

**Proteoglykane und Kollagenfibrillen in der extrazellulären Matrix
der Zahnpulpa des Menschen**

Eine licht- und elektronenmikroskopische Studie

Natalie Weindl

Aus der Anatomischen Anstalt der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Ulrich Welsch

**Proteoglykane und Kollagenfibrillen in der extrazellulären Matrix
der Zahnpulpa des Menschen**

Eine licht- und elektronenmikroskopische Studie

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Natalie Weindl
aus
Ingolstadt
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
Der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. U. Welsch

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Chr. Benz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 26. 07. 2005

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Kollagene und Proteoglykane in der Zahnpulpa des Menschen – Stand der Forschung	3
2.1. Verteilung der Kollagene in der menschlichen Zahnpulpa	3
2.2. Zusammensetzung und Verteilung der Proteoglykane in der menschlichen Zahnpulpa	5
2.3. Die Bindungstheorie von J. E. Scott	11
3. Bisherige Untersuchungen zum Bindegewebe der Zahnpulpa von Mensch und Tier	15
3.1. Lichtmikroskopische Untersuchungen	15
3.2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen	17
4. Färbungen mit Cupromeronic Blue (CMB)	20
5. Fragestellung	24
6. Material und Methoden	25
6.1. Färbungen für die Lichtmikroskopie	26
6.1.1. Hämalaun-Eosin-Färbung	27
6.1.2. Goldner-Färbung	28
6.1.3. Masson-Trichrom-Färbung	29
6.1.4. Azan-Färbung	30
6.1.5. Alzianblau-Färbung	31
6.1.6. PAS-Färbung	32
6.1.7. Immunhistochemische Färbungen	33
6.2. Elektronenmikroskopie	37
6.2.1. Transmissionselektronenmikroskopie ohne CMB-Färbung	37
6.2.2. Transmissionselektronenmikroskopie mit CMB-Färbung	39

7. Ergebnisse	41
7.1. Auswertung der lichtmikroskopischen Bilder	41
7.1.1. Hämalaun-Eosin	42
7.1.2. Goldner	42
7.1.3. Masson-Trichrom	43
7.1.4. Azan	43
7.1.5. Alzianblau	44
7.1.6. PAS	44
7.1.7. Toluidinblau	45
7.1.8. Immunhistochemie	45
7.2. Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder	51
7.2.1. Routine-TEM und TEM mit CMB – Ein Vergleich	51
7.2.2. Darstellung der Kollagenfibrillen	52
7.2.3. Darstellung der Proteoglykane	53
7.2.4. Nebenbefunde	54
7.2.5. Vermessungen der extrazellulären Matrix	55
7.2.6. Entwicklung eines 3-D-Modells der extrazellulären Matrix	73
8. Diskussion	78
9. Zusammenfassung	84
10. Literaturverzeichnis	86

1. Einleitung

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es, Proteoglykane und Kollagenfibrillen in der extrazellulären Matrix der gesunden Zahnpulpa im Dauergebiss des Menschen zu charakterisieren.

Die menschliche Zahnpulpa wurde in den letzten Jahren und Jahrzehnten auf verschiedene Aspekte hin mit unterschiedlichen morphologischen Methoden untersucht. So gab es z. B. eine Reihe von licht- und elektronenmikroskopischen Darstellungen der Gefäße (Kramer, 1960, Eifinger, 1970, Ripper, 1989), des Nervengewebes (Eifinger, 1970) und verschiedener Zelltypen (Seltzer und Bender, 1965). Bindegewebestrukturen wie kollagene Fasern wurden dabei eher als Nebenbefunde beschrieben.

Nach bisher vorliegenden Kenntnissen ist die Zahnpulpa aus „gallertigem“, relativ ursprünglichem Bindegewebe aufgebaut (Bargmann, 1968). Dieses besteht aus kollagenen Fasern, hauptsächlich der Typen I und III, und aus einer wasserreichen, gelartigen Grundsubstanz, „die eine Reihe verschiedener Glykosaminoglykane (hexosaminohaltige Chondroitinsulfate, Hyaluronsäure und Glutaminsäure enthaltene Komplexe) wie auch Glykoproteine, Dermatansulfat und Proteoglykane enthält“ (Schroeder, 2000).

J. E. Scott hat 1988 eine Färbemethode mit Cupromeronic Blue (= CMB) für die Elektronenmikroskopie entwickelt, mit der sich die Proteoglykan-Komplexe *in situ* genau darstellen lassen. Der Farbstoff Cupromeronic Blue ähnelt in seinen Eigenschaften und in seiner Spezifität dem bekannten Farbstoff Alzianblau, ist aber im Transmissionselektronenmikroskop kontrastreicher, so dass die markierten Makromoleküle scharf abgesetzt hervortreten. Dabei werden die negativ geladenen Proteoglykane von dem elektronendichten kupferhaltigen Farbstoff bedeckt und somit sichtbar gemacht. Mit dieser Methode fand Scott in der Sehne des M. flexor digitorum des fetalen Kalbes Proteoglykane mit Chondroitinsulfat und Dermatansulfat, die in regelmäßigen Abständen an die Kollagenfibrillen angeheftet sind (Scott, 1991, 2000). Diese Proteoglykane werden auch Decorine genannt. Da die Querstreifung der Kollagenfibrillen im Transmissionselektronenmikroskop deutlich

zu erkennen ist, ergibt sich ein immer wiederkehrendes Muster, ähnlich wie bei den quergestreiften Muskelzellen.

1991 entdeckte Scott im Gewebe von Sehnen einen Zusammenhang zwischen dem periodischen Bandenmuster und den an die Fibrillen angelagerten Proteoglykanen; so bindet z. B. Chondroitinsulfat immer an die gleiche Stelle in der Abfolge der Banden.

In dieser Dissertation wird die menschliche Zahnpulpa mit verschiedenen licht- und elektronenmikroskopischen Methoden untersucht, wobei die CMB-Methoden nach Scott (1988, 1991) und die Modifikation nach Erlinger (1995) im Vordergrund stehen. Zum ersten Mal wird in dieser Studie das Bindegewebe der Zahnpulpa mit Cupromeronic Blue angefärbt und analysiert. Im Vergleich mit früheren Arbeiten zur Charakteristik der Proteoglykan- und Kollagenassoziation in anderen Geweben (z. B. Scott, 1991, Erlinger, 1995, Erlinger et al. 1990, 1995, Welsch et al. 1992) sollen hier in der Zahnpulpa die verschiedenen Proteoglykane und Glykosaminoglykane in ihrer unterschiedlichen Verteilung nachgewiesen und charakterisiert werden. Außerdem wird ein räumliches Modell der extrazellulären Matrix in der menschlichen Zahnpulpa vorgestellt.

2. Kollagene und Proteoglykane in der Zahnpulpa des Menschen, Stand der Forschung

2.1. Verteilung der Kollagene in der menschlichen Zahnpulpa

Kollagenfasern der Zahnpulpa werden sowohl von Fibroblasten als auch von Odontoblasten gebildet (Geis-Wellnhofer, 1992, Ten Cate, 1985). Bis heute sind insgesamt rund zwanzig Kollagentypen bekannt (Scott, 1988, Löffler und Petrides, 1998, Hrala, 1999) und es werden immer noch neue entdeckt (Abdul-Malak, 1999). Sie werden mit römischen Ziffern durchnummieriert.

Die Typen I-III, V und XI bilden ultrastrukturell erkennbare Fibrillen, die sich zu Bündeln („Fasern“) zusammenlagern, die anderen Kollagene bilden keine Fibrillen (Lukinmaa und Waltimo, 1991, Wähner, 1998, Kleeberger, 1999, Abdul-Malak, 1999).

In der menschlichen Zahnpulpa wurden bisher kollagene Fibrillen der Typen I, III, V und VI gefunden. Am häufigsten ist Typ III Kollagen anzutreffen; sein Anteil liegt bei 30-45% des Gesamtkollagens (Schroeder, 2000). Danach folgt das Typ I Kollagen, das im lockeren Bindegewebe anderer Organe meistens zusammen mit dem Typ III Kollagen auftritt (Erlinger et al., 1995). Der Anteil von Typ V und Typ VI Kollagen ist sehr gering, wobei diese Strukturen sich bevorzugt in der Nähe von Blutgefäßen aufhalten (Lukinmaa und Waltimo, 1991). Shuttleworth et al. wiesen 1992 die Anwesenheit von Typ VI Kollagen in der Zahnpulpa nach, indem sie vorher alle anderen fibrillenbildenden Kollagentypen durch bakterielle Kollagenase beseitigten.

Zur räumlichen Anordnung der Kollagenfibrillen in der Zahnpulpa gibt es von einigen Autoren Hinweise. Søgaard-Pedersen et al. fanden 1990 durch elektronenmikroskopisches Scannen zahlreiche kollagene Fibrillen, die jedoch an den meisten Orten keine einheitliche Orientierung erkennen ließen.

Andere Autoren, die sich mit dem Thema beschäftigten, fanden vermehrt kollagene Fibrillen in der Nähe von Blutgefäßen und am Wurzelapex; so schrieb Ten Cate 1985: „The greatest concentration of collagen is generally seen in the most apical portion of the pulp.“ Ebenso befinden sich viele Fibrillen in der Odontoblastenschicht,

die teilweise bis ins Prädentin ziehen (Eifinger, 1970). Die zwischen den Odontoblasten verlaufenden Fibrillen werden von Eifinger (1970) ungewöhnlicherweise auch von Korff'sche Fasern genannt. Andere Autoren (Schroeder, 2000, Schiebler et al., 1997) dagegen schreiben, von Korff'sche Fasern seien Kollagenfasern, die sich im Manteldentin an der Schmelz-Dentin-Grenze befinden. Allerdings ist ihre Existenz bis heute umstritten. Schroeder (2000) behauptet sogar, von Korff'sche Fasern seien „möglicherweise nichts anderes als eine Anhäufung von Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen, die histochemisch Faserstrukturen vortäuschen“.

Die Menge der Kollagenfibrillen ist nicht nur topographisch unterschiedlich, sondern auch vom Alter abhängig. Im Laufe des Lebens nimmt die Zahl der Zellen in der Pulpa zugunsten der Fibrillen ab (Eifinger, 1970, Geis-Wellhofer, 1992). Laut Schroeder (2000) vermehrt sich aber nur die Fibrillenmenge im Bereich der Wurzelpulpa, während die Kronenpulpa keinen Anstieg an Kollagenen verzeichnet. Bemerkenswert ist ebenfalls, dass die Pulpa der Inzisivi dichter mit Kollagen bepackt ist als die der Prämolaren und Molaren (Schroeder, 2000).

Kollagenfibrillen erfüllen Stützfunktionen, sie haben demzufolge überwiegend mechanische Aufgaben. Die relativ enge Zahnpulpa ist jedoch von Hartgewebe umgeben. Weshalb also enthält sie so viele Kollagenfibrillen in bestimmter räumlicher Anordnung?

Diese Frage soll uns weiterhin beschäftigen.

2.2. Zusammensetzung und Verteilung der Proteoglykane in der Zahnpulpa des Menschen

Proteoglykane sind aus Sacchariden und einem einfach gebauten Protein, auch Core-Protein genannt, zusammengesetzt (Löffler, 1998). Dabei bildet das Core-Protein die zentrale Hauptkette, von der viele Saccharide abzweigen und sich in alle Richtungen erstrecken. Die zuckerhaltigen Strukturen sind die Glykosaminoglykane (GAGs), die aus einer Kette sich immer wiederholenden Disaccharideinheiten, meistens einem Hexosamin und einer Glucuronsäure, bestehen (Löffler, 1998). Sie sind über o-glykosidische oder n-glykosidische Bindungen mit dem Core-Protein assoziiert. Diese Makromoleküle können aufgrund ihrer Eigenschaften gut Wasser und Kationen binden, und somit die Permeabilität im Extrazellularraum beeinflussen (Löffler, 1998). Es wird spekuliert, ob Proteoglykane durch ihre Fähigkeit zur Kalziumbindung die Verkalkung der extrazellulären Matrix verhindern können (Cohen, 1987).

Glykosaminoglykane besitzen Sulfat- und Carboxylgruppen und weisen deshalb einen sauren Charakter auf. Es lassen sich verschiedene Glykosaminoglykane bestimmen, die sich in den Disacchariden und dem Vorhandensein von Sulfat- oder Carboxylgruppen unterscheiden.

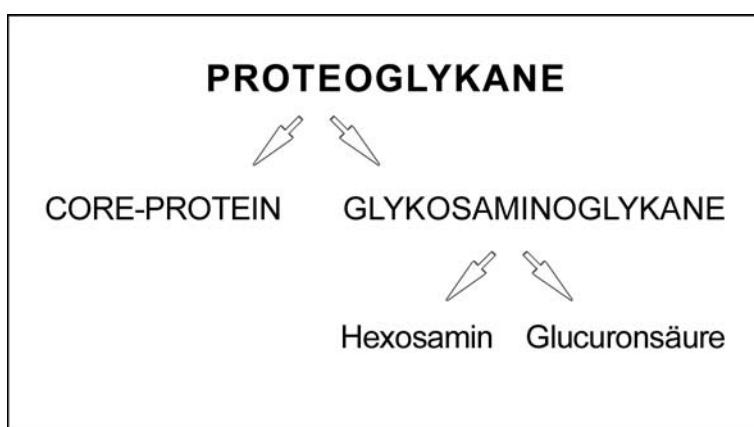


Abb. 1: Aufbauschema der Proteoglykane

Heparansulfat (HS) / Heparin:

Heparane sind aus D-Glucuronsäure, L-Iduronsäure und den Glukosaminen 2-Desoxy-2-acetamido- oder 2-Desoxy-2-sulfatamato-glucose aufgebaut. Diese sind 1→ 4 glykosidisch miteinander verknüpft (Scott, 1988):

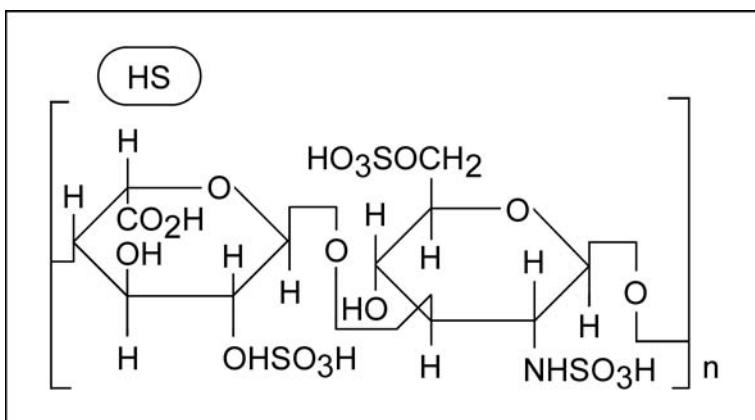


Abb. 2: Strukturformel des Heparansulfates (HS)

Dieses Glykosaminoglykan hat ein paar bemerkenswerte Eigenschaften; Heparansulfat hemmt die DNA-Synthese, wie Winterbourne und Salisbury 1981 herausfanden, und kann eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Zellwachstums spielen (Erlinger 1995). In Basalmembranen besitzt es bekannterweise Filterfunktionen. Erlinger et al. (1991) und Erlinger (1995) gelang es, dieses GAG in den Basalmembranen von Epithelien adulter Schweinelungen sichtbar zu machen. Ebenso kommt Heparansulfat auch am Rande von elastischen Fasern vor (Erlinger et al., 1991).

Mit dem Enzym Heparinase lässt sich Heparansulfat verdauen und somit nachweisen.

In der menschlichen Zahnpulpa sind Heparansulfate im Vergleich zu anderen GAGs eher selten; sie wurden lichtmikroskopisch in Regionen mit dicken Kollagenfaserbündeln nachgewiesen (Galeotti et al., 1990), wobei unklar bleibt, mit welchen Strukturen sie assoziiert sind.

Keratansulfat (KS):

Keratane enthalten N-Acetylglucosamine und D-Galaktose, die glykosidisch miteinander durch 1→3 oder 1→4 Bindungen verknüpft sind (Scott, 1988). Ebenso können auch Mannose, Fucose und Sialsäure darin auftreten. Die Strukturformel sieht folgendermaßen aus:

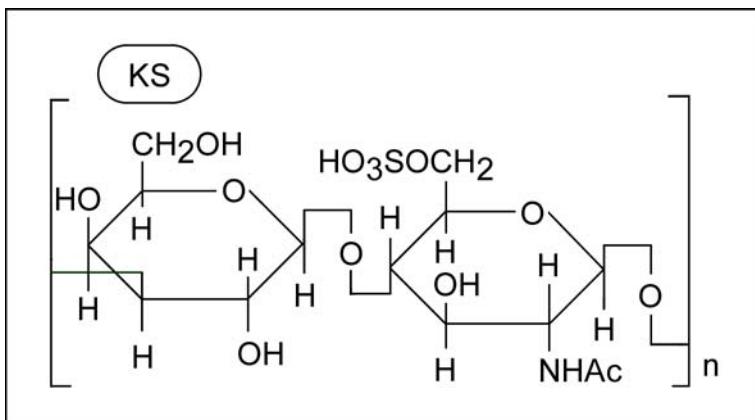


Abb. 3: Strukturformel des Keratansulfates (KS)

Keratan ist das einzige nicht carboxylierte Glykosaminoglykan (Scott, 1991, Erlinger, 1992).

Gemäß Löffler und Petrides (1998) kommt es ausschließlich in der Cornea und im Knorpel vor, was jedoch nicht zutrifft.

In der Zahnpulpa befindet es sich angeblich genauso wie Heparansulfat nur in der Nähe größerer Kollagenfaserbündel (Galeotti et al., 1989). Eine eindeutige Funktion ist bis heute nicht bekannt.

Chondroitinsulfat (CS-4, CS-6):

Die Chondroitinsulfate bestehen aus N-Acetyl-galactosamin und D-Glucuronsäure (Scott, 1988). Man unterscheidet das Chondroitin-4-sulfat (= Chondroitinsulfat A) und das Chondroitin-6-sulfat (Chondroitinsulfat C):

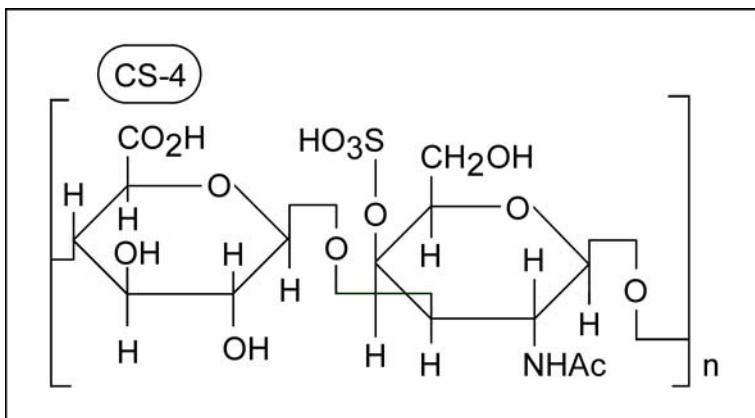


Abb. 4a: Strukturformel des Chondroitin-4-sulfates (CS-4)

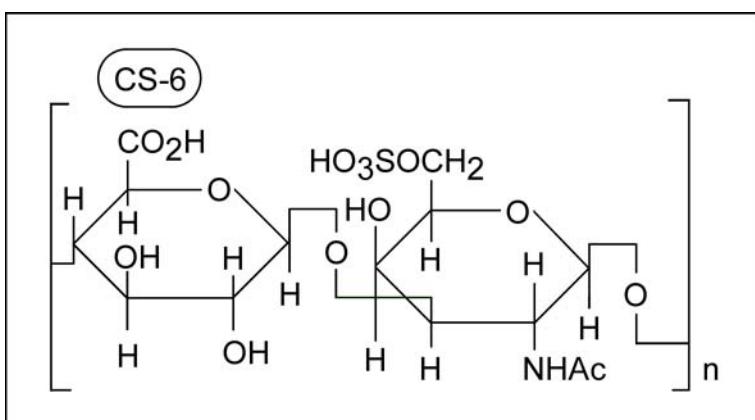


Abb. 4b: Strukturformel des Chondroitin-6-sulfates (CS-6)

Chondroitine sind Bestandteile von Knorpel, Hornhaut, Haut und Bindegewebe innerer Organe (Löffler und Petrides, 1998). In der menschlichen Zahnpulpa sind nur wenige Chondroitinsulfate im Vergleich zur gesamten Menge der GAGs anzutreffen, diese aber dafür überall im Gewebe (Galeotti et al., 1989).

Sie werden durch die Enzyme Chondroitinase AC und ABC gespalten und können somit nachgewiesen werden (Scott, 1988, Erlinger, 1995).

Dermatansulfat (DS):

Das Dermatansulfat ist eine abgewandelte Form des Chondroitinsulfates. Deshalb nennt man es auch Chondroitinsulfat B. Charakteristisch ist hier eine L-Iduronsäure, die in den anderen CS nicht vorkommt (Scott, 1991):

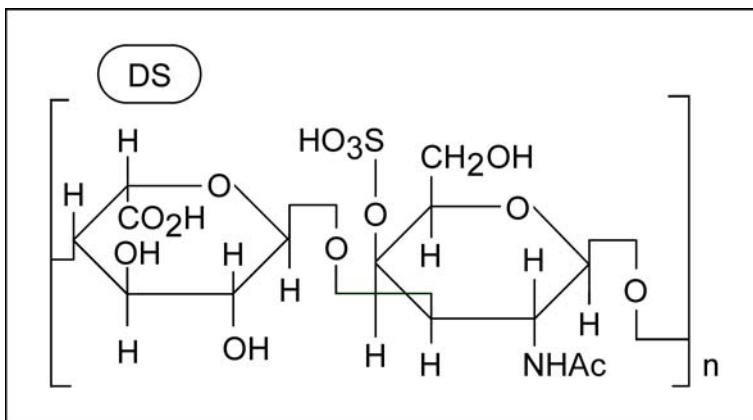


Abb. 5: Strukturformel des Dermatansulfates (DS)

Dermatane lassen sich durch die Chondroitinase ABC verdauen, logischerweise aber nicht durch die Chondroitinase AC (Erlinger, 1995). Man findet Dermatansulfate vor allem in der Haut, in Blutgefäßen und in Herzklappen (Löffler, 1999). In der Zahnpulpa des Menschen sind sie ebenso selten vertreten wie die Chondroitinsulfate A und C (Galeotti et al., 1989).

Interessant sind die Funktionen, die dem Dermatansulfat zugeschrieben werden: Die Gegenwart von DS hemmt die Genese von Kollagenfibrillen. Interessant und im Widerspruch dazu steht die Beobachtung, dass bei einer Lungenfibrose nicht nur die Kollagenbildung intensiviert ist, sondern gleichzeitig auch vermehrt DS auftritt (siehe Erlinger, 1995).

Andererseits wird durch Dermatansulfat auch die Verkalkung behindert; der Ursprungsort der Kalzifikation liegt an der sogenannten d-Bande des Querstreifenmusters der Kollagenfibrillen, genau die Stelle, die das DS am Kollagen besetzt (Scott, 1991).

Hyaluronsäure (HA):

Die Hyaluronsäure stellt eine gewisse Ausnahme unter den GAGs dar. Sie bildet langkettige, unverzweigte Moleküle aus bis zu 25000 Disaccharideinheiten, die aber nicht mit einem Core-Protein assoziiert sind (Löffler und Petrides, 1998). Glucuronsäure und N-Acetylglucosamin sind ihre Bestandteile (Scott, 1988). Es besteht eine Ähnlichkeit mit den Chondroitinen (Löffler und Petrides, 1998):

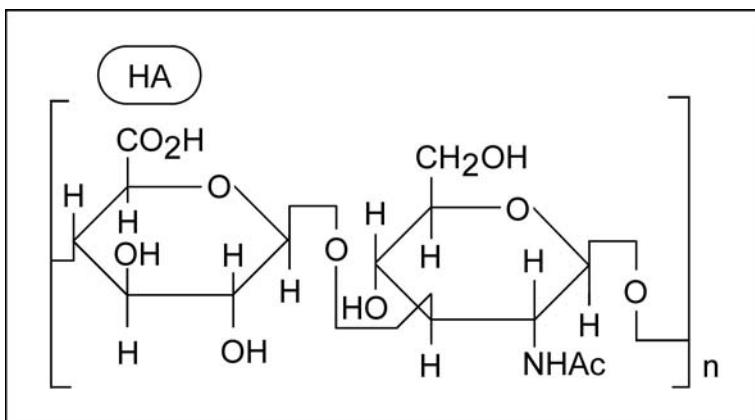


Abb. 6: Strukturformel der Hyaluronsäure (HA)

Dieses einzige nicht sulfatierte GAG kommt ubiquitär in allen Bindegewebstypen vor. In der Zahnpulpa ist es das am häufigsten vertretene GAG (Galeotti et al., 1989). Die Hyaluronsäure steigert die Genese der Kollagenfibrillen (Erlinger, 1992) und ist somit der Gegenspieler der Dermatane.

Im elektronenmikroskopischen Bild fallen sie als überdurchschnittlich lange, frei im extrazellulären Raum liegende, verzweigte Strukturen auf (Erlinger et al., 1990).

2.3. Die Bindungstheorie von J. E. Scott (1988, 2002)

Lebendige Organismen sind durch strukturelle Ordnung gekennzeichnet. Moleküle bilden Makromoleküle und diese bauen Zellen auf. Zellen sind die Bausteine der Organismen. Jedem dieser Bestandteile in einem so komplexen System kommt eine ganz bestimmte Aufgabe zu. Wenn sie ihre Aufgaben nicht mehr erfüllen können, werden sie vom Organismus abgebaut.

Kollagene kommen nahezu überall im menschlichen Körper vor und übernehmen spezielle Funktionen. Sie stabilisieren den Bindegewebsraum und schützen ihn vor äußereren mechanischen Einwirkungen. Wären die kollagenen Fasern nur ungeordnet im extrazellulären Raum verteilt, könnte die einzelne Fibrille der mechanischen Belastung nicht standhalten und wäre nutzlos. Sie muss sich also mit anderen Fibrillen zusammenlagern, um ein belastungsfähiges, dreidimensionales Netzwerk zu bilden. Doch wie sind diese Netzwerke tatsächlich aufgebaut? J. E. Scott von der Universität in Manchester hat sich jahrelang mit diesem Thema beschäftigt.

Schon seit einigen Jahrzehnten weiß man, dass es im extrazellulären Raum Kollagene und zuckerhaltige Proteine, die sogenannten Proteoglykane gibt. Letztere lagen scheinbar unregelmäßig und ohne Beziehung zu den kollagenen Fasern in der extrazellulären Flüssigkeit. Da man sie mit den damaligen Methoden nicht besser analysieren konnte, fasste man sie unter dem Namen „amorphe Grundsubstanz“ zusammen.

Im Jahr 1988 gelang es Scott, die Querstreifung der Kollagenfibrillen unter dem Elektronenmikroskop genau zu analysieren. Die Streifen ergeben ein bestimmtes Muster, das sich ca. alle 65 nm wiederholt. Dieses repetitive Muster nannte Scott die D-Periode, an ihr sind fünf verschiedene Banden mit den Buchstaben a-e markiert.

Weiterhin bemerkte er eine Präferenz der einzelnen Proteoglykane bzw. ihrer Glykosaminoglykane zu den diversen Banden des Kollagens; so fand sich an der c-Bande ausschließlich das mit Keratansulfat assoziierte Proteoglykan, während die d- und e-Bande nur von Proteoglykanen besetzt wurden, die mit Chondroitinsulfat oder Dermatansulfat assoziiert waren. War eines dieser Glykosaminoglykane nicht im Bindegewebe vorhanden, blieb dessen Bindestelle leer.

