

S. Preußker¹, N. Korneli¹, W. Klimm¹, G. Richter², U. Hempel³, R. Koch⁴

In-vitro-Mineralisation durch Pulpafibroblasten in Abhängigkeit von Wurzelwachstum und Stimulanzen



S. Preußker

In vitro mineralization by human pulp fibroblasts depending on root formation and stimulation

Ziel der Untersuchung war es, die Reparationsdentinbildung durch Pulpafibroblasten in vitro in Abhängigkeit von der Wurzelentwicklung und von zugesetzten chemischen Stimulanzen zu analysieren.

19 Pulpafibroblastenkulturen aus frisch extrahierten humanen Weisheitszähnen mit un- und vollständigem Wurzelwachstum wurden entsprechend den einfach oder in Kombination zugegebenen Stimulanzen (Calciumhydroxid, β -Glycerophosphat, Ascorbinsäure) in Gruppen unterteilt. Nach 25 Tagen erfolgte die Untersuchung hinsichtlich gebildeter Mineralisationsinseln (Rasterelektronenmikroskop Philips XL 30 ESEM, Energiedispersive Röntgenmikroanalyse), Lebensfähigkeit der Pulpafibroblasten (EZ4U-Test, am 1. Tag), Bildung von alkalischer Phosphatase (4-NPP-Test, am 0., 1., 4., 8., 11., 15. Tag) sowie von Kollagen Typ I (METRA-CIP EIA Kit, am 4. Tag). Mit Hilfe der Varianzanalyse wurde nach Unterschieden bezüglich der Zielvariablen zwischen den Gruppen mit und ohne Zusatz gesucht (globales $\alpha = 0,05$).

Bei der Energiedispersiven Röntgenmikroanalyse konnte die Bildung von Calciumphosphat durch die Pulpafibroblasten nachgewiesen werden. Mineralisationsleistung, Lebensfähigkeit und Kollagenbildung erwiesen sich als abhängig vom zugegebenen Stimulanz, aber als unabhängig vom Wurzelwachstum. (Dtsch Zahnärztl Z 2010; 65: 81–90)

Schlüsselwörter: Zellbiologie, Zellkultur, Pulpafibroblasten, Mineralisation, Kollagen Typ I, alkalische Phosphatase, Calciumphosphat

The aim of this study was the analysis of reparative dentinogenesis by pulp fibroblasts in vitro depending on root formation and chemical stimulation.

Pulp fibroblasts of 19 human caries-free freshly extracted third molars with incomplete or complete root formation were separately cultured. Each cell culture was divided into groups based on the presence of the following chemical additives in medium: calcium hydroxide, β -glycerophosphate, ascorbic acid (alone or combined with each other). The scanning electron microscope analysis of mineralized areas was carried out 25 days after application of chemical additives. Determination of viability was done at day 1 by using an MTT-test. At day 4, expression of collagen type I was measured with METRA-CIP EIA Kit and alkaline phosphatase activity was determined by the 4-NPP method at days 0, 1, 4, 8, 11 and 15. The differences of examined variables in groups without and with chemical additives were statistically analysed with variance analysis (global $\alpha = 0.05$).

X-ray microanalysis of the mineralized areas showed that pulp fibroblasts produced a high amount of calcium phosphate. The mineralizing activity, the viability and the expression of collagen type I of pulp fibroblasts were dependent on chemical stimulation, but independent of root development.

Keywords: cell biology, cell culture, pulp fibroblasts, mineralization, collagen type I, alkaline phosphatase, calcium phosphate

¹ Poliklinik für Zahnerhaltung (Direktor: Prof. Dr. C. Hannig) des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde,

² Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik (Direktor: Prof. Dr. M. Walter) des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde,

³ Institut für Physiologische Chemie (Direktor: Prof. Dr. rer. nat. R. Jessberger) des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden

⁴ Institut für Medizinische Informatik und Biometrie (Direktor: Prof. Dr. H. Kunath) des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden

Peer-reviewed article: eingereicht: 10.11.2008, akzeptiert: 27.10.2009

DOI 10.3238/dzz.2010.0081

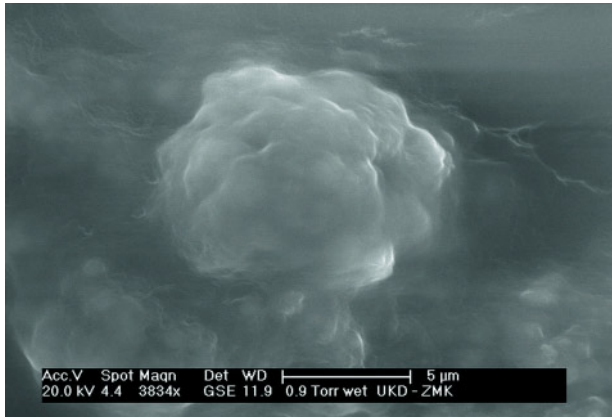


Abbildung 1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Mineralisationsinsel (ESEM, Vergrößerung 3834x).

Figure 1 Scanning electron microscope analysis of a mineralized nodule (ESEM, magnification of 3834 diameters).

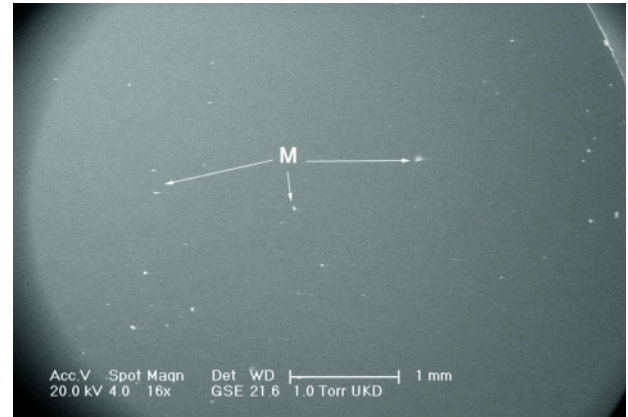


Abbildung 2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Ausschnittes auf dem Acrylplättchen zum Auszählen der Mineralisationsinseln (M) bei 16facher Vergrößerung (Probe aus Gruppe 4).

Figure 2 Scanning electron microscope analysis of a part of culture disc with a magnification of 16 diameters for counting of mineralized nodules (M) (sample of group 4).

1 Einleitung

1.1 Reparative und reaktive Dentinogenese

In der Pulpa jedes Zahnes laufen nach dessen Durchbruch lebenslang zwei Vorgänge ab, die dem Erhalt des Zahnes und seiner Vitalität dienen – die reaktive und die reparative Dentinogenese. Die reaktive Dentinogenese findet ständig statt. Sie ist die Antwort auf die alltäglichen Einflüsse wie Mastikation, thermische und chemische Reize, mechanische Irritationen oder Fehlbelastungen, denen der Zahn in der Mundhöhle ausgesetzt ist. Die Bildung reaktiven Tertiärdentins bedarf der Interaktion zwischen einem molekularen Stimulus und dem ausdifferenzierten Odontoblasten, um die Sekretion der Dentinmatrix anzuregen [13, 21].

