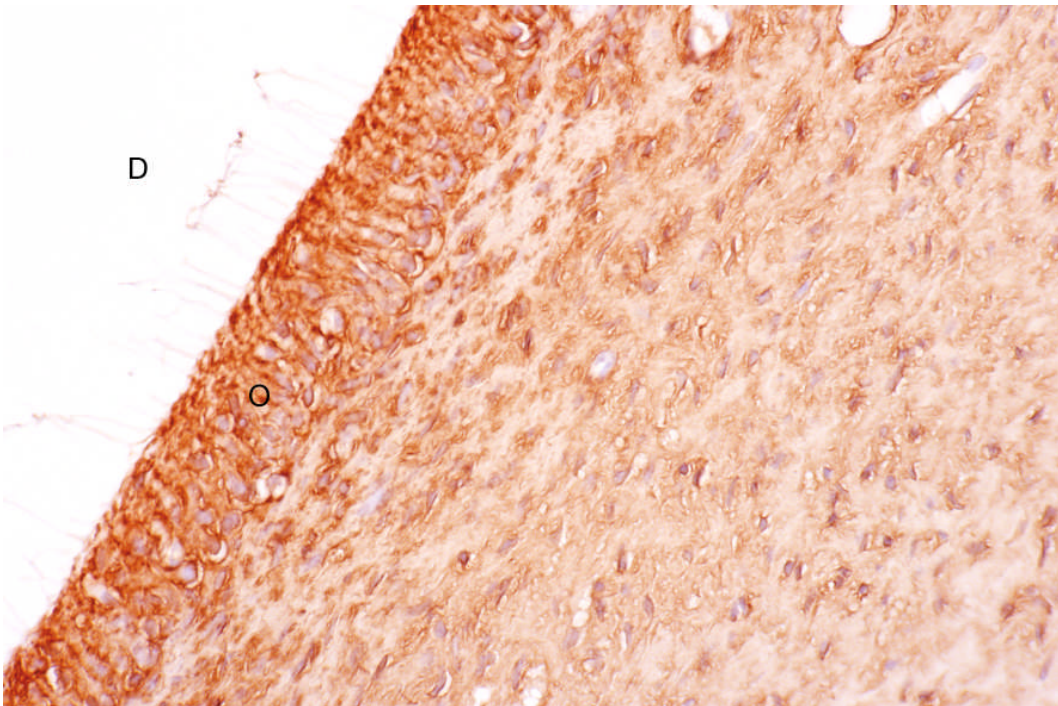


Abb. 60 Zahnpulpa Mensch, immunhistochemischer Nachweis des Chondroitin-6-sulfats, die Reaktion fällt in der Odontoblastenschicht (O) besonders intensiv aus, die Tomessen Fasern reagieren positiv. D: Region des abgelösten Dentins, Vergr. 250fach

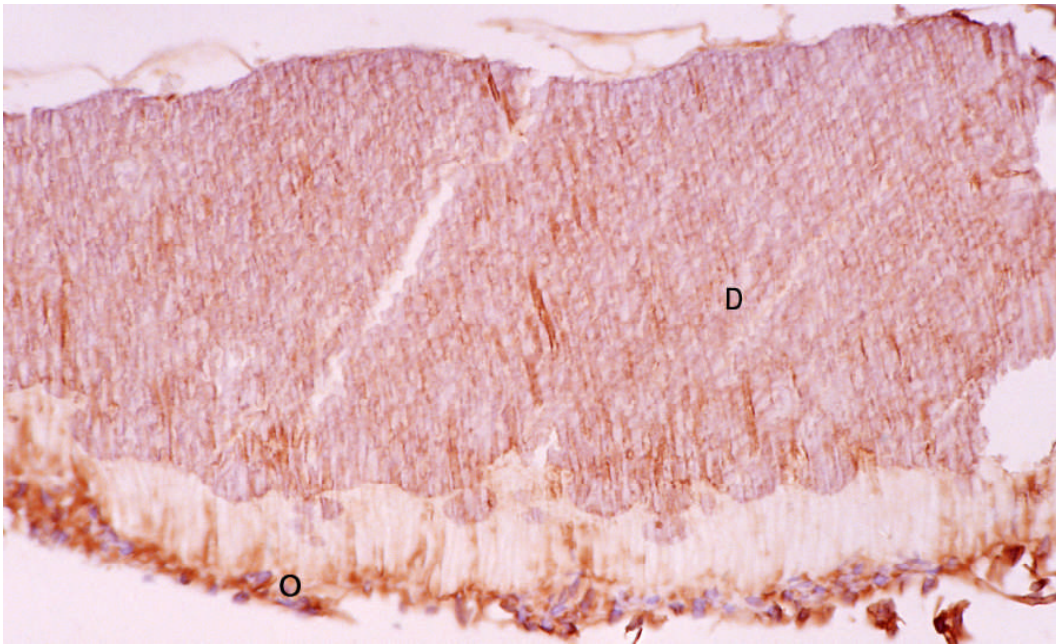


Abb. 61 Zahnpulpa Mensch, immunhistochemischer Nachweis des Chondroitin-6-sulfats in einem Dentinbruchstück (D). Die positive Reaktion findet sich am Rande der Dentinkanälchen, O: Odontoblasten, Vergr. 450fach

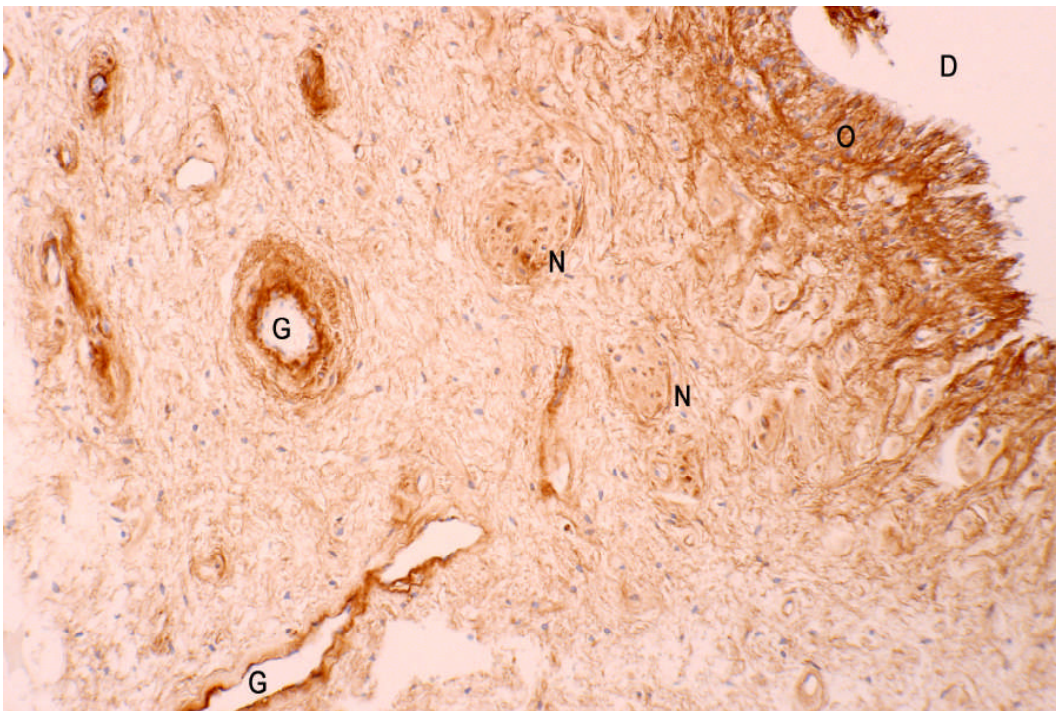


Abb. 62 Zahnpulpa Mensch, immunhistochemischer Nachweis des Chondroitin-6-sulfats in der Peripherie der Pulpa. Im Bereich der Odontoblasten (O) und der Zone unmittelbar unter diesen Zellen ist die Farbreaktion besonders kräftig. G: Gefäß, N: Nerv, D: Region des abgelösten Dentins, Vergr. 250fach

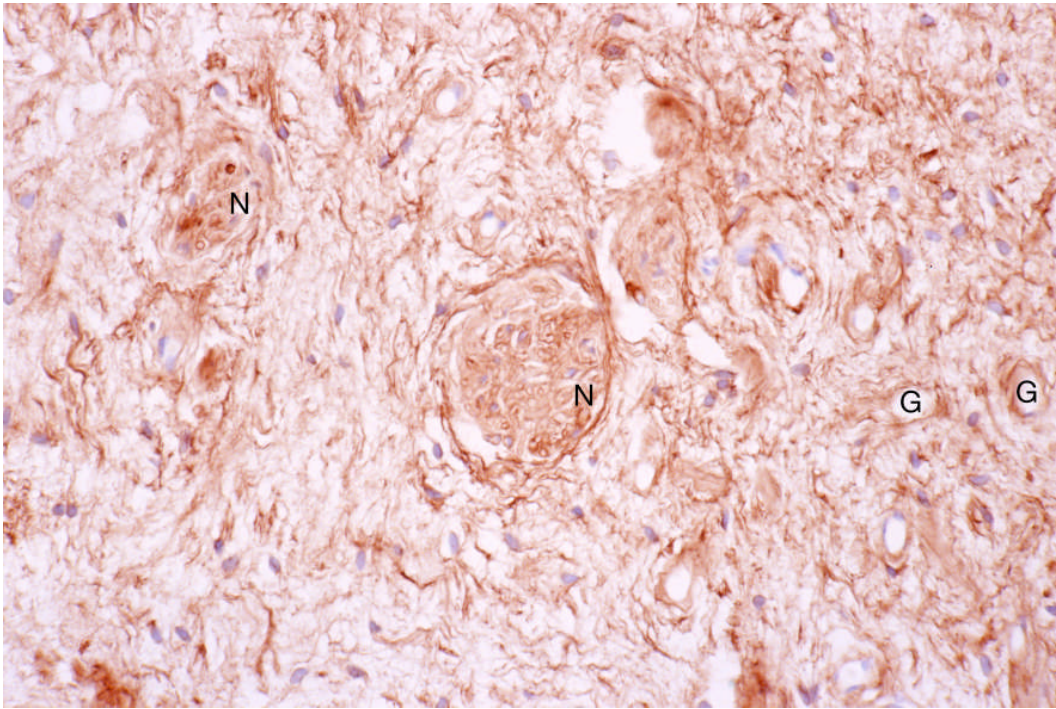


Abb. 63 Zahnpulpa Mensch, immunhistochemischer Nachweis des Chondroitin-6-sulfats im Bereich zweier Nerven (N). Die Wandbereiche kleiner Gefäße (G) reagieren relativ stark, Vergr. 450fach

Fibronectin

Fibronectin lässt sich in der gesamten Pulpa nachweisen. Es kommt in der zellreichen Peripherie deutlich häufiger vor als im Zentrum.

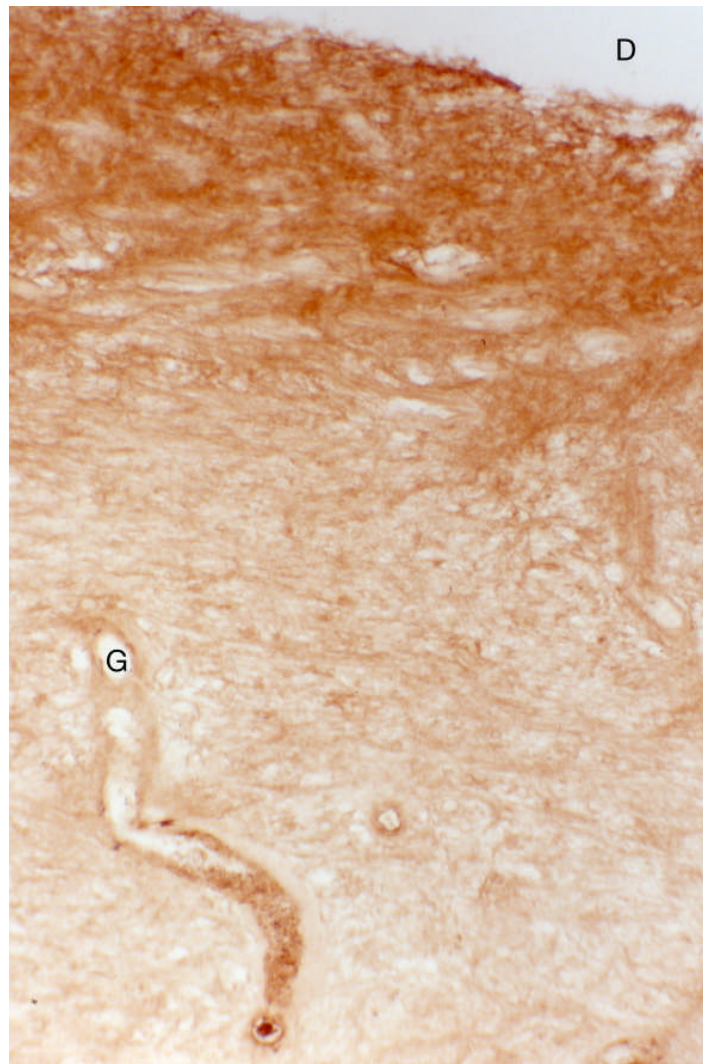


Abb. 64 Zahnpulpa Mensch, immunhistochemischer Nachweis des Fibronectins im Randbereich der Pulpa. D: Region des abgelösten Dentins, G: Gefäß. Die Peripherie der Pulpa reagiert kräftiger als das Zentrum, Vergr. 250fach

S-100

S-100 markiert sehr klar die Schwann-Zellen der Nerven in der Pulpa, deren Präsenz mithilfe dieses Nachweises zu erfassen ist. Außer größeren Nervenstämmen mit myelinisierten Fasern ließen sich auch einzelne feine Fasern erkennen, Einzelfasern, wie sie im Bereich der Odontoblasten zu erwarten wären, waren jedoch nicht erkennbar. Zusätzlich zu den Nerven reagierten mit dem S-100 einzelne große granulierte Zellen in der Pulpa, deren Natur nicht eindeutig geklärt werden konnte. In Parallelschnitten, die mit Alcianblau angefärbt waren, fanden sich keine Mastzellen, die u. U. für die S-100-Reaktion verantwortlich sein könnten. Möglicherweise handelt es sich um eine Kreuzreaktion mit Makrophagen.