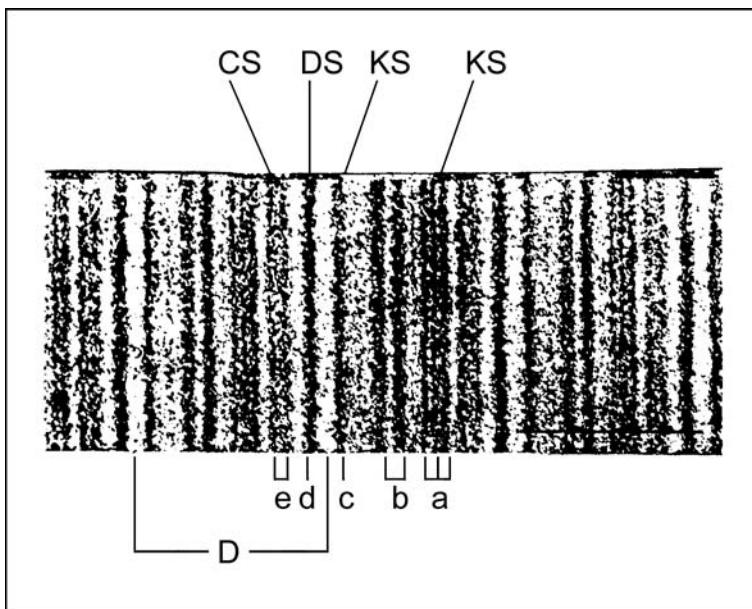


Abb. 7: Schemazeichnung nach Scott (2002).

Die Abbildung zeigt die spezifischen Bindungsstellen der mit Keratansulfat (KS), Chondroitinsulfat (CS) oder Dermatansulfat (DS) besetzten Proteoglykane an der Kollagenfibrille. D = D-Periode des sich immer wiederholenden Bandenmusters.

Die Glykosaminoglykane (GAGs) hatten also eine Affinität zu genau einer Stelle im Kollagen: Die „One proteoglycan - one binding site“-Theorie war entstanden.

Die Bindung der Proteoglykane an die Fibrille kommt folgendermaßen zustande: Jedes Kollagenmolekül besteht aus einer Tripelhelix. Mehrere dieser Helices lagern sich zu einer Kollagenfibrille zusammen, bei neutralem pH-Wert zu einer pentameren Mikrofibrille (Löffler und Petrides, 1998). Die Aminosäurekette einer Helix hat eine konstante sich wiederholende Aminosäuren-(AS)-abfolge der AS Glycin-X-Y, wobei in der X-Position meistens Prolin und in der Y-Position Hydroxyprolin zu finden ist (Löffler, 1999). Eine bedeutende Rolle für die Zusammenlagerung zu einer Tripelhelix spielen die AS Hydroxyprolin und Hydroxylysin, die bekannterweise vor allem am Kollagen in dieser hydroxylierten Form vorkommen (Löffler und Petrides, 1998).

Das Glycin, die kleinste der AS, legt sich auf die Innenseite der Peptidkette und ermöglicht so zwei Eigenschaften:

1. Eine Verdichtung der Tripelhelix und damit Verbesserung der Stabilität, und
2. eine Exponierung der hydroxylierten Aminosäuren, die dadurch mit anderen Makromolekülen interagieren können.

Die entstandenen Tripelhelices – mitunter auch Protofibrillen genannt – werden aktiv sezerniert; im Extrazellularraum lagern sich dann fünf dieser Protofibrillen zu einer Mikrofibrille zusammen (Löffler, 1999). Der Zusammenhalt der Mikrofibrillen erfolgt durch elektrostatische Anziehung und kovalente Vernetzung der Helices.

Die Proteoglykane wiederum sind über die positiv geladenen Aminogruppen des Hydroxylysins und Hydroxyprolins an die Kollagene assoziiert. Der genaue Bindungsmechanismus ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Laut Löffler und Petrides (1998) gehen die Glykosaminoglykane möglicherweise Wasserstoffbrückenbindungen oder elektrostatische Wechselwirkungen mit den Lysyl- und Hydroxylysylresten der Kollagenfibrillen ein. Die Proteoglykane wiederum binden sich mit Hilfe spezifischer Proteine an sehr lange Hyaluronsäuremoleküle (Löffler, 1999); diese komplexe, stark verzweigten Strukturen stabilisieren zusammen mit den Kollagenfasern die extrazelluläre Matrix.

Bei Scott (2002) ist eine direkte Verbindung zwischen den Proteoglykanen und den Hyaluronsäuremolekülen nicht zu finden. Seinen Forschungen nach sind Proteoglykane bivalent, d. h. sie verbinden sich mit jeweils zwei Kollagenfibrillen und vernetzen sie so miteinander. In früheren Untersuchungen wurde eine Verbindung der Kollagene untereinander in direktem Kontakt ihrer Oberflächen angenommen; diese Theorie bestätigt Scott nicht. Proteoglykane sind also der entscheidende Faktor zum Aufbau einer stabilen Matrix. Ihre Länge bestimmt den Abstand zwischen zwei kollagenen Fibrillen.

Alle Makromoleküle besitzen mehrere strukturelle Formen. Sie ergeben sich aus der Komplexität der Verbindungen. Primärstrukturen sind genetisch festgelegt, z. B. eine definierte Aminosäuresequenz aus 51 bestimmten AS ergibt Insulin. Organische Verbindungen haben oft Ladungen, die sich gegenseitig abstoßen oder anziehen und dadurch die Sequenz in einer charakteristischen Weise räumlich verändern; eine Sekundärstruktur entsteht. Kovalente Verbindungen und posttranslatorische Bildung von Seitenketten werden als Tertiärstrukturen bezeichnet. Und schließlich können sich diese Makromoleküle gegenseitig anziehen und sogenannte Domänen aufbauen. In all diesen diversen Bindungsmechanismen finden sich die Gesetzmäßigkeiten der chemischen Bindung und der elektrostatischen Anziehung wieder:

Organische Verbindungen müssen bestimmte Formen annehmen, damit auch die daraus entstehenden Makromoleküle bestimmte Formen bekommen, mit denen sie

ihre spezifische Funktion ausüben können. Scott postulierte 2002 diese Gesetzmäßigkeit für die extrazelluläre Matrix: **Die Gestalt eines Gewebes spiegelt sich wider in der Gestalt der Biopolymere, aus denen es konstruiert ist.** In unserem Fall handelt es sich um kollagene Fibrillen, die aus quervernetzten Molekülen zusammengebaut sind. Diese Fibrillen werden ihrerseits durch Proteoglykane verbunden. Nur weil sie in dieser Form eng miteinander verknüpft sind, können sie das Bindegewebe stabilisieren und stützen und ihm eine Struktur geben. Es braucht eine Kraft von 10 bis 40 kg, um ein 1mm dickes Kollagenfibrillenbündel zu zerreißen (Löffler und Petrides, 1998).

Doch Stabilität bedeutet auch, ein gewisses Maß einzuhalten. Es gibt also eine Obergrenze für die Anzahl der Bindungspartner in einer makromolekularen Konstruktion, die nicht überschritten werden kann, ohne dass diese ins Wanken gerät. Scott hat im Jahr 2002 das Bindegewebe auf diese Regel hin untersucht. Die Ergebnisse besagen, einfach formuliert, dass die Anzahl der assoziierten Proteoglykane direkt proportional zur Anzahl der Bindungsstellen am Kollagen ist. Sind alle Bindungsstellen mit Liganden besetzt, liegt ein Sättigungsgrad vor. Diese zweite, quantitative Regel wird hiermit formuliert: **Die Zusammensetzung eines Gewebes wird determiniert von stabilen, spezifischen Interaktionen zwischen den Makromolekülen, aus denen es aufgebaut ist.**

3. Bisherige Untersuchungen zum Bindegewebe der Zahnpulpa von Mensch und Tier

3.1. Lichtmikroskopische Untersuchungen

Die Zahnpulpa liegt im Inneren der Zähne und ist von einer dicken Schicht mineralisierter Hartsubstanz umgeben, die für jedes Fixierungsmittel praktisch undurchdringlich ist. Eine Fixierung des Pulpengewebes ist daher schwierig. Es bieten sich hier zwei verschiedene Methoden: Die Entkalkung der Zähne oder eine sofortige Spaltung des Hartgewebes und Freilegung des Weichgewebes. Entkalkungstechniken haben den Nachteil, dass sie lange Zeit in Anspruch nehmen und Gewebestrukturen zerstören; nur die Behandlung mit EDTA hat sich als schonend erwiesen (Geis-Wellhofer, 1992). Ein besonderer Nachteil ist die lange Dauer der Entkalkung: Die Präparate müssen oft wochenlang in den Lösungen liegen, bevor der Vorgang abgeschlossen ist.

Beim Aufbrechen der Zahnhartsubstanz dagegen besteht die Gefahr der Quetschung des Weichgewebes und des Abreißens der Odontoblastenschicht vom Dentin. Andere Faktoren, die die Erhaltung der organischen Strukturen negativ beeinflussen, sind: Die Anästhesie, der Extraktionsvorgang, eine zu lange Zeitspanne zwischen Extraktion und Fixierung, die Hitzeentwicklung beim Beschleifen der Zahnhartsubstanz und der Ultraschall der Luftturbine (Eifinger, 1970).

Wegen der schwierigen Gewinnung von adäquaten Präparaten ist die Zahnpulpa in der histologischen Forschung eher unbeliebt und verhältnismäßig wenig beschrieben.

Die ersten verlässlichen lichtmikroskopischen Untersuchungen der bindegewebigen Zahnpulpa wurden zu Beginn des 20. Jahrhunderts gemacht. Sie sind z. B. bei Bargmann (1968) zusammengefasst worden. Man beobachtete zwei Muster der Kollagenanordnung:

1. Diffus in die Grundsubstanz eingelagerte Fasern
2. Ausgerichtete Fasern, die parallel zu Gefäßen und Nerven verlaufen

Die Autoren Seltzer und Bender (1965) erwähnen als einzige retikuläre Fasern, die Netzwerke in der Pulpa bilden; sie sind mit Silber imprägnierbar, und im Gegensatz zu kollagenen Fasern angeblich zug- und biegeelastisch. Mit der Zeit sollen sich diese Silberfibrillen in Kollagen umwandeln.

Diese Beobachtungen hat Eifinger (1970) anhand von eigenen Untersuchungen überprüft und bestätigt. Er benutzte für die Lichtmikroskopie besonders die Färbungen HE, Azan und die Silberimprägnation nach Gömöri. Jagow (1987) zeigte mit Hilfe von Elasticafärbungen, dass in der Zahnpulpa von Hunden elastische Fasern ausschließlich in der Gefäßwand größerer Gefäße vorkommen. Retikulinfasern stellten sich in ihren Präparaten parallel zu glatten Muskelzellen dar.

Andere Autoren versuchten, Faserstrukturen immunhistochemisch nachzuweisen. Dabei werden Antikörper menschlichen oder tierischen Ursprungs gegen die Kollagentypen I, III, IV, V und VI eingesetzt. Die unterschiedliche Anfärbbarkeit mit den einzelnen Antikörpern gibt Aufschluss über das Verteilungsmuster der Kollagene im Bindegewebe (Bals, 1987, Lukinmaa und Waltimo, 1992). Es gibt die Übereinstimmung in den Ergebnissen, dass Kollagen vom Typ I und III in der selben Fibrille koexistieren können und den größten Anteil an Kollagen in der Pulpa bilden. Typ IV Kollagen findet sich charakteristischerweise an den Basalmembranen von Gefäßen, feine Spuren auch an Nervenfasern (Bals, 1987), und Typ V Kollagen, das ebenfalls nur in geringen Mengen vorhanden ist, verteilt sich um die Kapillaren (Lukinmaa und Waltimo, 1992). Dagegen fällt die Färbung von Typ VI Kollagen wieder kräftiger aus, besonders um Kapillaren und in der Odontoblastenschicht (Lukinmaa und Waltimo, 1992).

Die Bestandteile der amorphen interzellulären Substanz wurden 1990 von Galeotti et al. erforscht. Diese Autoren färbten vollständig durchgebrochene, permanente Prämolaren des Menschen mit Alzianblau bei kritischen Elektrolytkonzentrationen. Diese kommen durch verschiedene Molaritäten des verwendeten Magnesiumchlorids zustande. Je höher die Konzentration dieses Salzes ist, umso niedriger wird der pH-Wert, was sich wiederum auf die Anfärbbarkeit der Proteoglykane auswirkt: Während sich bei pH 1 nur sulfatierte Proteoglykane färben, reagiert bei pH 2,5 auch die Hyaluronsäure. Die Alzianfärbung fällt bei höheren pH-Werten also kräftiger aus. Galeotti et al. (1990) fanden in ihren Proben hauptsächlich Hyaluronate, seltener Dermatan- und Chondroitinsulfate; Heparan- und Keratansulfate waren nur in Regionen mit dicken Kollagenfaserbündeln präsent (siehe Kap. 2.2.).

Anstelle von Pulpagewebe des Menschen wurden oft auch Präparate von Tieren, besonders von Hunden und Schweinen, untersucht. Der Vorteil besteht in der leichteren Verfügbarkeit größerer Mengen an Untersuchungsmaterial. Die Beschaffung menschlicher Zähne gestaltet sich oft schwierig, da in der heutigen Zeit kaum noch Extraktionen stattfinden, und pulpengesunde Zähne generell nicht gezogen werden. Das hat zur Folge, dass das zur Verfügung stehende kostbare Zahnmaterial zum Großteil aus Weisheitszähnen besteht, die im Kiefer keinen Platz finden konnten.

Die tierische Zahnpulpa eignet sich somit viel besser für Experimente, die sich damit befassen, die Auswirkungen von Entkalkungs- und Färbemethoden (Geis-Wellnhofer, 1992) und Füllungswerkstoffen auf dieses spezielle Bindegewebe zu testen. Inwiefern die Ergebnisse auf den Menschen übertragen werden können, lässt sich jedoch niemals hundertprozentig vorhersagen. Besondere Erkenntnisse zur Struktur des Bindegewebes in tierischen Zahnpulpen waren in der vorliegenden Literatur nicht vorhanden. Nur in einer Studie zu Entkalkungs- und Färbemethoden an der Schweinezahnpulpa wurde erwähnt, dass sich kollagene Fasern im Vergleich zu allen anderen Strukturen am resistentesten gegenüber chemischen Einwirkungen zeigten (Geis-Wellnhofer, 1992).

3.2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Elektronenmikroskopie bietet der histologischen Forschung mit ihrer hohen Auflösung neue Möglichkeiten der Strukturanalysen. Im Bindegewebe, das im Lichtmikroskop als homogene, netzartige Faserstruktur erscheint, lassen sich hier die Bestandteile der extrazellulären Matrix deutlich darstellen. Bei starken Vergrößerungen erkennt man nicht nur die einzelnen Kollagenfibrillen, sondern auch Proteoglykane und Glykoproteine. Trotz dieser hohen Auflösung ist das Bindegewebe der Zahnpulpa unter dem Elektronenmikroskop weniger erforscht als mit lichtmikroskopischen Färbungen.

Erst seit den 50er Jahren setzten sich die Histologen mit diesem Thema auseinander. Sie zerschnitten die Pulpa in 1mm^3 kleine Stücke, fixierten sie in Glutaraldehyd und danach in Osmiumtetroxid. Mit der Methode erkannten sie damals schon die typische Querstreifung der Kollagenfibrillen. Die kollagenen Fibrillen sind

ihrer Meinung nach eher gerichtet angeordnet als diffus verstreut und verlaufen parallel zu Nerven und Gefäßen, besonders in der radikulären Pulpa. Kollagene wurden später auch an präkapillären Sphinktern entdeckt (Jagow, 1987).

Nur ein paar Jahre nach Veröffentlichung der ersten Ergebnisse strengte Eifinger (1970) eigene elektronenmikroskopische Versuche zur menschlichen Zahnpulpa an. Die Pulpen 18 gesunder Zähne wurden 3 Stunden lang im Osmiumtetroxid fixiert und mit Phosphowolframsäure und Uranylacetat, die in 70%igem Azeton gelöst waren, kontrastiert. Die Präparate wurden in Polyester (Vestopal) eingebettet. Diese Methodik liefert, wie wir heute wissen, recht unvollkommene Ergebnisse. Generell wird die gesamte Grundsubstanz von Kollagenfibrillen durchzogen. Kollagene Fibrillen zeigten sich interzellulär in Einbuchtungen zwischen den Fibroblasten. Manche Fibrillen verliefen exakt parallel zur Basalmembran von Zellen. Ihr Durchmesser betrug 250-300 Å. Auch im Zellinneren waren zum Teil sehr deutlich dünne Filamente zu sehen; ob sie eine Vorstufe bei der Kollagensynthese sind, konnte Eifinger nicht beweisen. Fakt ist, dass ihnen die typische Querstreifung fehlt. Aus heutiger Sicht handelt es sich bei letztgenannten Filamenten um Komponenten des Zytoskeletts.

In einer Versuchsreihe zur Devitalisierung der Zahnpulpa wurde die besondere Widerstandskraft der Kollagenfibrillen gegenüber chemischer Noxen demonstriert. Die Zähne wurden zuerst mit Arsentrioxid (Causticin) vorbehandelt, nach 24 Stunden extrahiert und in Glutaraldehyd fixiert. Die Ultraschnitte wurden mit Uranylacetat nachkontrastiert. Während die Zellkerne alle pyknotisch waren und die meisten Zellen sich teilweise oder ganz aufgelöst hatten, blieben die Faserstrukturen von der Devitalisierung nahezu unberührt (Felsch, 1981). Diese Resistenz machten sich Søgaard-Pedersen et al. (1989) zunutze. Mit Wasserstoffperoxid, dem Enzym Trypsin und dem Komplexbildner EDTA entfernten sie die Zellen aus der Zahnpulpa und legten somit das fibrilläre Netzwerk frei. Durch elektronenmikroskopisches Scannen wurde erkennbar, dass sich die Fibrillen vom Bindegewebe aus durch die Odontoblastenschicht bis ins Dentin hineinzogen. Erstaunlicherweise waren die Fibrillen im Dentin dichter angeordnet als im Prädentin, obwohl letzteres sich doch näher am Entstehungsort der Kollagene befindet. Existiert also ein Zusammenhang zwischen der Menge der kollagenen Fibrillen und der Kalzifikation? Laut Søgaard-Pedersen et al. (1989) gibt es eine Beziehung zwischen der Organisation der Kollagene und dem Gewebe, in dem sie lokalisiert sind. Die Gesamtzahl der Fibrillen wurde früher stark unterschätzt, weil sie sich mit älteren Methoden nicht so genau

darstellen ließen und sich daher dem Auge des Betrachters entzogen (Søgaard-Pedersen et al., 1989).

Verschiedene Kollagentypen wiesen Shuttleworth et al. 1992, und Rauch et al. 1991 nach. Das Team um Shuttleworth beseitigte mit bakterieller Kollagenase alle fibrillenbildenden Kollagene. Übrig blieben das Typ VI Kollagen und Fibrillin-enthaltende Mikrofibrillen, die zum elastischen Fasersystem gehören. Diese Proteine wurden in einem Komplex mit gegen sie gerichtete Antikörper und Immunogold markiert und mit der Technik der Rotationsbedämpfung im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht. Mit Antikörpern arbeiteten auch Rauch et al. (1991). Sie stellten ebenfalls Protein-Antikörper-Gold-Komplexe gegen die Kollagene I, III und VI her. Alle zur Markierung eingesetzten Antikörper waren mit quergestreiften Kollagenfibrillen assoziiert.

Diese kurz geschilderten Ergebnisse entsprechen dem jetzigen Stand der histologischen Erforschung des Bindegewebes der Zahnpulpa. Trotz dieser strukturellen Analysen gibt es noch Unklarheiten zum Aufbau und zur Zusammensetzung des Pulpabindegewebes, z. B. in Hinsicht der 3-dimensionalen Anordnung der Kollagene. Die Färbung der Matrix mit Cupromeronic Blue bei erheblich verbesserter Fixierungsmethodik soll uns helfen, ein räumliches Modell der extrazellulären Matrix in der Zahnpulpa zu erstellen. Insbesondere soll überprüft werden, ob die bisher an straffem und lockerem Bindegewebe erarbeiteten Befunde zur Kollagen-Proteoglykanassoziation auch für das „gallertige“ Bindegewebe der Zahnpulpa zutreffen.

4. Färbungen mit Cupromeronic Blue

Das Cupromeronic Blue (CMB) ist eine symmetrische, organische Verbindung mit der Summenformel $C_{36}H_{36}N_{12}O_{16}S_4Cu$. Sein Molekulargewicht beträgt 1084,54 Da. Es wurde 1972 von John E. Scott konzipiert (Scott, 1988) und für die histologische Forschung synthetisiert. Das Molekül setzt sich chemisch aus vier Pyrrolringen zusammen, die über vier Stickstoffatome kovalent zu einem Zyklus verbunden sind. An jedem der Pyrrolringe hängt zusätzlich ein methylisiertes Pyridin, das am Stickstoffatom eine positive Ladung besitzt. Ein zentrales Kupferkation bildet den Elektronenakzeptor, die N-Atome der Pyrrolringe die Elektronendonatoren. Es handelt sich hier also um einen Chelatkomplex mit vier Liganden. Das Cupromeronic Blue ist planar angeordnet, d. h. alle Atome liegen in einer Ebene. Es existieren verschiedene Isomere, die von einer cis- oder trans-Stellung der Bindungspartner abhängig sind.

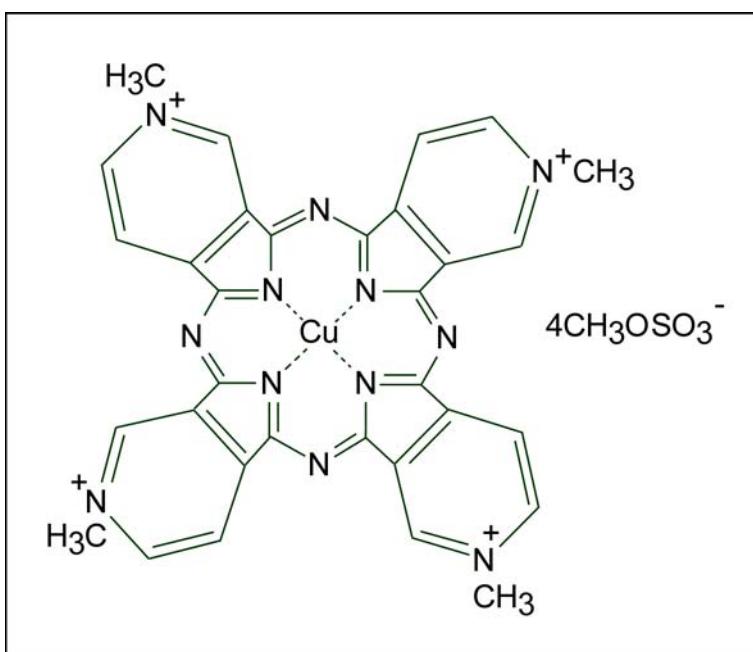


Abb. 8: Strukturformel des CMB

Die vier positiven Ladungen an den äußeren Enden dieses Makromoleküls spielen die entscheidende Rolle: Sie sind in der Lage, Polyanionen zu binden, die in Proteoglykanen und GAGs reichlich vorhanden sind.

Cupromeronic Blue, Toluidinblau, Cuprolinisches Blau und Alzianblau gehören zu einer bestimmten Gruppe von Farbstoffen, die Polyanionen markieren; in Verbindung

mit der Methodik der kritischen Elektrolytkonzentration (CEC) können sie verschiedene Arten von Anionen wie Carboxylate, Phospho- und Sulfatester darstellen. Für die CEC-Methode wird das Salz Magnesiumchlorid in seiner Konzentration variiert und zugesetzt. Bei niedrigeren Molaritäten wie z. B. 0,06 M färben sich nahezu alle Polyanionen, bei 0,3 M reagieren nur noch sulfatierte Proteoglykane und Glykosaminoglykane. Die Besonderheit des Cupromeronic Blue ist die fehlende Affinität zu den Nucleinsäuren der DNA; dafür bindet es Wolframate, was sich in einer höheren Elektronendichte bemerkbar macht (Scott, 1972, 1973 und 1985).

Die Farbstoffmoleküle lagern sich, von negativen Ladungen angezogen, außen an die Sulfat- und Carboxylgruppen der Proteoglykane an. Sie hüllen die extrazellulären Matrixbestandteile ein, wobei die ursprüngliche räumliche Struktur der Matrix erhalten bleibt. Eine direkte Vermessung der Kollagene und Proteoglykane in ihrer Länge und Breite wird damit ermöglicht. Cupromeronic Blue wird oft in Verbindung mit Enzymen verwendet, die jeweils ein bestimmtes GAG abspalten. Ihre Bindungsstellen am Kollagen sind dann frei. Der Vergleich mit einem Parallelversuch ohne Enzymverdauung gibt Aufschluss darüber, ob und wie viele GAGs überhaupt an die Fibrillen assoziiert waren; die Art des Proteoglykans lässt sich sehr leicht herausfinden, da die Enzyme bekannt sind. Die folgende Liste zeigt wichtige Untersuchungen an Geweben, die mit Cupromeronic Blue (CMB) und verwandten Farbstoffen bis jetzt erfolgten:

1986: M. Haigh und J. E. Scott (1986) entwickeln die CMB-Technik für die Licht- und Elektronenmikroskopie. Sie färben die Cornea von 60 Tage alten C57/BT Mäusen. Das Stroma präsentiert sich als chondroitin- und dermatansulfatreich. Ihre Proteoglykane haben Seitenketten und sind transfibrillär angeordnet im Gegensatz zu den Proteoglykanen der Descemetschen Membran; Heparansulfate sind hier vorherrschend.

- 1988:** In Versuchen am M. flexor digitorum tendon des fetalen Kalbes und an menschlichen Zwischenrippenknorpeln gelingt es Scott (1988), das Bandenmuster der Kollagene zu entschlüsseln. Er findet den Zusammenhang zwischen Proteoglykanen und ihren Bindungsstellen am Kollagen (siehe Kap.2.3.).
- 1989:** Lüllmann-Rauch (1989) behandelt Horn- und Bindegewebe des Auges, ebenso Leber und Milz von weiblichen Wisterratten mit Cuprolineic Blue und Toluidinblau. Im direkten Vergleich erweist sich das Toluidinblau als der wirkungsvollere Farbstoff; es kann aufgrund seiner geringeren Größe leichter Basalmembranen durchdringen. Cupromeric Blue wurde nicht eingesetzt.
- 1990:** An der menschlichen Glandula mammaria lactans weisen Erlinger et al. (1990) mit CMB kleine nadelförmige Präzipitate nach, die entlang kollagener Fibrillen verlaufen. In Querschnitten verbinden die Proteoglykane die Fibrillen scheinbar untereinander. Ferner entdecken sie GAGs in den Basalmembranen von Kapillaren, der Oberfläche von Adipozyten und in den Granula der Mastzellen.
- 1991:** Im cornealen Stroma des Kaninchens demonstriert Scott (1991), dass eine Proteoglykankette auch mehr als zwei Kollagenfibrillen überbrücken kann. Auf der ersten Abbildung seines Artikels sieht man vier helle Kollagenfibrillen, die alle mit demselben Proteoglykan eine Bindung eingehen. Die Cornea ist sehr beliebt für Studien, da sie bei den verschiedenen Spezies fast identisch ist. Ihr Trockengewicht setzt sich hauptsächlich aus Kollagenen und Proteoglykanen zusammen.
- 1992:** Der Beweis wird erbracht, dass Kollagene, Proteoglykane und GAGs schon sehr früh in der Entwicklungsgeschichte der Organismen entstanden sind. Welsch et al. (1992) untersuchen Priapulida, lebende Fossilien, deren Geschichte bis ins Kambrium zurückreicht, mit CMB und Alzianblau unter dem Licht- und Elektronenmikroskop. Das Ergebnis bestätigt die evolutionäre Konservierung der extrazellulären Matrixbestandteile über Hunderte von Jahrtausenden hinweg. Die typischen, nadelförmigen Präzipitate sind in der Grundsubstanz ebenso zu sehen wie an Kollagenfibrillen oder in der Basalmembran. Bindegewebefasern weisen eine periodisch wiederkehrende Querstreifung mit einer Länge von 47-50 nm auf. Die Autoren weisen mit dem CMB auch Proteoglykane an marinen Bakterien nach.