Kommt es zu einer lokalen Zerstörung des Odontoblastensaumes durch eine traumatische oder artifizielle Eröffnung der Pulpa, dann ist es das Ziel zahnärztlicher Bemühungen, die reparative Dentinogenese mit Hilfe medikamentöser Stimulation anzuregen, um die Vitalität des Zahnes zu erhalten und den Verschluss der Pulpakammer durch die Bildung von reparativem Tertiärdentin zu induzieren [13, 24]. Odontoblastenähnliche Zellen, die sich aus undifferenzierten Pulpafibroblasten entwickeln, sind in der Lage, die dentinbil-

dende Funktion verloren gegangener Odontoblasten zu übernehmen. Therapeutisch versucht man, die verletzte Pulpa mit Calciumhydroxid, Mineraltrioxidaggregat (MTA) [27], Adhäsivsystemen [3], aber auch mit Zyanoacrylat [5], Fibronektin [25], demineralisierter Dentinmatrix [16] und Hydroxylapatitkeramiken abzudecken. Im In-vivo-Tierexperiment konnten auch Wachstumsfaktoren, insbesondere TGF- β 1 und BMP2, 4 und 7, eingebettet in Trägermaterialien, mit Erfolg verwendet werden [8, 15]. Die klinische Umsetzung der Anwendung von Wachstumsfaktoren scheiterte bisher jedoch an den hohen Kosten, fehlender immunverträglicher Applizierbarkeit und der möglicherweise ungesteuerten Gewebeneubildung. Calciumhydroxid ist klinisch deshalb nach wie vor das Mittel der Wahl für die Versorgung von Pulpawunden [6]. Es wird seit 1920 in der Zahnmedizin angewandt und führt bei direkter Pulpaüberkappung in 80 – 90 % der Fälle zur hartgewebigen Restitution [6]. Die Calciumionen besitzen ein hohes mitogenetisches Potential und regen Zellen zur Migration, Differenzierung und Matrixbildung an. Die Hydroxylionen bewirken eine Gewebealkalität, die die Grundlage für Zelleinwanderung und Matrixbildung darstellt [26]. Unter Laborbedingungen verwendet man zur Differenzierungsanregung auch β -Glycerophosphat. Es bietet den Zellen Phosphat an und wirkt dentinogenetisch [1].

Über Erfolg oder Misserfolg der Therapie entscheiden jedoch nicht nur die Wahl des Medikaments, sondern in hohem Maße auch die Eigenschaften des beteiligten Zahnes, Entzündungszustand der Pulpa, mikrobielle Kontamination, individuelle Abwehrlage, Vorhandensein pluripotenter Fibroblasten oder Stammzellen, ausreichende Blutversorgung und Stand des Wurzelwachstums [22]. Es gibt klinische Belege dafür, dass das Wurzelwachstum einen entscheidenden Einfluss auf den Erfolg von Therapieverfahren wie direkte Überkappung oder Vitalamputation hat und die Regenerationsfähigkeit der Pulpa eines Zahnes mit abgeschlossenem Wurzelwachstum stetig abnimmt [22].

Merkmale des Umwandlungsprozesses von undifferenzierten Pulpafibroblasten zu odontoblastenähnlichen Zellen sind neben morphologischen Veränderungen das Auftreten typischer Zelldifferenzierungsmarker wie alkalische Phosphatase, Kollagen Typ I, Fibronektin, Aktin, Tubulin, Vimentin, Osteokalzin, Osteopontin und Osteonektin sowie die Bildung von extrazellulären Mineralisationsinseln aus Calciumphosphat [18, 22].

In dieser Untersuchung soll der Frage nachgegangen werden, inwieweit in vitro die Fähigkeiten von humanen Pulpafibroblasten zur reparativen Dentinogenese vom Stand des Wurzelwachstums und von dem Medium zugesetzten Stimulanzen (Calciumhydroxid, β -Glyce-

unabhängige Variablen	Zielvariablen							
	Lebensfähigkeit		Kollagen Typ I (ng/ml)		ALP (mU/mg)		Mineralisationsinseln pro mm ²	
	n	MW ± SD	n	MW ± SD	n	MW ± SD	n	MW ± SD
Wurzelwachstum								
unvollständig	73	1,19 ± 0,80	49	338 ± 163	38	670 ± 802	38	1,21 ± 1,28
vollständig	46	1,18 ± 0,97	28	268 ± 149	52	271 ± 334	46	1,93 ± 2,79
Zusatz								
Gruppe 1: Kontrolle	18	1,04 ± 0,81	11	298 ± 122	14	356 ± 425	13	0,56 ± 0,47
Gruppe 2: Ca(OH) ₂ +bGP	18	1,02 ± 0,79	11	177 ± 64	14	422 ± 528	13	1,62 ± 2,18
Gruppe 3: Ca(OH) ₂	18	0,99 ± 0,82	11	180 ± 84	14	256 ± 323	13	2,02 ± 1,92
Gruppe 4: bGP+AA	18	1,27 ± 0,97	11	414 ± 134	14	350 ± 299	13	2,44 ± 3,03
Gruppe 5: bGP	18	1,26 ± 0,98	11	367 ± 154	14	458 ± 595	13	0,74 ± 0,96
Gruppe 6: AA	18	1,27 ± 0,99	11	458 ± 142	14	815 ± 1134	13	1,95 ± 2,39
Gruppe 7: Ca(OH) ₂ +AA	11	1,63 ± 0,37	11	293 ± 175	11	396 ± 316	6	1,60 ± 2,21

Tabelle 1 Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (SD) der erhobenen Parameter.**Table 1** Mean values (MW) and standard deviation (SD) of measured parameters.

unabhängige Variablen	Zielvariable				
	Lebensfähigkeit	Kollagen Typ I	ALP	Mineralisationsinseln	
	nach Adjustierung	nach Adjustierung	nach Adjustierung	vor Adjustierung	nach Adjustierung
Wurzelwachstum	–	–	–	–	
Zusatz	+	+	–	+	
Gruppe 2: Ca(OH) ₂ +bGP	–	+	–	–	–
Gruppe 3: Ca(OH) ₂	–	+	–	+	+
Gruppe 4: bGP+AA	+	+	–	+	–
Gruppe 5: bGP	+	–	–	–	–
Gruppe 6: AA	+	+	–	+	–
Gruppe 7: Ca(OH) ₂ +AA	–	–	–	–	–

Tabelle 2 Ergebnisse der statistischen Analyse (+ signifikanter Zusammenhang, p < 0,05, – kein signifikanter Zusammenhang).**Table 2** Results of statistical analysis (+ significant correlation, p < 0.05, – no significant correlation).

(Abb. 1-9 und Tab. 1-2: S. Preußker)

rophosphat, Ascorbinsäure) abhängt. Zu diesem Zweck werden Differenzierungsindikatoren (Mineralisationsleistung, alkalische Phosphataseaktivität und Kollagenbildung) von Pulpafibroblasten aus Weisheitszähnen mit unterschiedlichem Stand der Wurzelentwicklung und unter dem Einfluss verschiedener chemischer Zusätze erfasst. Aus den Ergebnissen sollen Rückschlüsse auf Ursachen für ein unterschiedliches In-vitro-Verhalten der Pulpafibroblasten aus Zähnen mit voll- und unvollständigem Wurzelwachstum sowie Schlussfolgerungen für therapeuti-

sche Strategien bei der Vitalerhaltung der Pulpa abgeleitet werden.