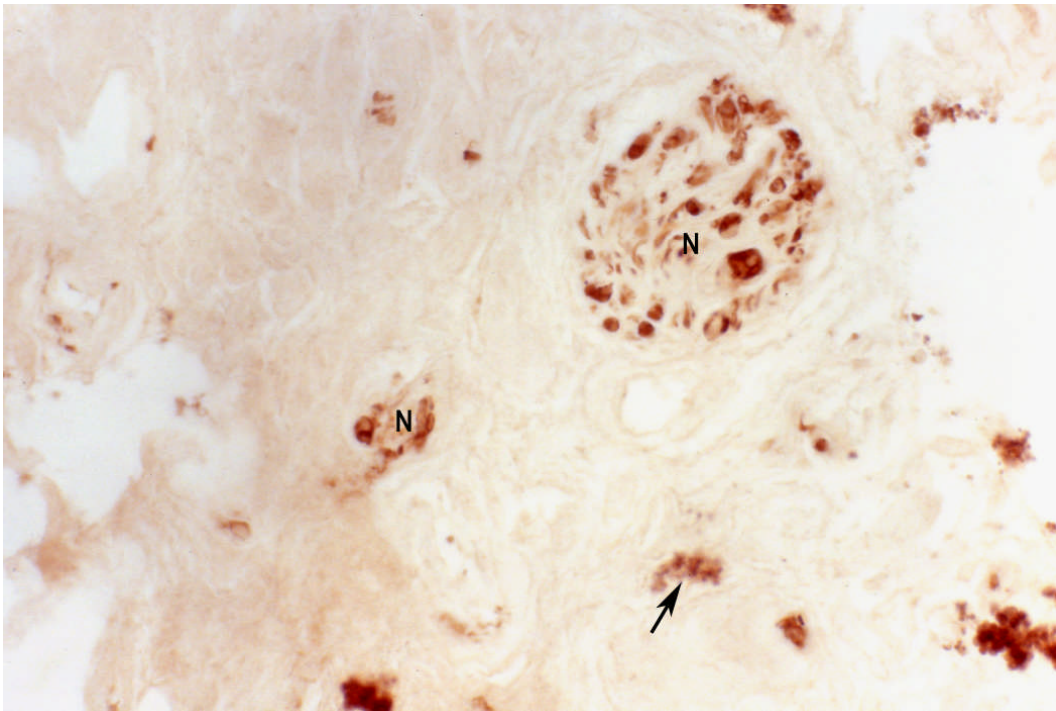


Abb. 65 Zahnpulpa Mensch, immunhistochemischer Nachweis des S-100 Proteins. Es reagieren die Schwann-Zellen der Nerven (N) sowie einzelne relativ große granulierten Zellen (Pfeil), Vergr. 450fach

Neurofilament-Protein (NFPC)

Mit dem NFPC-Antikörper lassen sich gut alle Nerven erfassen, einschließlich feiner Einzelfasern, die aber auch mit dieser Methode nicht im Bereich der Odontoblasten nachzuweisen waren.

Kollagen I

Der Nachweis von Kollagen I hebt kräftige und feine Fasern in der Umgebung von Blutgefäßen und in der Pulpaperipherie hervor, färbt aber auch zahlreiche feine Fasern in der gesamten Pulpamatrix an.

Kollagen III

Der Ausfall der immunhistochemischen Färbung des Kollagens vom Typ III fällt ähnlich wie die des Kollagens vom Typ I aus, ist aber generell kräftiger. Kollagen III-positive feine Fasern kommen in der gesamten Pulpa in reichem Maße vor.

3.3 Elektronenmikroskopische Befunde

In dieser Arbeit wird elektronenmikroskopisch nur Pulpagewebe vom Schwein untersucht. Entsprechende Befunde vom Menschen finden sich bei Weindl (2005).

Glykosaminoglykane wurden mit cupromeronischem Blau (CMB) und Scotts kritischer Elektrolytkonzentrationsmethode gefärbt (Scott und Haigh, 1988). Bei dieser Methode werden sulfatierte Glykosaminoglykane als Komponenten der Proteoglykane selektiv gefärbt. Der Betrachter kann sie dann als elektronendichte nadelförmige Präzipitate im Elektronenmikroskop und auf den Abbildungen erkennen.

3.3.1 Interaktionen von Kollagenfibrillen und Proteoglykanen in der Zahnpulpa des Schweins

Vorbemerkungen

Das Kollagenmolekül besteht aus drei helikalen Polypeptidketten, die umeinander gewunden sind und eine Art dreisträngige „Superhelix“ bilden (Alberts et al., 2009). Diese Kollagenmoleküle sind Monomere, die im Extrazellularraum polymerisieren und auf komplexe Weise die Kollagenfibrille bilden. Diese Fibrille ist nur im Elektronenmikroskop eindeutig zu erkennen. Sie lagert sich aber fast immer mit anderen Fibrillen zu Bündeln zusammen, die Kollagenfasern genannt werden und im Lichtmikroskop gut erkennbar sind. Die Zahl der Fibrillen, die eine Faser aufbauen, variiert stark und ist mit der Funktion der Fasern korreliert. In stark zugbeanspruchten Fasern sind diese besonders dick und enthalten hunderte von Fibrillen.

In einer Faser liegen die Fibrillen in konstantem Abstand parallel zueinander, was vor allem dem Fibrillen-assoziierten Proteoglykan Decoran zu verdanken ist, das die Fibrillen nicht nur sowohl verbindet, als auch auf Abstand hält, sondern auch ein Verschmelzen der Fibrillen verhindert (Erlinger et al., 1993).

Die Kollagenfibrillen sind meistens überwiegend aus Kollagen Typ I oder Kollagen Typ III aufgebaut. Typ I-Fibrillen sind etwas dicker (50-90 nm) als Typ III-Fibrillen (20-40 nm).

Die Kollagenmoleküle sind in der Fibrille so angeordnet, dass die Fibrille eine Querstreifung erfährt (Linnemann und Kühl, 1999; Alberts et al., 2009).

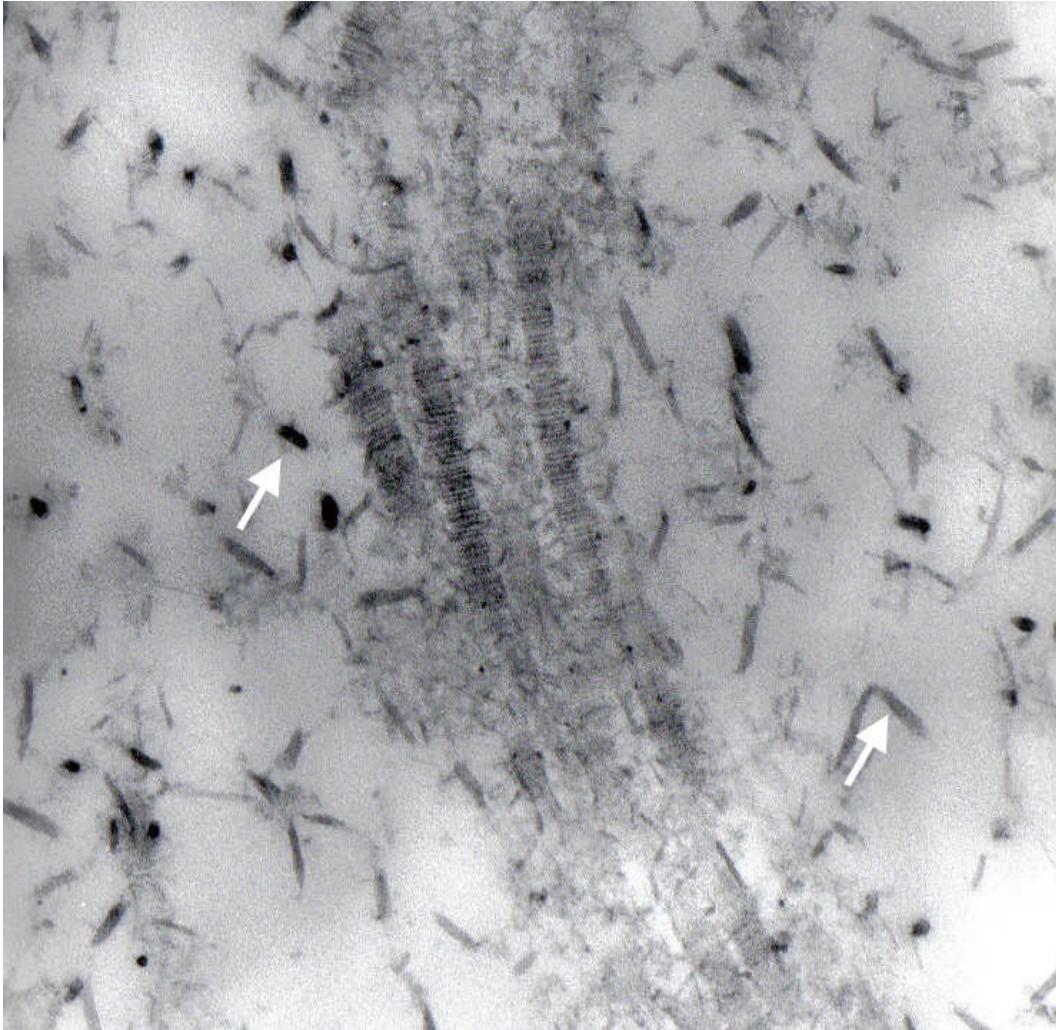


Abb. 66 Pulpa Schwein, Unterkiefer-Frontzahn, drei Kollagenfibrillen, longitudinal geschnitten. Pfeile: nicht kollagen-assoziierte Proteoglykane, 0,06 M CMB, Vergr. 89904fach

Die Querstreifung ist durch eine spezifische Abfolge dunkler und heller Banden gekennzeichnet. Das Muster dieser Banden wiederholt sich theoretisch alle 67 nm („D-Periode“).

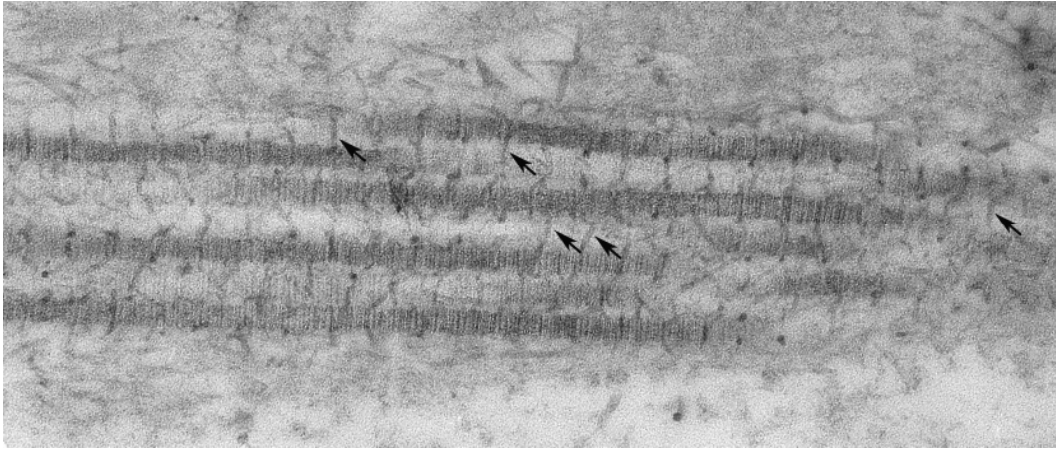


Abb. 67 Pulpamatrix, Schwein, Kollagenfibrillen longitudinal geschnitten mit assoziierten Proteoglykanen (Decoran, Pfeile), 0,06 M CMB, Vergr. 89900fach

Die Bandenabfolge lautet: d, c, b, a, e, d (Scott und Haigh, 1988), was im Prinzip auch auf den Kollagenfibrillen der Zahnpulpa erkennbar ist. Das genaue Querstreifenmuster wurde aber in dieser Arbeit nicht analysiert. Es zeigte sich aber, dass die tatsächlichen Messwerte der D-Periode im glutaraldehydfixierten und kunstharzeingebetteten Material von den theoretischen 67 nm oft abweichen (siehe Tabelle 5).

Unterschiede vom theoretischen Wert lassen sich wahrscheinlich auf Fixierungs- und Einbettungstechniken, auf die verschiedenen Gewebsarten und auch auf das Alter des Gewebes zurückführen (Erlinger, Welsch, Scott, 1993; Trotter & Koob, 1989; Hidaka & Takahashi, 1983; Kühn, 1987; Baccetti, 1967; Wilkie, 1988; Holland & Grimmer, 1981; Meyer, 1971).

Befunde am Kollagen und an den CMB-Präzipitaten der Zahnpulpa

Die Breite der D-Periode beläuft sich im vorliegenden fixierten Material im Durchschnitt auf ca. 54,8 nm.

Die nachfolgende Tabelle (es wird nur ein Auszug der Messwerte dargestellt) soll die Messungen belegen und den an 35 Zähnen (Milchzähne und bleibende Zähne) gemessenen Durchschnittswert der D-Periode 54,8 nm dokumentieren.