1995: Erlinger et al. (1995) färben das Bindegewebe der menschlichen Gingiva mit Cupromeronic Blue. Sie finden weitere interessante Aspekte zur räumlichen Anordnung der Proteoglykane heraus: An Kollagen assoziierte Proteoglykane aggregieren zu einem großen Präzipitat, das parallel zu den Fibrillen verläuft. An Querschnitten legen sich einige GAGs scheinbar halb um eine Fibrille herum. Größe und Dicke der Proteoglykane und GAGs variieren sehr stark. Das häufigste GAG im Bindegewebe ist das Dermatansulfat, an der Epithelbasis ist es das Heparansulfat. Im selben Jahr stellt Erlinger (1995) ultrastrukturell die Verteilung von Proteoglykanen in der Schweinelunge mit der CMB-Methode dar. Als erster kann er Heparansulfat an der Oberfläche von elastischen Fasern nachweisen (siehe auch Kap.2.2.).

5. Fragestellung

In dieser Dissertation wird zum ersten Mal die Matrix der menschlichen Zahnpulpa gezielt sowohl mit verschiedenen lichtmikroskopischen histologischen, histo-chemischen und immunhistochemischen Techniken als auch und insbesondere mit der von Scott entwickelten CMB-Methode untersucht. Dabei werden wir uns mit folgenden Fragen beschäftigen:

Welche Unterschiede gibt es in der Darstellung der Kollagenfibrillen und der Proteoglykane bei den unterschiedlichen Vorbehandlungen:

- ohne CMB,
- 0,3 M MgCl₂ und CMB,
- 0,06 M MgCl₂ und CMB?

Wie groß sind:

- der Durchmesser der Kollagenfibrillen,
- die Breite ihres Bandenmusters und
- die Länge und Durchmesser der mit ihnen verbundenen Proteoglykane ?

Wie sind die Kollagenfibrillen mittels Proteoglykanen verbunden und ist eine strukturelle Ordnung der Kollagenfibrillen mit unserer Methode erkennbar ?

Welche Aufgaben besitzen die Kollagenfibrillen speziell in der Zahnpulpa ?

Kann man die von Scott aufgestellten Theorie: 1 Proteoglykan – 1 Bindestelle in der Zahnpulpa bestätigen?

Lassen sich die Proteoglykane optisch (d.h. auf dem Foto des elektronenmikroskopischen Präparates) im Pulpabindegewebe nachweisen?

6. Material und Methoden

Es wurden 22 permanente, pulpengesunde Zähne für die Versuche verwendet. Sie stammten von 15 verschiedenen Patienten, die zwischen 12 und 82 Jahre alt waren. Bei den Zähnen handelte es sich um 2 Inzisivi, 2 Prämolaren, 3 Molaren, 14 Weisheitszähne und 1 überzähligen Zahn. 10 von ihnen waren belastet, die übrigen 12 waren retiniert oder teilretiniert. Das Untersuchungsmaterial wurde uns freundlicherweise von der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie zu München, Direktor Prof. Dr. Dr. Michael Ehrenfeld, mit dem Einverständnis der Patienten zur Verfügung gestellt. Die Extraktion erfolgte unter Lokalanästhesie mit den Anästhetika UDS und UDS forte. Direkt danach wurden die Zähne mit Hilfe eines Seitenschneiders so gespalten, dass die Pulpa mit einer möglichst großen Fläche frei lag. Die Proben kamen dann für mindestens 3 Stunden in eine Fixierlösung: 11 Zähne wurden in 3%igem Formalin für die Paraffineinbettung fixiert, die anderen 11 zuerst in 3%iger Glutaraldehydlösung gelagert; nach ca. 2,5 Stunden wurde die Lösung durch Zugabe von Phosphatpuffer in ein 1%iges Glutaraldehyd verwandelt. Die so in situ fixierten Zahnpulpen wurden vorsichtig aus der Pulpenhöhle herausgenommen und für die Elektronenmikroskopie in Araldit eingebettet.

6.1. Färbungen für die Lichtmikroskopie

Nach einer dreistündigen Fixierung in der Formalinlösung wurden die Zahnpulpen vorsichtig mit einem spitzen Stab herauspräpariert, 30 Minuten unter fließendem Wasser gewaschen und in einem Stück eingebettet. Dieser Arbeitsschritt erfolgte automatisch in einem 24-stündigen Programm mit diesen Lösungen:

Tabelle 1: Einbettung

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

Am nächsten Tag wurden die paraffindurchtränkten Proben der letzten Flüssigkeit entnommen und in Schälchen mit frisch erwärmtem Paraffin gelegt; auf einer kalten Platte erstarrte dieses zu einem festen Block. An einem Mikrotom mit Rasierklinge wurden 5 µm dünne Schnitte angefertigt und auf Objektträgern aufgefangen.

Die Färbelösungen in der Histologie sind wasserlöslich, Paraffin dagegen ist ein Fett. Will man also, dass die Gewebeprobe sich mit den Farbstoffen verbindet, muss sie erst einmal entparaffiniert werden. Dieser Vorgang läuft für alle folgenden lichtmikroskopischen Färbungen stereotyp ab:

Tabelle 2: Entparaffinieren und ins Wasser bringen

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	Aqua dest.	2-10 Min.

Folgende Färbungen werden eingesetzt:

6.1.1. Hämalaun-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung ist die klassische Übersichtsfärbung in der Histologie. Sie besteht aus nur zwei Farben. Das basische Hämalaun markiert vor allem die Zellkerne blau, während das saure, rote Eosin sich mit Zytoplasma und extrazellulären Fasern verbindet. Für ein optimales Ergebnis werden die Objekträger zuerst 10 Minuten in Hämalaun getaucht und dann 10 weitere Minuten unter fließendes Wasser gehalten. Den Fachbegriff für diesen Arbeitsschritt nennt man „Bläuen“. Im Eosin bleiben die Schnitte nur kurze Zeit, damit sie nicht zu sehr rot werden.

Tabelle 3: HE-Färbung

	Lösung	Dauer	Anmerkung
1.	Hämalaun	10 Min.	eher etwas länger färben
2.	Wasser	10 Min.	bläuen unter fließendem Wasser
3.	Eosin	2-5 Min.	eher etwas kürzer färben

6.1.2. Goldner-Färbung

Goldner arbeitete mit mehreren Lösungen, mit denen er ein schönes, farbreiches Ergebnis erzielte: Die Zellkerne erscheinen hier bräunlich-schwarz, das Zytoplasma ziegelrot, die Erythrozyten gelb und das Bindegewebe grün. Die einzelnen Schritte sind folgende:

Tabelle 4: Goldner-Färbung

	Lösung	Dauer	Anmerkung
1.	Eisenhämatoxylin	1-2 Min.	Weigert'sches EH, Kernfärbung
2.	Wasser	10 Min.	in fließendem Wasser spülen
3.	Säurefuchsin-Ponceau	5-8 Min.	und/oder Axophloxin
4.	1%ige Essigsäure	1 Min.	spülen
5.	Phosphomolybdänsäure-Orange	ca. 1 Min.	Bindegewebe vollständig entfärbten
6.	1%ige Essigsäure	1 Min.	spülen
7.	Lichtgrün	5 Min.	Gegenfärbung
8.	1%ige Essigsäure	5 Min.	spülen, dann abtupfen
9.	100%iger Alkohol	5 Min.	
10.	100%iger Alkohol	5 Min.	
11.	Xylol	5 Min.	
12.	Xylol	5 Min.	

Die Differenzierung mit Phosphomolybdänsäure-Orange ist besonders schwierig: Wird das Bindegewebe nicht vollständig entfärbt, nimmt es das Lichtgrün nicht so stark an. Bricht man die Reaktion zu spät ab, erscheint alles andere Gewebe farblos. Nach korrekter Durchführung aber erhält man eine der schönsten histologischen Färbungen.

6.1.3. Masson-Trichrom-Färbung

Die Masson-Trichrom-Färbung ist dreifarbig. Kollagene Fasern sind hier tiefblau, die Kerne leuchtend rot und das Zytoplasma blassrosa bis schwach bläulich (Welsch, 1993).

Tabelle 5: Masson-Trichrom-Färbung

	Lösung	Dauer	Anmerkung
1.	Celestinblau	5 Min.	
2.	Wasser	1 Min.	in Leitungswasser spülen
3.	Hämalaun	5 Min.	
4.	Wasser	5-10 Min.	in fließendem Wasser bläuen
5.	Säurefuchsin	5 Min.	
6.	Wasser	1 Min.	in Leitungswasser spülen
7.	Phosphomolybdänsäure	2 Min.	danach gut abtropfen lassen
8.	Methylblau	5 Min.	
9.	Wasser	1 Min.	in Leitungswasser spülen
10.	1%ige Essigsäure	2 Min.	

6.1.4. Azan-Färbung

Diese histologische Färbung verhält sich analog zum Masson-Trichrom, d.h. die einzelnen Gewebestrukturen stellen sich in den gleichen Farben dar.

Tabelle 6: Azanfärbung

	Lösung	Dauer	Anmerkung
1.	Azokarmin	ca. 45 Min.	bei 56-60 °C im Brutschrank
2.	Aqua dest.	1 Min.	spülen
3.	Anilinalkohol	ca. 1 Min.	Differenzierung
4.	essigsaurer Alkohol	1 Min.	stoppt die Reaktion
5.	Aqua dest.	1 Min.	spülen
6.	Phosphowolframsäure	ca. 30 Sec.	beizt das Bindegewebe
7.	Anilinblau-Orange-Essigsäure	1-10 Min.	mikroskopische Kontrolle
8.	Aqua dest.	1 Min.	spülen

6.1.5. Alzianblau-Färbung

Die folgenden beiden Methoden gehören zu den histochemischen Färbungen. Wie oben bereits genannt, hängt die Stärke der Anfärbbarkeit des Alzianblaus sehr vom pH-Wert in der Färbelösung ab. Bei extrem sauren Werten färben sich nur die stark sulfatierten Glykosaminoglykane und Proteoglykane, bei höheren auch alle anderen GAGs. Wir haben für diese Dissertation die pH-Werte 1 und 2,5 mit folgender Methodik verwendet:

Tabelle 7: Alzianblau bei pH 1

	Lösung	Dauer	Anmerkung
1.	0,1 M Salzsäure	2 Min.	
2.	Alzianblau in 0,1 M HCl	ca. 12 Std.	über Nacht stehen lassen
3.*	Aqua dest.	1 Min.	
4.*	Kernechtrot	3-5 Min.	Gegenfärbung
5.	Aqua dest.	1 Min.	spülen

Tabelle 8: Alzianblau bei pH 2,5

	Lösung	Dauer	Anmerkung
1.	3%ige Essigsäure	2 Min.	
2.	Alzianblau in 3%iger Essigsäure	ca. 12 Std.	über Nacht stehen lassen
3.*	Aqua dest.	1 Min.	
4.*	Kernechtrot	3-5 Min.	Gegenfärbung
5.	Aqua dest.	1 Min.	spülen

Die unterschiedlichen Molaritäten lassen sich durch das Verwenden verschiedener Säuren erklären. Salzsäure ist stärker sauer und bewirkt einen pH-Wert von 1. In Parallelversuchen wurden die Alzian-Präparate in Kernechtrot getaucht. Die mit Sternchen gekennzeichneten Arbeitsschritte sind nur für diese Gegenfärbung notwendig.

6.1.6. PAS-Färbung

Sie färbt Polysaccharide und Glykoproteine rot. Deren Glykol-Gruppen müssen zuerst mit Perjodsäure zu einem Aldehyd reagieren, die sich dann mit fuchsinschweliger Säure durch Bildung eines roten basischen Farbstoffes nachweisen lassen (Romeis, 1989).

Tabelle 9: PAS-Färbung

	Lösung	Dauer	Anmerkung
1.	1%ige Perjodsäure	10 Min.	Oxidation
2.	Aqua dest.	1 Min.	spülen
3.	Schiff'sches Reagenz	3-5 Min.	
4.	Sulfitwasser	1 Min.	spülen
5.	Wasser	10 Min.	spülen
6.*	Hämalaun	5-10 Min.	Gegenfärbung
7.*	Wasser	10 Min.	in fließendem Wasser bläuen

Nach der Färbung wurden sämtliche Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Zum Schluss wurden sie mit DPX eingedeckt.

Tabelle 10: Dehydrierung

	Lösung	Dauer
1.	Aqua dest.	10 Sek.
2.	70%iger Alkohol	10 Sek.
3.	80%iger Alkohol	10 Sek.
4.	96%iger Alkohol	10 Sek.
5.	100%iger Alkohol	10 Sek.
6.	100%iger Alkohol	2 Min.
7.	Xylol/Alkohol	5 Min.
8.	Xylol	5 Min.
9.	Xylol	5 Min.

6.1.7. Immunhistochemische Färbungen

Die Immunhistochemie bedient sich der Hilfe von Immunglobulinen zum Nachweis eines bestimmten Vertreters einer Substanzklasse, in diesem Fall eines Glykosaminoglykans. Dabei bilden sich schwer lösliche Komplexe zwischen den Antigenen und den Antikörpern aus, die unter anderem mit einem fluoreszierenden Farbstoff sichtbar gemacht werden können. Einfacher zu handhaben sind immunhistochemische Dauerpräparate, in denen das gesuchte Molekül mit Hilfe von Farbstoffen lokalisiert und sichtbar gemacht wird. Die Darstellung beruht also auf einer chemischen Reaktion, die nur zwischen dem Farbstoff und der Gewebskomponente abläuft, und ist daher, ebenso wie die PAS-Färbung, nicht als Übersichtsfärbung geeignet.

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurde der ABC-Kit HistostainTM plus der Firma Zymed verwendet. Der Antikörper gegen das Chondroitin-6-sulfat stammte von der Firma ICN und wurde im Verhältnis 1:100 verdünnt. Die Firma Seikagaku lieferte den Antikörper gegen das Dermatansulfat; der Verdünnungsfaktor war hier 1:2000. Der Antikörper gegen das Decorin wurde 1:10 verdünnt. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurde mehrmals mit einem Phosphatpuffer (PBS) gespült. Das Chondroitin-6-sulfat wurde mit dem Farbstoff 3,3 Diaminobenzidin (DAB) dargestellt, die anderen beiden Glykosaminoglykane mit dem Farbstoff AEC. Die DAB-Präparate konnten in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (siehe Tabelle 10) und in DPX eingedeckt werden. Bei den Präparaten, die mit AEC behandelt wurden, war die Dehydrierung nicht möglich, da der Alkohol die Färbung zerstört hätte. Sie wurden daher in aqua dest. gewaschen und sofort danach in Aquatex eingedeckt.

Das genaue Procedere ab der Rehydrierung zeigen folgende drei Tabellen:

Tabelle 11: Nachweis des Chondroitin-6-sulfates (Ch-6-S)

	Lösung	Dauer	Anmerkung
1.	PBS	5 Min.	waschen
2.	Chondroitinase AC	1 Std.	bei 37°C im Brutschrank
3.	PBS	5 Min.	
4.	3%iges H ₂ O ₂	10 Min.	
5.	PBS	5 Min.	
6.	Kit-Blocker A	10 Min.	danach kein PBS
7.	AK gegen Ch-6-S	1 Std. 20 Min.	bei Raumtemperatur; 1:100
8.	PBS	2 Min.	3 x
9.	AK B	10 Min.	
10.	PBS	2 Min.	3 x
11.	Streptavidin C	10 Min.	
12.	PBS	2 Min.	3 x
13.	DAB	10 Min.	mit 2 Tropfen H ₂ O ₂ versetzen
14.	Aqua dest.	2 Min.	spülen

Tabelle 12: Nachweis des Dermatansulfates (DS)

	Lösung	Dauer	Anmerkung
1.	Citratpuffer	3 x 5 Min.	in der Mikrowelle
2.	keine	20 Min.	abkühlen lassen
3.	PBS	5 Min.	
4.	3%iges H ₂ O ₂	10 Min.	
5.	PBS	5 Min.	
6.	Kit-Blocker A	10 Min.	danach kein PBS
7.	AK gegen DS	1 Std.	1:2000
8.	PBS	2 Min.	3 x
9.	AK B	10 Min.	
10.	PBS	2 Min.	3 x
11.	Streptavidin C	10 Min.	
12.	PBS	2 Min.	3 x
13.	AEC	10 Min.	
14.	Aqua dest.	2 Min.	spülen

Die eine Hälfte dieser Präparate wurde mit Citratpuffer vorbehandelt, die andere sofort in den Phosphatpuffer gelegt (3. Schritt).

Tabelle 13: Nachweis von Decorin

	Lösung	Dauer	Anmerkung
1.	PBS	5 Min.	
2.	Chondroitinase AC	1 Std.	bei 37°C im Brutschrank
3.	PBS	5 Min.	
4.	3%iges H ₂ O ₂	10 Min.	
5.	PBS	5 Min.	
6.	Kit-Blocker A	10 Min.	danach kein PBS
7.	AK gegen Decorin	1 Std.	1:10
8.	PBS	2 Min.	3 x
9.	AK B	10 Min.	
10.	PBS	2 Min.	3 x
11.	Streptavidin C	10 Min.	
12.	PBS	2 Min.	3 x
13.	AEC	10 Min.	
14.	Aqua dest.	2 Min.	spülen

6.2. Elektronenmikroskopie

Die für die Elektronenmikroskopie bestimmten Zahnpulpen wurden zunächst in einer 3%igen Glutaraldehydlösung fixiert. Nach ca. 2,5-3 Stunden wurde die Fixierlösung durch Zugabe von Phosphatpuffer in eine 1%ige überführt und die Proben im Kühlschrank gelagert. Das Weichgewebe wurde nach ausreichender Fixierung vorsichtig herauspräpariert und in mehrere Stückchen mit einer Kantenlänge von ungefähr 1,5 mm geschnitten. Jede Gewebeprobe wurde so auf drei neue Gefäße mit 1%iger Glutaraldehydlösung verteilt, wobei die Proben aus den ersten beiden Gefäß mit Cupromeronic Blue vorbehandelt wurden, während die Proben aus dem dritten Gefäß keine CMB-Vorbehandlung erhielten, sondern direkt für die Transmissionselektronenmikroskopie eingebettet wurden.

6.2.1. Transmissionselektronenmikroskopie ohne CMB-Färbung

Die Einbettung für die Elektronenmikroskopie ist mit relativ aufwändigen und langwierigen Arbeitsschritten verbunden. Verwendet wurde als Einbettmaterial das Araldit, ein polymerisierbares Polyester.

I. Waschen in Phosphatpuffer

Der Phosphatpuffer setzte sich aus Kaliumdihydrogenphosphat und Dinatriumhydrogenphosphat zusammen. Dieser Vorgang wurde 4 mal bei 4°C durchlaufen, das erste Mal 5 Min., dann 10 Min., 15 Min. und 30 Min. lang.

II. Kontrastierung

10 ml 2%iges Osmiumtetroxid wurde mit 10 ml aqua inject. verdünnt. Die Proben wurden 2 Stunden lang mit diesem Gemisch inkubiert. Osmiumtetroxid ist hochgiftig und darf daher nur unter dem Abzug verwendet werden.

III. Waschen in Phosphatpuffer

Das Waschen im Phosphatpuffer bewirkte die Entfernung von überschüssigen Osmiumpräzipitaten. Die Prozedur dauerte etwa 10 Minuten.

IV. Entwässern

Die Proben wurden zuerst kurz gespült und dann mit Alkoholen zunehmender Konzentration inkubiert:

Tabelle 14: Entwässern

Lösung Nr.	Medium	Dauer
1	30% Ethanol	10 Min.
2	30% Ethanol	10 Min.
3	50% Ethanol	10 Min.
4	50% Ethanol	10 Min.
5	70% Ethanol	10 Min.
6	70% Ethanol	10 Min.
7	90% Ethanol	10 Min.
8	90% Ethanol	10 Min.
9	100% Ethanol	20 Min.
10	100% Ethanol	20 Min.
11	100% Ethanol	20 Min.
12	Propylenoxid	20 Min.
13	Propylenoxid	20 Min.

V. Einbetten

Dann wurden die Proben in Gläschchen mit einem 1:1 Araldit-Propylenoxid-Gemisch gelegt und über Nacht darin stehen gelassen. Am nächsten Tag wurden sie für 6 Stunden in frisches Araldit mit 2%igem Beschleuniger überführt. Als letztes wurde eine 2. Lösung mit Araldit und 2%igem Beschleuniger angesetzt, das Gemisch in kleine Formen verteilt und die Gewebeproben hineinlegt. Die Polymerisation dauerte 48 Stunden bei einer Temperatur von 60°C.

6.2.2. Transmissionselektronenmikroskopie mit CMB-Färbung

Die Gewebeproben wurden nach der Fixierung der Lösung entnommen und 3 mal für jeweils 10 Min. in einem 0,2 M Acetatpuffer mit einem pH-Wert von 5,6 und einer 1%igen Glutaraldehydlösung gewaschen. Über Nacht wurden sie dann in die Färbelösungen gestellt, die sich folgendermaßen zusammensetzten:

- 9 ml Acetatpuffer,
- 0,1 g CB/CMB,
- 0,61 g $MgCl_2 \times 6 H_2O$ und
- 1 ml 25%iges Glutaraldehyd für die 0,3 M CMB-Lösung.

Für die 0,06 M CMB-Einbettung wurden statt 0,61 g nur 0,122 g $MgCl_2$ verwendet. Am nächsten Tag folgte wieder eine Waschung der gefärbten Präparate. Dazu wurde der Acetatpuffer mit 0,3 M $MgCl_2$ und 1%iger Glutaraldehydlösung (GA) vermischt. Diese Prozedur wurde 3 mal für jeweils 20 Min. auf dem Rüttler durchgeführt, anschließend noch einmal für 6-8 Stunden unter häufigem Pufferwechsel, die letzten beiden Male allerdings ohne GA. Die gewaschenen Präparate wurden eine Stunde lang in 0,5%igem $NaWo_4$, gelöst in 0,2 M Acetatpuffer und 0,3 M $MgCl_2$, nachgefärbt. Für die 0,06 M CMB-Einbettung wurde wieder 0,06 M $MgCl_2$ verwendet. Über Nacht stand das Untersuchungsmaterial in einem Gemisch aus 0,5%igem $NaWo_4$ und 30%igem Ethanol.

Entwässerung und Einbettung in Araldit liefen wie im vorherigen Kapitel ab.

Alle fertiggestellten Blöcke wurden in einer Halterung befestigt und mit einem Ultramikrotom vom Typ Reichert OMU 3 geschnitten. Zum Schneiden wurde ein Diamantmesser benutzt, mit dem wir Semi- und Ultradünnschnitte herstellten. Die Semidünnschnitte hatten eine Dicke von 1 μm und dienten der lichtmikroskopischen Kontrolle. Sie wurden auf einem Wassertropfen aufgefangen und anschließend auf einen Objektträger gelegt. Auf einem Strecktisch bei ca. 60 °C verdunstete das aquabidest. und die Schnitte hafteten nun fest auf ihrer Unterlage. Jetzt wurde Toluidinblau darauf geträufelt, die Überschüsse abgegossen und die Objekte erneut getrocknet. Unter dem Lichtmikroskop konnte man jetzt sehen, welche Strukturen später unter dem Elektronenmikroskop zu erwarten waren. Die Ultradünnschnitte waren durchschnittlich 90-120 nm dick; sie wurden auf runden Kupfernetzchen mit

einem Durchmesser von 3,05 mm aufgefangen und getrocknet. Präparate für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden für 20 Min. mit einer gesättigten Uranylacetatlösung inkubiert, mit aqua dest. gespült, 4 Min. lang mit Bleicitrat behandelt und dann wieder mit aqua dest. gespült. CMB-eingebettete Objekte wurden nur mit Bleicitrat bei pH 12 nachkontrastiert. Die Schnitte wurden unter einem Elektronenmikroskop der Firma Philips bei einer Betriebsspannung von 80 kV untersucht und fotografiert.

7. Ergebnisse

7.1. Auswertung der lichtmikroskopischen Bilder

Von elf Zahnpulpen wurden Schnitte mit zehn verschiedenen Färbemethoden gefärbt und unter dem Mikroskop ausgewertet. Darüber hinaus wurden auch einige Semidünnschnitte mit Toluidinblau gefärbt. Die interessantesten Beobachtungen wurden fotografiert und dokumentiert. Dabei kamen wir zu dem Ergebnis, dass die Goldner- und die Masson-Trichrom-Färbung die kollagenen Fasern am besten hervorhoben. Während Einzelfasern relativ blass erschienen, waren dickere Faserbündel an ihrem kräftigen Grün- bzw. Blauton zu erkennen. Brauchbare Bilder lieferte ebenfalls die HE-Färbung, obwohl sie keine typische Bindegewebefärbung ist. Kollagene Fasern sind hier in einer homogenen, blass-roten Farbe darstellbar. Andere Strukturen wie Nerven, Gefäße und die Zellkerne der Fibroblasten kamen im HE-Präparat stets deutlich zum Vorschein. Die Toluidinblaufärbung lieferte gute Darstellungen von myelinisierten Axonen, Gefäßwänden und der Odontoblastenschicht mit Dentin und Prädentin, zeigte aber Kollagenfasern nur unzureichend. Weniger aussagekräftig waren auch die PAS- und Alzianblaufärbungen. Die Azanfärbung fiel im vorliegenden Material insgesamt blass aus. Die PAS-Färbung zeigte nur an wenigen Stellen eine positive Reaktion, das restliche Gewebe war gänzlich transparent, und die Präparate, die mit Alzianblau inkubiert wurden, nahmen die Farbe nur schwach an, obwohl sie insgesamt bis zu einem Tag in der Lösung stehen gelassen wurden.

Im Folgenden sollen die Färbeergebnisse dargestellt werden.