2 Material und Methode

2.1 Gewinnung von Pulpafibroblastenkulturen und Versuchsansatz

Die Pulpafibroblasten wurden aus 19 frisch extrahierten humanen kariesfreien Weisheitszähnen unter In-vitro-Bedingungen gewonnen und entsprechend ihrer Wurzelentwicklung in zwei Gruppen unterteilt. Elf Zähne hatten ein abgeschlossenes und acht Zähne ein unvollständiges Wurzelwachstum. Zahnkeime fanden keine Verwendung. Nach der Entfernung der Pulpen aus den einzelnen Zähnen und der mechanischen Zerkleinerung unter sterilen Bedingungen sowie Gewebeaufspaltung mittels Kollagenase Typ IA (Sigma-Aldrich-Chemie, Taufkirchen, Deutschland), wurde jede der Pulpafibroblastenkulturen separat in D-MEM (PAA, Cölbe, Deutsch-

land) kultiviert. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten (Corning, Wiesbaden, Deutschland) in 100 µl Medium pro Well mit einer Dichte von 1 × 10⁵ Zellen/Well kultiviert. Die Zellen wurden in 100 µl Medium pro Well mit einer Dichte von 1 × 10⁵ Zellen/Well kultiviert. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten (Corning, Wiesbaden, Deutschland) in 100 µl Medium pro Well mit einer Dichte von 1 × 10⁵ Zellen/Well kultiviert.

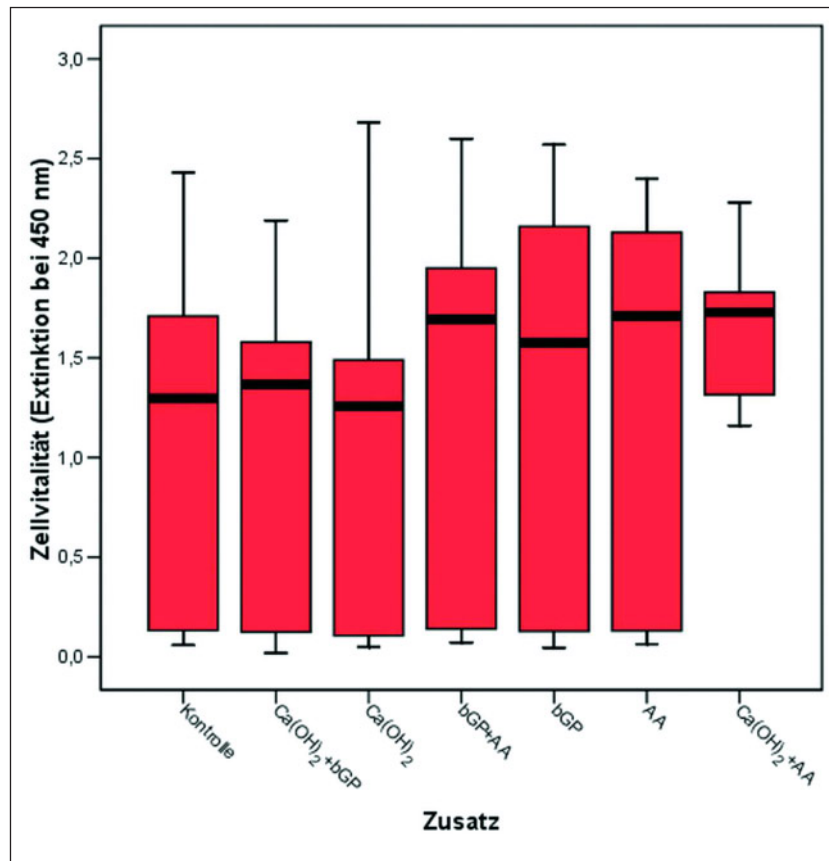


Abbildung 3 Zellvitalität der Pulpafibroblasten in Abhängigkeit von zugesetzten Stimulanzen.

Figure 3 Viability of dental pulp fibroblasts depending on chemical additives.

land), 10% FKS (Sigma-Aldrich-Chemie, Taufkirchen) und 50 µg/ml Gentamycin (Biochrom AG seromed, Berlin) angelegt [11, 12]. Für den Versuch wurden Zellen der 3. oder 4. Passage zu je 30.000 in 24-Well-Platten genutzt. Während des Versuchszeitraumes von 25 Tagen erfolgte die Stimulation der Pulpafibroblasten durch den Zusatz von 1,7 mg/ml bzw. 23 mM Calciumhydroxid (entspricht einer gesättigten Lösung) (Merck, Darmstadt), 10 mM β-Glycerophosphat (Sigma-Aldrich-Chemie, Taufkirchen) und 50 µg/ml Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich-Chemie, Taufkirchen) zum Medium, so dass sich für jede Einzelzahnkultur die folgenden sieben Versuchsgruppen ergaben:

Gruppe 1: Kontrolle – ohne Zusatz,

Gruppe 2: Calciumhydroxid und

β-Glycerophosphat (Ca(OH)₂+bGP),

Gruppe 3: Calciumhydroxid (Ca(OH)₂),

Gruppe 4: β-Glycerophosphat und

Ascorbinsäure (bGP+AA),

Gruppe 5: β-Glycerophosphat (bGP),

Gruppe 6: Ascorbinsäure (AA) und

Gruppe 7: Calciumhydroxid und

Ascorbinsäure (Ca(OH)₂+AA).

β-Glycerophosphat und Ascorbinsäure wurden bei jedem Mediumwechsel alle zwei Tage wieder neu zugesetzt, so dass

sie während der gesamten Versuchszeit konstant einwirkten. In Analogie zur klinischen Anwendung kam das Calciumhydroxid durch eine einmalige Gabe zu Versuchsbeginn für nur 24 Stunden zur Wirkung.

2.2 Bestimmung von Differenzierungsparametern

Zur Einschätzung der Lebensfähigkeit der Pulpafibroblasten fand der nicht-radioaktive Zellproliferationstest EZ4U (Biozol, Eching) am ersten Versuchstag nach Zusatzapplikation Verwendung. Dieser Test nutzt die Umwandlung von Tetrazoliumsalzen in intensiv gefärbte Formazanderivate durch lebende Zellen als Zeichen für die Zellvitalität, die als Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm ermittelt wird.

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) wurde mittels 4-NPP(4-Nitrophenylphosphat)-Test (Merck, Darmstadt, Deutschland) am 0., 1., 4., 8., 11. und 15. Tag sowie die Kollagen-Typ-I-Bildung mittels METRA CICP EIA Kit (Quidel, San Diego, USA) am 4. Versuchstag gemessen. Das C-terminale Propeptid (CICP) des Typ-I-Kollagens, das mit diesem Kit erfasst wird, gilt als

biochemischer Marker für die Kollagenproduktion.

Unter dem Rasterelektronenmikroskop (Philips XL 30 ESEM, Eindhoven, Niederlande) ist aus Platzgründen eine Betrachtung von Kulturen in Zellkulturplatten (24 Wells) nicht möglich. Deswegen wurden beim Versuchsansatz vor der Zellzugabe in die entsprechenden Wells herausnehmbare Acrylplättchen eingelegt, die von den Pulpafibroblasten ebenso besiedelt wurden wie sonst der Wellboden. Zur Bestimmung der Mineralisationsleistung erfolgte 25 Tage nach Zugabebeginn der chemischen Stimulanzen die Aufbereitung der mit Pulpafibroblastenkulturen bewachsenen Acrylplättchen. Nach dem Entfernen des Mediums aus dem Well und zweimaligem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Plättchen getrocknet. Zur qualitativen Ermittlung der Mineralisationsleistung diente die Energiedispersive Röntgenmikroanalyse (Philips XL 30 ESEM, Eindhoven, Niederlande), um Calcium und Phosphor in den sich bildenden Zellknoten festzustellen. Zur quantitativen Analyse der Mineralisationsleistung der Pulpafibroblasten wurden die Acrylplättchen raster-elektronenmikroskopisch im Feuchtraum betrachtet (Philips XL 30 ESEM),