Tabelle 5: D-Periode gemessen an Longitudinalschnitten

Zahn	Bandenbreite in nm
Bleibender Zahn Unterkiefer, 1. Prämolare	49,0 nm
Bleibender Zahn Unterkiefer, 1. Prämolare	50,0 nm
Bleibender Zahn Unterkiefer, 2. Prämolare	46,0 nm
Bleibender Zahn Oberkiefer, 2. Molare	59,0 nm
Milchzahn Oberkiefer, 1. Molare	41,4 nm
Milchzahn Oberkiefer, 1. Molare	59,5 nm
Milchzahn Oberkiefer, 2. Molare	54,0 nm
Milchzahn Oberkiefer, 2. Molare	51,3 nm
Bleibender Zahn Oberkiefer, 1. Molare	54,5 nm
Bleibender Zahn Oberkiefer, 1. Molare	39,5 nm
Bleibender Zahn Oberkiefer, 1. Molare	51,7 nm
Milchzahn Oberkiefer, 1. Molare	65,5 nm
Milchzahn Oberkiefer, 1. Molare	47,2 nm
Milchzahn Oberkiefer, 1. Molare	59,5 nm
Milchzahn Oberkiefer, 1. Molare	67,7 nm
Bleibender Zahn Unterkiefer, 2. Prämolare	41,4 nm
Bleibender Zahn Unterkiefer, 2. Prämolare	59,5 nm
Bleibender Zahn Unterkiefer, 1. Prämolare	62,2 nm
Bleibender Zahn Unterkiefer, 2. Prämolare	74,6 nm

Milchzahn Oberkiefer, 2. Molar	53,9 nm
Milchzahn Oberkiefer, 2. Molar	77,9 nm
Milchzahn Oberkiefer, 1. Molar	51,2 nm
Milchzahn Oberkiefer, 1. Molar	83,5 nm
Bleibender Zahn Oberkiefer, 2. Molar	46,4 nm
Ergebnis aller gemessenen Werte (auch die hier nicht aufgeführten) im Durchschnitt:	54,8 nm

Verteilung und Anordnung der CMB-Präzipitate

Die CMB-Präzipitate wurden in der Zahnpulpa in zwei Typen gefunden: 1. in Form feiner Nadeln, die in Beziehung zu einer Kollagenfibrille stehen, und bei denen in dieser Arbeit davon ausgegangen wird, dass es sich um die Kohlehydratkette des Decorans handelt (Orgel et al., 2009) und 2. in Form größerer dickerer Nadeln, die keine Beziehung zu den Kollagenfibrillen (Abb. 66) haben. Die nadelförmigen Proteoglykanpräzipitate docken bevorzugt an bestimmten Banden der Fibrillen an. (Scott und Thomlinson, 1998) und zwar den d- und e-Banden. Dies trifft wahrscheinlich auch auf die Fibrillen in der Zahnpulpa des Schweins zu, und zwar bei Milch- und bleibenden Zähnen. Eine gesicherte Aussage zu dieser Lokalisation kann aber nicht gemacht werden, da dies die sorgfältige Analyse einer Serie von Aufnahmen noch höherer Vergrößerungen erfordern würde. Sicher kann gesagt werden, dass an longitudinal angeschnittenen Kollagenfibrillen sehr oft ein CMB-Präzipitat in Höhe der relativ dicken d-Bande anzutreffen ist, die Präzipitate wiederholen sich also folglich alle (theoretisch) 67nm (Abb. 68, 69, 70 u. a.).

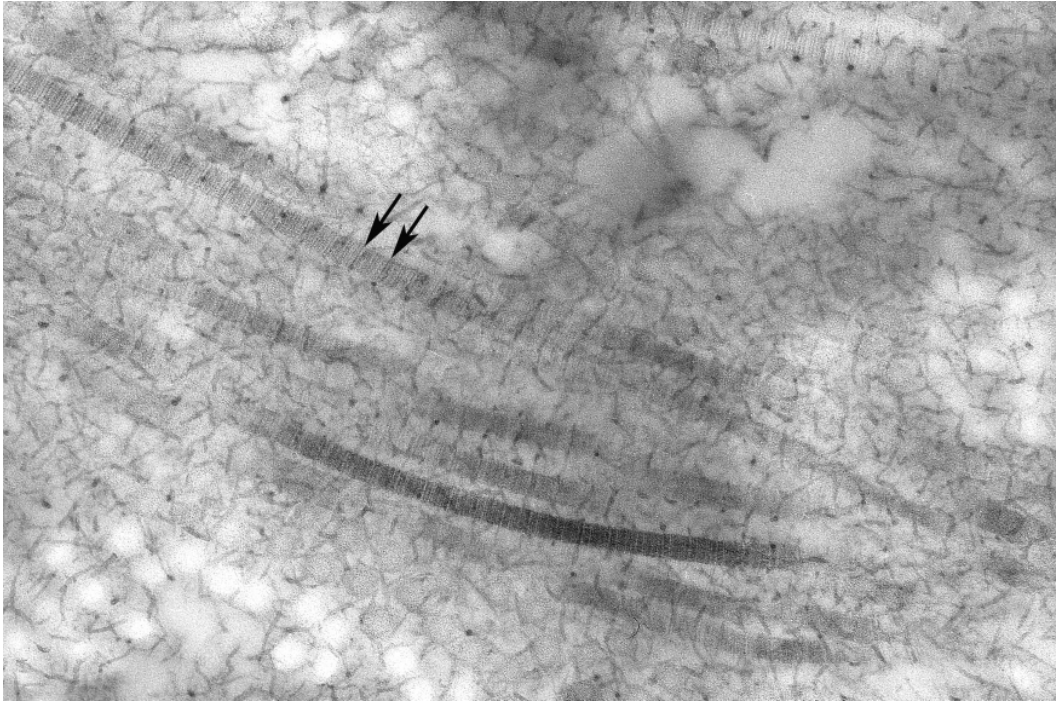


Abb. 68 Zahnpulpa Oberkiefermilchmolar, Pfeile: d-Bande der D-Periode, 0,06 M CMB, Vergr. 66750fach

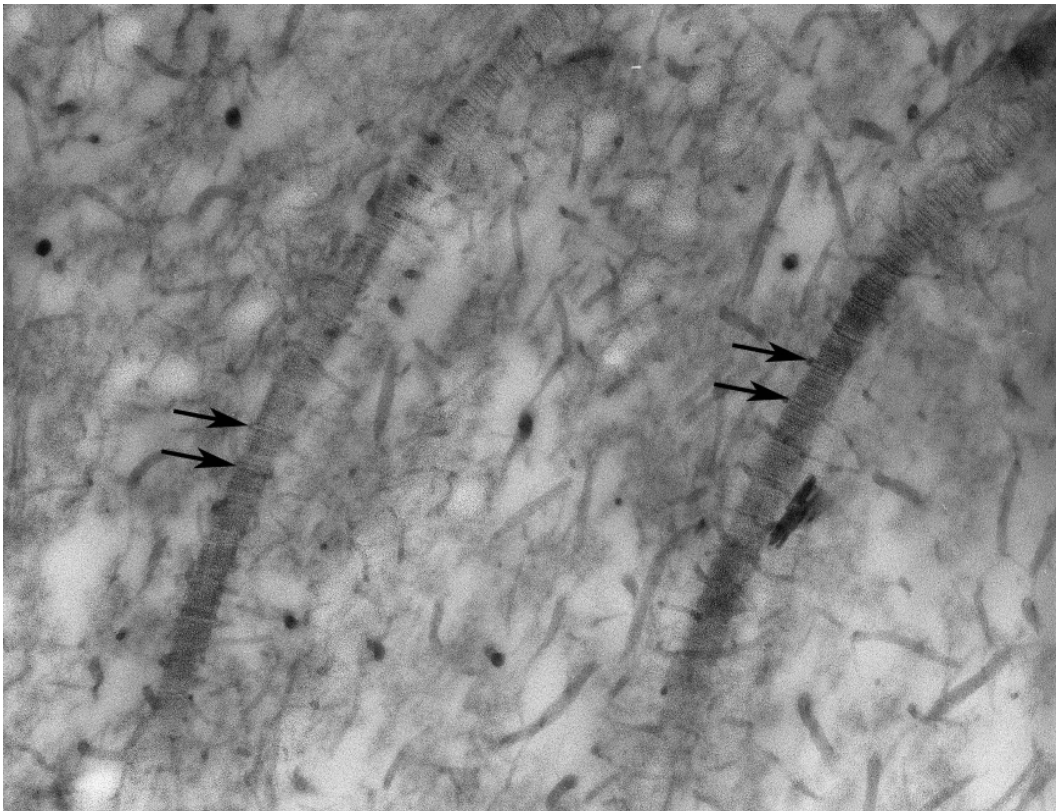


Abb. 69 Zwei Kollagenfibrillen in der Zahnpulpa eines Oberkiefer-Milchmolaren. Pfeile deuten D-Periode an. Beachte die vielen großen CMB-Präzipitate in der Matrix ohne Beziehung zu den Kollagenfibrillen. 0,06 M CMB, Vergr. 89900fach

Weiterhin ließ sich feststellen, dass die Proteoglykanpräzipitate sehr häufig unterschiedliche Andockarten aufweisen. Wie z. B. in Abbildung 70 deutlich wird, stehen die Präzipitatnadeln nicht nur, wie z. T. ausschließlich angenommen, senkrecht beziehungsweise horizontal von den Kollagenfibrillen ab, sondern scheinen sich auch direkt auf die Kollagenfibrillen beziehungsweise sogar um sie herum zu legen. Allerdings ist dies wohl nur eines der vielen Andockmuster zwischen Proteoglykanen und Kollagenfibrillen. Oft sind die CMB-Präzipitate quer getroffen und erscheinen dann als dunkle Punkte, die den Kollagenfibrillen eng anliegen (z. B. Abb. 68, 70).



Abb. 70 Kollagenfibrillenbündel in der Zahnpulpa eines Oberkiefermilchmolaren, Pfeile zeigen auf die Verbindung benachbarter Fibrillen durch CMB-positive Proteoglykane, Pfeilköpfe: CMB-Präzipitate, die der Fibrille longitudinal oder schräg anliegen. 0,06 M CMB, Vergr. 66750fach

Die Abbildungen 68, 70, 73 und 74 zeigen Ausschnitte von Kollagenbündeln in der Zahnpulpa des Hausschweines. Hier erkennt man das Zusammenspiel des Systems "Kollagenfibrillenbündel". Es besteht ein bestimmter Abstand zwischen den Fibrillen, der immer gewahrt wird. Auch in diesen Abbildungen lassen sich viele senkrecht zu den Kollagenfibrillen abstehende Präzipitatnadeln

erkennen, aber ebenso sind quer angeschnittene, zirkulär um die Fibrillen herum liegende, Präzipitatnadeln vorhanden.

Neben den beschriebenen kollagenassoziierten Proteoglykanen liegen ebenfalls nicht kollagenassoziierte Proteoglykane in der Pulpamatrix vor. Diese nicht kollagenassoziierten Proteoglykane imponieren aufgrund ihres hohen Hyaluronananteils als sehr große Polyanionen und erscheinen in vielfältigen Formen (z. B. Abbildungen 69, 71, 72, 75).

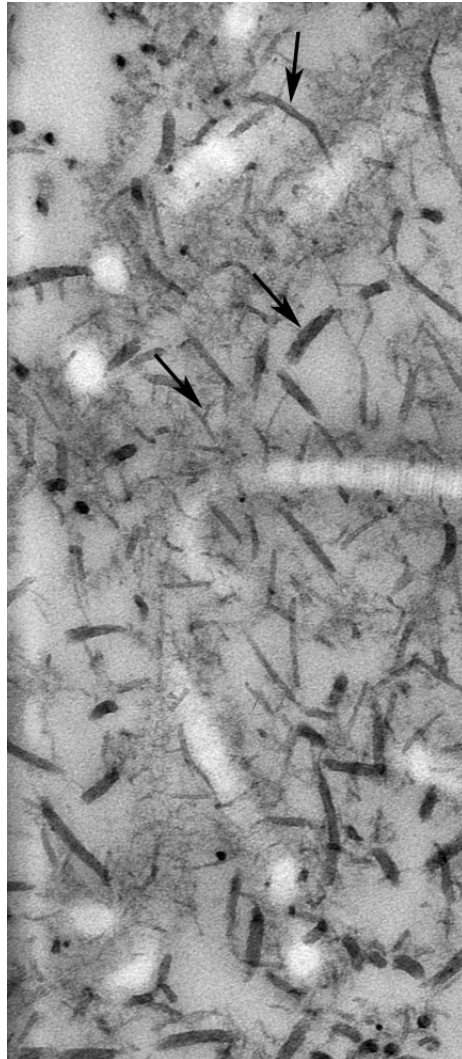


Abb. 71 bleibender Oberkiefermolar, Pfeile: nicht kollagenassoziierte Glykosaminoglykane und vermutlich Hyaluronan, 0,06 M CMB, Vergr. 89900fach

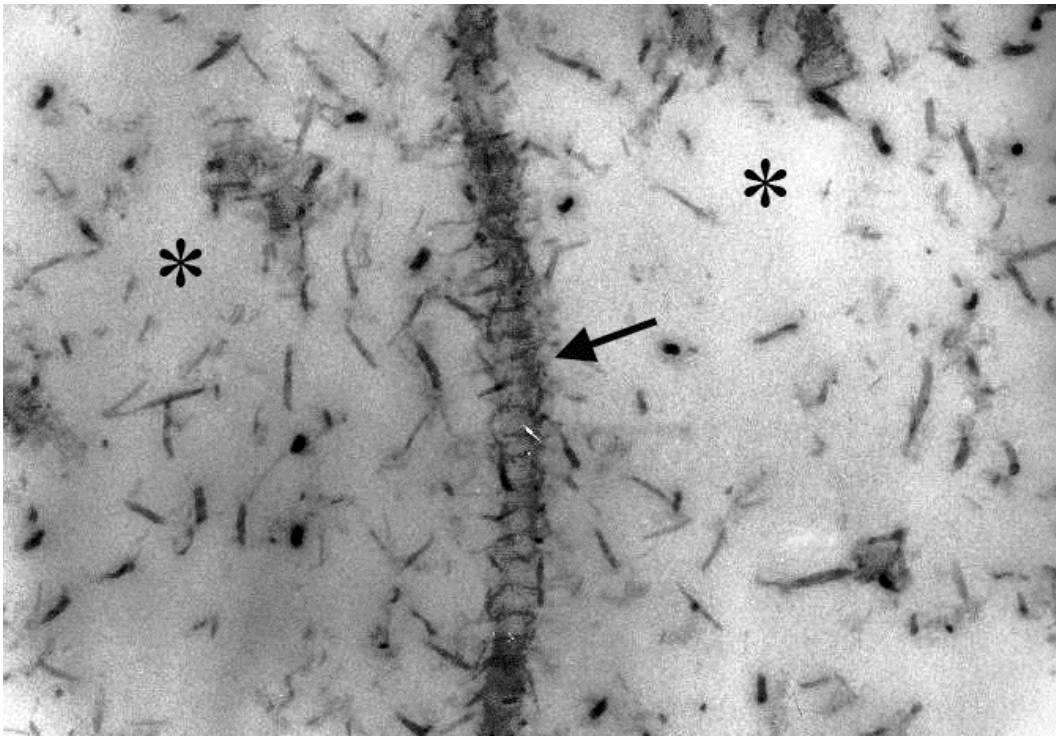


Abb. 72 Einzelne Kollagenfibrille (Pfeil) in amorpher Matrix (Sternchen); die Fibrille ist mit CMB-Präzipitaten bedeckt, obwohl vermutlich keine weitere Fibrille in der Nähe liegt. Zahnpulpa in Unterkieferfrontzahn, Milchzahn, 0,06 M CMB, Vergr. 66750fach