7.1.1. Hämalaun-Eosin

In den HE-Präparaten fällt auf, dass die Fibroblasten gleichmäßig in der zentralen Pulpa verteilt sind. Sie sind vor allem an ihren Kernen erkennbar, die oft länglich und euchromatinreich sind. Die blass-rosafarbenen Kollagenfasern liegen hier ebenfalls gleichmäßig im Interstitium verteilt und verlaufen öfter parallel zu den länglichen Fibroblasten; sie ziehen aber auch in alle anderen Richtungen, so dass das Bild eines feinen Netzwerkes entsteht. Im Allgemeinen nimmt die Dichte der Kollagenfasern zur Peripherie hin zu, was sich in einer stärkeren Anfärbbarkeit des Gewebes bemerkbar macht. Sie sind in der Nähe der Grenze zum Dentin i. A. parallel zur Oberfläche, d. h. zur Odontoblastenschicht, angeordnet, ebenso die Fibroblasten. In manchen Präparaten dagegen findet man an einzelnen Stellen direkt basal des Odontoblastensaums lediglich eine ungeordnete, aber verdichtete Fibroblastenschicht mit geringfügig höherer Konzentration an kollagenen Fasern. Nervenfasern und Gefäße sind mit der HE-Färbung gut darstellbar, was die Abb. 9 zeigt.

7.1.2. Goldner

Kollagenfasern sind hier grün angefärbt, Fibroblastenkerne braun-rot. Im Inneren der Zahnpulpa erscheinen die Bindegewebsfasern als relativ lockere Netzwerke. An einigen Stellen mitten im Gewebe jedoch verdichten sich diese Netzwerke zu kleinen Inseln. Besonders hohe Konzentrationen kollagener Fasern befinden sich in der Nähe größerer Gefäße und Nerven: Dort bilden sie eine beinahe homogene grüne Fläche, durchsetzt von roten Fibroblastenkernen. So dichte Kollagenfaserbündel, die kreuz und quer verlaufen wie in Abb. 10, sind selten. Das Präparat stammt aus der Peripherie der Wurzelpulpa. Peripher folgen auf diese Fasern eine auffällig dichte Fibroblastenschicht und dann der Odontoblastensaum.

7.1.3. Masson-Trichrom

Die Trichromfärbung nach Masson liefert sehr kräftige Färbungen. Wie bei anderen Färbungen auch werden Nerven- und Gefäßstrukturen am deutlichsten hervorgehoben mit dem Unterschied, dass alle Farben intensiver als im HE-Präparat wirken: Die Odontoblasten erscheinen in einem dunklen Lila, ihre einzelnen Fortsätze sind gut zu erkennen. Dieselbe Farbe zeigen die Endothelzellen der Arterien und Venolen; die dicht darum angeordneten Kollagenfasern sind dunkelblau. Im Gegensatz dazu sind die fibrillären Netzwerke in der Zahnpulpa blau und lila dargestellt.

In der Abb. 11 sind die gewellten Kollagenfasern leicht von den querangeschnittenen Nervenfasern zu unterscheiden: Die vielen Zellkerne, die im Nervengewebe zu finden sind, gehören den Schwann'schen Zellen; im Bereich der Kollagenfasern dagegen sind oft nur wenige Zellen vorhanden. In Kollagenfaserbündeln verlaufen die Kerne parallel zur Richtung der Fasern, an anderen Stellen erscheinen sie ungeordnet verteilt. Kollagenfaserbündel, die so groß und auffällig sind wie die Nervenfaser in Abb. 12, werden in der Zahnpulpa des Menschen nicht angetroffen.

7.1.4. Azan

Die Gewebeproben färben sich im Allgemeinen nur blass an. Aus den blass-blauen Präparaten stechen nur die Erythrozyten leuchtend rot hervor. Entsprechend schwer gestaltet sich daher das Auffinden kollagener Fasern und deren Beschreibung. Im Prinzip lässt sich aber doch sagen, dass die charakteristische Anordnung des Bindegewebes in der Zahnpulpa trotz der blassen Farbe erkennbar ist: Lockere fibrilläre Netzwerke in der Hauptmasse der Zahnpulpa und dichtere Fasern um Nerven und Gefäße (Abb.13).

7.1.5. Alzianblau

Pro fixierter Gewebeprobe wurden vier Schnitte für die Alzianfärbung ausgewählt. Sie wurden bei zwei verschiedenen Elektrolytkonzentrationen mit den pH-Werten 1 und 2,5 weiterverarbeitet. Zwei Präparate bekamen zum Vergleich eine Gegenfärbung mit Kernechtrot. Die Alzianfärbung bei pH 1 soll lediglich die sulfatierten Glykosaminoglykane markieren, also nicht die Hyaluronsäure. Dagegen färbt das Alzianblau bei höheren pH-Werten alle Glykosaminoglykane; man erwartet hier daher ein kräftigeres Bild.

Unsere Ergebnisse jedoch wurden dieser Erwartung nicht immer gerecht. Unter dem Lichtmikroskop kann man oft keinen Unterschied zwischen den verschieden sauren Alzianblaufarblösungen feststellen. Nerven, Gefäße und Bindegewebe stellen sich gleichermaßen zartblau dar. Mit Kernechtrot gegengefärbte Präparate liefern klarere und kräftigere Färbeergebnisse:

Alle charakteristischen Strukturen der Zahnpulpa sind wieder deutlich zu sehen. Der Odontoblastensaum ist vollständig rot gefärbt, wie die Abb. 14 zeigt. Bemerkenswert ist, dass auch das Alzianblau kräftiger wirkt als in den Präparaten ohne Gegenfärbung. Kollagene Fasern um Gefäße sind in einem homogenen Hellblau dargestellt, im lockeren Bindegewebe findet man ebenfalls i. A. eine recht homogene hellblaue Färbung. Selten können blaugefärbte Kollagenfasern hervortreten.

7.1.6. PAS

Am schwierigsten gestaltet sich die Auswertung derjenigen histologischen Schnitte, die ausschließlich mit Perjodsäure und Schiff'schem Reagenz behandelt wurden. Die meisten Präparate zeigen nämlich i. A. nur eine zarte Reaktion. Lediglich die Basalmembranen der Gefäße und die Glykolipide der Nervenaxone färben sich in einem unregelmäßigen Rotton. Ein solches Nervenfaserbündel ist in Abb. 15 zu sehen. Das Bindegewebe ist nur schwach markiert und daher für die Fotografie nicht gut geeignet.

Auch bei der PAS-Färbung wurden zum Vergleich einige Schnitte mit Hämalaun gegengefärbt. Die so hergestellten Präparate sind den HE-Präparaten sehr ähnlich. Kollagenfasern kommen rosa zum Vorschein; an manchen Stellen finden sich sogar

farblich besonders stark hervorgehobene faserige Strukturen, was einen höheren Gehalt an Glykoproteinen vermuten lässt.

7.1.7. Toluidinblau

Eine Sonderstellung nehmen die mit Toluidinblau gefärbten Schnitte ein. Sie wurden als Semischnitte unter mikroskopischer Kontrolle hergestellt und sind somit 5x dünner als die 5µm dicken Paraffinschnitte. Alle in den Präparaten enthaltenen Strukturen besitzen schärfere Umrissse. Fibroblastenkerne sind stark dunkel umrandet und im Inneren inhomogen. Die Wandschichten der Arteriolen und Venolen sind sehr anschaulich dargestellt. Am bemerkenswertesten ist aber das Nervengewebe, das in der Toluidinblaufärbung ganz anders abgebildet wird: Der Farbstoff bindet sich ausschließlich an die Myelinscheide, die Axone bleiben weiß. Bei allen anderen bisher besprochenen Färbungen sieht man die Nervenaxone sehr deutlich, das Myelin dagegen nicht. Auch das Perineurium, das mehrere Axone umgibt, hebt sich farblich vom Hintergrund ab und lässt die Nervenbündel wie Inseln im Bindegewebe erscheinen. Für die Untersuchung von Kollagenfasern allerdings eignet sich die Toluidinblaufärbung nicht gut. In der Abb.16 ist die ganze Übergangszone von der Pulpa ins Dentin zu erkennen.

7.1.8. Immunhistochemie

Mit immunhistochemischer Technik konnten folgende Glykosaminoglykane in der Zahnpulpa nachgewiesen werden:

Chondroitin-6-sulfat:

Unter dem Mikroskop zeigen sich die mit 3,3 Diaminobenzidin behandelten Präparate in einem gelb-braunen Farbton. Die Markierungen sind homogen, was bedeutet, dass dieses Glykosaminoglykan gleichmäßig im Bindegewebe verteilt ist. Nervengewebe und Endothelien sind kaum zu erkennen. Der Odontoblastensaum dagegen färbt sich kräftig braun.

Dermatansulfat:

Die zum Teil sehr blass gefärbten Schnitte stellen das ganze Bindegewebe rötlich-braun dar. Auffällig ist, dass die Gefäßwände sehr deutlich zu sehen sind; Dermatansulfat ist also in Gefäßwänden in einer höheren Konzentration vorhanden als im restlichen Bindegewebe. Die insgesamt schwache Reaktion lässt sich vermutlich darauf zurückzuführen, dass der Antikörper gegen das Dermatansulfat stärker verdünnt verwendet wurde als bei den anderen beiden immunhistochemischen Versuchen (1:2000). Die Farbintensität schwankte von Präparat zu Präparat. Die mit Citratpuffer vorbehandelten Präparate liefern insgesamt etwas bessere Ergebnisse.

Decorin:

Da das Decorin als chondroitinsulfat- und dermatansulfathaltiges Proteoglykan definiert ist (s.o.), fällt seine immunhistochemische Darstellung folglich positiv aus. Es ist überall in der menschlichen Zahnpulpa nachweisbar und tritt sowohl in der Odontoblastenschicht als auch in den Gefäßwänden besonders deutlich hervor. Relativ schwach dagegen ist die Reaktion des Farbstoffs AEC, der die Immunreaktion sichtbar macht, in der Nähe von Nervenaxonen. Das Bindegewebe färbt sich hier rot bis rot-braun.

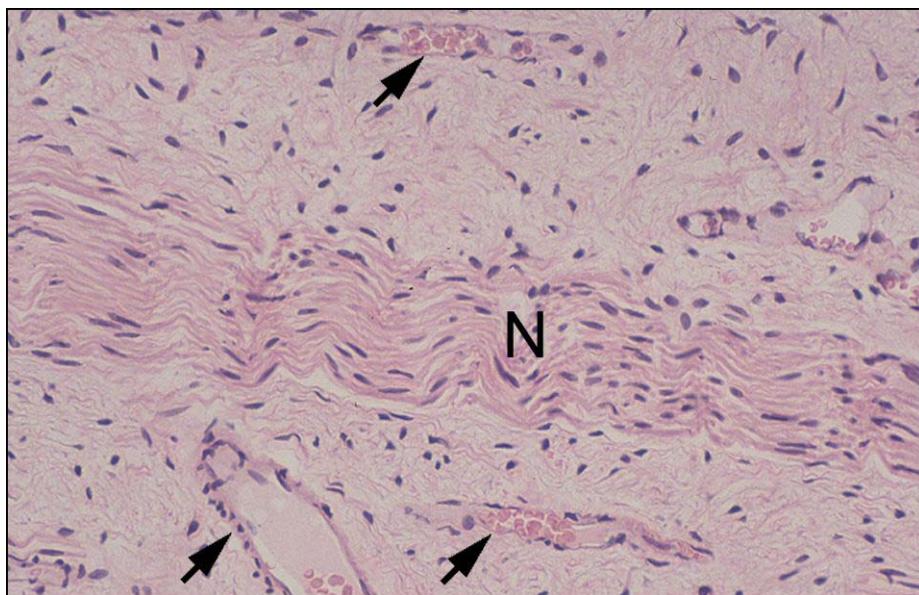


Abb. 09: Bindegewebe aus dem Zentrum der Pulpa. Von links nach rechts läuft ein kleiner Nerv (N). Mehrere Venolen mit Erythrozyten im Inneren sichtbar (Pfeile). Kollagene Fasern sind blassrosa.
HE, Vergr.: x 280

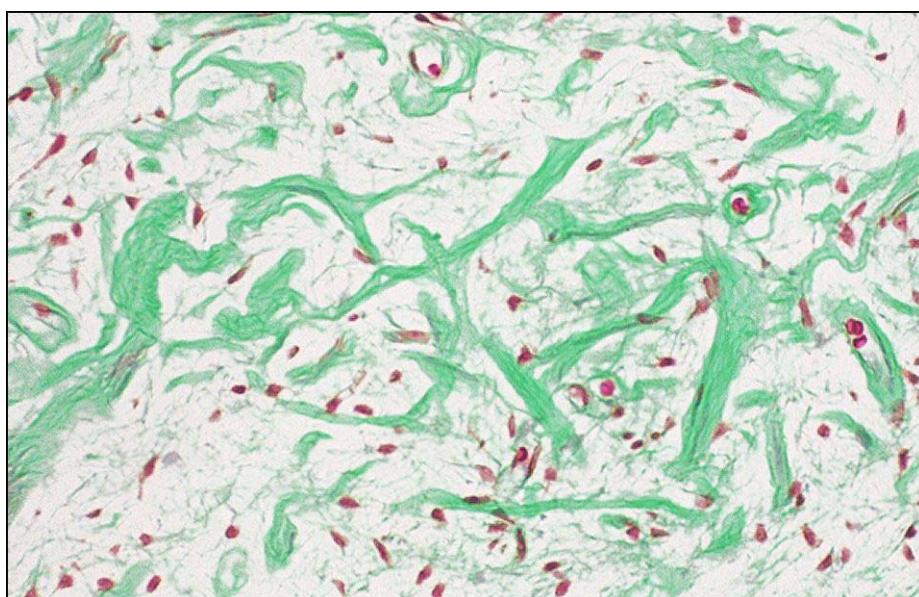


Abb. 10: Bindegewebe aus der Peripherie der Wurzelpulpa.
Die grün gefärbten Kollagenfasern bilden ein ganz zartes Grundgerüst sowie ein dreidimensionales Netzwerk größerer Bündel.
Goldner, Vergr.: x 280

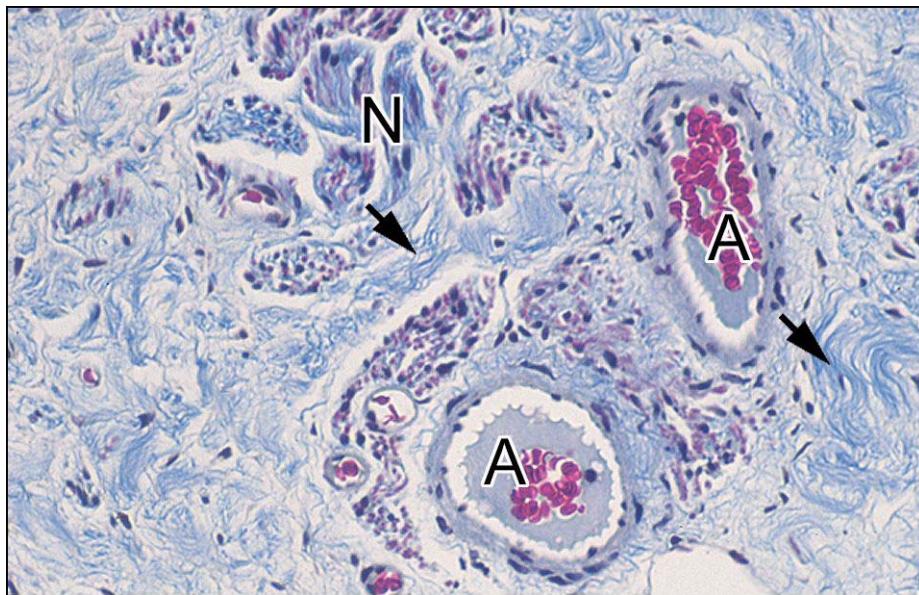


Abb. 11: Zwei Arteriolen (A) mit Erythrozyten im Lumen.

Etwas weiter oben im Bild sind dunklere Nervenfaserbündel zu erkennen. Kollagenfasern (Pfeile) sind gewellt und umgeben das Nerv- und Gefäßsystem.
Masson-Trichrom, Vergr.: x 280

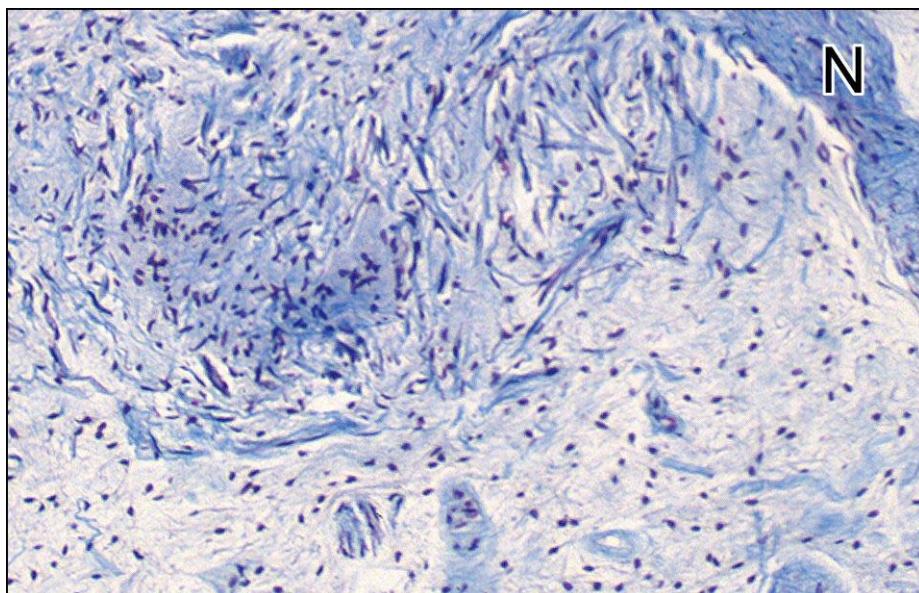


Abb. 12: Im Zentrum liegen viele gestreckte kollagene Fasern. Rechts oben im Bild ist ein Nervenfaserbündel (N) zu sehen.
Masson-Trichrom, Vergr.: x 130

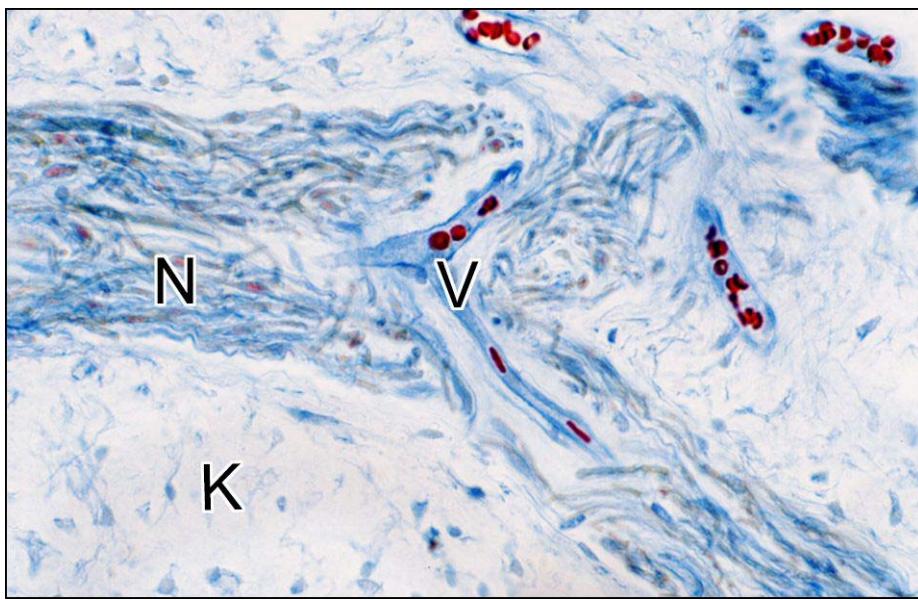


Abb. 13: Nervenfasern (N) werden von Venolen (V) und Kollagenfasern (K) begleitet.
Azan, Vergr.: x 530

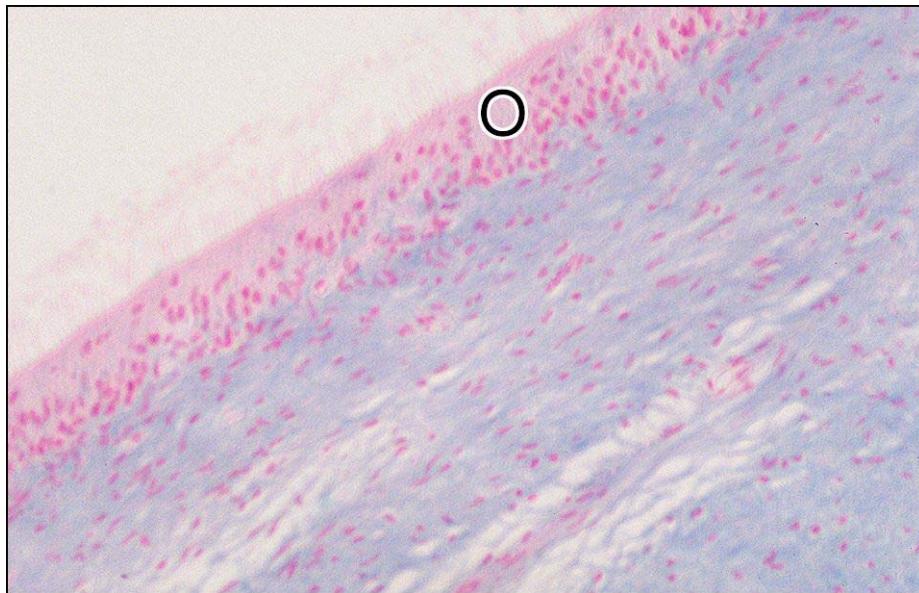


Abb. 14: Alzianblau (pH 2,5) färbt die Grundsubstanz des Bindegewebes schwach blau an. Die Kollagenfasern treten kaum als besondere Strukturen hervor. O = Odontoblastensaum. Gegenfärbung mit Kernechtrot. Alzianblau pH 2,5; Vergr.: x 280

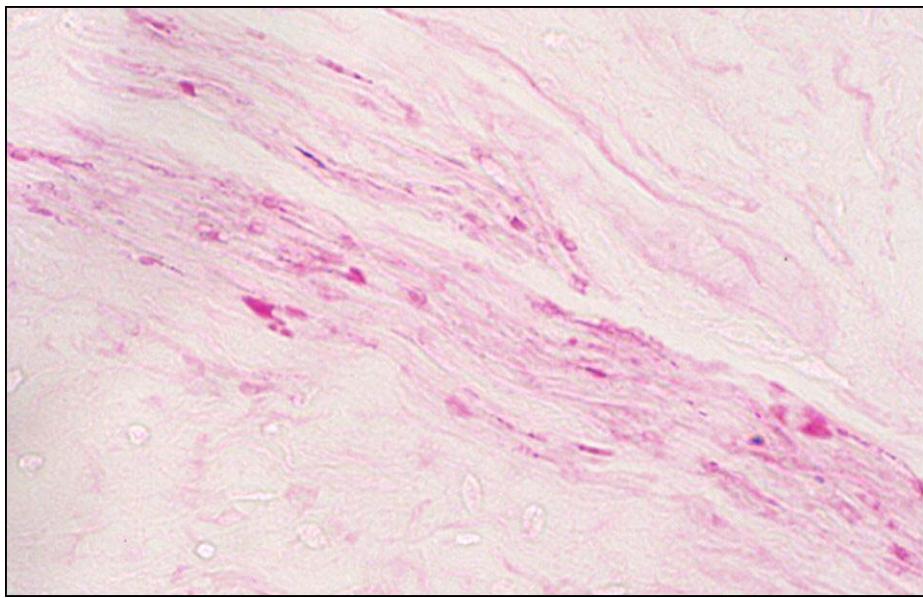


Abb. 15: In der PAS-Färbung werden ausschließlich die Glykolgruppen der GAGs und neutrale Glykoproteine angefärbt. Diagonal laufen zwei Nerven durch das Bild.

PAS, Vergr.: x 530

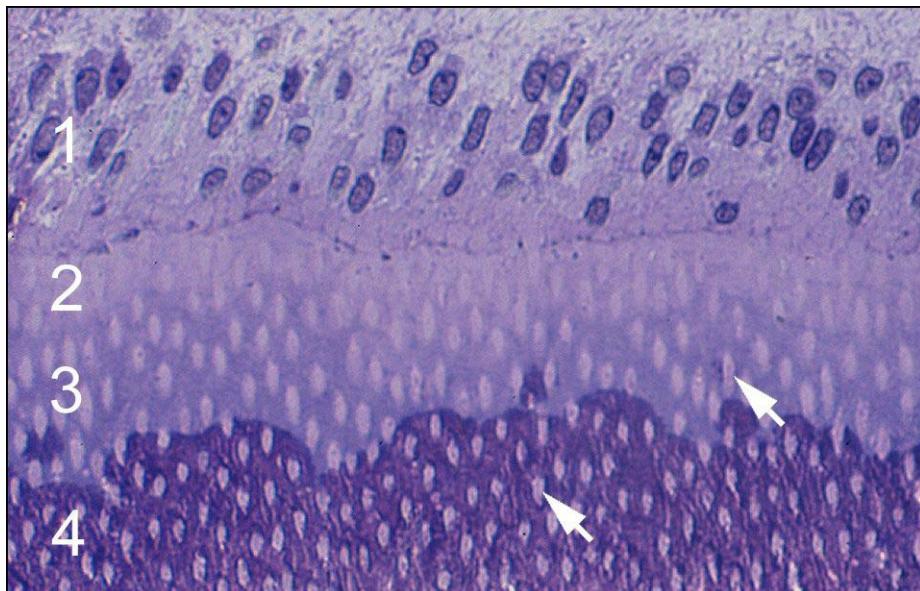


Abb. 16: Übergang von der Pulpa ins Dentin: Odontoblastensaum (1), Prädentin (2), langsam verkalkendes Dentin (3), stark verkalkendes Dentin (4). Odontoblastenfortsätze ziehen durch die Dentinkanälchen (Pfeile).

Semidünnsschnitt, Toluidinblau, Vergr.: x 530

7.2. Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Auswertung elektronenmikroskopischer Präparate. An kollagenen Fasern wurde der Durchmesser und die Länge des periodischen Bandenmusters (D-Periode) vermessen; Proteoglykane wurden hinsichtlich der Länge und Breite ihrer Gestalt und ihrer Ansatzstellen an den Kollagenfibrillen bestimmt. Die Resultate sind in den Tabellen 15 + 16 weiter unten zusammengefasst.

7.2.1. Routine-TEM und TEM mit CMB – Ein Vergleich

Mit Hilfe der Routine-Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) lässt sich die Ultrastruktur der Gefäße, Fibroblasten, Nervenfasern mit ihren Myelinscheiden und des Extrazellularraumes klar analysieren (Abb. 18, 19). Die Kollagenfibrillen zeigen bei günstiger Schnittführung das typische Querstreifenmuster. Eine Markierung der Proteoglykane fehlt dagegen fast vollständig, d.h. die Existenz von Proteoglykanen an Kollagenfibrillen kann mit dieser Methode nicht präzise bestätigt werden. Erst die Präparate mit CMB-Vorbehandlung liefern eindeutige Bilder von Morphologie und Lokalisierung der Proteoglykane (Abb. 32, 33), und auch die einzelnen Banden des Querstreifenmusters der Kollagenfibrillen sind hier klarer erkennbar und lassen sich mit dem Modell nach Scott (Abb. 7) vergleichen. Am stärksten dominiert die b-Bande mit ihren beiden dunklen Streifen. Exakt zwischen zwei b-Banden setzen die Proteoglykanpräzipitate an den Kollagenfibrillen an. Es handelt sich hierzu folge der Angaben Scotts (1988) um chondroitinsulfat- und dermatansulfathaltige Proteoglykane, die sich an die d-Bande anheften. Die Existenz dieser GAGs in der menschlichen Zahnpulpa wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation mit immunhistochemischer Technik weiter oben nachgewiesen.

