



## Hintergrund

Während der Dentinogenese bilden Odontoblasten bioaktive Proteine, die in das Dentin eingebettet und dort konserviert werden. Die Matrixproteine können zeitlebens durch demineralisierende Vorgänge aus Dentin herausgelöst und reaktiviert werden. Diese biochemischen Signalmoleküle modulieren die Immunantwort und das Verhalten von Zellen der Zahnpulpa.

## Zielsetzung

Beurteilung der Effekte von Dentinmatrixproteinen (DMPs) auf

- I. **Migration**,
- II. **Vitalität** und
- III. **Mineralisation** humaner Pulpazellen

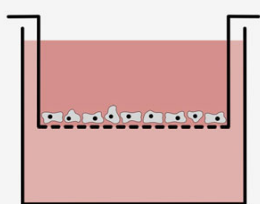
## Material & Methoden

### Isolation

- Pulverisierung von menschlichem Dentin mit einer gekühlten Schwingmühle (Mixer Mill MM 200, RETSCH GmbH, Haan, Germany)
- Inkubation mit 10% EDTA (EDTA Disodium Salt Dihydrate BioChemica, AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany)
- Zentrifugation und Reinigung des Überstandes mit Feinpartikelfiltern (1,2 µm, 0,45 µm und 0,2 µm Acrodisc® Syringe Filters with Supor® Membrane, Port Washington, NY, USA)
- Konzentrierung der DMPs unter Verwendung von Zentrifugenfiltern mit einer Durchlässigkeit bis 3000 Da (Amicon® Ultra-15 3K, Merck Millipore Ltd., Billerica, MA, USA) in Phosphatpuffer
- Quantifizierung des repräsentativen Wachstumsfaktors TGF-β1 mit einem Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

### Migration

- Analyse der Migration von primären Pulpazellen mit einem modifizierten Boyden Chamber Assay (Transwell® polycarbonate membrane cell culture inserts, Corning, Amsterdam, The Netherlands)
- Kristallviolett-Färbung nach 24 h (n=9)



- 2×10<sup>5</sup> primäre Pulpazellen in 1% fetalem Kälberserum (FBS)
- Negativkontrolle: 1% FBS
- Positivkontrolle: 10% FBS
- Rekombinantes TGF-β1 (10.000 pg/ml)
- DMPs mit einer äquivalenten TGF-β1-Konzentration von 1, 10, 100, 1.000 und 10.000 pg/ml

### Vitalität

- Kultur von primären Pulpazellen in 96 Well Platten (4×10<sup>3</sup> Zellen/Well)
- Testgruppen:
  - 1% FBS
  - 10% FBS
  - 1.000 pg/ml rekombinantes TGF-β1
  - DMPs mit einer äquivalenten TGF-β1-Konzentration von 100, 200, 500 und 1.000 pg/ml
- Bestimmung der Zellvitalität mittels MTT-Tests an den Tagen 0, 1, 3, 5, 7 und 10 (n=9)

### Mineralisation

- Kultur von primären Pulpazellen (4×10<sup>3</sup> Zellen/Well) in 96 Well Platten (Cellstar® 96 Well Advanced TCTM Plate, Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Austria) unter Zusatz von DMPs in äquivalenten TGF-β1-Konzentrationen von 100, 200, 500 und 1.000 pg/ml oder osteogenem Differenzierungsmedium als Positivkontrolle (StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)
- Alizarin-Färbung zum Nachweis der Mineralisationsaktivität nach 14 Tagen (n=9)

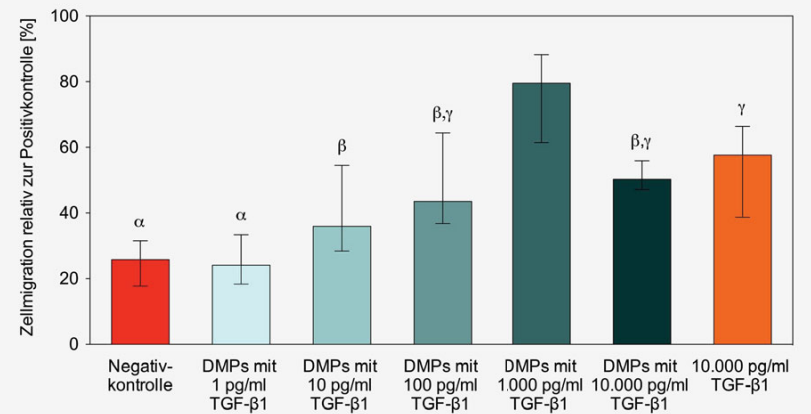
### Statistik

- Nicht-parametrische Darstellung
- Mann-Whitney U-Test mit einem Signifikanzniveau von α=0,05