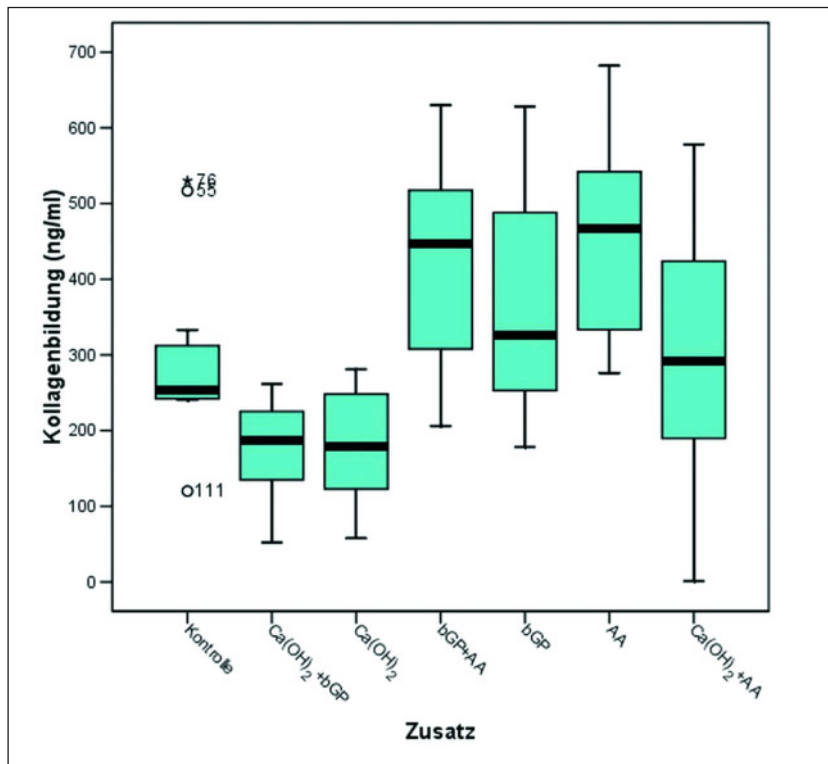


Abbildung 4 Kollagen-Typ-I-Bildung der Pulpafibroblasten in Abhängigkeit von zugesetzten Stimulanzen.

Figure 4 Formation of collagen type I of dental pulp fibroblasts depending on chemical additives.

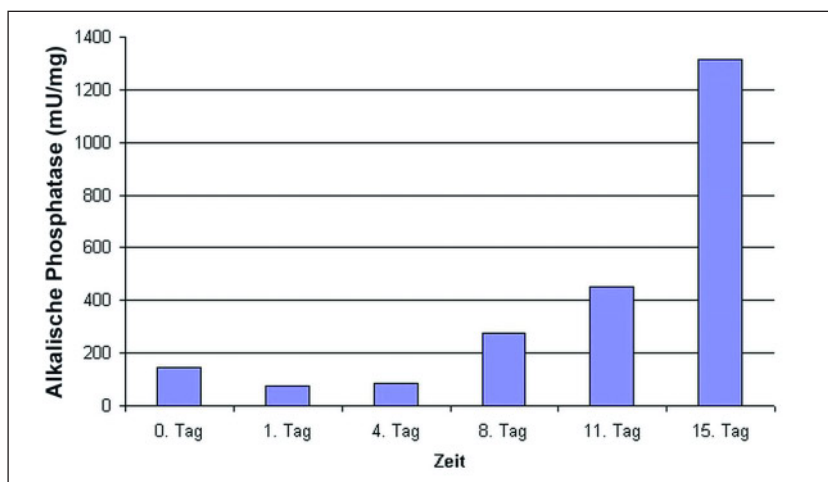


Abbildung 5 Mittlere alkalische Phosphataseaktivität der Pulpafibroblasten in Abhängigkeit von der Zeit.

Figure 5 Mean alkaline phosphatase activity of dental pulp fibroblasts depending on experimental time.

die bei 16facher Vergrößerung erkennbaren Mineralisationsinseln quadrantenweise pro Acrylplättchen ausgezählt (Abb. 1 und 2) und die Anzahl der Mineralisationsinseln pro mm^2 berechnet.

2.3 Statistische Analyse

Alle Messungen erfolgten doppelt. Mittels einer Varianzanalyse mit korrelierten Residuen für Wiederholungsmessungen am gleichen Zahn bei unterstellter identischer Korrelation mit anschließenden Dunnett-Tests zum globalen Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ wurde jeweils nach Unterschieden bezüglich der Zielvariablen (Ausbildung von

Mineralisationsinseln, Lebensfähigkeit, Kollagen-Typ-I-Bildung und alkalische Phosphataseaktivität) zwischen den Gruppen mit Zusatz und der Kontrollgruppe gesucht. Das Stadium des Wurzelwachstums fand dabei ebenfalls Berücksichtigung.

3 Ergebnisse

3.1 Zellvitalität – Ergebnisse des EZ4U-Tests

Die Lebensfähigkeit bzw. die Zellvitalität der Pulpafibroblasten stand in kei-

nem Zusammenhang zur Wurzelentwicklung, sondern nur zu den verwendeten Stimulanzen. Eine signifikant erhöhte Lebensfähigkeit gegenüber der Kontrollgruppe zeigten die Pulpafibroblasten der Gruppen 4 (β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure), 5 (β -Glycerophosphat) und 6 (Ascorbinsäure) (Tab. 1 und 2, Abb. 3). Die laut Mittelwert höchste Zellvitalität wurde in der Gruppe 7 (Calciumhydroxid und Ascorbinsäure) beobachtet. Aufgrund der geringen Probenzahl in dieser Gruppe ($n = 11$) stellte der statistische Test keine Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe fest.

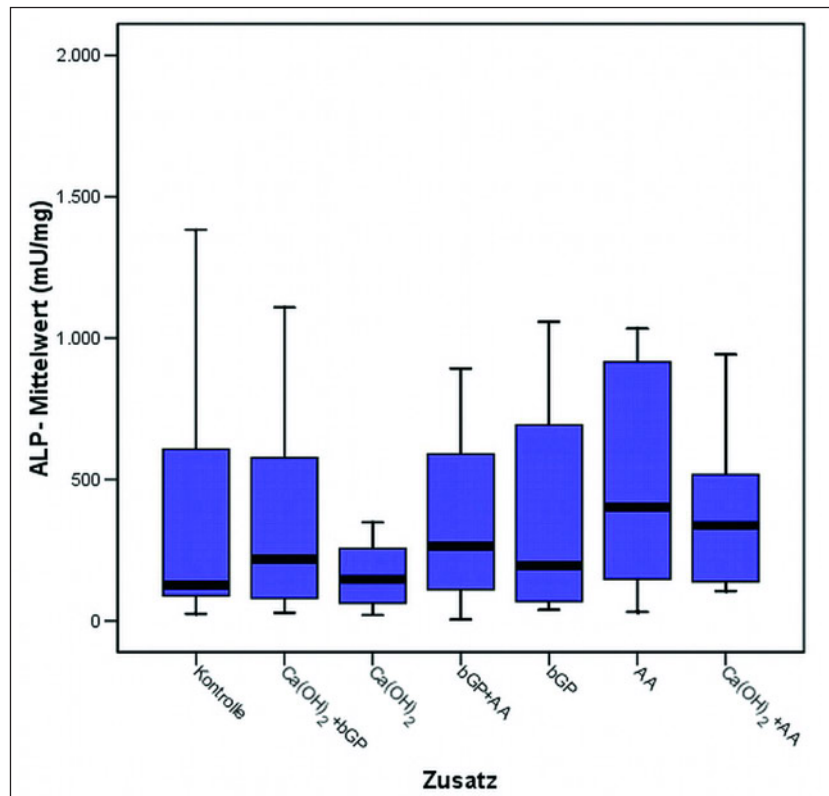


Abbildung 6 Alkalische Phosphataseaktivität der Pulpafibroblasten in Abhängigkeit von zugesetzten Stimulanzen.