7.2.2. Darstellung der Kollagenfibrillen

Die einzelne Kollagenfibrille ist im Präparat in ihrem Durchmesser konstant und hat eine Länge, die mit der Schnitt-Technik nicht bestimmbar ist. Sie tritt plötzlich an einer Stelle in die Bildebene ein und verschwindet ebenso schnell wieder, eine Eigenschaft, die u. a. durch ihren gewellten Lauf zu erklären ist. Der Durchmesser der Fibrillen liegt im Schnitt bei ca. 38 nm, die D-Periode des Querstreifenmuster misst ca. 50 nm (siehe Tabellen 15 + 16). An jede Fibrille ist in regelmäßigen Abständen ein Proteoglykan angelagert, d.h. pro D-Periode findet sich im Schnittbild ein Proteoglykan, das benachbarte Fibrillen verbindet. Diese gleichmäßige Anheftung von Präzipitaten an Kollagenfibrillen ist in den Abb. 32 und 33 klar zu sehen. Die Abbildungen zeigen Bündel paralleler Fibrillen, die sich trotz ihrer hohen Dichte in keinem Fall gegenseitig berühren; sie sind immer über Proteoglykanpräzipitate, die die Weite des Spaltes zwischen zwei Kollagenen offensichtlich festlegen, miteinander verknüpft, bzw. voneinander getrennt. Parallele Fibrillenbündel treten ubiquitär im Bindegewebe der Zahnpulpa auf. Die Bündel weisen hohe Formstabilität auf, da die Fibrillen untereinander durch zahllose Proteoglykane verbunden sind (Abb. 31). Man findet parallele Kollagenfibrillen häufig in der Nähe von Nervenfasern und Fibroblasten (Abb. 19). Kollagenfibrillen treten auch im Interzellularraum der Odontoblastenschicht (Abb. 24) und in der Nähe der selten in der Pulpa anzutreffenden Mastzellen (Abb. 29) auf. In Übersichtsaufnahmen mit relativ geringem Vergrößerungsfaktor lassen sich auch Kollagenfibrillenbündel nachweisen, die unabhängig von anderen Gewebekomponenten scheinbar zufällig im Bild erscheinen. Sie tauchen wie kleine Inseln inmitten der amorphen Interzellulärsubstanz auf.

Ein besonderes Augenmerk soll an dieser Stelle auf die Gefäße, Nervenzellfortsätze und elastische Fasern gerichtet werden, denn hier ist eine Regelmäßigkeit in der Anordnung extrazellulärer fibrillärer Strukturen zu erkennen. Endothel- und Schwannzellen sind an ihrer Basallamina beinahe lückenlos mit kleinen Proteoglykanen besetzt, die ihrerseits in direkter Verbindung zu Kollagenfibrillen stehen können. Die mit der Basallamina assoziierten CMB-Präzipitate sind deutlich kleiner als diejenigen, die an die Kollagenfibrillen angeheftet sind. Die Kollagenfibrillenbündel folgen in paralleler Ausrichtung dem Nerven- bzw. Gefäßverlauf, da sie im Querschnittsbild der Gefäße- und Nervenfasern meist auch im Querschnitt

angetroffen sind. Auf die längsverlaufenden Kollagenfibrillen folgen zumeist zirkulär angeordnete Fibrillen (Abb. 21).

Die querangeschnittenen Fibrillen sind annähernd rund; an ihnen lässt sich eindeutig demonstrieren, dass die kollagenassoziierten Proteoglykane in allen Richtungen von der Fibrille abstehen können. Eine Fibrille kann sich daher mit mehreren anderen verbinden (Abb. 20). Kollagenfibrillen können in parallelen Bündeln, oder, in seltenen Fällen, auch einzeln auftreten. Auch in diesem Falle finden sich an ihrer Oberfläche CMB-Präzipitate. Die Fibrillenbündel überkreuzen sich in verschiedenen Winkeln; dabei bilden sich auch Verbindungen zweier nicht parallel verlaufender Fibrillen über ihre Proteoglykane aus (Abb. 34, 35).

Im Prädentin zwischen den Tomes'schen Fasern finden sich in einer hohen Konzentration Kollagenfibrillen in der extrazellulären Matrix. Doch trotz ihrer hohen Dichte richten sie sich nicht parallel zueinander aus, sondern ziehen kreuz und quer an den Odontoblastenfortsätzen vorbei (Abb. 25). Der Betrachter gewinnt aus diesem Grund auch den Eindruck, die Fasern seien hier kürzer als im zentralen Bindegewebe der Zahnpulpa, was aber nicht unbedingt der Fall sein muss; zur Überprüfung dieser Aussage jedoch reichen die mit histologischer Technik erzielten Ergebnisse nicht aus. Ein Beweis, ob kollagene Fasern im Prädentin tatsächlich kürzer sind, kann nur durch eine dreidimensionale Rekonstruktion bestätigt oder widerlegt werden.

7.2.3. Darstellung der Proteoglykane

Proteoglykane binden das Cupromeronic Blue stark und sind daher als sehr dunkle, scharf konturierte, nadelförmige Strukturen zu erkennen. Sie sind beinahe überall lokalisiert: Frei im Bindegewebe, an Basallaminae und an Kollagenfibrillen. An Kollagenfibrillen beträgt ihr Durchmesser im Schnitt ca. 8 nm (siehe Tabellen 15 + 16). Die Länge variiert –ausschnittsbedingt- ungefähr zwischen 40 und 200 nm. Besonders dünne und kurze Nadeln finden sich an den Basallaminae von Zellen (Abb. 22), besonders lang (Durchmesser = 2-3 nm, Länge = 25 nm) sind einzelne, z. T. verzweigte Präzipitate, die vermutlich Hyaluronsäure mit assoziierten Proteoglykanen darstellen, frei im Bindegewebe liegen und unterschiedlich ausgerichtet sind (Abb. 28). Ihre Dimensionen sind im Ultradünnenschnitt nicht sicher zu bestimmen. Die Proteoglykane an den Kollagenfibrillen können schräg oder senkrecht von ihrer

Oberfläche abstehen, oder parallel zu ihrer Längsachse verlaufen. Weiterhin gewinnt man den Eindruck, dass einzelne Proteoglykane streckenweise auch zirkulär an der Oberfläche der Fibrille verlaufen. Präzipitate, die direkt aus der Bildebene treten, sehen wie schwarze Punkte aus, die bei höherer Vergrößerung ein helles Zentrum besitzen.

7.2.4. Nebenbefunde

Unabhängig von der Fragestellung dieser Dissertation sollen einige Entdeckungen hier kurz angesprochen werden.

Die Abb. 23 zeigt eine kleine Venole, die von wenigen Kollagenfibrillen umgeben ist. Bemerkenswert sind die Ausstülpungen der Endothelwand, die sogenannten Marginalfalten, die sich nur an Venolen und Kapillaren befinden.

Ein Fibroblast ist in Abb. 28 zu sehen. Das darin enthaltene endoplasmatische Retikulum ist die Produktionsstätte für GAGs und Protoprotifibrillen. Diese werden sezerniert und sind im vorliegenden Präparat rund um den Fibroblasten im Interzellularraum zu finden. Die durch das CMB markierten Proteoglykane sind frei in der Matrix oder an Kollagenfibrillen zu finden. Mitunter sind sie auch mit Zellmembranen verknüpft. Wegen der besonders kräftigen Reaktion des Cupromeronic Blue mit den Granula der Mastzelle wurde die Abb. 29 ebenfalls als Bildmaterial in die Dissertation aufgenommen. Diese freie Bindegewebszelle produziert Histamine und Heparine, die sich aufgrund ihrer negativen Ladungen tiefschwarz färben. Die Granula lagern sich um den Zellkern an und füllen fast den ganzen Intrazellularraum aus.

Als letzten Nebenbefund sind die beiden Zellkontakte zu nennen (Abb. 26, 27), die in der Odontoblastenschicht fotografiert wurden. Es handelt sich dabei um eine zonula adhaerens und eine gap junction. Die zonula adhaerens dient der mechanischen Verbindung zweier Zellen, während über die gap junction Informationen ausgetauscht werden. In den in dieser Schicht engen Interzellularräumen kann man einzelne kleine Kollagenfibrillenbündel entdecken.

7.2.5. Vermessungen der extrazellulären Matrix

In den Tabellen 12 + 13 werden die Werte unserer Vermessungen aufgelistet. Der Fibrillendurchmesser der Kollagene wurde zwei Mal pro Bild bestimmt: Einmal anhand der längsangeschnittenen Fasern und ein weiteres Mal anhand der querangeschnittenen. Die Bandenlänge wurde 5 x pro Bild gemessen und dann der Durchschnittswert verwendet. Für die Durchmesser der Fibrillen und die Länge und Breite der Proteoglykane wurden Maximalwerte verwendet, da die kleineren ausgerechneten Werte das Resultat verfälschen würden, weil die Gefahr besteht, dass Strukturen vorzeitig die Schnittebene verlassen und kürzer erscheinen, als sie in Wirklichkeit sind.

Tabelle 15: Vermessung der 0,3 M CMB-Präparate

Präparat	Bildnummer	Banden-länge	Längsschnitt Fibrillen-durchmesser	Querschnitt Fibrillen-durchmesser	Nadel-länge	Nadel-breite
20/02	52.0KE.4.6.8.	55,6 nm	38,9 nm	37,8 nm	77,8 nm	8,6 nm
20/02	39.0KE.4.6.7.	44,9 nm	43,5 nm	52,4 nm	89,9 nm	9,7 nm
23/02	52.0KE.5.5.3.	55,8 nm	49,2 nm	45,2 nm	76,4 nm	7,4 nm
29/02	52.0KE.6.6.5.	49,2 nm	41,9 nm	47,6 nm	98,5 nm	7,4 nm
36/02	52.0KE.5.5.6.	57,5 nm	39,4 nm	50,9 nm	49,2 nm	7,0 nm
39/02	28.5KE.3.6.0.	45,7 nm	32,0 nm	33,6 nm	53,3 nm	9,2 nm
45/02	39.0KE.6.5.3.	55,3 nm	49,8 nm	53,2 nm	53,1 nm	8,3 nm
75/02	52.0KE.7.6.3.	47,6 nm	33,6 nm	36,1 nm	41,0 nm	7,8 nm
78/02	52.0KE.7.8.3.	49,2 nm	31,2 nm	43,5 nm	49,2 nm	7,8 nm
81/02	73.0KE.7.6.7.	41,6 nm	25,5 nm	25,5 nm	47,5 nm	7,1 nm
	Durchschnitt	<u>50,2 nm</u>	<u>38,5 nm</u>	<u>42,6 nm</u>	<u>59,1 nm</u>	<u>8,0 nm</u>

Tabelle 16: Vermessung der 0,06 M CMB-Präparate

Präparat	Bildnummer	Banden-länge	Längsschnitt Fibrillen-durchmesser	Querschnitt Fibrillen-durchmesser	Nadel-länge	Nadel-breite
21/02	52.0KE.5.5.0.	55,8 nm	41,0 nm	37,0 nm	82,1 nm	9,0 nm
21/02	52.0KE.5.4.7.	50,1 nm	49,2 nm	44,4 nm	73,1 nm	8,2 nm
24/02	39.0KE.3.7.6.	55,7 nm	44,5 nm	54,6 nm	60,2 nm	7,8 nm
24/02	73.0KE.3.7.7.	57,9 nm	40,0 nm	45,2 nm	75,3 nm	7,0 nm
26/02	52.0KE.7.2.0.	50,9 nm	36,9 nm	41,1 nm	59,9 nm	10,7 nm
27/02	52.0KE.5.6.3.	45,1 nm	41,0 nm	47,7 nm	82,0 nm	7,8 nm
37/02	52.0KE.7.2.5.	53,4 nm	41,0 nm	43,5 nm	55,8 nm	9,0 nm
40/02	28.5KE.6.6.0.	52,5 nm	40,5 nm	43,5 nm	57,0 nm	10,5 nm
43/02	52.0KE.6.7.2.	48,4 nm	32,8 nm	32,9 nm	49,2 nm	7,8 nm
46/02	52.0KE.7.1.6.	49,2 nm	36,1 nm	43,1 nm	50,1 nm	8,2 nm
74/02	73.0KE.7.5.1.	50,5 nm	35,6 nm	35,7 nm	53,5 nm	8,3 nm
77/02	52.0KE.7.9.0.	45,1 nm	31,2 nm	37,0 nm	43,5 nm	8,2 nm
	Durchschnitt	<u>51,2 nm</u>	<u>39,2 nm</u>	<u>42,1 nm</u>	<u>61,8 nm</u>	<u>8,5 nm</u>

TEM – Bilder ohne CMB:



Abb. 17: Kollagenfibrillen in der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).

Zu beachten ist der starke Kontrast zwischen den dunklen Kollagenfibrillen und dem hellen Hintergrund. Die Querstreifung ist nur undeutlich erkennbar, ebenso wie die assoziierten Proteoglykane.
TEM ohne CMB, Vergr.: x 121720

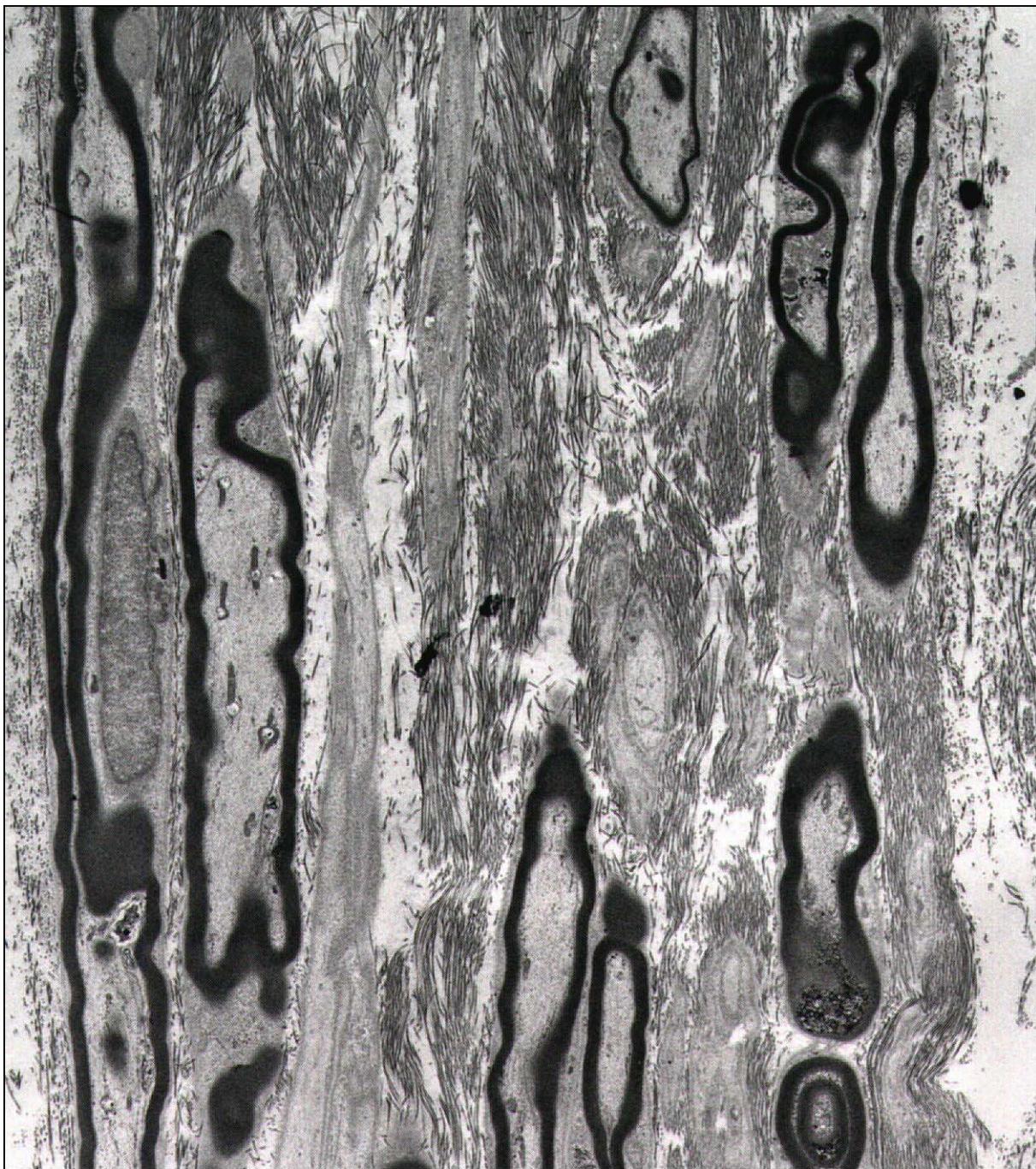


Abb. 18: In der Nähe von myelinisierten Nervenaxonen, hier schwarz umrandet, finden sich auffallend viele Kollagenfibrillen. Die Fibrillen sind zum größten Teil schräg-, die Nerven ebenfalls schrägangeschnitten; die kollagenen Fibrillen verlaufen also überwiegend parallel zu den Axonen.
TEM ohne CMB, Vergr.: x 3900

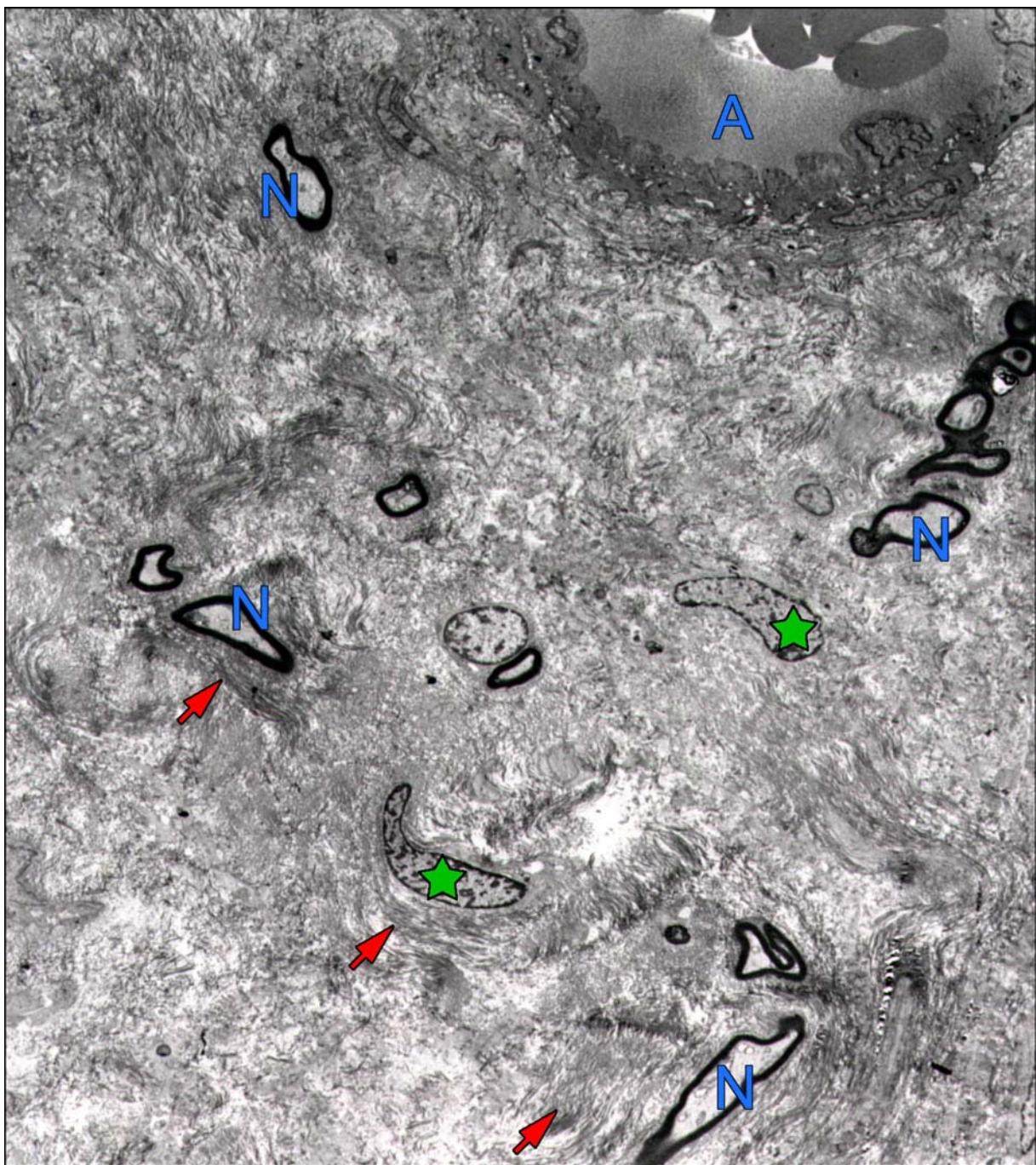


Abb. 19: Gewellte Bündel von Kollagenfibrillen (Pfeile) in der Nähe der Fibroblasten (Sterne) und myelinisierten Nervenfasern (N). Rechts oben im Bild befindet sich eine Arteriole (A) mit Erythrozyten im Lumen. Auch um sie verlaufen längs und zirkulär angeordnete Kollagenfibrillen.
TEM ohne CMB, Vergr.: x 2840

0,3 M CMB - Bilder:

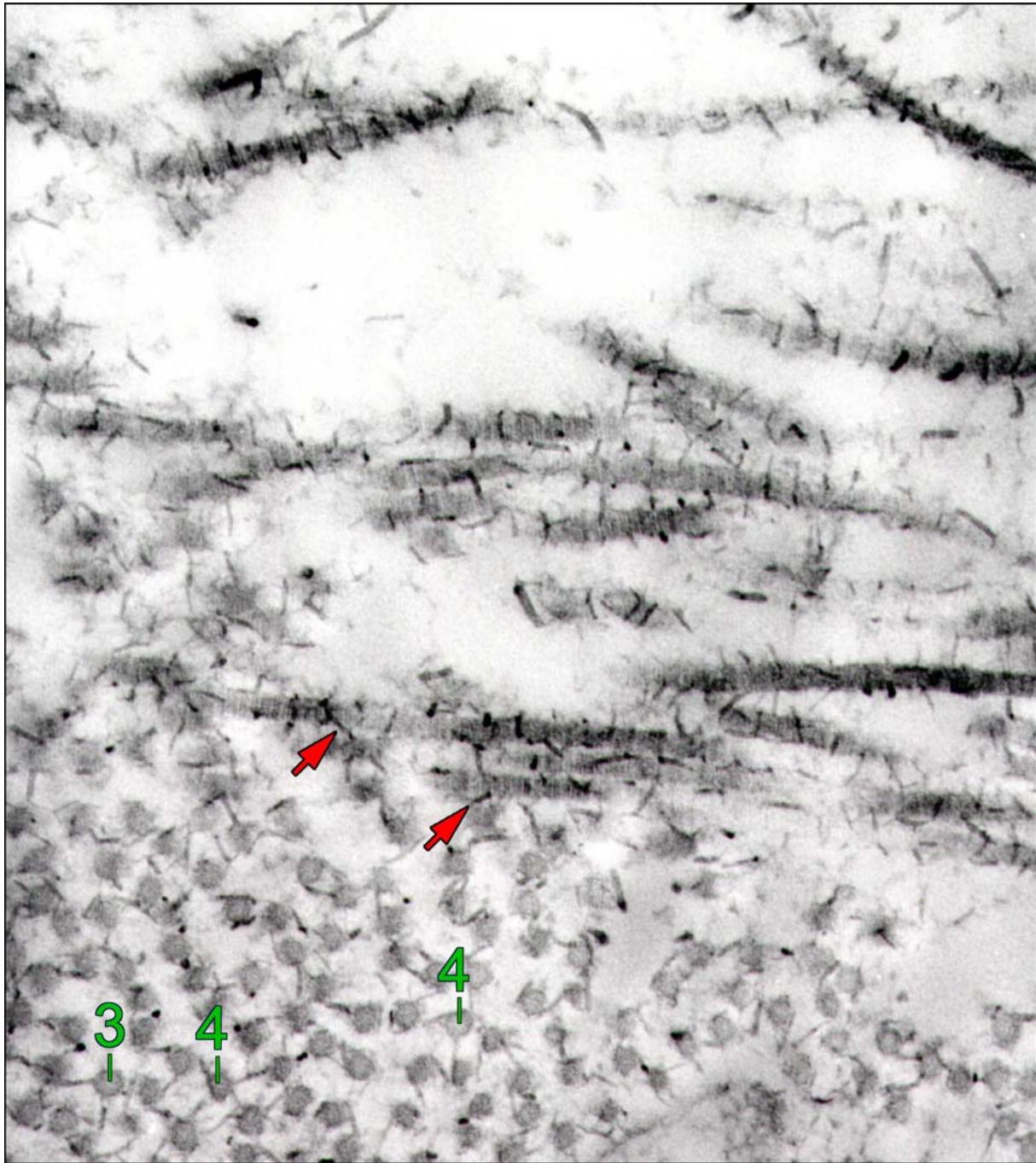


Abb. 20: Quer- und längsangeschnittene Kollagenfibrillen sowie mittels CMB dargestellte Proteoglykane in einer Bildebene. Die Proteoglykanpräzipitate an den querangeschnittenen Fibrillen verbinden diese mit mehreren benachbarten Fibrillen. Die Zahlen geben die Anzahl der Bindungspartner an. Auch zwischen senkrecht aufeinanderstehenden Kollagenfibrillen kommt es zu Verknüpfungen (Pfeile).