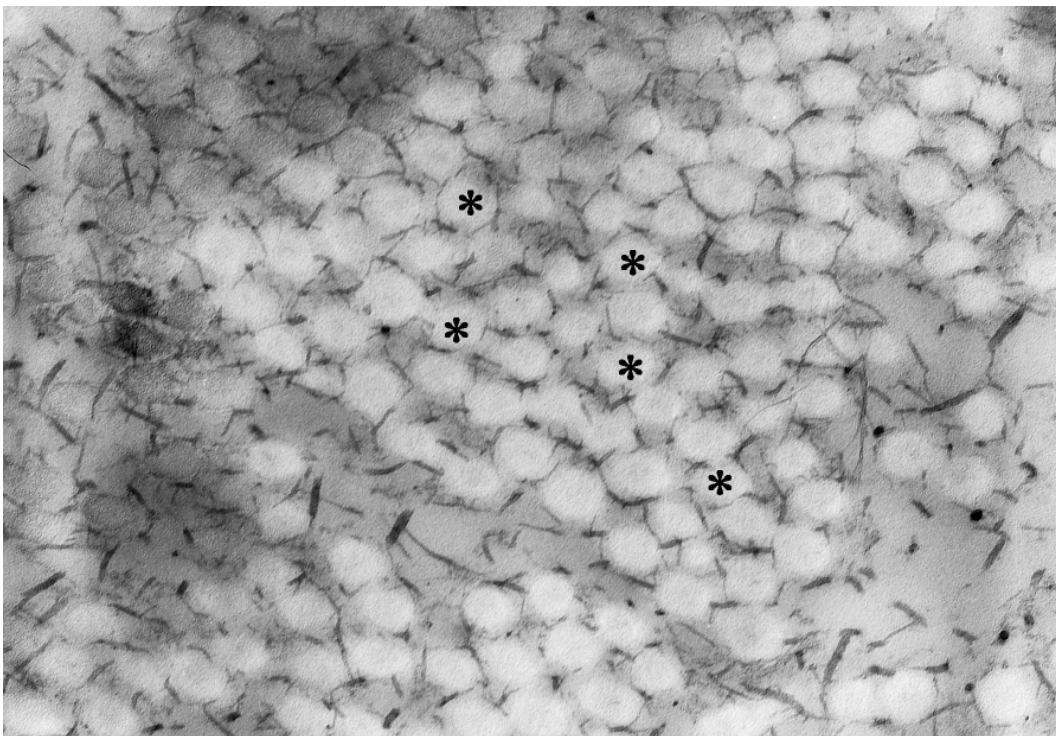


Abb. 73 Zahnpulpa eines bleibenden Oberkiefermolaren, Kollagenfibrillen (Sternchen) im Querschnitt; alle Fibrillen sind komplex durch das Proteoglykan Decoran verbunden, 0,06 M CMB, Vergr. 89900fach

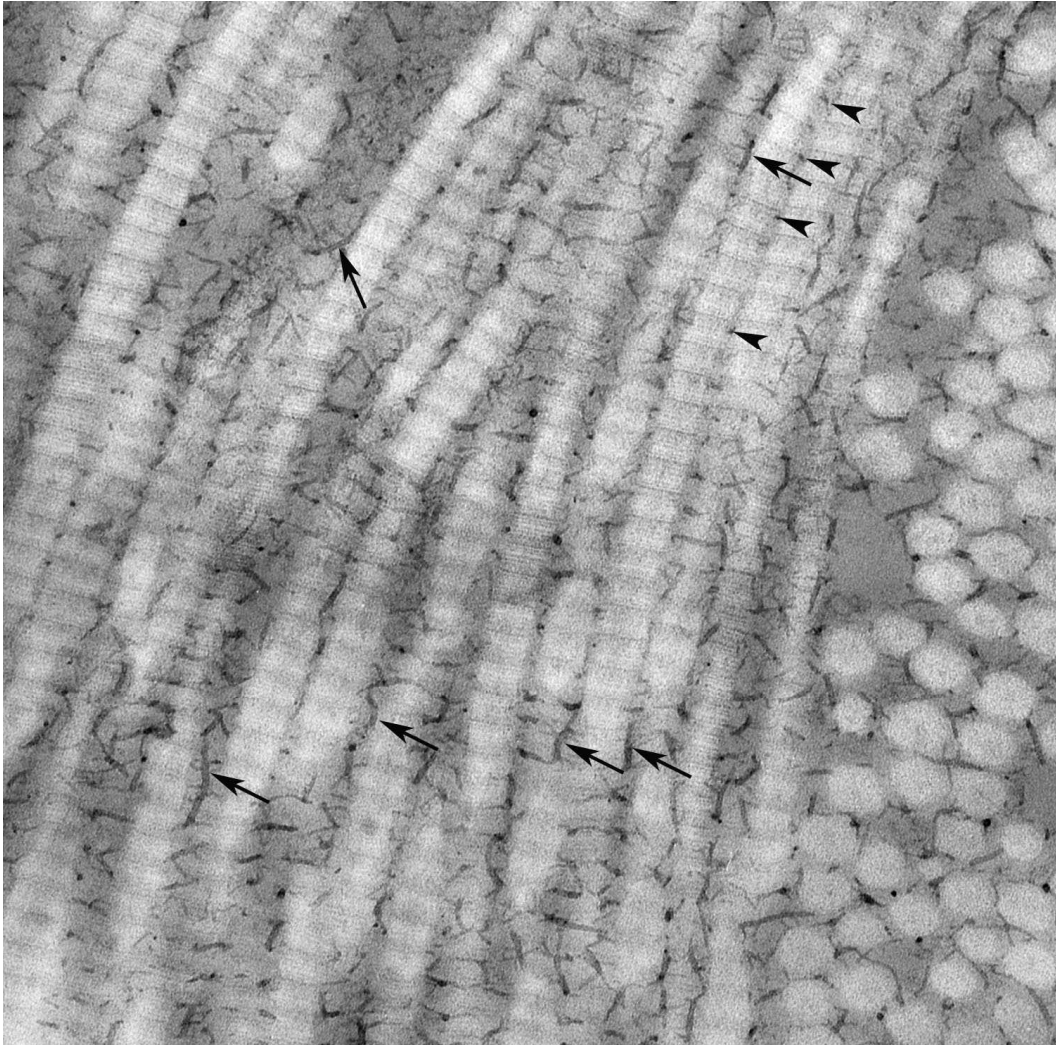


Abb. 74 Zahnpulpa eines Oberkiefermilchmolaren, dicht gepackte Kollagenfibrillen (linkes Dreiviertel des Bildes längsgetroffen, rechtes Viertel quergetroffen). Pfeilköpfe: quergetroffene CMB-Präzipitate; Pfeile: „atypisch“ angeordnete CMB-Präzipitate an den Kollagenfibrillen. Alle Fibrillen sind durch Proteoglykane verbunden, 0,06 M CMB, Vergr. 89900fach

Die Kollagenfibrillen stellen sich im Querschnitt als kreisrunde, helle Strukturen dar. Die einzelnen Fibrillen sind stets durch einen geringen Abstand voneinander getrennt. Der trennende Raum wird sehr oft durch CMB-Präzipitate überbrückt (z. B. Abb. 70, 73 rechts). Der durchschnittlich, während diesen Untersuchungen gemessene Durchmesser der Fibrillen beläuft sich auf ca. 72,65 nm.

Tabelle 6: Messwerte des Kollagenfibrillendurchmessers im Querschnittbild

Zahn:	Querschnitt in nm:
Bleibender Zahn Oberkiefer 1. Molar	92,9 nm
Bleibender Zahn Oberkiefer 1. Molar	48,9 nm
Bleibender Zahn Oberkiefer 1. Molar	73,4 nm
Bleibender Zahn Oberkiefer 1. Molar	86,9 nm
Bleibender Zahn Oberkiefer 1. Molar	71,9 nm
Milchzahn Oberkiefer Caninus	86,9 nm
Milchzahn Oberkiefer Caninus	78,6 nm
Milchzahn Oberkiefer Caninus	107,8 nm
Milchzahn Oberkiefer Caninus	80,9 nm
Milchzahn Oberkiefer Caninus	74,9 nm
Milchzahn Oberkiefer 1. Molar	87,3 nm
Milchzahn Oberkiefer 1. Molar	62,3 nm
Milchzahn Oberkiefer 1. Molar	49,4 nm
Milchzahn Oberkiefer 1. Molar	47,9 nm
Ergebnis aller gemessenen Werte (auch die hier nicht aufgeführten) im Durchschnitt:	72,65 nm

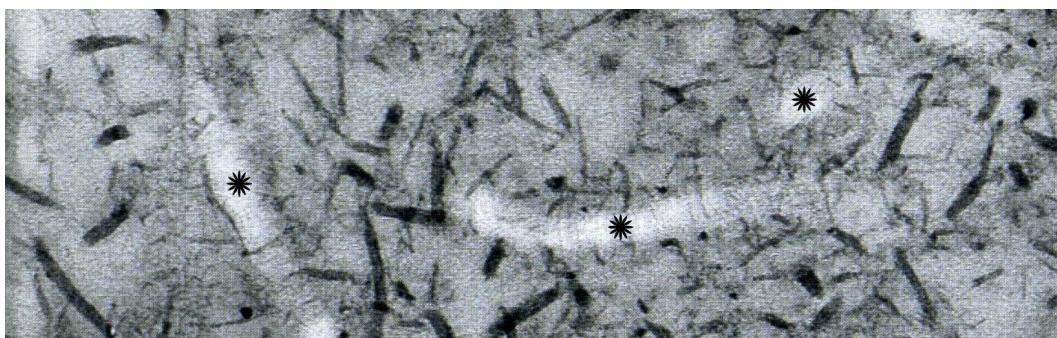


Abb. 75 Zahnpulpa, bleibender Unterkiefermolar, Matrix mit z.T. sehr großen CMB-Präzipitaten, die nicht mit den Kollagenfibrillen (Sternchen) assoziiert sind, 0,06 M CMB, Vergr. 55900fach

Nicht kollagenassoziierte Glykosaminoglykane, wie sie z.B. in den Abbildungen 66, 69, 71, 72 und 75 vermehrt vorkommen, bestehen vermutlich aus Hyaluronan und angelagerten Proteoglykanen und liegen fast immer in Form dicker, z. T. gekrümmter Präzipitate vor.

Einige der Präzipitatnadeln stellen sich im Vergleich zu den anderen auffällig groß dar. Es liegt die Vermutung nahe, dass sich u. U. mehrere dünne Nadeln zu einem Konglomerat zusammenfügen und sich dadurch für den Betrachter als größer darstellen.

3.3.2 Vergleich der Interaktionen zwischen Kollagenfibrillen und Proteoglykanen in der Pulpamatrix von Milchzähnen und bleibenden Zähnen beim Schwein

Anhand des gegebenen Untersuchungsmaterials ist es naheliegend, die Kollagenstruktur und die Interaktionen zwischen Proteoglykanen und den Kollagenfibrillen bei Milchzähnen und bei bleibenden Zähnen gegenüber zu stellen.

Prinzipiell ist bekannt, dass sich bei bleibenden Zähnen die Kronenpulpa aufgrund der zunehmenden Kalkablagerungen über die Jahre kontinuierlich verengt (Schroeder, 2000).

Man vermutete, dass sich im Laufe der Zeit und mit zunehmender Beanspruchung Veränderungen in der Kollagenstruktur und dem Verhalten der Proteoglykane deutlich machen würden (Schroeder, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde solchen Vermutungen nachgegangen, und es wurden die elektronenmikroskopischen Bilder von Milchzähnen (6 Monate) und bleibenden Zähnen (18 Monate) miteinander verglichen.

In der hier vorgelegten Untersuchung ließ sich feststellen, dass sich am Andockverhalten der Proteoglykane zu den Kollagenfibrillen der Milchzahn nicht vom bleibenden Zahn unterscheidet.

Auch das Vorkommen, die Verteilung und die Gestalt der nicht kollagenassoziierten Glykosaminoglykane ergaben im Vergleich keine wesentlichen Unterschiede.

Ein minimaler Unterschied wurde bei der Auswertung der D-Periode bei bleibenden Zähnen im Vergleich zu Milchzähnen ermittelt.

Die D-Periode bei Milchzähnen tendiert generell zu etwas höheren Werten als bei bleibenden Zähnen, so dass in dieser Untersuchung die Durchschnittswerte von 55,56 nm für die Milchzahnbandenbreite und 53,60 nm für die D-Periode des bleibenden Zahnes herausgearbeitet

werden konnten. Allenfalls konnte noch ein Unterschied in den Dicken der Kollagenfibrillen bei Dauermolaren und Milchmolaren festgestellt werden.