Figure 6 Alkaline phosphatase activity of dental pulp fibroblasts depending on chemical additives.

3.2 Ergebnisse der Kollagenmessung

Die Produktion von Kollagen Typ I durch die Pulpafibroblasten war ebenfalls unabhängig vom Wurzelwachstum, aber abhängig vom Zusatz. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde in den Gruppen 2 (Calciumhydroxid und β -Glycerophosphat) sowie 3 (Calciumhydroxid) signifikant weniger Kollagen und in den Gruppen 4 (β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure) sowie 6 (Ascorbinsäure) signifikant mehr Kollagen gebildet als in der Kontrollgruppe (Tab. 1 und 2, Abb. 4).

3.3 Ergebnisse der ALP-Bestimmung

Die über den Versuchszeitraum mehrfach gemessene Aktivität der alkalischen Phosphatase zeigte dabei einen Anstieg im Zeitverlauf (Abb. 5). Die mittlere alkalische Phosphataseaktivität (Mittelwert aus allen positiven ALP-Messungen) stand weder in einem signifikanten Zusammenhang zum Wurzelwachstum noch zu den verwendeten Stimulanzen (Tab. 1 und 2, Abb. 6). Obwohl der ALP-Mittelwert in der Gruppe 6 (Ascorbinsäure) als einziger wesentlich höher war als in der Kontrollgruppe, wurde dieser

Unterschied wegen der hohen Standardabweichung als nicht signifikant herausgefiltert.

3.4 Qualitative und quantitative Mineralisationsleistung der Pulpafibroblasten

Eine durch Pulpafibroblasten gebildete Mineralisationsinsel in rasterelektronenmikroskopischer Betrachtung wird in Abbildung 1 dargestellt. Bei der Energiedispersiven Röntgenmikroanalyse der Mineralisationsinsel konnte im Vergleich zum benachbarten zellschichtbedeckten Areal ein deutlich erhöhter Gehalt an Calcium und Phosphor nachgewiesen werden, was auf die Bildung von Calciumphosphat durch die Pulpafibroblasten in vitro schließen lässt. Das Element Stickstoff kam erwartungsgemäß nur in der Zellschicht vor, und der Sauerstoffgehalt war an beiden Stellen sehr hoch (Abb. 7 und 8).

In allen Gruppen, auch in der Kontrollgruppe, konnten Mineralisationsinseln nachgewiesen werden. Die meisten Mineralisationsinseln wurden in Gruppe 4 (β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure), gefolgt von den Gruppen 3 (Calciumhydroxid) und 6 (Ascorbinsäure), gebildet (Tab. 1, Abb. 9). Innerhalb des

statistischen Systems lagen diese drei Gruppen vor der Adjustierung nach *Dunnnett* signifikant über der Kontrollgruppe. Nach der Adjustierung war nur noch das Vorkommen von Mineralisationsinseln in der Calciumhydroxidgruppe signifikant erhöht (Tab. 2). Das Stadium des Wurzelwachstums stellte sich bezüglich der Bildung von Mineralisationsinseln durch die Pulpazellen in unserem Versuch als unbedeutend heraus (Tab. 2).

4 Diskussion

4.1 Gewinnung von Pulpafibroblastenkulturen

Obwohl im Rahmen dieser Untersuchung kein spezifischer immunhistochemischer Nachweis für das Vorliegen humaner Pulpafibroblasten erbracht wurde, kann aufgrund der Zellmorphologie und der Anzuchtmethode [11, 12] davon ausgegangen werden, dass es sich um solche handelt. *Levin et al.* [12] beschrieben 1988 eine sichere Methode für die Gewinnung von humanen Pulpafibroblastenkulturen nach Aufspaltung von mechanisch zerkleinertem Pulpagewebe mittels Kollagena-

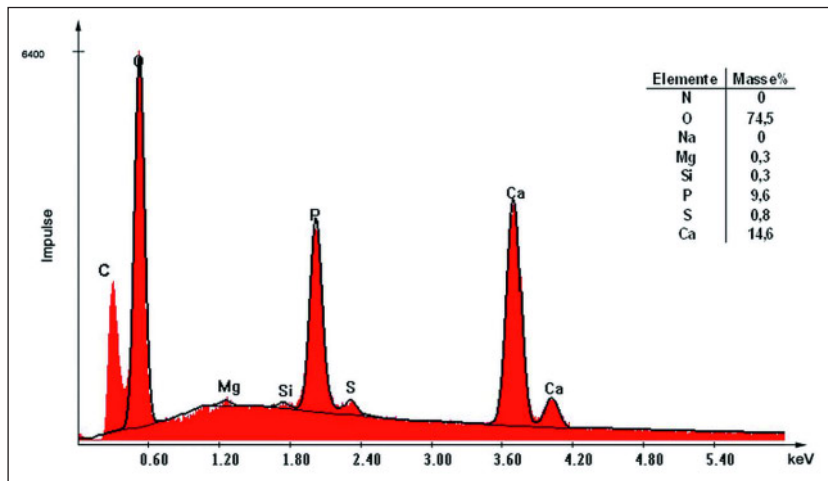


Abbildung 7 Energiedispersive Röntgenmikroanalyse einer Mineralisationsinsel (100 s Live Time), (C wurde bei der Berechnung der Masseprozentage nicht berücksichtigt).

Figure 7 X-ray microanalysis of a mineralized nodule (100 s live time), (C was not considered).

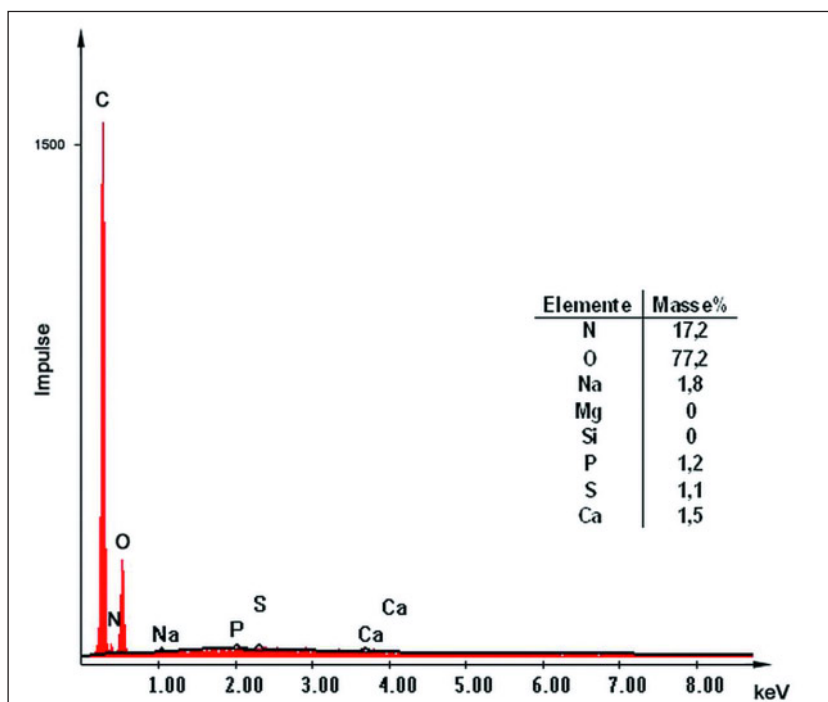


Abbildung 8 Energiedispersive Röntgenmikroanalyse neben einer Mineralisationsinsel – Zellschicht (100 s Live Time), (C wurde bei der Berechnung der Masseprozentage nicht berücksichtigt.).