## Ergebnisse

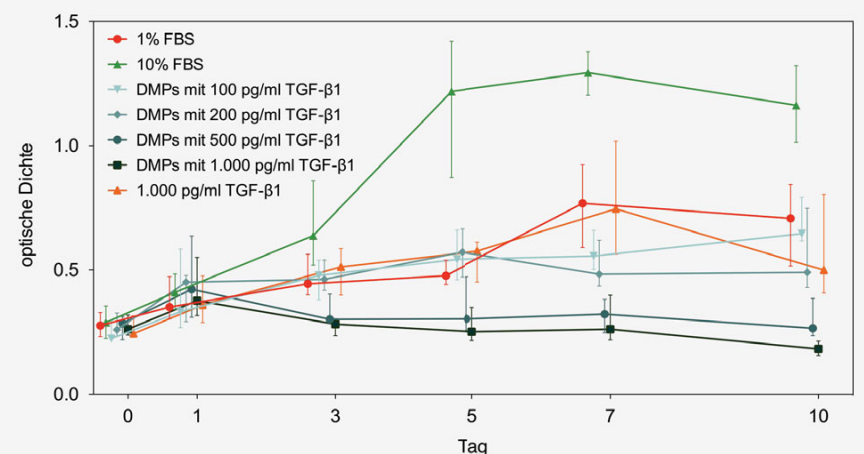
### Migration

DMPs zeigten einen konzentrationsabhängigen chemotaktischen Effekt auf humane Pulpazellen. Bei einer äquivalenten Konzentration von 1.000 pg/ml übertraf dieser sogar den maximalen Migrationsreiz von rekombinantem TGF-β1. Dargestellt sind Mediane mit 25-75% Perzentilen, wobei die Unterschiede bei gleichen griechischen Buchstaben nichtsignifikant sind (α, β, γ).



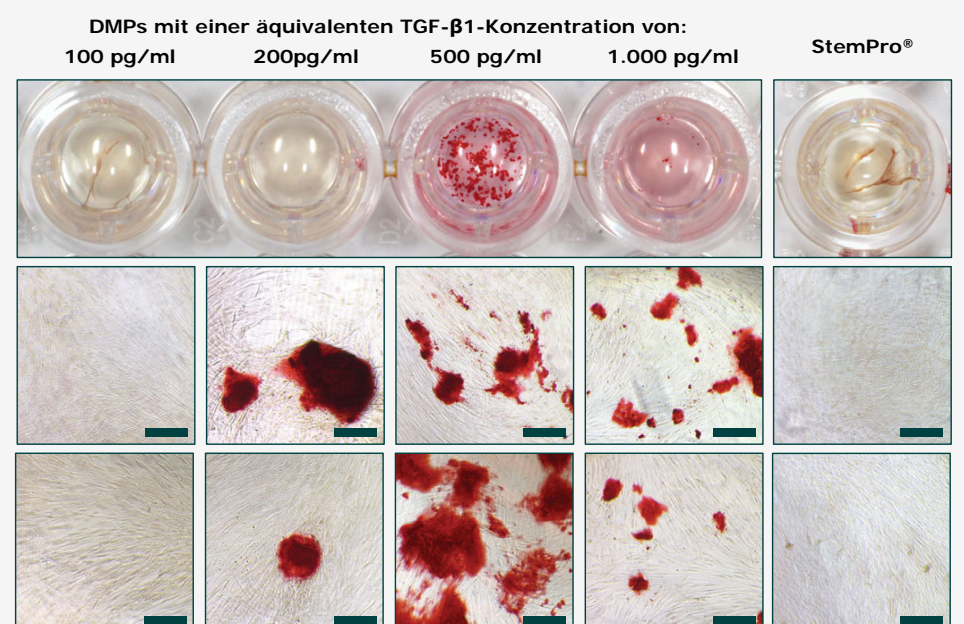
### Vitalität

Initial führten DMPs in geringen Mengen zu einem leichten Anstieg der Zellvitalität, wobei höhere Konzentrationen zu einer Reduktion des Stoffwechsels von Pulpazellen beitrugen. Dargestellt sind die Mediane mit 25-75% Perzentilen.



### Mineralisation

Nach 14 Tagen bewirkten DMPs eine deutliche Mineralisation primärer Pulpazellen ab einer äquivalenten TGF-β1-Konzentration von 200 pg/ml. Maßstabsbalken: 150 µm



## Schlussfolgerung

Signalmoleküle aus humanem Dentin regen Pulpazellen zur Migration an und fördern bei reduziertem Stoffwechsel die Zelldifferenzierung. Die klinisch einfach zu erreichende Freisetzung endogener Signalmoleküle durch oberflächliche Demineralisation des Dentins könnte in Zukunft Maßnahmen zum Vitalerhalt der Pulpa sowie regenerative endodontische Verfahren optimieren.