0,3 M CMB, Vergr.: x 66750

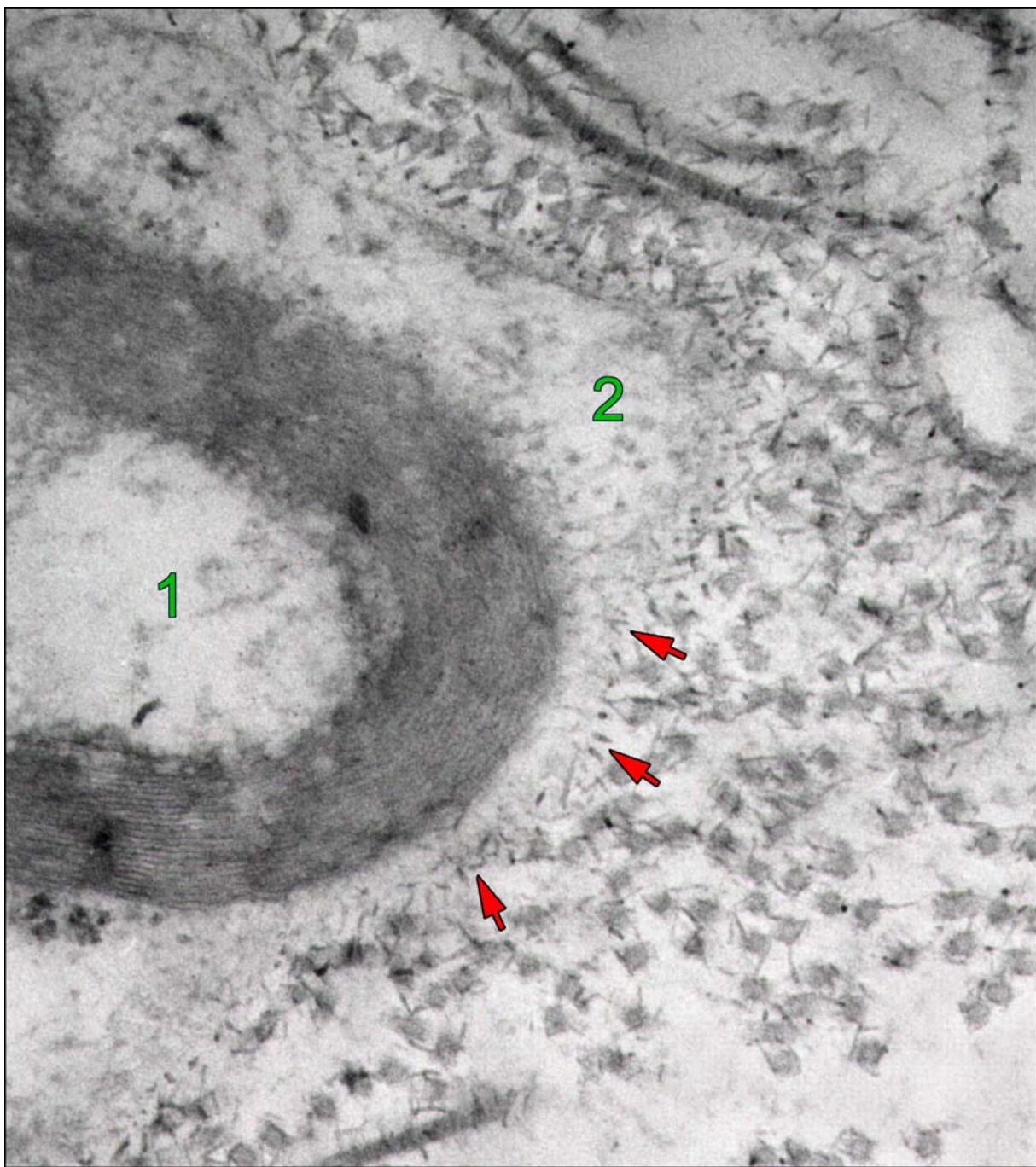


Abb. 21: Myelinisierte Nervenfaser (1) und Schwann'sche Zelle (2). Die Basallamina der Schwann'schen Zelle ist von kleinen Proteoglykanen (Pfeile) gesäumt. Auffällig ist auch hier wieder, dass querangeschnittene Kollagenfibrillen näher an der Schwann'schen Zelle liegen als die längsangeschnittenen, d. h. dass die Vorzugsausrichtung der Fibrillen parallel zur Nervenfaser verläuft.

0,3 M CMB, Vergr.: x 65550

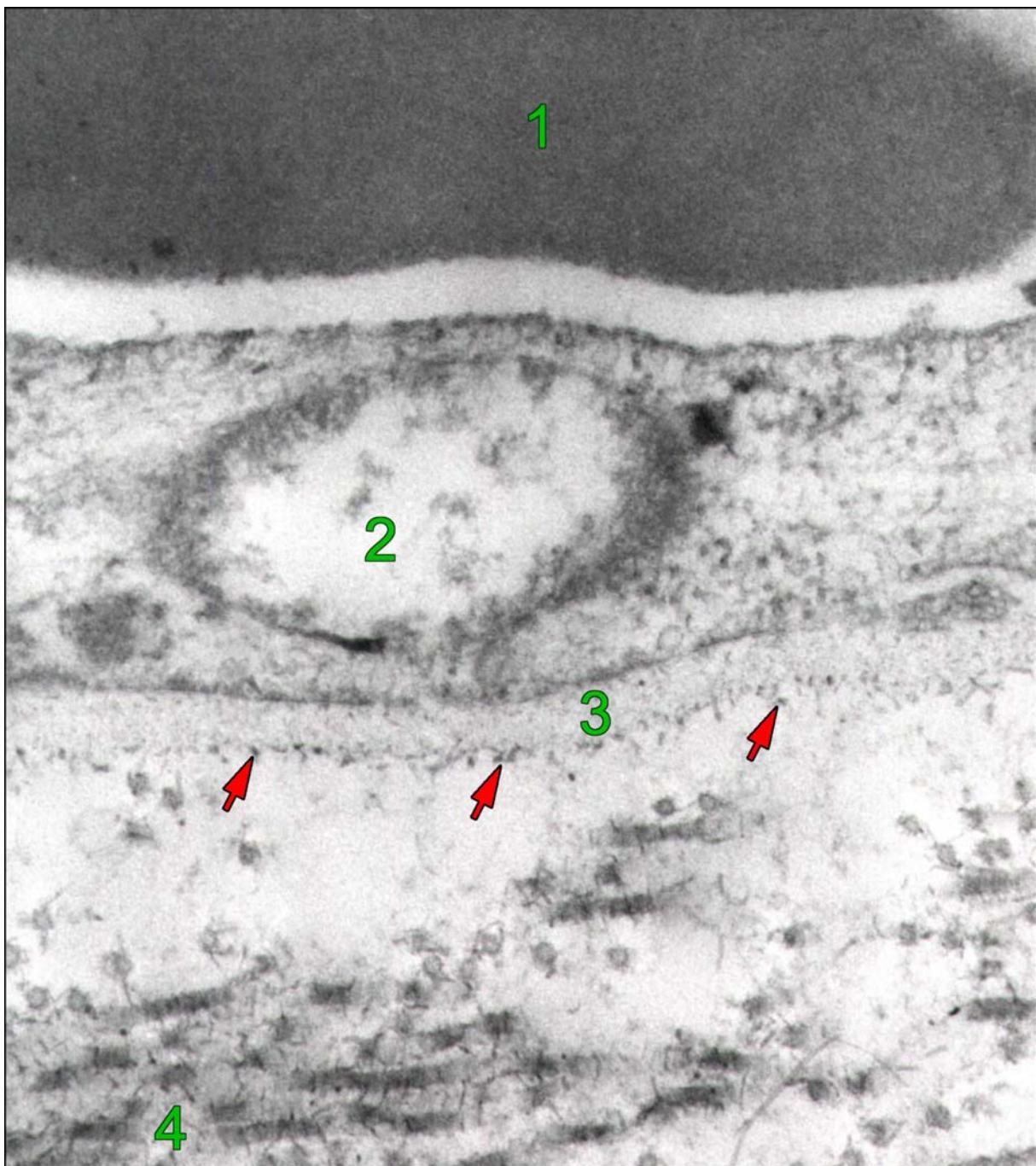


Abb. 22: Blutkapillare mit einem Erythrozyten (1). 2: Endothelzelle; 3: Basallamina der Kapillare mit feinen CMB-Präzipitaten (Pfeile); 4: Kollagenfibrillen.
0,3 M CMB, Vergr.: x 65550

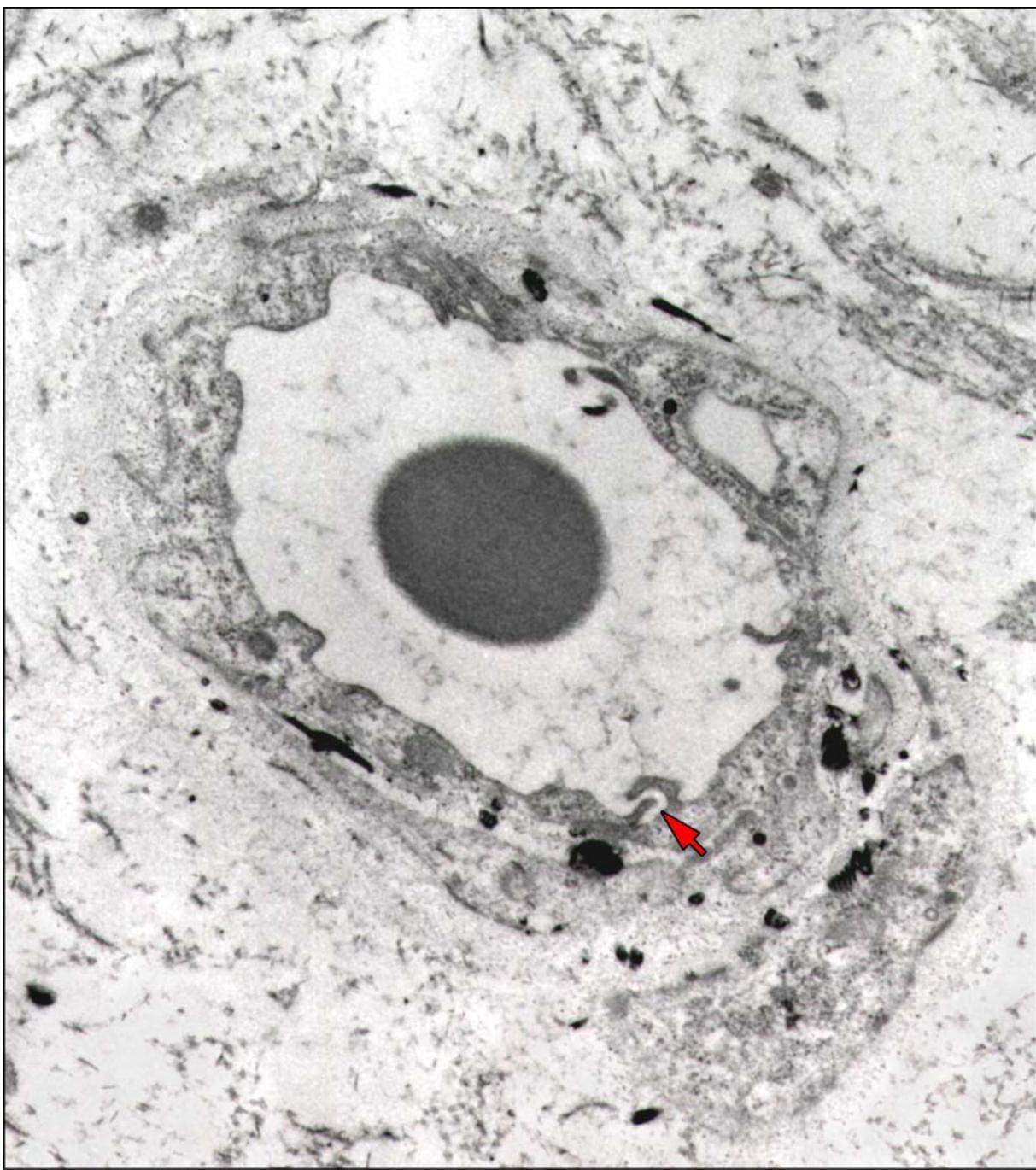


Abb. 23: Eine kleine Venole mit apikalen Membranfalten (Pfeil). Um das kleine Gefäß befinden sich hier relativ wenige Kollagenfibrillen. Im Lumen ist neben den Proteinpräzipitaten ein Erythrozyt zu sehen.
0,3 M CMB, Vergr.: x 20700

0,06 M CMB - Bilder:

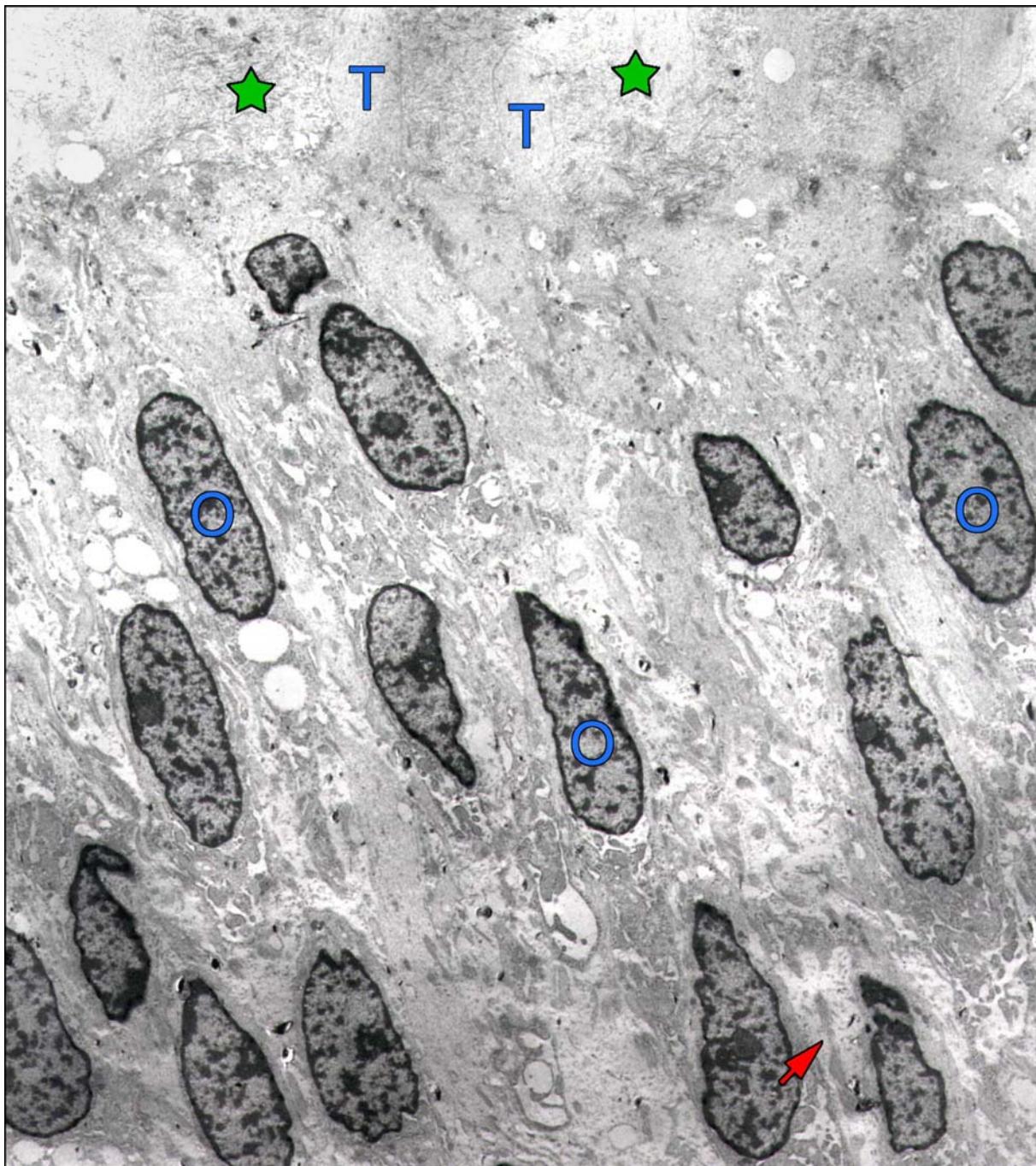


Abb. 24: Odontoblastensaum, erkennbar an den vielen, dicht beieinander liegenden Zellkernen (O). In dieser Schicht findet man nur wenige Kollagenfibrillen (Pfeil), im Gegensatz zum Prädentin (Sterne), das im oberen Bildrand liegt. T = Tomes'sche Faser.
0,06 M CMB, Vergr.: x 3800

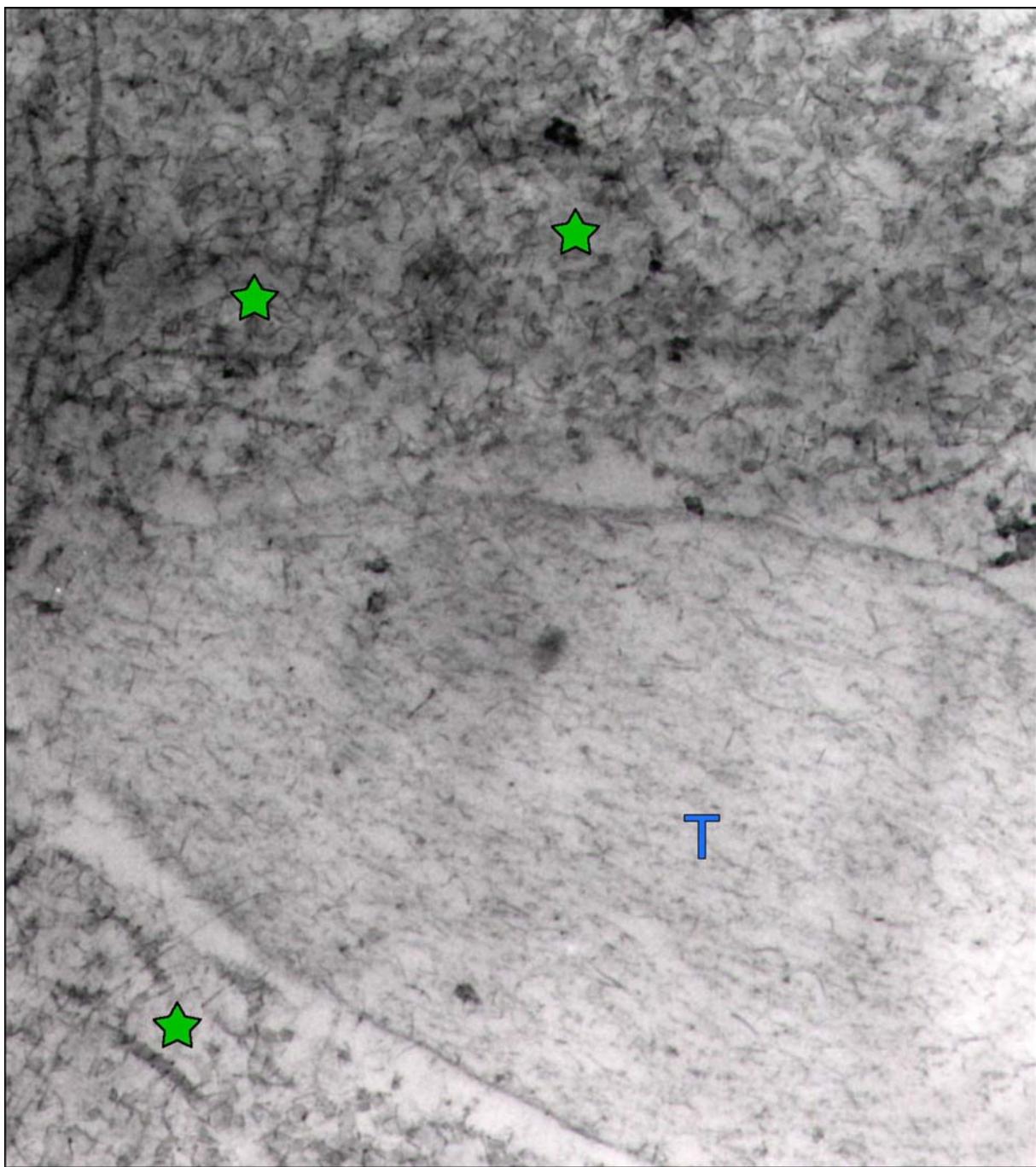


Abb. 25: Tomes'sche Faser (T) im Prädentin. Zu beachten ist die große Dichte der umgebenden Kollagenfibrillen (Sterne), die in alle Richtungen verlaufen.
0,06 M CMB, Vergr.: x 26450

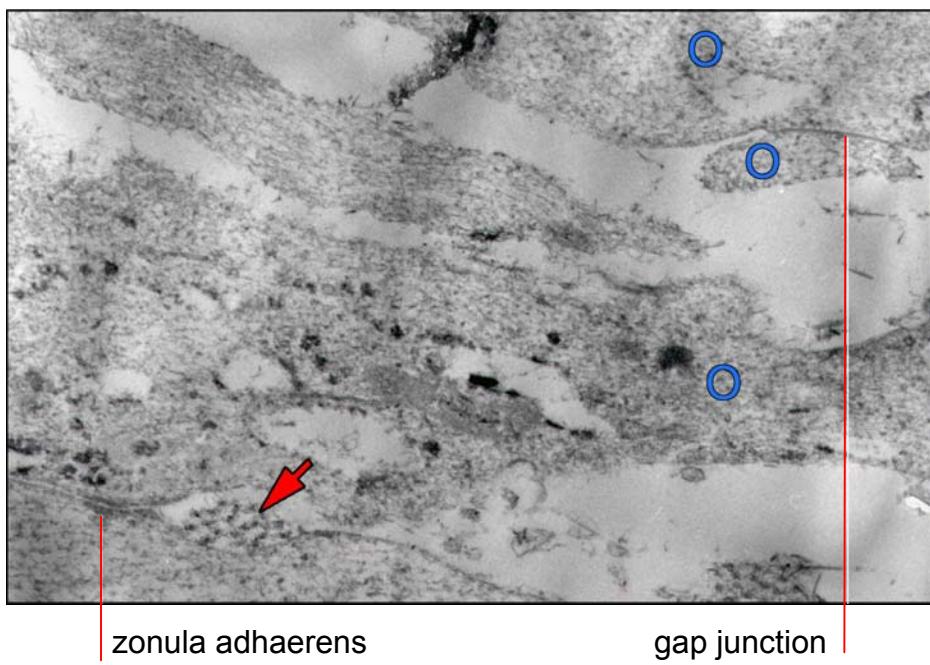
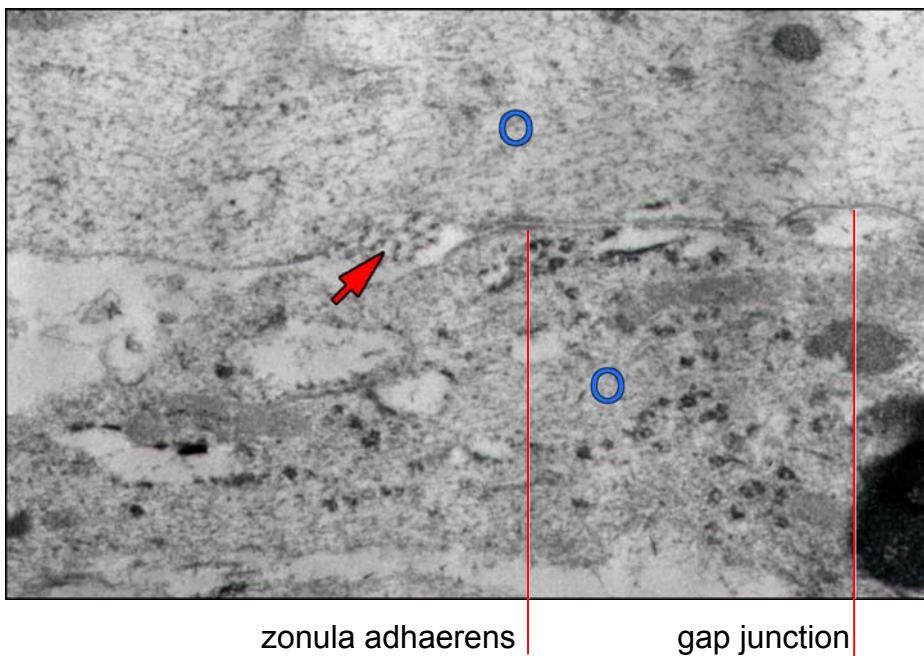


Abb. 26 + 27: In diesen Bildern sieht man die Zellkontakte zonula adhaerens und gap junction zwischen zwei Odontoblasten (O). Direkt neben der zonula adhaerens liegen einige Kollagenfibrillen (Pfeile) im extrazellulären Raum.

0,06 M CMB, Vergr.: Abb. 26 = x 26450,

Abb. 27 = x 35650

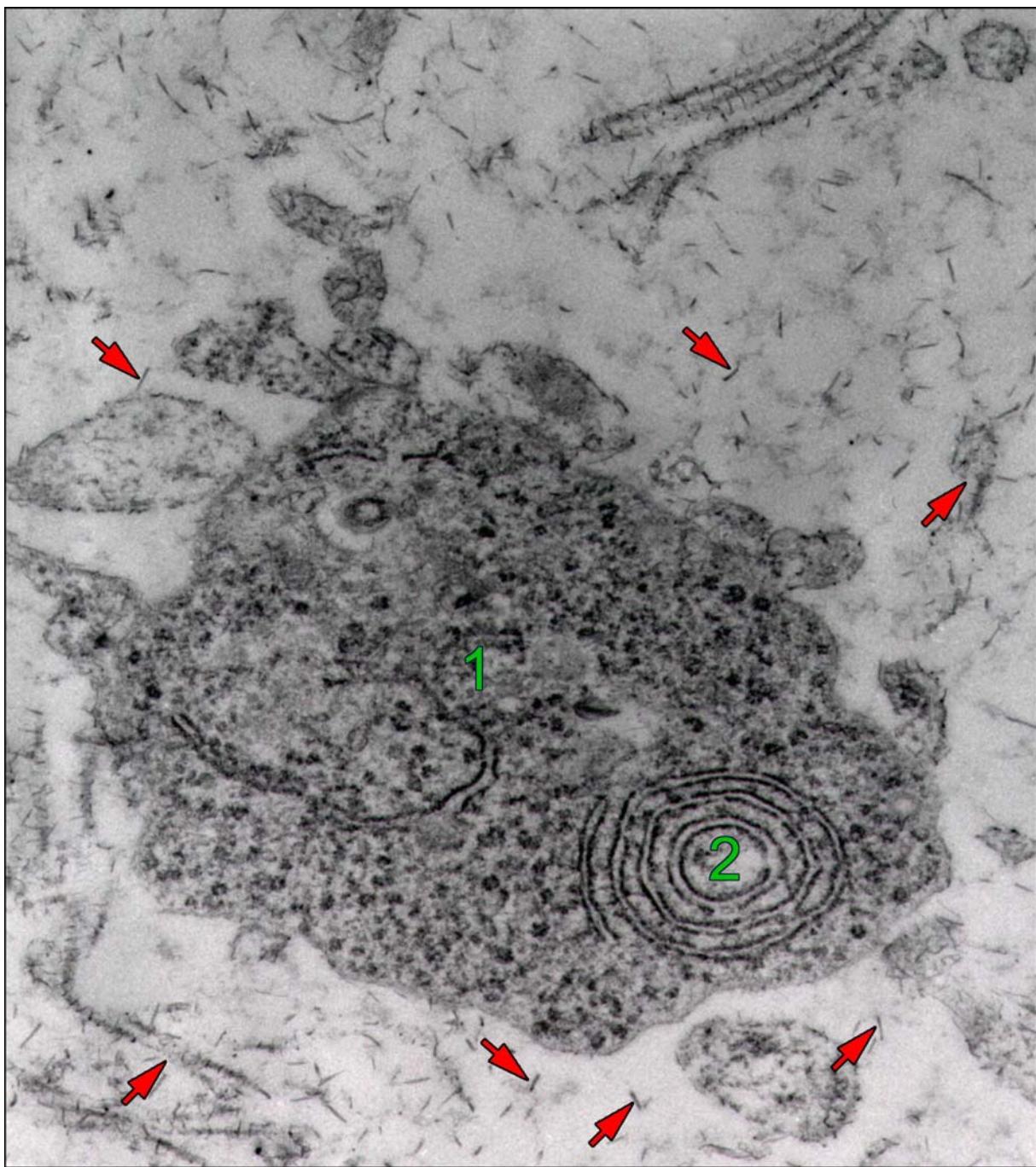


Abb. 28: Zellleib eines Fibroblasten (1). Im rauen endoplasmatischen Retikulum (2) werden Vorstufen für die Kollagensynthese und GAGs hergestellt. Einige durch CMB darstellbare Produkte kann man rund um die Zelle entdecken (Pfeile); sie finden sich frei in der Matrix oder an Kollagenfibrillen.