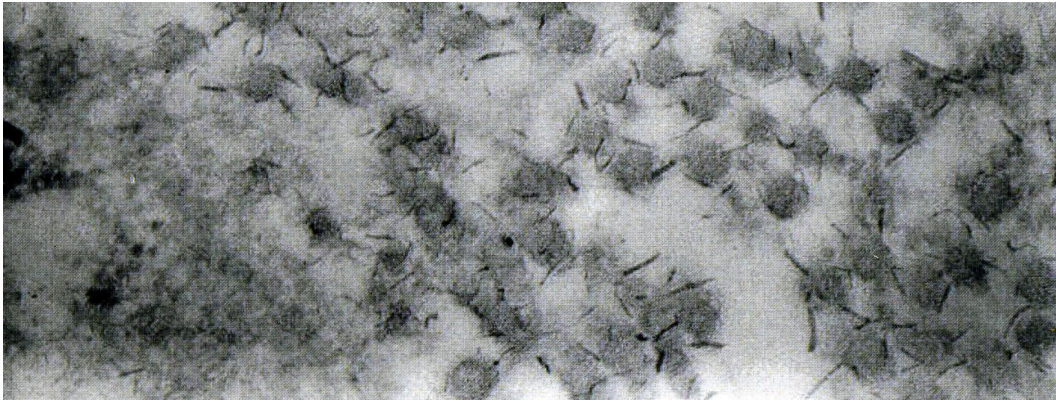


Abb. 76 Zahnpulpa in einem bleibenden Oberkiefermolaren, Kollagenfibrillenbündel im Querschnitt, einzelne Fibrillen sind schräg angeschnitten. Die nadelförmigen dunklen CMB-Präzipitate verbinden benachbarte Kollagenfibrillen, 0,3 M CMB, Vergr. 66750fach

4. Diskussion

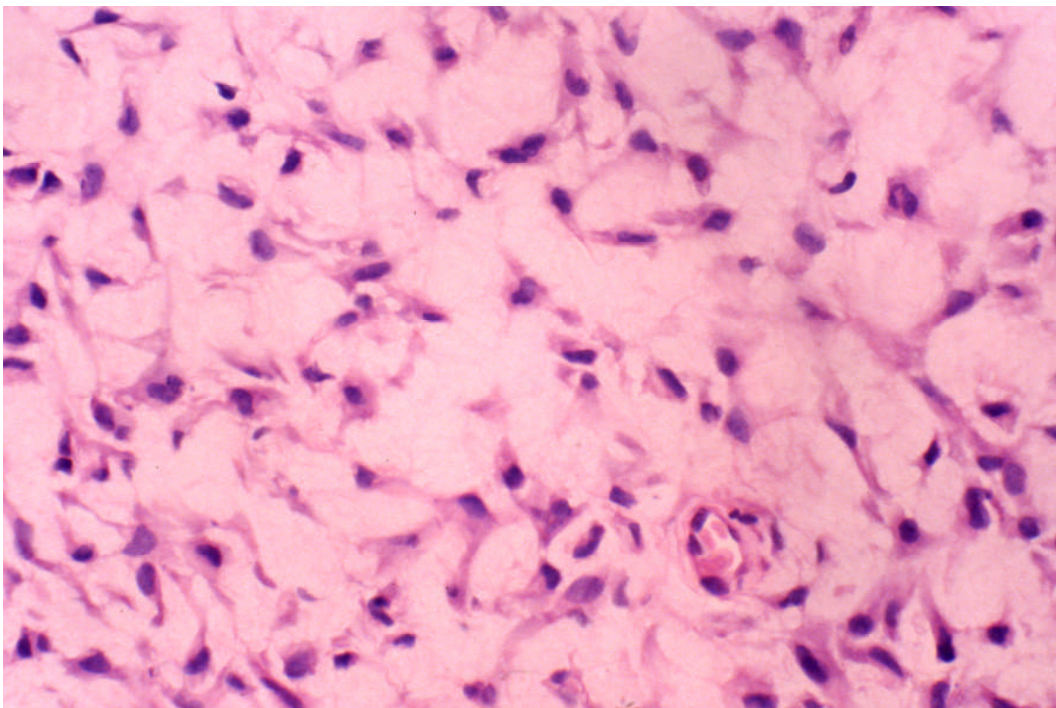


Abb. 77 Zahnpulpa Mensch, typischer histologischer Aufbau in einem Ersatzzahn, Färbung HE, Vergr. 500fach

Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, a) dass das Bindegewebe der Zahnpulpa von Milch- und Ersatzzähnen des Schweins keine durchgehenden histologischen Unterschiede aufweist (allenfalls ist der Gehalt an Kollagenfasern [Typ I Kollagen] in der Zahnpulpa der Ersatzzähne höher als in der Zahnpulpa der Milchzähne) und b) dass dieses Bindegewebe in den Ersatzzähnen des Schweins und denen des Menschen ebenfalls morphologisch im Prinzip gleichartig aufgebaut ist. Nicht selten sind in der Pulpa des Menschen mehr Kollagenfasern zu erkennen, was vermutlich am generell höheren Alter der untersuchten menschlichen Zähne liegt. Zum Teil sind auch vorhergehende Entzündungsprozesse nicht auszuschließen, nach deren Abheilung möglicherweise vermehrt Kollagen produziert wurde. Generell sind die Fibroblasten in der Peripherie der Pulpa größer und zytoplasmareicher als im Zentrum. Tendenziell sind die Zellen in der Zahnpulpa des Schweins etwas größer als die des Menschen, was möglicherweise durch das relativ junge Alter der Schweinezähne erklärt werden kann, obwohl der Pulparaum nicht wachsen kann. Unter Umständen liegt auch ein genetisch bedingter Größenunterschied vor. So ergibt sich für beide untersuchten Spezies folgendes histologisches Bild der **Zahnpulpa** (Abb. 77): Ein Grundgerüst aus locker verteilten Fibroblasten, die über Fortsätze miteinander verknüpft sind und zwischen denen sich eine Matrix aus Proteoglykanen und Kollagenfasern befindet. Die Abstände zwischen den Pulpafibroblasten sind annähernd gleich, so dass sich ein ebenmäßiges morphologisches Bild ergibt. Die Peripherie der Pulpa ist fast immer zellreicher und oft reicher an Kollagenfasern als das Zentrum der Pulpa, die Zellen der Peripherie sind größer und zytoplasmareicher als die des Zentrums.

Immunhistochemisch kommen Kollagen Typ I und Typ III in ähnlicher Verteilung und Menge vor, wobei zu beachten ist, dass keine spezifischen quantitativen Analysen vorgenommen wurden.

In der Einleitung war angedeutet worden, dass die Einordnung des Pulpagewebes in die Systematik der Bindegewebe uneinheitlich vorgenommen wird. Im Folgenden soll der morphologische Aspekt des Bindegewebes der Zahnpulpa mit dem der Zahnpapille, des Mesenchyms, und dem des gallertigen Bindegewebes verglichen werden (Abb.78, 79, 80).

Die **Zahnpapille** (Abb. 78) ist, speziell in den ersten Stadien ihrer Entwicklung, deutlich zellreicher als das Bindegewebe der ausgebildeten Zahnpulpa. Die Zellen sind kleiner, ihre Kerne sind rundlicher und heller und die Fortsätze sind kürzer als in der Zahnpulpa durchgebrochener Zähne. Die Matrix ist hell (proteoglykan- und wasserreich) und enthält nur wenige zarte Kollagenfasern.

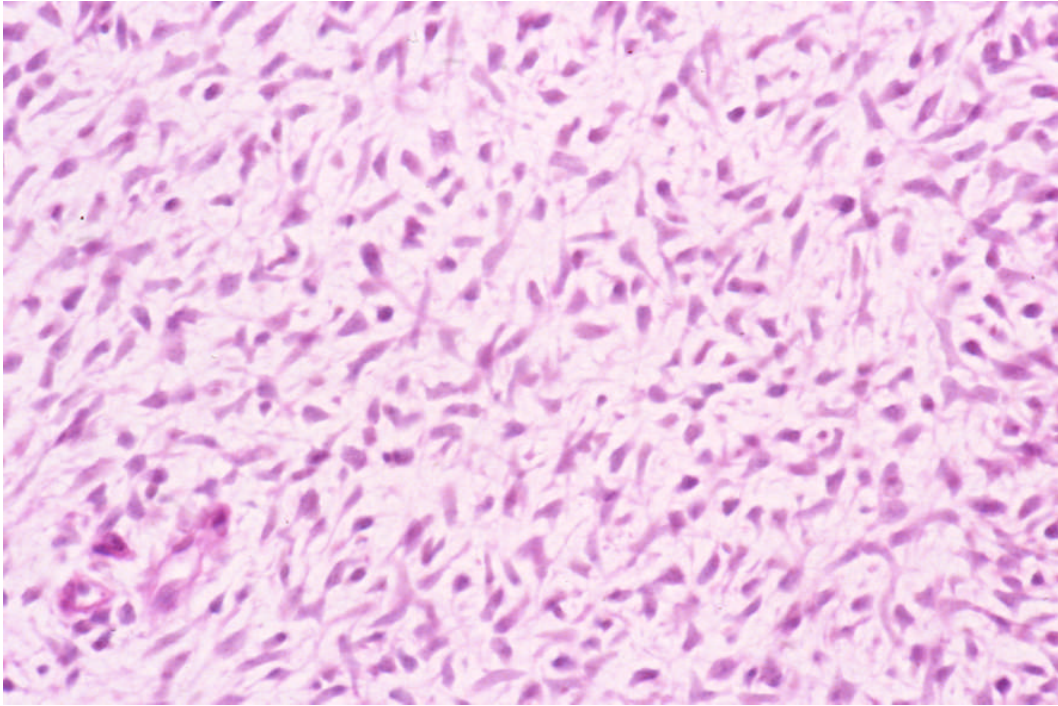


Abb. 78 Ausschnitt aus der Zahnpapille, Mensch, Färbung HE, Vergr. 500fach

Das typische **Mesenchym** (Abb. 79) besitzt unterschiedlich dichtgelagerte Zellen, in Blastemen sind die Zellen dichter gepackt als in späteren Bindegewebszonen. Die Mesenchymzellen sind klein und zart. Die Kerne der Mesenchymzellen sind rundlich, hell und besitzen einen relativ großen Nucleolus, Mitosen sind häufig. Die Zellfortsätze sind sehr fein. Die Matrix ist hell (proteoglykan- und wasserreich), Kollagenfasern sind selten und zart. Die Mesenchymzellen unterscheiden sich deutlich von den Fibroblasten der Pulpa durchgebrochener Zähne, ähneln aber den Zellen der Zahnpapille. Sowohl das Mesenchym als auch das Gewebe der Zahnpapille unterscheiden sich besonders deutlich vom Gewebe der Pulpa durchgebrochener Zähne in Hinsicht auf die Bindegewebsmatrix, die beim durchgebrochenen Zahn deutlich weiträumiger und faserreicher als im Mesenchym und in der Papille ist.

Interessant ist der Gedanke von Scott et al. (2003), dass die hyaluronanreiche Kapsel von bestimmten Bakterien u. U. der erste Hinweis auf die Entstehung einer „Bindegewebs“-Matrix sein könnte.

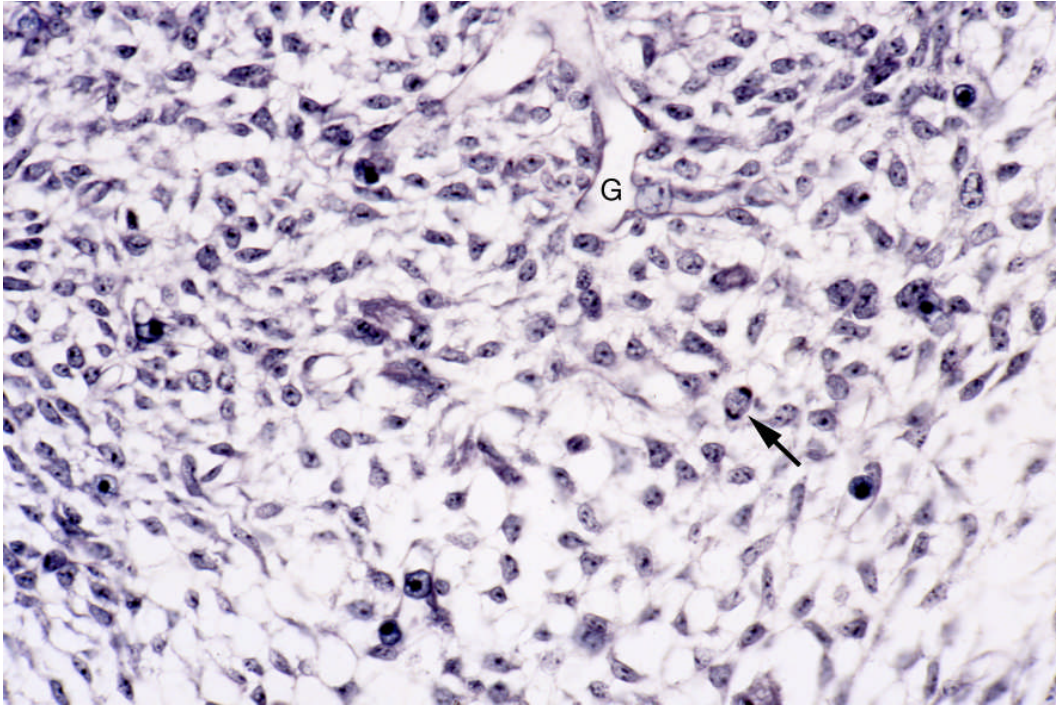


Abb. 79 Mesenchym in einem Mausembryo, Körperperipherie, links vermutlich ein Blastem der Skelettmuskulatur; G: Gefäß, Pfeil: Mitose, Färbung Eisenhämatoxylinfärbung, Vergr. 500fach

Das **gallertige Bindegewebe** (Abb. 80) besitzt locker verteilte, relativ große Fibroblasten, deren Kern meist länglich und nicht auffällig hell ist. Die Zellfortsätze sind oft lang und relativ kräftig. Der Matrixraum ist sehr umfangreich. In der Matrix kann erstaunlich viel Kollagen vorkommen, die hellen, proteoglykanreichen Bezirke nehmen vermutlich nicht so viel Raum ein, wie im Mesenchym.