Figure 8 X-ray microanalysis adjacent to a mineralized nodule – cell layer (100 s live time), (C was not considered).

se Typ IA und Trypsin und stellten konfluente Kulturen her. In Anlehnung an diese Methode wurde hier gearbeitet.

4.2 Reparative Dentinogenese und Stand der Wurzelentwicklung

Reparative Vorgänge verlaufen bei noch nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum und bei weitem Pulpakavum besser als bei Zähnen mit abgeschlossenem Wurzelwachstum – dieser Zusammenhang wird in der Literatur beschrieben und durch klinische Erfahrungen bestätigt [10]. Die vorliegende In-vitro-Studie kann diese klinische Empirie jedoch nicht untermauern. Alle untersuchten Parameter (Zellvitalität, Kollagenproduktion, Freisetzung der alkalischen

Phosphatase, Bildung von Mineralisationsinseln) erwiesen sich als unabhängig vom Stand der Wurzelentwicklung der verwendeten Weisheitszähne.

Eine mögliche Erklärung für den in vitro nicht deutlich werdenden Zusammenhang liegt vermutlich in der „Auslese“ regenerationsfähiger Pulpen bei der Gewinnung der Pulpafibroblastenkulturen aus Einzelzähnen. Für den Versuchsansatz wurden pro angezüchteter Pulpa mehrere Millionen Zellen benötigt. Rund 50 % der angesetzten Pulpafibroblastenkulturen konnten aufgrund fehlender oder zu geringer Proliferationsleistung nicht für den Versuch verwendet werden. In vivo ist der Stand der Wurzelentwicklung entscheidend für das Überleben der Pulpa, da ein offenes

Foramen eine Vaskularisation garantiert, die für die Bereitstellung regenerationsfördernder Faktoren notwendig ist. In vitro hingegen wird nur noch der einzelne Pulpafibroblast betrachtet, dessen Versorgung durch ein künstliches Zellkulturmedium erfolgt. Es scheint in Bezug auf das Wurzelwachstum deshalb sinnvoll, eine strikte Trennung von In-vivo- und In-vitro-Ergebnissen vorzunehmen.

4.3 Abhängigkeit der reparativen Dentinogenese von chemischen Stimulanzen

Die Konzentration der zugesetzten Stimulanzen β -Glycerophosphat (10 mM) und Ascorbinsäure (50 μ g/ml) zum Me-

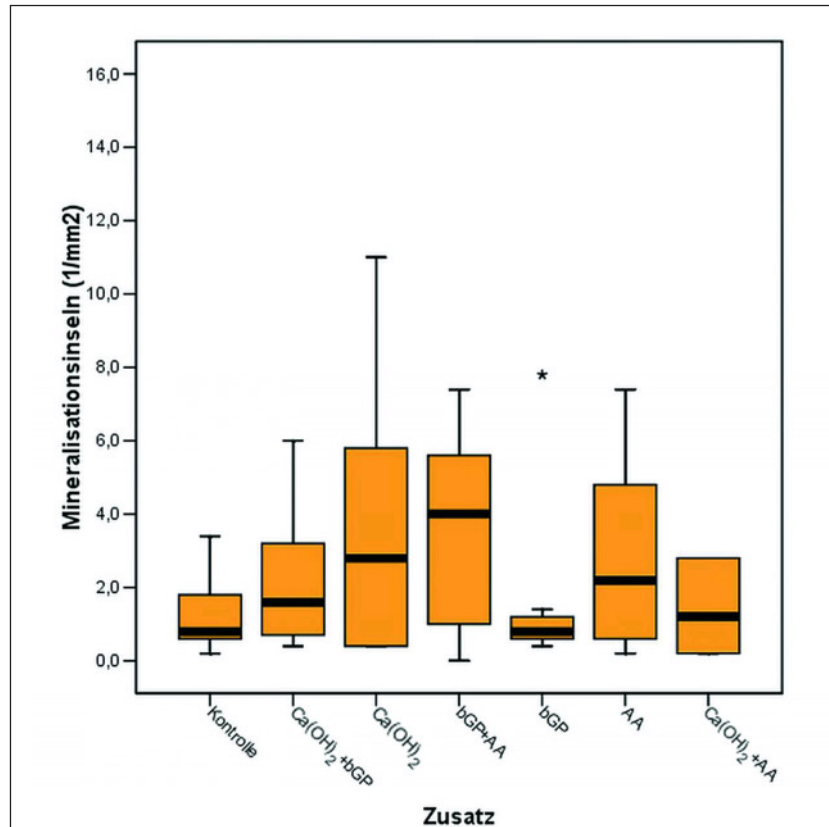


Abbildung 9 Mineralisationsleistung der Pulpafibroblasten in Abhängigkeit von zugesetzten Stimulanzen.

Figure 9 Mineralizing activity of dental pulp fibroblasts depending on chemical additives.

dium wurden in Anlehnung an *Kuo et al.* [11] gewählt, die damit an Pulpafibroblastenkulturen die Bildung von mineralisierter extrazellulärer Matrix induzierten.

Im Gegensatz zum Wurzelwachstum ließen sich fast alle untersuchten Parameter durch die Art der zugesetzten Stimulanzen beeinflussen. Ein frühes Kriterium zur Beurteilung des Verhaltens der Pulpafibroblasten *in vitro* ist die Lebensfähigkeit. Sie wurde 24 Stunden nach Versuchsbeginn bestimmt. Nach der statistischen Auswertung konnte in den Gruppen, denen β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure allein oder in Kombination zugesetzt wurden, eine signifikant höhere Lebensfähigkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Das traf auf die Gruppen 2, 3 und 7, denen Calciumhydroxid allein oder in Kombination mit β -Glycerophosphat bzw. Ascorbinsäure zugesetzt wurde, nicht zu. Calciumhydroxid hat in der gesättigten Lösung (1,7 mg/ml bzw. 23 mM) einen pH-Wert von rund 12. Um es den Kulturen für 24 Stunden zuzusetzen, wurde die angegebene Menge jedoch nicht in Wasser, sondern im Medium gelöst. Bedingt durch das Puffersystem

des Mediums lag der pH-Wert zum Zeitpunkt der Applikation bei 9,6. Da nach *Al-Sharer et al.* [2] bereits eine Calciumhydroxidkonzentration von 0,4 mg/ml (0,05 mM) zytotoxisch wirkt, hat der Zusatz der verwendeten Suspension sicher eine Reihe von Zelluntergängen induziert, die sich quantitativ in einer verminderten Lebensfähigkeit widerspiegeln. Anhand unserer Methodik lässt sich jedoch nicht nachvollziehen, wann der pH-Wert in der Kultur wieder ein neutrales Niveau erreichte. *Schroeder* [19] gibt einen Zeitraum von 24 Stunden an, in denen hauptsächlich das Puffersystem des Brutschrankes für eine weitere Neutralisation des pH-Wertes sorgt. Das Überleben der Zelle nach dem Zusatz von Calciumhydroxid ist jedoch nicht nur vom pH-Wert abhängig, sondern auch von ihrem Anpassungsvermögen an eine stark erhöhte extrazytosolische Calciumkonzentration. *Torneck et al.* [23] geben eine direkte Abhängigkeit zwischen Proliferationstendenz und Gehalt an freien Calciumionen an. Durch die hohe extrazelluläre Calciumkonzentration wird in den fibroblastenähnlichen Pulpazellen das physiologische Gleichgewicht von intra- und extrazellulärem