0,06 M CMB, Vergr.: x 36600



Abb. 29: Darstellung einer Mastzelle (M) mit der CMB-Methode. Die histamin- und heparinreichen Granula sind negativ geladen und färben sich daher tiefschwarz

0,06 M CMB, Vergr.: x 8850

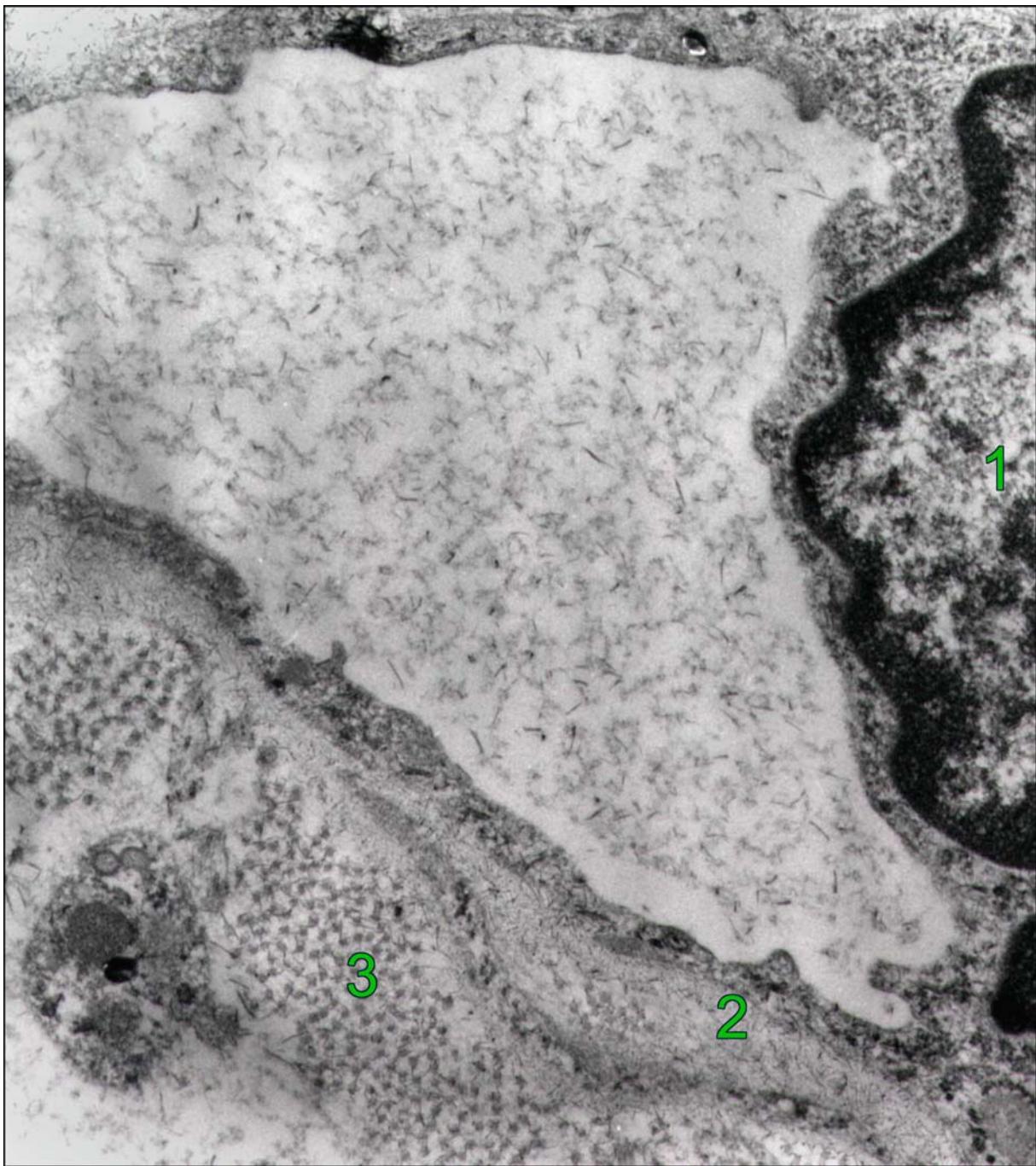


Abb. 30: Kleine Venole mit Zellkern einer Endothelzelle (1). Außen an der Basallamina des Endothels liegen Proteoglykanpräzipitate (2), darauf folgen wieder querangeschnittene Kollagenfibrillenbündel (3).
0,06 M CMB, Vergr.: x 26450

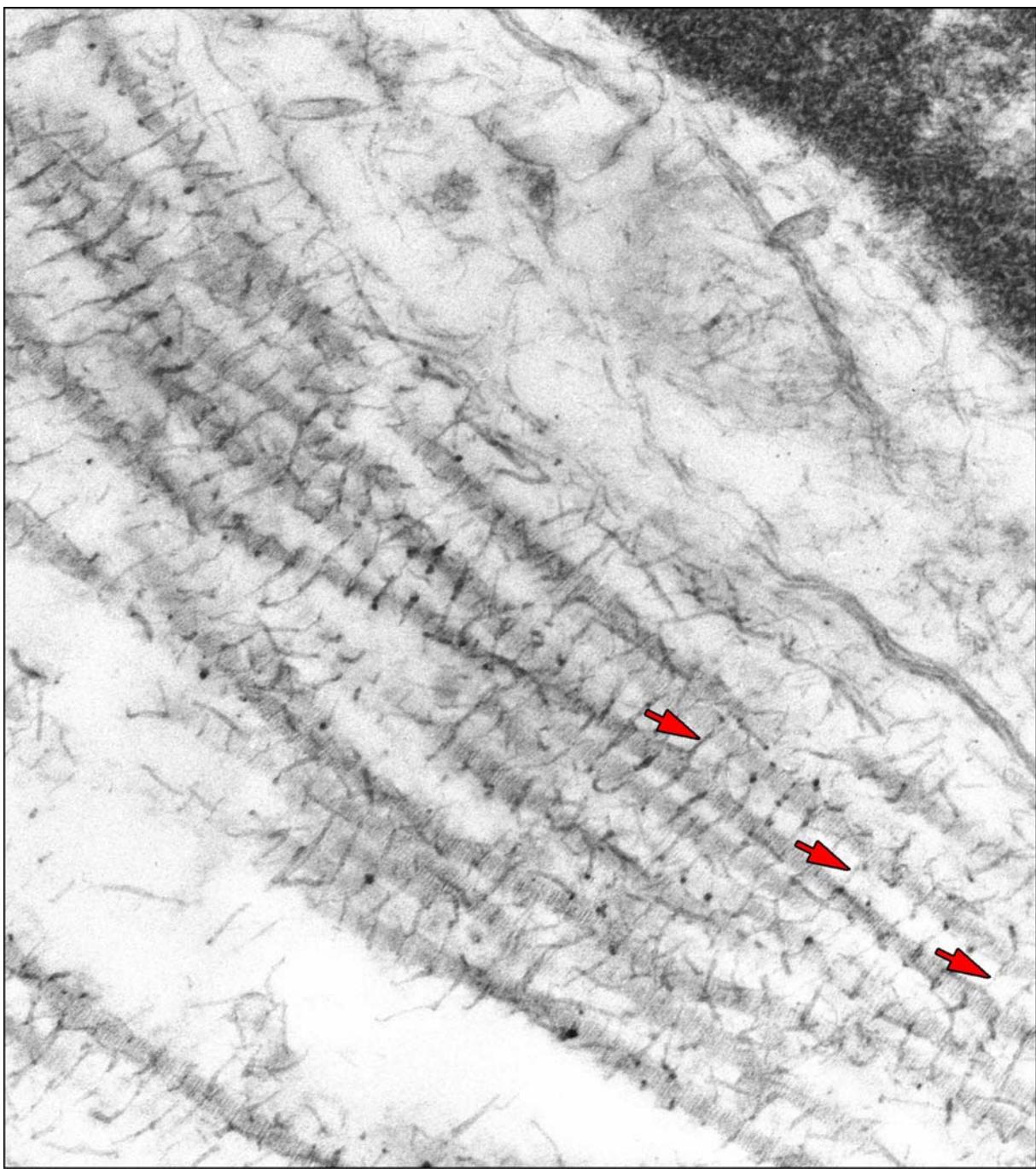


Abb. 31: Kollagenfibrillen in der Nähe eines Fibroblasten. Die parallel zueinander verlaufenden Fibrillen sind über weite Streckenabschnitte regelmäßig durch Proteoglykane miteinander verknüpft (Pfeile). Die Länge der Proteoglykanpräzipitate bestimmt den Abstand zwischen zwei Kollagenfibrillen.

0,06 M CMB, Vergr.: x 66650

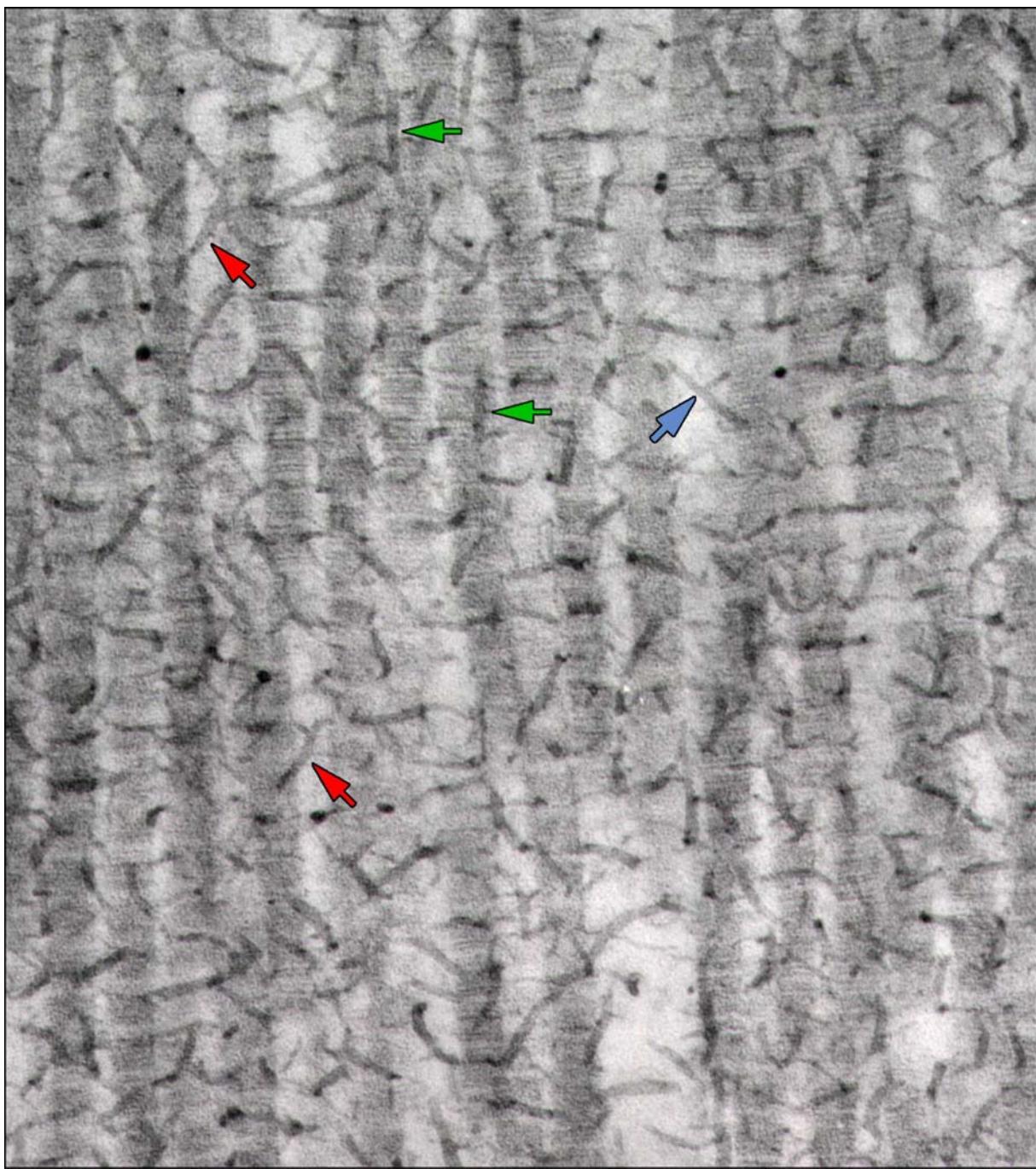


Abb. 32: Parallele Kollagenfibrillen mit Querverbindungen durch Proteoglykanbrücken. Die Proteoglykane stehen nicht immer senkrecht von den Fibrillen ab, sondern sie können auch schräg (rote Pfeile) oder sogar parallel (grüne Pfeile) verlaufen. Lange Präzipitate überspringen möglicherweise eine ganze Fibrille und heften sich erst an der übernächsten an (blauer Pfeil).
0,06 M CMB, Vergr.: x 121700

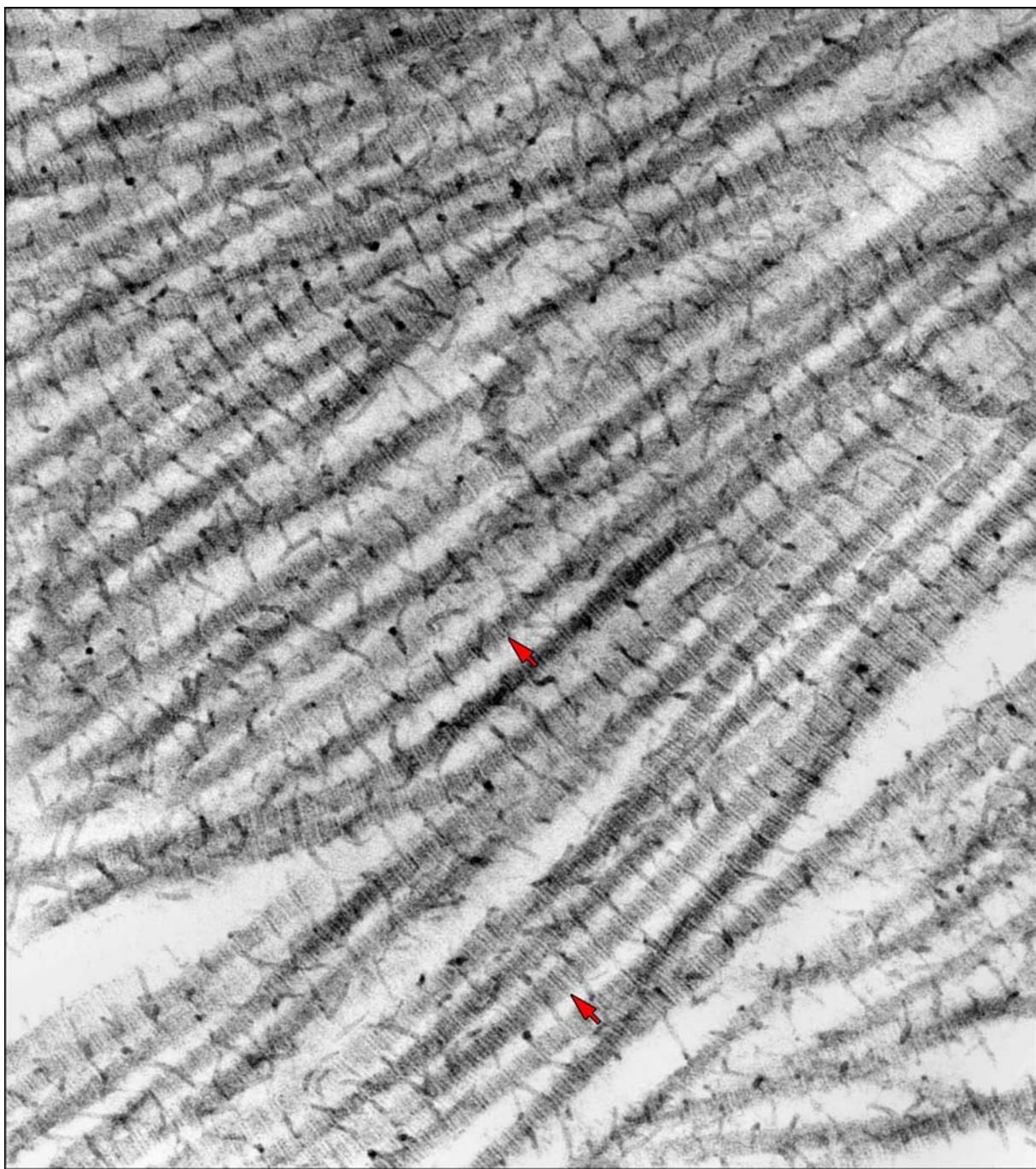


Abb. 33: An diesen parallelverlaufenden Kollagenfibrillen ist die periodische Querstreifung gut zu erkennen; am besten zu identifizieren sind die beiden dunklen Streifen der b-Bande (Pfeile). Proteoglykane, die mit dem Kollagen assoziiert sind, befinden sich in regelmäßigen Abständen genau zwischen zwei b-Banden. Es muss sich also nach Scott (2002) um ein Proteoglykan mit Dermatan- und Chondroitinsulfaten handeln (Decorin).
0,06 M CMB, Vergr.: x 121700

7.2.6. Entwicklung eines 3-D-Modells der extrazellulären Matrix

Kollagen ist das häufigste Protein in Bindegewebe und Stützgewebe. (Leonhardt, 1990). Es kommt beinahe in allen Regionen unseres Körpers vor. Seine Fasern stützen unseren Organismus und halten ihn zusammen. Kollagene Fasern haben einen gewellten Verlauf und können gestreckt werden, dehnbar sind sie fast gar nicht. Sie ziehen in verschiedene Richtungen und durchflechten einander. Dabei entsteht ein stabiles Maschenwerk, das sehr hohen Belastungen standhalten kann. Proteoglykane bilden Querverbindungen zwischen den Fibrillen aus und festigen dieses Netzwerk. Ihnen kommt also wahrscheinlich eine wichtige Aufgabe bei der mechanischen Stabilisierung des kollagenen Stützgewebes zu. In den beiden folgenden Zeichnungen wird demonstriert, wie ein solches Fasergeflecht in der Zahnpulpa aussehen könnte. Die erste Skizze (Abb. 34 a) ist ein schematisches Modell des Kollagen-Proteoglykan-Gerüsts. Es soll verdeutlichen, dass Proteoglykane sowohl parallel als auch senkrecht aufeinander stehende Fibrillen miteinander verbinden. Pro D-Periode ist eine Kollagenfibrille von mindestens einem Proteoglykanpräzipitat besetzt. Als Vorlage für dieses Modell dient ein Ausschnitt aus der Abb. 34.

Die zweite Zeichnung (Abb. 35 a) dagegen ist eine räumliche Rekonstruktion des kollagenen Netzwerkes, das auf dem Foto in der Abb. 35, zu sehen ist. Die Proteoglykane wurden weggelassen, damit der Betrachter sich auf das Wesentliche, die variable Anordnung der kollagenen Fibrillen, konzentriert. Die zweidimensionale Denkweise wird damit auf die dreidimensionale erweitert.



Abb. 34: Region der Pulpa mit locker verteilten Kollagenfibrillen. Längs- und querangeschnittene kollagene Fibrillen wechseln einander ab; sie verbinden sich auch untereinander (Pfeile) und bilden somit Netzwerke.
0,3 M CMB, Vergr.: x 90300

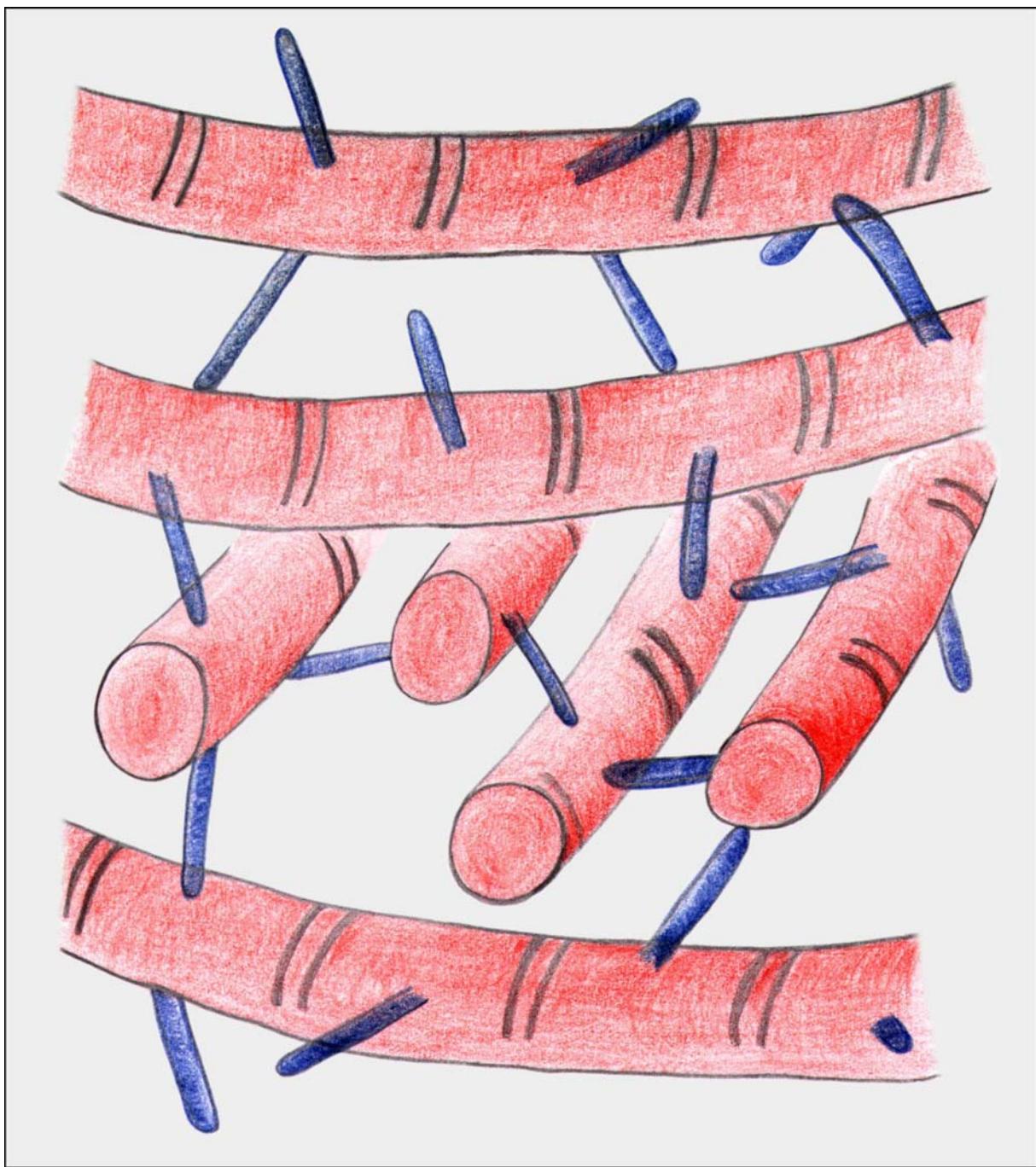


Abb. 34a: Schematische grafische Darstellung des kollagenen Netzwerkes. Die Fibrillen schneiden sich oft im 90°-Winkel und werden auch an den Schnittstellen durch Proteoglykane miteinander verbunden.



Abb. 35: Das Ein- und Austreten der kollagenen Fibrillen in die Schnittebene vermittelt dem Betrachter ein räumliches Bild des kollagenen Netzwerkes.
0,06 M CMB, Vergr.: x 90300

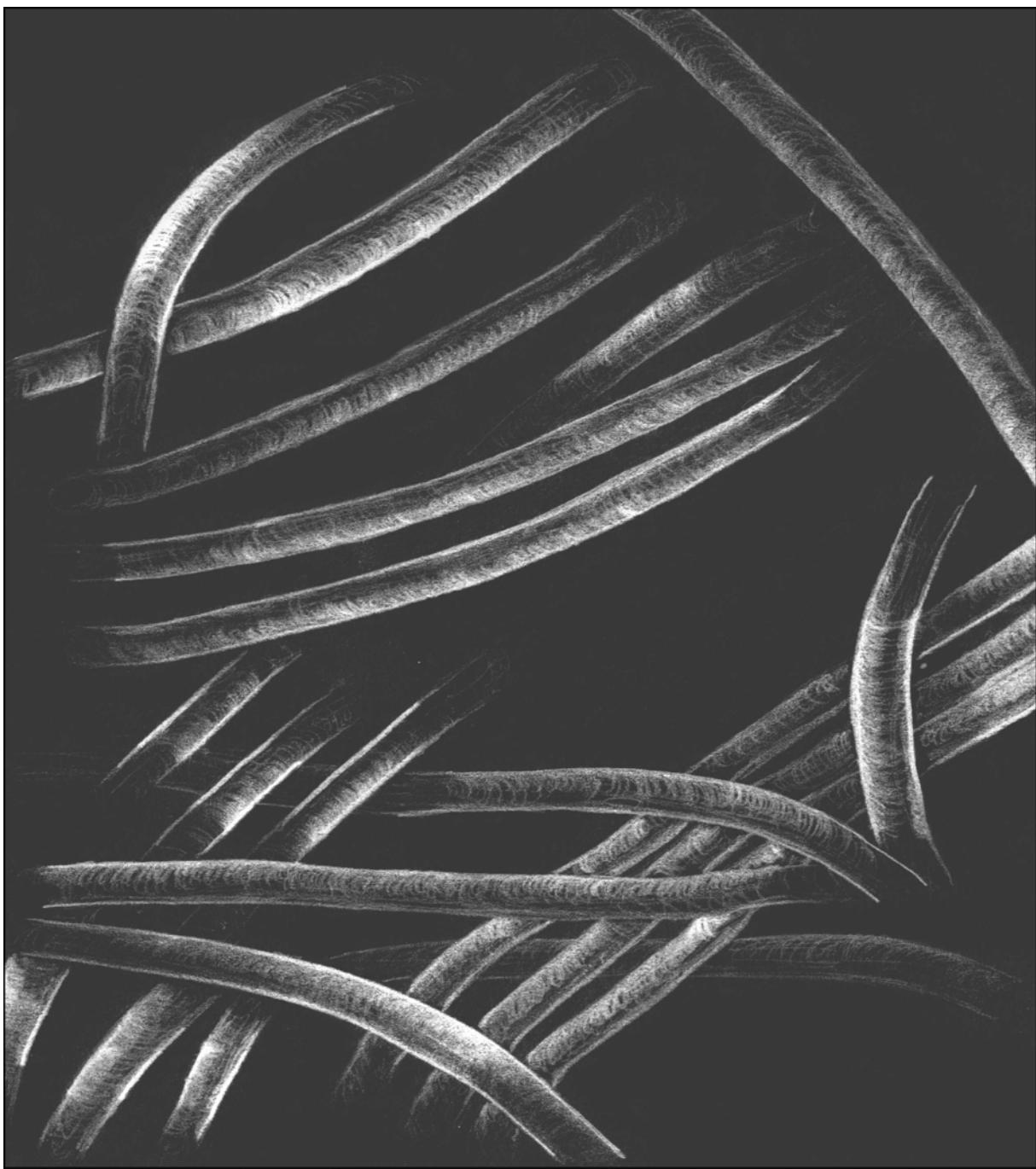


Abb. 35a: Negativzeichnung zum vorherigen Bild. Zur besseren plastischen Darstellung wurde auf die Proteoglykanpräzipitate verzichtet.

8. Diskussion

In der medizinischen Forschung sind vor allem im Bereich der Physiologie und Pathophysiologie des menschlichen Körpers noch sehr viele Fragen offen. Zahlreiche Reaktionsmechanismen und -partner sind noch nicht bekannt und stellen ein Risiko bei der Gabe von Medikamenten dar. Um ganz spezielle Pharmaka entwickeln zu können, die präzise ein Leiden bekämpfen, müssen alle anderen für den Wirkstoff in Frage kommenden Reaktionspartner erkannt und ausgeschaltet werden. Dazu ist ein umfassendes Wissen der Chemie und Morphologie des Menschen notwendig. Die Histologie als ein Teilbereich der Morphologie trägt dazu bei, die genaue Lokalisation einer chemischen Verbindung zu eruieren. Mit exakt definierten Farbreaktionen, z. B. in der Immunhistologie, wird eine gewählte Struktur optisch hervorgehoben und eine Verwechslung ausgeschlossen.