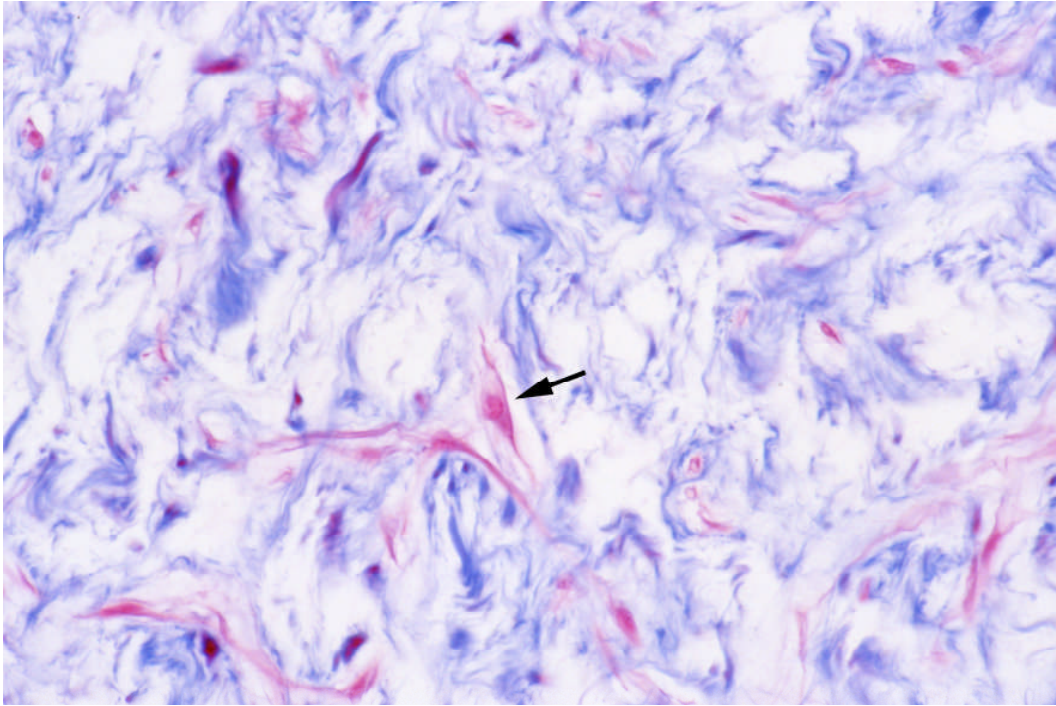


Abb. 80 Gallertiges Bindegewebe der Nabelschnur des Menschen; Pfeile: Fibroblasten (rot), Kollagenfasern (blau), Färbung Azan, Vergr. 500fach

Kollagenfibrillen in der Zahnpulpa von Milch- und Ersatzzähnen

Kollagenfasern bzw. -fibrillen sind in der Zahnpulpa nicht homogen verteilt, sondern treten in der Pulpaperipherie (oft) sowie in der Umgebung von Arterien, Arteriolen und Nerven in höherer Konzentration auf als in den übrigen Regionen der Pulpa. Diese Aussage beruht auf der Interpretation der Färberegebnisse der histologischen Färbungen (HE, Azan, van Gieson) und der immunhistochemischen Nachweise von Kollagen Typ I und Kollagen Typ III, und betrifft sowohl die Zahnpulpa von Mensch und Schwein. Die Ursache für das vermehrte Vorkommen von Kollagenfibrillen in der Pulpaperipherie ist schwer zu erklären; hier befinden sich die Odontoblasten, die relativ dicht zusammen liegen und möglicherweise der Stabilisierung ihrer Lage bedürfen. In der Umgebung der Arterien und Nerven dient das Kollagen vermutlich auch der Lagestabilisierung. Auf den relativen Kollagenreichtum im Bereich der Odontoblasten und Blutgefäße in der Zahnpulpa des Menschen haben bereits Eifinger (1970), und Ten Cate (1985), hingewiesen, deren Aussagen auf den Ergebnissen histologischer Färbungen beruhen.

Unbefriedigend ist das Ergebnis der Silberimprägnation nach Gomori, die üblicherweise klar die Verteilung der retikulären Fasern im Bindegewebe zeigt. Die retikulären Fasern sind feine verzweigte Kollagenfasern, die überwiegend aus Kollagen Typ III bestehen (siehe z.B. Kühn, 1987; und Drenckhahn, 2008). Die Ursache für den unbefriedigenden Färbeausfall ist nicht klar, möglicherweise liegt in der Zahnpulpa, in der vermutlich die üblichen Zug- und Druckbelastungen

von Bindegewebsstrukturen fehlen, ein besonderer Typ von retikulären Fasern vor. Dass die wesentliche Komponente von retikulären Fasern, das Kollagen vom Typ III, in reichem Maße vorhanden ist, zeigt der immunhistochemische Nachweis dieses Kollagentyps. Da aber retikuläre Fasern auch besondere Glykoproteine, enthalten, die für das üblicherweise klare Färbeergebnis der Silberimprägnation wichtig sind, könnte es sein, dass die retikulären Fasern der Zahnpulpa in dieser Hinsicht Besonderheiten zeigen. Für diese Vermutung spricht auch das Ergebnis der PAS-Reaktion, die ja Glykoproteine nachweist. Das Ergebnis der PAS-Reaktion ist in der Zahnpulpa schwach und eher verwaschen, allenfalls lassen sich bei starker Vergrößerung feinfaserige Strukturen erkennen, was sich deutlich vom Erscheinungsbild der retikulären Fasern in z. B. Milzgewebe unterscheidet, die sowohl bei der Versilberung, als auch der PAS-Reaktion klar und deutlich erkennbar sind.

Auffällig ist, dass die immunhistochemische Färbung für Kollagen vom Typ I und vom Typ III ähnlich ausfällt. Dennoch fällt bei genauerem Hinsehen der immunhistochemische Nachweis des Kollagens vom Typ III generell kräftiger aus als der des Kollagens vom Typ I, es scheinen sich auch mehr Fasern darzustellen. Es gibt aber keine Regionen in der Pulpa, in denen nur Fasern mit Kollagen vom Typ I oder III vorzukommen scheinen. Daher erscheint die Vermutung berechtigt zu sein, dass in der Zahnpulpa die Kollagenfasern (und –fibrillen) sowohl Kollagen vom Typ I als auch vom Typ III enthalten, wobei Kollagen vom Typ III überwiegt.

Die räumliche Beziehung von Kollagenfibrillen und Proteoglykanen, soweit sie sich mit Hilfe des CMB darstellen lassen

Die Gestalt und die Form wohl aller beweglichen Organismen (Tiere) und ihrer verschiedenen Organe werden durch die extrazelluläre Matrix des Bindegewebes aufrecht erhalten (bei den eher statischen Pflanzen übernimmt Zellulose die Funktion des Kollagens). Die Struktur und die mechanischen sowie funktionellen Eigenschaften der Matrix hängen von der Existenz der Kollagenfibrillen ab, die an der „richtigen“ Stelle vorkommen und hier in bestimmter Ordnung festgehalten werden. Die interfibrilläre Organisation wird durch Brücken aus Proteoglykanen stabilisiert. Sowohl Kollagen als auch Proteoglykane sind Biopolymere (Scott, 2002).

Die Kollagenfibrillen sind in allen bisher untersuchten Matrices verschiedener Bindegewebe durch molekulare Brückenstrukturen aus dem Proteoglykan Decoran (=Decorin) verbunden bzw. getrennt (Orgel et al., 2009). Wegen der Universalität der Verbreitung dieser zwei makromolekularen Strukturen (Kollagen / Decoran) sprechen Scott und Thomlinson (1998) und Scott (2003) von „shape modules“. Damit soll zum Ausdruck gebracht werden, dass hier ein elementares Modul in

allen Formen der Bindegewebsmatrix vorliegt. Wenn Decoron, das Protein des Decorans, fehlerhaft exprimiert wird, wird die Organisation der Bindegewebsmatrix gestört (Scott et al., 1998).

Die vorliegende Untersuchung hat auf elektronenmikroskopischer Ebene gezeigt, dass die fundamentalen shape modules auch in der Zahnpulpa des Schweines vorkommen, nachdem Weindl (2005) gezeigt hatte, dass sie auch beim Menschen vorkommen. Damit wird die Universalität der Verbreitung der shape modules um ein Gewebe erweitert, dessen funktionelle Eigenschaften viel weniger eindeutig durch mechanische Kräfte (Zug – Druck) bestimmt werden als das in den meisten Bindegeweben (Sehnen, Bänder, Knorpel, usw.) der Fall ist. Tenorio et al. (2003) haben lichtmikroskopisch gezeigt, dass Decorin und Biglycan in der Zahnpulpa der Ratte vorkommen.

Scott und Thomlinson (1998) haben den molekularen Aufbau der Brückenstruktur also der Proteoglykane, zwischen Kollagenfibrillen in den verschiedenen Bindegeweben biochemisch und elektronenmikroskopisch analysiert. Das verbindende Proteoglykan scheint bei allen bisher untersuchten Organismen und Organen stets Decoran (= Decorin) zu sein. Das Decoran besteht annähernd zu 50% aus Protein und zu 50% aus Glykosaminoglykanen (Orgel et al., 2009). Der Proteinanteil ist an spezifischen Stellen nicht-kovalent an der Kollagenfibrille befestigt, und die eigentliche Brücken- oder Verbindungsstruktur wird von mindestens 2 antiparallelen Glykosaminoglykanketten gebildet, die meistens aus Chondroitinsulfat (oder Dermatansulfat = Dermochondansulfat) bestehen (Scott und Thomlinson, 1998; Scott und Stockwell, 2006). Wesentliche Komponenten der extrazellulären Matrix (letztlich unserer ganzen Gestalt, Scott, 2006) werden also durch Kohlenhydratketten zusammen gehalten (Scott, 2006, 2008).

Wenn Bindegewebe unter bestimmten Bedingungen mit dem Farbstoff Cupromeronic Blue (CMB = Kupfermeronisches Blau) im Block gefärbt wird, erscheinen die zwei (oder mehr, Scott 2001) Glykosaminoglykanketten als elektronendichte feine Nadeln. Das CMB bindet elektrostatisch an Polyanionen. Diese Nadeln (Scott und Thomlinson 1998 sprechen von „filaments“) verbinden die benachbarten Kollagenfibrillen einerseits und halten sie andererseits auf einen bestimmten Abstand. Sie beeinflussen auch ihre Ausrichtung. Sie überspannen regelmäßig alle 60 – 65 nm und orthogonal den Raum zwischen den Kollagenfibrillen. Die Zahl „60 – 65“ entspricht ungefähr einer D-Periode. Auch in der vorliegenden Untersuchung wurde oft eine CMB-„Brücke“ pro D-Periode gefunden. Die Länge der Brücken ist in den verschiedenen Organen und bei verschiedenen Organismen unterschiedlich (Orgel et al., 2009). Speziell die Querschnittsbilder der Kollagenfibrillen (z. B. Abb. 73) zeigen, dass die Verbindungen zwischen den Fibrillen sehr komplex sind und nicht einfach aus Strukturen bestehen, die senkrecht von der Fibrillenoberfläche abstehen. Hinweise auf die Existenz von „Protofibrillen“, longitudinalen Untereinheiten der

Fibrillen, wie sie in Bindegeweben alter Menschen auftreten können (Scott, 1990), fanden sich in der Zahnpulpa nicht.

Die exakten Bindungsstellen des Decorans an den Kollagenfibrillen sind schwer zu bestimmen (Scott, 2001), und es gelang in dieser Arbeit auch nicht, die Bindungsstellen am Kollagen in der Zahnpulpa exakt zu identifizieren; es ist jedoch davon auszugehen, dass hier die gleichen Verhältnisse wie in anderen Matrices vorliegen. Orgel et al. (2009) haben den Proteinanteil des Decorans, das Decoron, analysiert und gefunden, dass dieses halbmondförmige Gestalt besitzt, was zur gekrümmten Oberfläche der Kollagenfibrillen passt. Eine Besonderheit liegt in der Zahnpulpa möglicherweise darin, dass die Glykosaminoglykanbrücken nicht nur senkrecht zur Längsachse der Kollagenfibrillen verlaufen, sondern auch schräg und z. T. wahrscheinlich auch der Kollagenfibrille direkt aufliegen. Die Bedeutung solcher Glykosaminoglykanketten ist noch unklar, möglicherweise sind sie Anteile anderer Proteoglykane.

Interessant ist, dass auch einzelne isoliert liegende Kollagenfibrillen (Abb. 69, 71, 72) an ihrer Oberfläche dicht mit Decoran bedeckt sind, ohne dass sie hier eine Brückenstruktur aufbauen können. Dies deutet u. U. darauf hin, dass dem Decoran zusätzlich Funktionen zukommen, die bisher unbekannt sind.

Die Glykosaminoglykanbrücken widerstehen in Sehnen erheblichen mechanischen Zugkräften (Cribb und Scott, 1995), wie sie in der Pulpahöhle nie auftreten. Es wird vermutet, dass diese Brücke bei der Osteoarthritis unterbrochen ist oder fehlt (Scott et al., 2006; Scott und Wigley, 2007). Auch bei der Osteogenesis imperfecta verändern sich die Proteoglykan-Bindungsstellen an der Kollagenfibrille (Scott und Tenni, 1997).

Ein neuer Aspekt dieser Glykosaminoglykanbrücken ergab sich, als Haverkamp et al. (2005) entdeckten, dass sie Zuckereinheiten besitzen, die elastische Eigenschaften haben, die vermutlich auf reversiblen molekularen Gleitmechanismen beruhen. Hydrophobe Bindungen und Wasserbrücken brechen wahrscheinlich unter mechanischem Stress und können sich neu bilden, wenn der Stress nachläßt. Dies ist wahrscheinlich die generelle Basis für die reversible Deformierung (= Elastizität) der Matrix. Diese molekulare Elastizität wurde auch von Scott (2003, 2006) und Scott und Stockwell (2006) beschrieben.

Dass Kollagen z. T. überraschende funktionelle Eigenschaften aufweisen kann, zeigt das mutabile Bindegewebe der Echinodermen (Bacetti, 1967; Erlinger et al., 1993; Holland und Grimmer, 1981; Scott, 1991; Trotter und Koob, 1989; Wilkie, 1988). Dieses kollagene Gewebe kann vermutlich auf

neuronale Signale hin (Heinzeller und Welsch, 1994), seine Konsistenz stark verändern und in Sekunden zwischen weich sowie biegsam und steinhart wechseln.

Es ist, wie schon angedeutet, davon auszugehen, dass alle genannten Eigenschaften des shape modules auch für die Matrix der Zahnpulpa zutreffen, obwohl hier – vermutlich – keine mechanischen Deformierungen vorkommen.

Die enge und regelhafte Beziehung wurde zwischen Kollagenfibrillen und Decoran von Scott und Haigh (1988) im Stroma der Kornea des Kaninchens entdeckt und seither in vielen Bindegeweben von Wirbellosen und Wirbeltieren (z.B. Scott, 1980, 1985, 1988, 1990, 1991, 1993, 2002, 2006; Erlinger et al., 1990, 1993, 1995; Welsch Erlinger und Storch, 1992; Scott, 1995; Erlinger, 1995; Welsch Erlinger und Potter, 1991) nachgewiesen.