Elektrolytgehalt verschoben und dadurch in einem bestimmten Konzentrationsintervall eine erhöhte Mitoserate induziert [6, 23]. Andere Autoren bezweifeln, dass die erhöhte Zellproliferation durch Calciumionen ausgelöst sei, sondern erklären sie als Folge des unspezifischen chemischen Traumas durch den pH-Wert des Calciumhydroxidpräparates [5].

In vitro bildet sich durch die starke Alkalität der klinisch verwendeten wässrigen Calciumhydroxidsuspension bei der direkten Pulpaüberkappung nach *Schroeder* [19] eine oberflächliche dreischichtige Nekrosezone (äußere Schicht der Obliteration, mittlere Zone des entzündlichen Ödems, pulpanahe Schicht der Kolliquationsnekrose). Diese Alkalität ist aber durch die abschirmende Eigenschaft der entstehenden Calciumkarbonatmembran in ihrer Wirkung räumlich und zeitlich begrenzt [9]. Die Wirkung des Calciumhydroxids auf die Pulpafibroblasten ist also in Klinik sowie im vorliegendem Experiment zeitlich limitiert.

Im Gegensatz zu den Erwartungen hatten weder Calciumhydroxid noch die anderen verwendeten Zusätze einen signifikanten stimulierenden Einfluss

auf die Aktivität der alkalischen Phosphatase, obwohl sie ein zellmembran-gebundenes Enzym ist, das die Hydrolyse von Phosphomonoestern in alkalischer Umgebung katalysiert. Das dabei entstehende organische Phosphat ist ein wichtiger Bestandteil des Mineralisationsprozesses der Zelle. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase korreliert mit der Differenzierung von Pulpafibroblasten zu odontoblastenähnlichen Zellen [14]. Gemessen über alle Proben dieser Studie war ein Ansteigen der Werte vom 1. zum 15. Tag zu verzeichnen, was dem physiologischen Verhaltensmuster mineralisationsfähiger Zellen entspricht. Ein anfängliches Absinken der alkalischen Phosphataseaktivität vom Tag 0 zum Tag 1 kann möglicherweise mit Zelluntergängen erklärt werden, bedingt vor allem durch die hochkonzentrierte Calciumhydroxidzugabe.

Neben der Aktivität der alkalischen Phosphatase ist die Menge an gebildetem Kollagen Typ I ein weiterer wichtiger Marker für die Mineralisationsbereitschaft der Pulpafibroblasten [15]. In der vorliegenden Studie wurde die Menge des ins Medium abgegebenen C-terminalen Propeptids des Kollagens Typ I am 4. Versuchstag bestimmt. Die stimulierende Wirkung auf die Kollagenproduktion war beim Zusatz von Ascorbinsäure allein oder in Kombination mit β -Glycerophosphat bereits am vierten Tag nachzuweisen, nicht aber beim Zusatz von Calciumhydroxid allein oder in Kombination mit β -Glycerophosphat. Dort zeigte sich die Kollagenproduktion zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert. Ascorbinsäure ist ein wichtiger Cofaktor bei der Biosynthese von Kollagen. β -Glycerophosphat wiederum wird zur Mineralisation der gebildeten kollagenen Matrix benötigt [4]. Insofern korreliert das Ergebnis mit den physiologischen Gesetzmäßigkeiten. In vivo lässt sich neu gebildetes Kollagen bereits am 4. Tag immunhistologisch nach Vitalamputation und Defektverschluss mit Calciumhydroxid nachweisen [19]. In dieser Studie führte der Zusatz von Calciumhydroxid jedoch zu einer verminderten Menge an Kollagen Typ I. Das bedeutet, dass die Reduktion der Zellzahl im Kulturwell möglicherweise die verminderte Produktion bewirkte. Die Vermutung eines zeitlich versetzten Anstieges liegt nahe,

wurde aber im Rahmen dieser Studie nicht überprüft.

Mit der angewandten Methode der Energiedispersiven Röntgenmikroanalyse konnte die Bildung von Calciumphosphat durch Pulpafibroblasten in vitro nachgewiesen werden. Bei der quantitativen Auswertung der Mineralisationsleistung durch die Pulpafibroblasten stellten sich die β -Glycerophosphat-Ascorbinsäure-Gruppe, die Calciumhydroxidgruppe und die Ascorbinsäuregruppe als die drei führenden heraus. Innerhalb des statistischen Systems lag aber nach der Adjustierung nach *Dunnett* nur die Calciumhydroxidgruppe signifikant über der Kontrollgruppe, sicher zum einem bedingt durch die geringen Fallzahlen, aber auch durch die hohen Standardabweichungen. Sie sind neben der messtechnischen Komponente ebenfalls durch die biologische Diversität der Pulpafibroblasten bedingt, die nicht unbedeutend zu sein scheint.

Bisher wurde die Bildung von Mineralisationsinseln als aktiver Stoffwechselprozess von Pulpafibroblasten diskutiert. In Betracht gezogen werden sollte aber auch die Möglichkeit einer rein chemischen Calciumphosphatausfällung ohne zelluläre Mineralisationsleistung. Vorhersagen sind aber aufgrund der Komplexität der Kulturmedien und der dadurch bedingten Wechselwirkungen der Ionen und Proteine untereinander nicht möglich. Der Calciumgehalt im D-MEM mit 10 % FKS beträgt 2,1 mM, der Phosphatgehalt 1,1 mM. Bei so geringen Konzentrationen fällt chemisch sicher noch kein Calciumphosphat aus. Im Fall der Calciumhydroxidstimulation wird für 24 Stunden 23 mM Calcium zugesetzt und anschließend wieder entfernt. Aus der bei β -Glycerophosphatstimulation (10 mM) zugesetzten Lösung werden bei 37 °C 3 mM Phosphat freigesetzt [7]. Es wäre empfehlenswert, im Rahmen von zukünftigen Untersuchungen eine Kontrollgruppe ohne Pulpafibroblasten anzulegen, um verbindliche Aussagen zu einer chemischen Ausfällung von Calciumphosphat treffen zu können.