In unserem Fall wurde ein besonderes Augenmerk auf die extrazelluläre Matrix der menschlichen Zahnpulpa gelegt. Wir untersuchten die darin enthaltenen Kollagene, Glykosaminoglykane und Proteoglykane nach Färbung mit Cupromeronic Blue, eine Methode, die hier erstmals an der Pulpa angewandt wurde und die generell in der Bindegewebeforschung zu neuen Erkenntnissen geführt hat. Auch wir können einige Entdeckungen zum Verteilungsmuster und zum räumlichen Aufbau extrazellulärer Matrixbestandteile verzeichnen.

In Zellnähe:

Im eigentlichen Bindegewebe der Zahnpulpa bilden kollagene Fibrillen bzw. Fasern ein gleichmäßiges, lockeres Netzwerk, wie man schon in lichtmikroskopischen Präparaten sehen kann. Die Kollagene vom Typ I und III sind dabei am häufigsten vertreten (Schroeder, 2000). Auffällig ist die von mehreren Autoren beschriebene und durch eigene Versuche bestätigte Verdichtung dieses Faserwerkes um Nerven und größere Gefäße. Die Proteoglykane weisen ein ähnliches Verteilungsmuster auf. Galeotti et al. (1990) fanden sie im Überfluss an den Basalmembranen von Gefäßwänden und Nervenfasern, und in Gebieten mit dicken Kollagenfaserbündeln. Diese Aussage deckt sich mit unseren Ergebnissen.

Auch an den in der Schweinelunge untersuchten Basalmembranen entdeckte Erlinger (1992) Proteoglykane. Durch Experimente mit Enzymverdauung identifizierte er die daran assoziierten GAGs als Heparansulfate. Der chemische Nachweis der

einzelnen Matrixbestandteile konnte von uns nur immunhistochemisch unter dem Lichtmikroskop, nicht aber mit der CMB-Methode erbracht werden, da keine Enzyme verwendet wurden, um organische Strukturen zu schonen. In der Nähe von Zellen mit einer Basallamina fanden wir folgenden Aufbau der extrazellulären Matrix: Kollagen vom Typ IV an den Basalmembranen von Endothelzellen und Schwann'schen Zellen, mit Anlagerungen von Proteoglykanen, die in gleichmäßigen Abständen an den Zelloberflächen verteilt sind. Darauf folgte eine ca. 1 µm breite Schicht mit parallelen, teils sehr dicht beieinanderliegenden Kollagenfibrillen. Sie sind querangeschnitten, ebenso wie die Nervenfasern, bzw. die Gefäße, was bedeutet, dass sie entlang derselben verlaufen. Erst weiter peripher wird das Nerven- oder Gefäßsystem von spiraling oder ringförmig angeordneten Fibrillen umspunnen. Die senkrecht aufeinanderstehenden Kollagenfibrillen sind über Proteoglykanketten miteinander verbunden und stabilisieren somit einzelne Axone oder Gefäßstränge gegeneinander und in ihrem Verlauf. Ob Kollagene generell auch Verbindungen zu den Heparanen an der Basalmembran besitzen, lässt sich nicht mit hundertprozentiger Sicherheit sagen. In manchen elektronenmikroskopischen Aufnahmen allerdings sieht es so aus, als würden solche Verknüpfungen tatsächlich existieren (Abb. 21). Vernetzungen finden sich also einerseits zwischen den Kollagenfibrillen, die aufeinander senkrecht stehen können, und andererseits zwischen Kollagenfibrillen und den Basalmembranen von Zellen. Weder bei Erlinger (1991) noch bei Scott (2002) sind solche Vernetzungen in dieser Weise beschrieben und könnten ein neues Licht auf die Organisation von Bindegewebe werfen.

In der Odontoblastenschicht:

Die Odontoblasten befinden sich in der Peripherie der Zahnpulpa und umgeben sie gleichsam wie eine Mauer. Ihre Zellkörper liegen dicht beieinander und sind über Zonula adhaerens und gap junctions miteinander verbunden (Abb. 26, 27). Diese Masse an Zellen und das gleichzeitige Fehlen von interzellulären Räumen macht das seltene Vorkommen von Kollagenen und Proteoglykanen zu einer logischen Konsequenz. Die Behauptung von Schroeder (2000), dass die histologisch sichtbar gemachten Fasern der peripheren Pulpa nichts anderes seien, „als eine Anhäufung von Glykoproteinen und GAGs, die histochemisch Faserstrukturen vortäuschen“ (Schroeder, 2000), trifft also nicht zu. Mit der CMB-Methode können ganz deutlich gewellte Kollagenfibrillen ausgemacht werden, an denen in regelmäßigen Abständen

Proteoglykan-Präzipitate angeheftet sind (Abb. 33). Sie befinden sich oft in der Nähe der Zellkontakte in Form von kleinen, parallelen Fibrillenbündeln (Abb. 26, 27). In ihrer räumlichen, elektronenmikroskopischen Darstellung zeigen Søgaard-Pedersen et al. (1990), dass kollagene Fibrillen tatsächlich vom pulpalen Bindegewebe durch die Odontoblastenschicht hindurch bis ins Prädentin und Dentin ziehen. Sie verlaufen größtenteils gerade durch die dentinbildende Schicht, einige Quervernetzungen sind jedoch nicht zu übersehen. Es handelt sich hier wahrscheinlich um die von Karl von Korff 1906 erstmals mit Silberimprägnation dargestellten und beschriebenen Fasern, die das kollagene Gerüst für das sogenannte Manteldentin bilden sollen. Als Manteldentin wird andererseits die äußerste, 10-30 µm dicke Dentinschicht bezeichnet, die parallel zur Schmelz-Dentin-Grenze verläuft (Schroeder, 2000). Über die Existenz dieser von Korff'schen Fasern sind sich die Wissenschaftler bis heute noch nicht einig. Anhand unserer vorliegenden Ergebnisse aber können wir mit Sicherheit bestätigen, dass kollagene Fibrillen in der Odontoblastenschicht zu finden sind. Wie bereits weiter oben erwähnt, weisen sie dieselben Eigenschaften auf wie die Kollagenfibrillen im pulpalen Bindegewebe: Sie sind parallel angeordnet und durch Proteoglykane miteinander verknüpft. Somit müssen wir auch von Seltzers und Benders (1965) Behauptung, dass es sich um verzweigte oder netzförmige Fibrillen handelt, abweichen: Kollagenfibrillen bilden keine Verzweigungen. Diese Aussage ist sehr leicht nachzuvollziehen, hält man sich das morphologische Modell der Kollagensynthese vor Augen. Die Grundstruktur besteht aus einer Kette dreier sich immer wiederholender Aminosäuren. Drei dieser Ketten wiederum lagern sich zu einer Tripelhelix zusammen (Löffler und Petrides, 1998). Mehrere Tripelhelices ergeben eine Kollagenfibrille. Die Konstruktion dieser Fibrille ist stabil und in sich abgeschlossen; es gibt also keine Möglichkeit, eine Verzweigung zu bilden. Die retikulären Fasern, die Seltzer und Bender (1965) gesehen haben, waren demnach im Prinzip wohl nur optische Täuschungen; doch auch die dreidimensionale Darstellung von Søgaard-Pedersen et al. (1990) zeigt ganz deutlich ein Netzwerk von Kollagenfibrillen in der Odontoblastenschicht. Es muss daher noch weitere Erklärungen für dieses Phänomen geben. Eine finden wir bei Mallinger et al. (1988): Der Autor Plenk Jr. setzt sich darin in einem Kapitel mit der Anordnung von Kollagenfibrillen in Knochen und im Zahndein auseinander. Seiner Meinung nach überkreuzen sich kollagene Fibrillen spitzwinkelig; eine Übersichtsaufnahme der extrazellulären Matrix kann daher den Eindruck erwecken, die Fibrillen würden sich verzweigen. In Wirklichkeit aber laufen sie lediglich dicht aneinander vorbei.

Im Präentin:

Auch im Präentin gab es einige Entdeckungen, die der Wissenschaft in Zukunft noch viele Fragen aufwerfen werden. In der Abb. 25 wird deutlich, dass zwischen den Tomes'schen Fasern eine Vielzahl von proteoglykanassoziierten Kollagenen verlaufen. Sie sind dichter gepackt als in der Odontoblastenschicht und im lockeren Bindegewebe. Dies bestätigen auch Søgaard-Pedersen et al. (1990) mit einer Studie über Dentin und Pulpa mit dem Scanning-Elektronenmikroskop. Sie fanden allerdings eine Parallelität der Fasern zur inneren Dentinoberfläche, die wir in unseren Aufnahmen nicht direkt so nachweisen können; in den CMB-Bildern ziehen die Kollagenfibrillen scheinbar kreuz und quer durch das Präentin (Abb. 25). Das lässt vermuten, dass sie trotz ihrer hohen Dichte nicht sehr viele Querverbindungen miteinander eingehen: Wären zwei Fibrillen nämlich über mehrere Proteoglykane miteinander verknüpft, lägen sie zwangsläufig parallel. Weshalb also diese Unordnung zwischen den Odontoblastenfortsätzen? Es könnte einen Zusammenhang mit der Kalzifikation geben, die an der d-Bande der Kollagene beginnt. Dermatansulfate besetzen die d-Bande und hemmen daher diesen Prozess. Durch eine „chaotischere“ räumliche Anordnung ist es vielleicht möglich, die DS leichter abzuspalten und die Mineralisierung beginnen zu lassen. Die Kollagene würden hier also eine andere Funktion erfüllen.

Das ist aber eine Theorie, die sich allein auf cytologische Befunde nicht stützen lässt. Laut Schroeder (2000) ist das kollagene Gerüst jedoch der Ausgangspunkt für die Manteldentinbildung (s.o.); ein direkter Zusammenhang zwischen den Kollagenen und der Mineralisierung des Präentins ist daher nicht von der Hand zu weisen.

Die Messwerte:

Ein Teilespekt der Auswertung der durchgeführten Versuche war die metrische Bestimmung extrazellulärer Matrixbestandteile. Die Durchmesser kollagener Fibrillen von einigen Körperteilen sind bereits gemessen und aufgeschrieben worden. Zum Vergleich werden hier ein paar Angaben nach Löffler (1999) genannt: Durchmesser der Kollagene im Knorpel = 15-25 nm, in der Cornea = 30 nm, in der Haut = 60 nm und in den Sehnen = 30-130 nm; unsere Werte von ca. 35-40 nm in der Zahnpulpa sind in der Mitte anzusiedeln. Abweichungen sind bei der Bandenlänge festzustellen; während Löffler (1999) und Mallinger (1988) sie mit 64-67 nm für die Zahnpulpa angeben, sind es bei uns durchschnittlich nur 50 nm. Die Breite der Präzipitate wurde

von Erlinger (1995) in der Gingiva auf 6-7 nm festgelegt; mit einem durchschnittlichen Wert von 8 nm weichen wir kaum von seinem Ergebnis ab. Die Nadellänge der kollagenassoziierten Proteoglykane variiert am stärksten. Wir erreichten Messwerte zwischen 43,5 und 98,5 nm. Einen Richtwert anzugeben ist daher nicht sehr sinnvoll. Freie Hyaluronsäurepräzipitate können sogar 10 mal so lang werden.

Das dreidimensionale Modell:

Obwohl sich so viele Morphologen und Biochemiker mit dem Aufbau der extrazellulären Matrix beschäftigt haben, gibt es doch kaum ein räumliches Modell des Fasersystems. Das liegt wahrscheinlich auch daran, dass Kollagene in verschiedenen Körperregionen unterschiedliche Organisationen aufweisen: In den Sehnen sind die Fibrillen ganz überwiegend streng parallel angeordnet und liegen sehr dicht beieinander, während die Kollagene der Haut scheinbar durcheinander verlaufen und keinen Hinweis für ein höheres System geben. Parallel Fibrillen sind ebenfalls in der Cornea zu entdecken, wenngleich sie auch in Schichten vorliegen. Jede einzelne Schicht weist dabei eine andere Ausrichtung auf. Im echten Bindegewebe der Zahnpulpa sind die Kollagenfibrillen locker verteilt und eher ungeordnet. Erst in Gefäßnähe verdichten sie sich zu dicken Fibrillenbündeln. Dabei durchflechten sich die einzelnen Fibrillen zweier sich kreuzender Bündel und gehen elektrostatische Bindungen über ihre Proteoglykanketten mit ihren Bindungspartnern ein. Diese Quervernetzungen geben dem Stützgewebe einen guten mechanischen Halt.

Scott beschreibt im Jahr 2002 die Form der Proteoglykan-Moleküle noch näher. Er identifiziert sie unter dem Elektronenmikroskop als hufeisenförmige Körper, die an jedem ihrer beiden Enden eine Kopie der negativen Ladung tragen. Auf den uns vorliegenden Aufnahmen ist diese Hufeisenform nicht zu erkennen; die Präzipitate stellen sich immer – sowohl an längs- als auch an querangeschnittenen kollagenen Fibrillen – als gerade, nadelförmige Gebilde dar. Einigkeit herrscht mit Scott (2002) in Bezug auf die Bindestellen der Proteoglykane. Es gibt einwandfrei eine Quervernetzung zweier Kollagenfibrillen über Proteoglykanbrücken, also muss es auch zwei Bindestellen geben. Am Kollagen dagegen muss man sich die Bindemöglichkeiten rund um die einzelne Fibrille angeordnet vorstellen. So wird es ermöglicht, mehr als zwei Fasern durch mehrere Proteoglykane miteinander zu verknüpfen. Im Stroma der Cornea eines Kaninchens demonstriert Scott 1991 eine

Verbindung von vier Kollagenfibrillen, die in einer Reihe liegen. An querangeschnittenen Fasern in einer Arbeit von Erlinger erkennt man pro Fibrille ca. 4-5 Präzipitate, die sich in alle Richtungen erstrecken und scheinbar zufällig Verbindungen mit benachbarten Kollagenen eingehen (Erlinger, 1992). So ähnlich wie im Bindegewebe der Schweinelunge sehen auch die Quervernetzungen der Kollagenfibrillen in der Zahnpulpa aus. Aggregate der Proteoglykane wie in den Versuchen zur menschlichen Gingiva von Erlinger et al. im Jahre 1995 zeigten sich bei uns allerdings nicht.

9. Zusammenfassung

In dieser Doktorarbeit wurde zum ersten Mal das Bindegewebe der menschlichen Zahnpulpa mit dem von Scott entwickelten Farbstoff Cupromeronic Blue angefärbt und untersucht. Die Methode wird erst seit ca. 15 Jahren in der Histologie angewandt; sie erschließt der Wissenschaft neue Möglichkeiten in der Bindegewebeforschung, denn mit seinen positiven Ladungen ist der Farbstoff in der Lage, extrazelluläre Matrixbestandteile so schonend einzuhüllen, dass von ihren räumlichen Strukturen nichts zerstört wird. Selbstverständlich erfordert so eine authentische, maßstabsgerechte Darstellung von Geweben auch eine sanfte Vorbehandlung; zu diesem Zweck wurde bei der Gewinnung des Zahnmarkes auf Entkalkungsmaßnahmen und Enzymverdauung verzichtet. Mit dieser Strategie erzielten wir folgende Ergebnisse:

1. Ein Vergleich zwischen der TEM ohne und mit CMB-Färbung zeigt, dass ein sicherer Nachweis von Proteoglykanen an kollagenen Fibrillen nur mit dem Farbstoff Cupromeronic Blue gegeben ist.
2. Kollagenassoziierte Proteoglykane stehen oft senkrecht zur Fibrillenachse und verbinden zwei Fibrillen miteinander; sie können aber ebenso gut schräg oder sogar parallel zur Kollagenfibrille verlaufen, oder eine Fibrille überspringen und sich erst an die übernächste anheften.
3. Nach der von Scott aufgestellten „One proteoglycan – one binding site“ – Theorie enthalten die im Bindegewebe der menschlichen Zahnpulpa vorkommenden kollagenassoziierten Proteoglykane Dermatan- und Chondroitinsulfate, da die Präzipitate eindeutig an die d-Bande angeheftet sind. In dieser Untersuchung wurden Chondroitin-6-sulfat und Dermatansulfat immunhistochemisch in der Zahnpulpa des Menschen nachgewiesen.
4. Kollagenfibrillen, die entlang von Gefäßen und Nerven ziehen, können über die Proteoglykane der Basalmembranen mit ihnen verbunden sein.

5. Kollagenfibrillen treten nicht nur in parallelen Bündeln auf, sondern ihre einzelnen Fibrillen durchkreuzen sich und bilden Netzwerke. Man findet hier Proteoglykan-Brücken zwischen nicht parallelen Fasern.
6. Die extrazelluläre Matrix zeigt in Gefäß- und Nervennähe einen typischen Aufbau: 1. Eine Basalmembran mit Proteoglykanen, 2. Kollagenfibrillen, die entlang des Gefäßes oder Nervs ziehen, und 3. Kollagenfibrillen, die in einem gewissen Abstand senkrecht dazu verlaufen.

Die Ergebnisse veranschaulichen, wie ein Binde- und Stützsystem im menschlichen Körper aufgebaut sein kann. Ob sich unser Modell auch auf andere Bindegewebe übertragen lässt, werden spätere Forschungen auf diesem Gebiet beweisen. Das von uns untersuchte Material stammt ausschließlich von gesunden Zähnen; Nerven, Gefäße und extrazelluläre Matrix befinden sich also in ihrem physiologischen Zustand. Interessant wäre in diesem Zusammenhang eine vergleichende Studie mit pulpitischen Zähnen und der CMB-Methode. Für zukünftige Versuche zur Pathologie des Bindegewebes in der Zahnpulpa hoffe ich einen Grundstein gelegt zu haben.

10. Literaturverzeichnis

ABDUL-MALAK, Oliver Afif:

Licht- und elektronenmikroskopischer Nachweis von Endostatin der Kollagene Typ XV und Typ XIX während der embryonalen und fetalen Entwicklung der Maus
Dissertation, Göttingen, 1999

BALS, Thomas:

Grundlagen der Kollagenverteilung in der menschlichen Pulpa und im menschlichen Desmodont, immunhistochemische Darstellung der Prokollagene vom Typ I und III, der Kollagene vom Typ IV, V und VI sowie des Glykoproteins Undulin
Dissertation, Berlin 1987

BARGMANN, Wolfgang:

Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen
7. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart 1968

BERKOVITZ, B. K. B., BOYDE, A., FRANK, R. M., HÖHLING, H. J., MOXHAM, B. J., NALBANDIAN, J., TONGE, C. H.:

Teeth

Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-London-Paris-Tokio 1989

BUDDECKE, E.:

Saure Glykosaminoglykane und Proteoglykane

Archiv für dermatologische Forschung, Band 244, S. 95-104, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg 1971

COHEN, Stephen:

Pathways of the pulp

Mosby Year Book, St. Louis 1991

EIFINGER, Franz F.:

Die Mikromorphologie der menschlichen Zahnpulpa

Hanser, München 1970

ERLINGER, R.:

Glycosaminoglycans in porcine lung: an ultrastructural study using Cupromeronic blue

Cell & tissue research, 281: S 473-483, Springer Verlag 1995

ERLINGER, R., SCHUMACHER, U., WELSCH, U.:

Ultrastructural localization of glycosaminoglycans in the human mammary gland

Acta histochemica, Suppl.-Band XL, S. 65-70, 1990

ERLINGER, R., SCHUMACHER, U., WELSCH, U.:

Ultrastrukturelle Untersuchungen zur Verteilung und Zusammensetzung von Glykosaminoglykanen in der Lunge von Mensch und Schwein

Verh. Anat. Ges. 84 (Anat. Anz. Suppl. 168), 81-82, Gustav Fischer Verlag Jena 1991

ERLINGER, R. , WILLERSHAUSEN-ZÖNNCHEN, B., WELSCH, U.:
Ultrastructural localization of glycosaminoglycans in human gingival connective
tissue using Cupromeronic blue
Journal of periodontal research, 30: S. 108-115, 1995

FELSCH, Willy:
Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die nach Applikation von
Arsentrioxyd in der Zahnpulpa menschlicher Zähne auftretenden Veränderungen
Dissertation, Regensburg 1981

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. 1990; 104 (4) : 657-
665

GEIS-WELLNHOFER, Susanne:
Entkalkungs- und Färbemethoden der Zahnpulpa beim Göttinger Miniaturschwein
Dissertation, Regensburg 1992

HAIGH, M., SCOTT, J. E.:
A method of processing tissue sections for staining with Cupromeronic Blue and
other dyes, using
CEC techniques, for light and electron microscopy
Bas. Appl. Histochem., 30, 479-486, 1986

HRALA, Boris Peter:
Kollagene im marginalen Weichgewebe von Zahn und Implantat
Dissertation, Erlangen-Nürnberg, 1999

JAGOW, Martina:
Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen des Blut- und Lymphgefäß-
systems der Pulpa dentis und des Zahnkeims
Dissertation, Gießen, 1987

KLEEBERGER, Wolfram:
Immunhistologische Untersuchung von Kollagentypen an den Rückenmarksgefäßen
des Menschen
Dissertation, Würzburg, 1999

KUO, M. Y. P., LAN, W. H., LIN, S. K., HONG, C. Y., HAHN, L. J.:
Collagen expression in human dental pulp cell cultures
Journal of dental research, 70: S. 447, 1991

LEONHARDT, Helmut:
Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen
8. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York 1990

LÖFFLER, Georg:
Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1999

LÖFFLER, G., PETRIDES, W.:
Biochemie und Pathobiochemie
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1998

LUKINMAA, P. L., WALTIMO, J.:
Immunhistochemical localization of types I and VI collagen in human permanent teeth and Periodontal ligament
Journal of dental research, 71 (2): S. 391-397, 1992

LÜLLMANN-RAUCH, R.:
Experimental mucopolysaccharidosis: Preservation and ultrastructural visualization of Intralysosomal glycosaminoglycans by use of the cationic dyes Cuproline Blue and Toluidine Blue
Histochemistry, 93: S. 149-154, 1989

MALLINGER, R., NEUMÜLLER, J.:
Das kollagene Bindegewebe
Verlag Wilhelm Maudrich, Wien-Berlin-München 1988

RAUCH, R. U., BECKER, J., SCHUPPAN, D., RABANUS J. P., NIECHOY, U., GELDERBLOM, H. R.:
Immunelectron micorscopical localization of different types of collagen in human dental pulp
Journal of dental research, 70: S. 473, 1991

RIPPER, Cornelia:
Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen über die Angloarchitektur der Zahnpulpa des Menschen
Dissertation, Gießen 1989

ROMEIS, Benno:
Mikroskopische Technik
17. Aufl. Urban und Schwarzenberg, Hrsg.: Böck, Peter, München 1989

SCHROEDER, Hubert E.:
Orale Strukturbiologie
5. unveränderte Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York 2000

SCHROEDER, Hubert E.:
The Periodontium
Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg-New York-Tokio 1986

SCOTT, John E.:
Proteoglycan-fibrillar collagen interactions
Biochemical Journal, 252, S. 313-323, 1988

SCOTT, John E.:
Proteoglycans: collagen interactions and corneal ultrastructure
Chemical Morphology, Volume 19, Manchester University, Manchester M13 9PL.
U.K., 1991

SCOTT, John E.:

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

Int. J. Biol. Macromol., Volume 13, S.157-161, June 1991

SCOTT, John E.:

Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues

The FASEB Journal, Vol. 6: S. 2639-2645, June 1992

SCOTT, John E.:

The first and second "laws" of chemical morphology, exemplified in mammalian extracellular matrices

Eur. J. Histochem., 46: S. 111-124, 2002

SELTZER, S. and I. B. BENDER:

The dental pulp. Biologic considerations in dental procedures

Lippincott, Philadelphia, 1965

SHUTTLEWORTH, C. A., BERRY-LINDA, KIELTY-CAYR, M.:

Microfibrillar components in dental pulp: Presence of both type VI collagen- and fibrillin-containing microfibrils

Archives of Oral Biology. 1992; 37 (12) : 1079-1084

SÖGAARD-PEDERSEN, B., BOYE, H., MATTHIESSEN, M. E.:

Scanning electron microscope observations on collagen fibers in human dentin and pulp

Scandinavian Journal of dental research, 98 (2): S. 89-95, 1989

STUHLSATZ, H. W.:

Struktur und Analytik der Proteoglykane und Glykosaminoglykane des Bindegewebes

Verh. Anat. Ges. 75, S. 103-113 (1981)

THONEMANN, Birger:

Histologische, biochemische und histochemische Untersuchungen am Zahnkeim des Hausschweins.

Dissertation, CH-Verlag, Regensburg 1991

TEN CATE, A. R.:

Oral Histology

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

WÄHNER, Jean:

Polarisationsmikroskopische Untersuchungen an immunhistochemisch markierten Kollagentypen

Dissertation, Leipzig, 1998

WELSCH, U.:
Histologie. Farbatlas der Zytologie, Histologie und Mikroskopischen Anatomie des Menschen
Urban und Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore 1997

WELSCH, U., ERLINGER, R., STORCH, V.:
Glycosaminoglycans and fibrillar collagen in Priapulida: a histo- and cytochemical study
Histochemistry (1992) 98: S. 389-397, Springer Verlag 1992

WINTERBOURNE, D. J., SALISBURY, J. G.:
Heparan sulfate is a potent inhibitor of DNA synthesis in vitro
Biochem. Biophys. Res. Comm. 101: S. 30-37; 1981

WUNSCH, Matthias:
Zellmembranassoziierte Chondroitinsulfat/Dermatansulfat Proteoglykane arterieller glatter Muskelzellen
Dissertation, Münster, 1998

YAMAUCHI, S., BANES, A. J., YAMAUCHI, M.:
Biochemical characterization of extracellular matrix protein in dental pulp
Journal of dental research, 71: S. 714, 1992

Danksagung

Ich bedanke mich bei Frau Herzmann, Frau Tost und Frau Köhler
für ihre tatkräftige Mitarbeit bei der Erstellung
der histologischen Schnitte.

Ich bedanke mich bei meinem Cousin Ralph Lemmerz
für die graphische Gestaltung der Bilder.

Lebenslauf

1979	Am 12. Januar 1979 wurde ich, Natalie Weindl, als einziges Kind von Herrn Karlheinz Weindl und Frau Dr. Marion Henriette Weindl, geb. Schütt, in Ingolstadt geboren.
1985-1989	Besuch der Grundschule am Hedernfeld in München
1989-1994	Besuch des Thomas-Mann-Gymnasiums in München/Solln
1994-1998	Besuch des Wilhelm-Hausenstein-Gymnasiums in München/Bogenhausen
26.06.1998	Abiturprüfung am Wilhelm-Hausenstein-Gymnasium
1998	Immatrikulation an der Ludwigs-Maximilians-Universität im Fach Zahnheilkunde zum Wintersemester 98/99
12.10.1999	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
02.04.2001	Zahnärztliche Vorprüfung
01.- 05.10.2001	Famulatur an der Universitätsklinik Witten/Herdecke
19.10.2004	Zahnärztliche Prüfung
seit Mai 2005	Assistenzzahnärztin in Meitingen bei Augsburg