In einer vergleichenden Serie von Korneagewebe (Frosch, Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Schaf, Katze, Hund, Schwein, Kuh und Mensch) haben Scott und Bosworth (1990) festgestellt, dass die Bindung des Decorans an die Kollagenfibrille an verschiedenen Stellen erfolgen kann; bei allen Arten ist aber eine Bindung an die d- und e-Bande der D-Periode nachweisbar, zusätzlich findet sich bei vielen Säugetieren eine Bindung an die a- und c-Bande. In der vorliegenden Untersuchung wurde im Längsschnitt durch Kollagenfibrillen in der Zahnpulpa des Schweines, und zwar sowohl bei Milch- als auch bei Ersatzzähnen meist nur eine verbindende CMB-Nadel pro D-Periode beobachtet. Allerdings gewinnt man an Querschnittsbildern (z. B. Abb. 73) den Eindruck, dass benachbarte Kollagenfibrillen dreidimensional durch mehrere CMB-Nadeln verbunden sind. Eine dreidimensionale Rekonstruktion lag außerhalb der Möglichkeiten dieser Untersuchung, erscheint aber interessant und würde die Ergebnisse, die auf der Analyse von Längsschnitten beruhen, erweitern. In der Kornea fanden Scott und Bosworth (1990) Bindung von Glykosaminoglykanen an d-, e-, a- und c-Banden der D-Periode einer Kollagen (Typ I)-fibrille. Die Bindung an die a-Bande erfolgte durch ein keratanreiches Glykosaminoglykan. Die in der Zahnpulpa möglicherweise fehlende Bindung an die a-Bande lässt sich dahingehend interpretieren, dass in der Zahnpulpa das Decoran kein, bzw. nur sehr wenig Keratansulfat enthält. Die wesentlichen Glykosaminoglykane des Decorans der Zahnpulpa dürften somit Chondroitinsulfat und Dermatansulfat sein, die beide immunhistochemisch nachweisbar waren, wobei das Chondroitinsulfat zu überwiegen scheint, da es sich im immunhistochemischen Präparat stets in viel kräftigerer Reaktion nachweisen lässt als das Dermatansulfat. In der Kornea kommt das Dermatansulfat besonders reichlich in dünnen Corneae vor, z.B. der der Maus, in die leicht O₂ diffundiert (Scott und Bosworth, 1990). Biros et al. (2002) fanden in der Kornea regionale Unterschiede im Sulfatierungsgrad des Chondroitinsulfats. Im lockeren Bindegewebe beträgt das

Verhältnis Dermatansulfat zu Chondroitinsulfat ca. 50:50 (Brooks et al., 2002), was bereits 1995 Erlinger im Bindegewebe der Schweinelunge beobachtet hatte.

Die vorliegende Untersuchung zeigte, dass Decoran in der gesamten Zahnpulpa des Schweins vorkommt. Lichtmikroskopisch-immunhistochemisch und elektronenmikroskopisch mit Hilfe der CMB Methode fand sich das Decoran überall, wo Kollagen vorkommt. Eigenartigerweise fand Scott (1997) in der Zahnpulpa des Ratteninzisivus Decoran nur in der Peripherie der Zahnpulpa; möglicherweise enthält dieser spezielle, stets nachwachsende Zahn im Zentrum der Pulpa keine Kollagenfibrillen. Batbayal et al. (2006) fanden eine unterschiedliche Decorinverteilung in unterschiedlich alten Plazenten.

In der Literatur ging man lange davon aus, dass das Kollagenfibrillen-Proteoglykannetzwerk ganz überwiegend nur „orthogonal“ verläuft, darunter versteht man, dass zwischen den Kollagenfibrillen nur rechtwinklige, sternförmig angelegte Verbindungen herrschen. (Cribb und Scott, 1995; Erlinger et al. 1990; Scott und Thomlinson, 1998). Diese Auffassung kann im Zuge dieser Arbeit erweitert werden.

Die vorliegende Untersuchung zeigt (wie schon angedeutet), dass es CMB-Präzipitate gibt, welche sich ringförmig um die Kollagenfibrillen legen, oder die schräg oder parallel auf den Kollagenfibrillen verlaufen. Die Funktion dieser der unmittelbaren Oberfläche der Kollagenfibrillen zugeordneten Proteoglykane bleibt noch unklar. Möglicherweise weist hier das CMB andere Proteoglykane als das Decoran nach.

Im Zuge dieser Untersuchungen zeigte sich, dass größere und breitere Kollagenfibrillen vermehrt in älterem Gewebe, welches in diesen Beispielen die Dauermolaren mit einem Durchschnittsalter von 1,5 Jahren repräsentieren, vorhanden sind. Ob hier ein genereller Alterungsprozess oder ein kausaler Zusammenhang mit der alterstypischen Verkleinerung der Pulpahöhle, die u.U. veränderte funktionale Bedingungen für das Kollagen mit sich bringt, besteht, ist noch unklar. Bei Untersuchungen der Rattenhaut konnte man herausfinden, dass die Länge der Glykosaminoglykane im Alter abnimmt, wohingegen die Größe des Kernproteins bestehen bleibt. Es lässt sich vermuten dass die Längenänderung der Glykosaminoglykanketten auch zu einer Verringerung der Distanz zwischen den Kollagenfibrillen führt, wofür aber in der Zahnpulpa keine Bestätigung gefunden wurde. Es wurde vermutet, dass die Verkleinerung der Decoranmoleküle mit der Neubildung von Bindegewebe zusammenhängt und es eine Gewebereaktion auf Entzündung und Verletzung darstellt (Nomura et al., 2003).

Batbayal et al. (2006) konnten in ihren Untersuchungen an der Ratte feststellen, dass durchaus auch bei den Größen der Proteoglykane eine Altersabhängigkeit besteht. Stockwell und Scott (1965) stellten fest, dass auch die Menge der vorhandenen Proteoglykane im Alter einer steten Zunahme unterliegt.

Intrafibrillär wurden in den Kollagenfibrillen der Zahnpulpa des Schweines keine Proteoglykanpräzipitate gefunden; dies kann in anderen Geweben vorkommen (Erlinger et al., 1993) und könnte mit der Existenz von Protofibrillen zusammenhängen, die wahrscheinlich Untereinheiten der Fibrillen sind. Möglicherweise sind die Kollagenfibrillen im besonderen Kompartiment Zahnpulpa nicht aus Protofibrillen aufgebaut oder den Protofibrillen fehlt eine Verknüpfung durch Proteoglykane.

Neben dem kollagen-assoziierten Proteoglykan, also dem Decoran, kommen in der Zahnpulpa auch Proteoglykane vor, die nicht mit den Kollagenfibrillen assoziiert sind. Diese Proteoglykane besitzen im CMB-Präparat unterschiedliche Größe und Struktur (z. B. Abb. 66, 69, 71, 72), ihre Natur wurde in dieser Untersuchung nicht analysiert. Sie dürften zu einem erheblichen Teil Hyaluronan als Komponente enthalten. Die nicht-kollagenassoziierten Proteoglykane spielen quantitativ eine große Rolle in der Zahnpulpa, wie die kräftige Alcianblaufärbung zeigt.

Fibronectin ist ein großes Matrixglykoprotein, das bei der Verbindung von Zellen mit der Matrix eine entscheidende Rolle spielt. Es kommt auch in der Zahnpulpa in reichem Maße vor, wie die vorliegende Untersuchung zeigt. Es existiert in verschiedenen Isoformen und besteht aus verschiedenen Domänen (Alberts et al., 2009), die z.B. mit Integrinen der Zellmembran von Fibroblasten oder mit Kollagenfibrillen verbunden sein können. Der Reichtum an Fibronectin in der Peripherie der Zahnpulpa ist wahrscheinlich mit dem Zell- und Kollagenreichtum in der Zahnpulpa korreliert.

Die eigentümliche positive Reaktion der S-100 Proteine in den Fibroblasten der Zahnpulpa des Schweines beruht wahrscheinlich auf einer unspezifischen bzw. zufälligen Kreuzreaktion. Diese Reaktion wurde – bei gleicher Methodik – beim Menschen nicht gefunden. Protein S-100 ist eine Familie multifunktionaler Proteine, deren Aktivität kalziumabhängig ist und die Kreuzverbindungen zwischen Proteinen vermitteln (Rudolph und Schubert, 2008). S-100 wird insbesondere in Zellen exprimiert, die dem Neuroektoderm und der Neuralleiste entstammen. In der Haut reagieren melanozytäre Zellen (Rudolph und Schubert, 2008), aber auch Nerven, Langerhanszellen und Fettzellen. Außerdem reagieren auch viele neurogene, chondroge und lipomatöse Tumoren der Haut (Weiss et al., 1983). Es können aber auch dermale Stromazellen, also Fibroblasten, positiv reagieren (Chorny und Barr, 2002). Wie wohl die positive Reaktion in der

Schweinezahnpulpa vermutlich ein unspezifisches Artefakt ist, so könnte doch eine Beziehung zum, im Vergleich zum menschlichen Material, sehr jungen Alter der untersuchten Schweine bestehen. Dieser Frage könnte mit aufwendigen Kontrollen gesondert nachgegangen werden.

Ein auffälliges Phänomen ist eine ungewöhnlich stark ausgeprägte Adventitia der Arteriolen und Arterien in der Zahnpulpa sowohl des Schweines als auch des Menschen (siehe z. B. Abb. 6, 9, 13, 38, 39, 41, 45, 55). Diese Adventitia besteht überwiegend aus Kollagenfasern, die aus Typ I Kollagen aufgebaut sind (kräftige Blaufärbung im Azanpräparat, kräftiger immunhistochemischer Nachweis des Kollagen vom Typ I) jedoch kommen hier zusätzlich Kollagenfasern vom Typ III vor. In einzelnen Arterien ist die Wand ungewöhnlich zellreich (z. B. Abb. 6), wobei nicht immer klar zu erkennen war, ob es sich bei den Zellen um Fibrozyten, oder um relativ kleine, oft verzweigte Muskelzellen handelt. Die Morphologie der relativ zarten Zellen spricht dafür, dass es sich um Fibrozyten handelt. Diese Zellen können 7 – 8 Schichten aufbauen. Der biologische Sinn solcher zellreichen Adventitia bleibt unklar. Der Kollagenreichtum könnte zu einer Verfestigung der Gefäßwand führen, die zu einer Dämpfung des Pulses in der engen Pulpahöhle führen könnte. Ein starker Puls könnte von sensiblen Nervenfasern registriert werden und zu Missempfindungen führen. Die mit immunhistochemischen Methoden nachgewiesenen Nerven sind meistens nicht mit Blutgefäßen assoziiert und vermutlich sensorische Fasern.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Untersuchung wurde das Gewebe der Zahnpulpa des Schweines im Vergleich mit der Pulpa von Zähnen des Menschen mit verschiedenen histologischen, histochemischen, immunhistochemischen und elektronenmikroskopischen Methoden untersucht. Zahnpulpa von Mensch und Schwein sind sehr ähnlich aufgebaut und bestehen aus verzweigten Fibroblasten und reich entwickelter Matrix, in der erstaunlich viele Blutgefäße und auch Nerven vorkommen. Kleine Unterschiede zwischen den zwei Säugetierarten, wie z.B. vermehrter Kollagengehalt beim Menschen, hängen vermutlich damit zusammen, dass das untersuchte Material vom Menschen mindestens 30 Jahre alten Zähnen entstammte, wohingegen das Material vom Schwein maximal 2 Jahre alten Zähnen entstammte.

Beim Schwein wurden keine konstanten Unterschiede im Aufbau der Zahnpulpa von Milch- und Dauerzähnen beobachtet.

Die Matrix der Pulpa enthält ein dichtes dreidimensionales Netzwerk aus meistens feinen Kollagenfasern. In der Pulpaperipherie und in der Umgebung von Arterien bzw. Arteriolen und Nerven sind Kollagenfasern besonders konzentriert. Immunhistochemisch bestehen diese Fasern aus Kollagen vom Typ III und Kollagen vom Typ I. Typische retikuläre Fasern lassen sich lichtmikroskopisch nur unbefriedigend und wohl nur teilweise mit den histologischen Silberimprägnationsmethoden nachweisen. Elastische Fasern fehlen in der Matrix.

Fibronectin kommt in der gesamten Zahnpulpa vor und ist in der zellreichen Peripherie in reichem Maße vertreten als im Zentrum der Pulpa.

Die Substrathistochemie (PAS-Reaktion, Alcianblau-Färbung) zeigt, dass die Zahnpulpa in mäßigem Umfang neutrale Glykoproteine, aber in reichem Maße anionische Proteoglykane enthält, deren Glykosaminoglykane mehrheitlich Chondroitinsulfat und Dermatansulfat sind.

Decorin (= Decoran) kommt in reichem Maße in einem sehr regelmäßigen Lokalisierungsmuster vor, und verbindet in regelmäßigen Abständen benachbarte Kollagenfibrillen. Das Muster der regelmäßigen Brücken aus Glykosaminoglykanketten zwischen Kollagenfibrillen entspricht dem Konzept der „Shape-modules“, das in Bindegewebstypen mit ganz anderen biomechanischen Funktionen, als sie in der Zahnpulpa herrschen, erarbeitet wurde, und das offenbar ganz universell gilt.

S-100 und Neurofilament-Protein markieren gut kleine Nerven.

Der kationische kupferhaltige Farbstoff „Cupromeronic Blue“ markiert im elektronenmikroskopischen Präparat scharf die Glykosaminoglykane von Proteoglykanen. In der Matrix kommen kollagen- und nicht-kollagenassoziierte Proteoglykane vor. Das typische kollagenassoziierte Proteoglykan ist das Decoran (= Decorin), das in anderen Bindegeweben an d- und e-Bande und z. T. zusätzlich an die a- und e-Bande der D-Periode der Kollagenfibrillen bindet. Die Bindungsstellen können am Kollagen der Zahnpulpa nicht genau ermittelt werden; es scheint aber ein komplexes dreidimensionales Muster vorzuliegen. Sehr häufig wurden in der Zahnpulpa auf Längsschnitten durch Kollagenfibrillen nur eine Decoran-„Brücke“ pro D-Periode beobachtet. Neben Decoran, das die benachbarten Kollagenfibrillen verbindet bzw. auf Abstand hält, kommen Proteoglykane vor, die ringförmig oder parallel oder schräg zur Längsachse der Kollagenfibrillen verlaufen.

Nicht-kollagenassoziierte Proteoglykane kommen in unterschiedlicher Größe und Struktur in der Pulpamatrix vor.

Curriculum Vitae

Name: Stumpf
Vorname: Stephanie Katrin
Anschrift: ohne Angaben
Geboren: ohne Angaben
Eltern: ohne Angaben
Geschwister: ohne Angaben

Bildungsweg:

2000-2006: Ludwig-Maximilians-Universität München
Studium der Zahnmedizin
1991-2000: Gymnasium (ohne Angaben)
1987-1991: Hauptschule (ohne Angaben)

Danksagung

Hiermit danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ulrich Welsch (Lehrstuhl II, Anatomische Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München) für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeiterinnen am Lehrstuhl II der Anatomischen Anstalt für die Mithilfe bei der Anfertigung der histologischen, histochemischen und elektronenmikroskopischen Präparate insbesondere bei Frau Sabine Tost, Frau Claudia Köhler, Frau Andrea Asikoglu und Frau Pia Unterberger. Ein besonderer Dank geht auch an Frau PD Dr. rer. nat. Mechthild Stöckelhuber, (jetzt TU München) für viele Hinweise zur Literatur.