Das In-vitro-Ergebnis unterstreicht die guten klinischen Erfahrungen mit Calciumhydroxid bei der direkten Pulpaüberkappung. Laut Literaturangaben besitzen die Calciumionen ein hohes mitogenetisches Potential und regen die

Zellen zur Migration, Differenzierung, Matrixbildung sowie Mineralisation an. Auch die Hydroxylionen wirken sinngemäß, da die von ihnen erzeugte Gewebealkalität eine hervorragende Grundlage für die Einwanderung von Zellen und die Matrixbildung darstellt [19, 20, 23, 26]. *Seux et al.* [20] konnten nach der Anwendung von Dycal, dem erhärtenden Calciumhydroxidpräparat, beobachten, dass humane Pulpafibroblasten in vitro nicht nur die typischen Odontoblasten-Phänotypmarker wie Aktin, Vimentin und Kollagen Typ I bildeten, sondern auch ihre Morphologie in Richtung einer polarisierten, odontoblastenähnlichen Zelle änderten. Die differenzierungs- und funktionsanregende Wirkung von Ascorbinsäure auf Odontoblasten und Zementoblasten im In-vitro-Experiment an Rattenzähnen wurde von *Sakamoto* und *Takano* beschrieben [17]. Nach *Tziafas* und *Economides* [26] hängt die kristalline Struktur der Mineralisationsinseln weniger vom Material an sich ab, sondern vielmehr von den umgebenden Faktoren. Diese Aussage deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung, da sowohl die Applikation von Calciumhydroxid als auch von Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat zur Bildung von Mineralisationsinseln geführt haben. Die in der Literatur beschriebene differenzierungsanregende Wirkung von Calciumhydroxid, β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure auf Pulpafibroblastenkulturen kann anhand des Markers Mineralisationsleistung bestätigt werden.

5 Schlussfolgerungen

- In der vorliegenden In-vitro-Studie gelang es, Pulpafibroblasten mittels zugesetzter Stimulanzen (β -Glycerophosphat, Calciumhydroxid und Ascorbinsäure) zur Differenzierung anzuregen.
- Es konnten in vitro gemessen an Zellvitalität, alkalischer Phosphataseaktivität, Typ-I-Kollagenbildung und Mineralisationsleistung keine Unterschiede im Differenzierungsverhalten zwischen Pulpafibroblasten aus Zähnen mit voll- und unvollständigem Wurzelwachstum festgestellt werden.
- Die Ausprägung der Marker Zellvitalität, Typ-I-Kollagenbildung und Mineralisationsleistung war in den Pulpafi-

broblastenkulturen abhängig vom zugegebenen Stimulans, aber unabhängig vom Wurzelwachstum.

- Die klinisch beobachteten Unterschiede in der Fähigkeit der Pulpafibroblasten zur reparativen Dentinogenese in Abhängigkeit von der Wurzelentwicklung sind vermutlich weniger durch ein unterschiedliches Potential der Pulpafibroblasten als durch die mit der Wurzelentwicklung korrelierende vasculäre Versorgungssituation bedingt.

- Die starke Streuung der erhobenen Differenzierungsparameter weist u. a. auf eine hohe interindividuelle biologische Variabilität der Pulpafibroblasten hin.

DZZ

Interessenkonflikte: Der Autor erklärt, dass kein Interessenkonflikt im Sinne der Richtlinien des International Committee of Medical Journal Editors besteht.

Korrespondenzadresse:

Dr. med. dent. Susann Preußker
Poliklinik für Zahnerhaltung
Universitätsklinikum Carl Gustav Carus
der Technischen Universität Dresden
Fetscherstr. 74
01307 Dresden
E-Mail: susann.preussker@
uniklinikum-dresden.de

Literatur

- About I, Bottero MJ, de Denato P, Camps J, Franquin JC, Mitsiadis TA: Human dentin production in vitro. *Exp Cell Res* 258, 33–41 (2000)
- Al-Shaher A, Wallace J, Agarwal S, Bretz W, Baugh D: Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. *J Endodont* 30, 359–361 (2004)
- Costa CA: Pulp response to direct capping with an adhesive system. *Am J Dent* 13, 81–87 (2000)
- Couble ML, Farges JC, Bleicher F, Perrot-Mabillon B, Boudeulle M, Magloire H: Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif Tissue Int* 66, 129–138 (2000)
- Cvek M, Granath L, Cleaton-Jones P, Austin J: Hard tissue barrier formation in pulpotomized monkey teeth capped with cyanoacrylate or calcium hydroxide for 10 and 60 minutes. *J Dent Res* 66, 1166–1174 (1987)
- Folwaczny M, Mehl A, Haffner C, Hickel R: Möglichkeiten und Perspektiven bei der direkten Überkappung der Pulpa. *Dtsch Zahnärztl Z* 53, 307–321 (1998)
- Hempel U, Poppe M, Reinstorf A et al.: Proliferation and differentiation of osteoblasts on Biocement D modified with collagen type I and citric acid. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater* 71B, 130–143 (2004)
- Jepsen S, Lüttges JE, Albers H-K, Fleiner B, Rueger CD: Reparationsvorgänge der Pulpa nach Implantation von rekombinatem humanen bone morphogenetic protein (BMP). *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir* 19, 150–152 (1995)
- Klimm W: Endodontologie. Grundlagen und Praxis. Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln 2003
- Krenkel C, Grunert J: Hartgewebige Ausheilung von Zahnwurzelfrakturen. *Zahnärztl Prax* 4, 138–141 (1986)
- Kuo MYP, Lan WH, Lin SK, Tsai KS, Hahn LJ: Collagen gene expression in human dental pulp cell cultures. *Arch Oral Biol* 37, 945–952 (1992)
- Levin LG, Banes AJ, Bergholtz G: A method for isolation of viable cells from human dental pulp. *J Tissue Cult Methods* 11, 23–26 (1988)
- Magloire H, Joffe A, Bleicher F: An in vitro model of human dental pulp repair. *J Dent Res* 75, 1971–1978 (1996)
- Nakashima M: The effects of growth factors on DNA synthesis, proteoglycan synthesis and alkaline phosphatase activity in bovine dental pulp cells. *Arch Oral Biol* Vol 37, 231–236 (1992)
- Nakashima M, Nagasawa H, Yamada Y, Reddi AH: Regulatory role of transforming growth factor- β , bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. *Developmental Biol* 162, 18–28 (1994)
- Robson WC, Katz RW: Preliminary studies on pulp capping with demineralized dentin. *Proc Finn Dent Soc*, 88 Suppl 1 (1992)
- Sakamoto Y, Takano Y: Differential roles of ascorbic acid on dentin and cementum formations in rat teeth. *J Dent Res* 82 (Spec Iss B), 0502 (2003)
- Satoyoshi M, Koizumi T, Teranaka T et al.: Extracellular processing of dentin matrix protein in the mineralizing odontoblast culture. *Calcif Tissue Int* 57, 207–241 (1995)
- Schroeder U: Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation and differentiation. *J Dent Res* 64 (Spec Issue), 541–548 (1985)
- Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, Gauthier JP, Magloire H: Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. *Arch Oral Biol* 36, 117–128 (1991)
- Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Bégue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H: Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol* 39, 273–280 (1995)
- Stanley HR: Pulp capping: Conserving the dental pulp – can it be done? Is it worth it? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 68, 628–639 (1989)
- Torneck CD, Moe H, Howley TP: The effect of calcium hydroxide on porcine pulp fibroblasts in vitro. *J Endodont* Vol 9, 131–136 (1983)
- Tziafas D: Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. *Int J Dev Biol* 39, 281–290 (1995)
- Tziafas D, Alvanou A, Kaidoglou K: Dentinogenic activity of allogenic plasma fibronectin on dog dental pulp. *J Dent Res* 71, 1189–1195 (1992)
- Tziafas D, Economides N: Formation of crystals on the surface of calcium hydroxide-containing materials in vitro. *J Endodont* 25, 539–542 (1999)
- Tziafas D, Pantelidou O, Alvanou A, Belibasakis G, Papadimitriou S: The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. *Int Endodont J* 35, 245–254 (2002)