Des Weiteren möchte ich diese Doktorarbeit meinem verstorbenen Großvater Herrn Andreas Stumpf sen. widmen, der mich schon in meiner frühesten Kindheit sehr geprägt hat und immer den allerhöchsten Wert in der Ausbildung und der Verwirklichung der eigenen Träume und Ziele gesehen hat. Danke!

Literaturverzeichnis

Alberts B, Johnson A, Walter P, Lewis J, Raff M, Roberts K: Molecular Biology of the Cell
Taylor & Francis, 5th Revised edition (2009)

Abdul-Malak, OA: Licht- und elektronenmikroskopischer Nachweis von Endostatin der Kollagene
Typ XV und Typ XIX während der embryonalen und fetalen Entwicklung der Maus
Dissertation, Göttingen (1999)

Baccetti B: High resolutions on collagen of echinodermata.
Monitore Zoologico Italiano (N.S.): 1: 201-206 (1967)

Balduini C, De Luca G, Passi A, Rindi S, Salvini R, Scott JE: Effect of oxygen tension and lactate
concentration on keratan sulphate and chondroitin sulphate biosynthesis in bovine cornea
Biochim Biophys Acta. 1115(3): 187-191 (1992)

Bargmann W: Histologie und Mikroskopische Anatomie des Menschen
Thieme Verlag Stuttgart, New York, 7. Auflage (1977)

Bartold PM, Moule AJ, Li H, Rigby P: Isolation and characterization of the proteoglycans synthesized
by adult human pulp fibroblasts in vitro
Int Endod J. 28(3): 163-171 (1995)

Batbayal T, Ishii Y, Nomura Y, Watanabe M, Yasuko T, Nakamura S: Change in decorin during aging
of rat placenta
Connect Tissue Res. 47(4): 235-241 (2006)

Biros DJ, Brooks DE, Brown MP, Merritt KA, Kubilis PS: Regional and zonal variations in the sulfation patterns of chondroitin sulfate in normal equine corneal stroma

Am J Vet Res.63(1): 143-147 (2002)

Bloom W, Fawcett DW: A Textbook of Histology

10th edn. W.B. Saunders, Philadelphia (1975)

Brooks SA, Dwek MV, Schumacher U: Functional and molecular Glycobiology

Bios Scientific Publishers Ltd. Oxford (2002)

Chorny JA, Barr RJ: S-100-positive spindle cells in scars: a diagnostic pitfall in the re-excision of desmoplastic melanoma.

Am J Dermatopathol 24(4):309-12 (2002)

Cribb AM, Scott JE: Tendon response to tensile stress: an ultrastructural investigation of collagen: proteoglycan interactions in stressed tendon.

J.Anat. 187: 423-428 (1995)

Drenckhahn D: Bindegewebe. In : Benninghoff A, Drenckhahn D: Anatomie des Menschen. Band 1: Zelle, Gewebe, Entwicklung, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem

Elsevier, München, 17. Auflage (2008)

Eifinger F: Die Mikromorphologie der menschlichen Zahnpulpa

Hanser, München (1970)

Erlinger R, Schumacher U, Welsch U: Ultrastructural localization of glycosaminoglycans in the human mammary gland

Acta Histochem Suppl. 40: 65-70 (1990)

Erlinger R, Welsch U, Scott JE: Ultrastructural and biochemical observations on proteoglycans and collagen in the mutable connective tissue of the feather star *Antedon bifida* (Echinodermata, Crinoidea)

J Anat. 183(1): 1-11 (1993)

Erlinger R: Glycosaminoglycans in porcine lung: an ultrastructural study using Cupromeronic Blue
Cell Tissue Res 281: 473-483 (1995)

Erlinger R, Willershausen-Zönnchen B, Welsch U: Ultrastructural localization of glycosaminoglycans in human gingival connective tissue using Cupromeronic blue

J Periodont Res 30: 108-115 (1995)

Galeotti F, Fallai S, Pagavino G, Pierleoni P, Romagnoli P: The intercellular substance of the pulp of human fully erupted permanent premolar teeth

Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschung Leipzig 104(4): 657-665 (1990)

Geis-Wellnhofer S: Entkalkungs- und Färbemethoden der Zahnpulpa beim Göttinger Miniaturschwein
Dissertation, Regensburg (1992)

Harlamb SC, Messer HH: The identification of proteoglycan-associated mRNAs in human dental pulp cells

Arch Oral Biol.41(11): 1097-1100 (1996)

Haverkamp R, Williams MW, Scott JE: Stretching single molecules of connective tissue glycans to characterise their shape-maintaining elasticity.

Biomacromolecules 6:1816-1818 (2005)

Heinzeller T, Welsch U: Crinoidea

Microscopic Anatomy of Invertebrates, 14: Echinodermata: 9-148 (1994)

Hellwig E: Einführung in die Zahnheilkunde

Urban und Fischer Verlag, 3. Auflage (2003)

Hidaka M, Takahashi K: Fine structure and mechanical properties of the catch apparatus of the sea urchin spine, a collagenous connective tissue with muscle-like holding capacity.

Journal of Experimental Biology 103: 1-14 (1983)

Holland ND, Grimmer JC: Fine structure of the cirri and a possible mechanism for their motility in stalkless crinoids (Echinodermata)

Cell and Tissue Research 214: 207-217 (1981)

Hrala BP: Kollagene im marginalen Weichgewebe von Zahn und Implantat

Dissertation, Erlangen-Nürnberg (1999)

Junqueira LC, Carneiro J, Kelley R: Histologie

Springer-Verlag Berlin Heidelberg 5. Auflage (2002)

Kemp TS: The Origin and Evolution of Mammals.

Oxford: Oxford University Press: 1-331 (2005)

Kühn K: The classical collagens: types I, II and III. In: Structure and Function of Collagen Types (ed. R. Mayne & R.E. Burgeson)

Academic Press Orlando (1987)

Leblond CP, Warshawsky H: Dynamics of enamel formation in the rat incisor tooth

J Dent Res.58: 950-75 (1979)

Leonhardt H: Histologie, Zytologie und Mikroskopische Anatomie des Menschen

Thieme Stuttgart, New York, 6. Auflage, (1981)

Linnemann M, Kühl M: Biochemie für Mediziner

Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig/Wiesbaden: 171-202, 704-716 (1999)

Löffler G, Petrides W: Biochemie und Pathobiochemie

Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1998)

Löffler G: Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie

Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 85-144, 663-676 (2001)

Lüllmann-Rauch R: Taschenbuch der Histologie

Thieme Verlag, Stuttgart, 3. Auflage (2009)

Matheson S, Larjava H, Hakkinen L: Distinctive localization and function for lumican, fibromodulin and decorin to regulate collagen fibril organization in periodontal tissues

J Periodontal Res. 40(4): 312-324 (2005)

Mayne R, Burgeson RE: Structure and function of collagen types

Academic Press, Inc.(1987)

Meyer DL: The collagenous nature of problematic ligaments in crinoids (Echinodermata)

Marine Biology 9: 235-241 (1971)

Michel G: Kompendium der Embryologie der Haustiere

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1972)

Nomura Y, Abe Y, Ishii Y, Watanabe M, Kobayashi M, Hattori A, Tsujimoto M: Structural changes in the glycosaminoglycan chain of rat skin decorin with growth

J Dermatol 30(9): 655-664 (2003)

Orgel JPRO, Eid A, Antipova O, Bella J, Scott JE: Decorin Core Protein (Decoron) Shape Complements Collagen Fibril Surface Structure and Mediates its Binding

PLoS ONE 4(9): e7028 (2009)

Romeis B: Mikroskopische Technik

Urban & Schwarzenberg 17. Auflage, Hrsg.: Böck P, München (1989)

Rudolph P, Schubert Ch: Melanozytäre Läsionen

in Klöppel G et al.: Pathologie: Kopf-Hals-Region, Weichgewebstumoren, Haut

Springer Verlag, Berlin, 3. Auflage (2008)

Schnorr B: Embryologie der Haustiere, 2. Auflage,

Stuttgart Enke Verlag (1989)

Schroeder HE: Orale Strukturbiologie

Thieme-Verlag Stuttgart (2000)

Scott JE: Collagen-Proteoglykan Interactions: Localization of proteoglycans in tendon by electron microscopy

Biochem. J. 187: 887-891 (1980)

Scott JE: Proteoglycan histochemistry - a valuable tool for connective tissue biochemists.

Coll Rel Res 5: 541-598 (1985)

Scott JE: Proteoglycan-fibrillar collagen interactions

Biochem. J. 252: 313-323 (1988)

Scott JE, Haigh M: Identification of specific binding sites for keratan sulphate proteoglycans and chondroitin-dermatan sulphate proteoglycans on collagen fibrils in cornea by the use of cupromeronic blue in 'critical-electrolyte-concentration' techniques.

Biochem. J 253: 607–610 (1988)

Scott JE: Proteoglycan: collagen interactions and subfibrillar structure in collagen fibrils. Implications in the development and ageing of connective tissues

J. Anat. 169: 23-35 (1990)

Scott JE, Bosworth TR: A comparative biochemical and ultrastructural study of proteoglycan-collagen interactions in corneal stroma. Functional and metabolic implications.

Biochem J 270(2): 491-497 (1990)

Scott JE: Proteoglycan: collagen interactions in connective tissues. Ultrastructural, biochemical, functional and evolutionary aspects

Int. J. Biol. Macromol. 13 (1991)

Scott JE: The nomenclature of glycosaminoglycans and proteoglycans.

Glycoconjugate Journal 10:419-421 (1993)

Scott JE: Extracellular matrix, supramolecular organisation and shape

J. Anat. 187: 259-269 (1995)

Scott JE, Tenni R: Osteogenesis Imperfecta Mutations May Probe Vital Functional Domains (e.g. Proteoglycan Binding Sites) of Type 1 Collagen Fibrils.

Cell Biochemistry and Function 15: 283-286 (1997)

Scott JE, Dyne KM, Thomlinson AM, et al.: Human cells unable to express decoron produced disorganized extracellular matrix lacking „shape modules“ (interfibrillar proteoglycan bridges).

Exp Cell Res 243:59-66 (1998)

Scott JE, Thomlinson AM: The structure of interfibrillar proteoglycan bridges ("shape modules") in extracellular matrix of fibrous connective tissues and their stability in various chemical environments.

J Anat 192 (3):391-405 (1998)

Scott JE: Structure and function in extracellular matrices depend on interactions between anionic glycosaminoglycans.

Pathol Biol 49(4): 284-289 (2001)

Scott JE: The first and second "laws" of chemical morphology, exemplified in mammalian extracellular matrices.

Eur J Histochem 46(2): 111-124 (2002)

Scott JE, Heatley F: Biological Properties of Hyaluronan in Aqueous Solution Are Controlled and Sequestered by Reversible Tertiary Structures, Defined by NMR Spectroscopy.

Biomacromolecules 3:547-553 (2002)

Scott JE: Elasticity in extracellular matrix "shape modules" of tendon, cartilage, etc. A sliding proteoglycan-filament model

J Physiol. 553(2): 335-343 (2003)

Scott JE, Thomlinson AM, Prehm P: Supramolecular organization in streptococcal pericellular capsules is based on hyaluronan tertiary structures.

Exp Cell Research 285:1-8 (2003)

Scott JE: Our Elastic Shape is Held Together by Carbohydrate Strings. Implications for The Aetiology of Osteoarthritis

Biosynthesis, Structure, and Degradation-1 Session 1 Satellite Symposium of IUBMB (2006)

Scott JE, Stockwell RA: Cartilage elasticity resides in shape module decoran and aggrecan sumps of damping fluid: implications in osteoarthritis.

J Physiol 574(3): 643-650 (2006)

Scott JE, Wigley RD: Cartilage is Held Together by Elastic Carbohydrate Strings. Implications in Osteoarthritis

The Journal of Rheumatology 34(1):8-9 (2007)

Scott JE: Cartilage is held together by elastic glycan strings. Physiological and pathological implications.

Biorheology 45(3-4): 209-217 (2008)

Sreenath T, Thyagarajan T, Hall B, Longenecker G, D`Souza R, Hong S, Wright JT, MacDougall M, Sauk J, Kulkarni AB: Dentin sialophosphoprotein knockout mouse teeth display widened pre-dentin zone and develop defective dentin mineralization similar to human dentinogenesis imperfecta type III

J Biol Chem 278(27): 24874-24880 (2003)

Stockwell RA, Scott JE: Observations on the acid glycosaminoglycan (mucopoly: saccharide) content of the matrix of ageing cartilage.

Ann Rheum Dis 24: 341-350 (1965)

Ten Cate AR: Oral Histology

The C.V. Mosby Company, St. Louis-Toronto-Princeton (1985)

Tenorio DM, Santos MF, Zorn TM: Distribution of biglycan and decorin in rat dental tissue

Braz J Med Biol Res. 36(8): 1061-1065 (2003)

Trotter JA, Koob TJ: Collagen and proteoglycan in a sea urchin ligament with mutable mechanical properties

Cell and Tissue Research 258: 527-539 (1989)

Unno H, Swzuki H, Nakamura-Oghima K, Jung H-S, Oshima H: Pulpal Regeneration Following Allogenic Tooth Transplantation into Mouse Maxilla.

The Anatomical Record 292: 570-579 (2009)

Weindl N: Proteoglykane und Kollagenfibrillen in der extrazellulären Matrix der Zahnpulpa des Menschen.

Dissertation an der medizinischen Fakultät der LMU München (2005)

Weiss L: Histology. Cell and Tissue Biology

Elsevier Science Publishing, New York: 5. Auflage (1983)

Welsch U, Erlinger R, Potter IC: Proteoglycans in the notochord sheath of lampreys

Acta Histochem. 91(1): 59-65 (1991)

Welsch U, Erlinger R, Storch V: Glycosaminoglycans and fibrillar collagen in Priapulida: a histo- and cytochemical study

Histochemistry 98(6): 389-397 (1992)

Welsch U: Lehrbuch Histologie

Elsevier Verlag, München, 2. Auflage (2006)

Wilkie JC: Design for disaster: the ophiuroid intervertebral ligament as a typical mutable collagenous structure

Echinoderm Biology (ed. R.D. Burke, P.V. Mladenov, P. Lambert & R.P. Parsley), Rotterdam: Balkema 25-38 (1988)