Aus dem Zentrum für Zahn-, Mund-, und Kieferheilkunde der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Westdeutsche Kieferklinik Poliklinik für Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde Komm. Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. T. Beikler

Immunolokalisation von Neuropeptid Y in der dentalen Pulpa unterschiedlicher Altersklassen nach neonataler, systemischer Capsaicin-Applikation

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nora Bergmann

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf Dekan Referent: Univ.-Prof. Dr. W. H.-M. Raab Korreferent: Prof. Dr.A. Hugger In Liebe und Dankbarkeit für meine Eltern und meinen Mann.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung		
1.1	Allgemein		
1.2	Pulpa	I-Dentin-Komplex	2-15
1.2.1		Anatomie	2-4
1.2.1.	1	Zelltypen	5
1.2.1.	2	Nervenfasertypen	5-8
1.2.2		Physiologie	8-9
1.2.2.	1	Mikrozirkulation	9-11
1.2.2.	2	Odontoblasten	11-12
1.2.2.	3	Odontoblastenähnliche Zellen	12-13
1.2.2.	4	Sonstige Zellen	13-14
1.2.2.5		Neuropeptide	14-15
1.3	Caps	aicin	15-21
1.3.1		Vorkommen	15
1.3.2		Pharmakologie	16-18
1.3.3		Transient receptor potential vanilloid 1	18-19
1.3.4		Auswirkung auf die Pulpa	20-21
1.4	Neuro	opeptid Y	22-25
1.4.1		Vorkommen	22
1.4.2		Funktion	22-23
1.4.3		Auswirkung auf die Pulpa	23-25
2	Frag	estellung und Ziel der Studie	26

3	Material und Methode		
3.1	Tierstudienmodell	27-29	
3.1.1	Capsaicin-Applikation	27-28	
3.1.2	Intravitalperfusion und Fixierung	28-29	
3.2	Immunhistochemie	29-30	
3.2.1	Gewebevorbereitung	29	
3.2.2	Anti-Neuropeptid Y	29-30	
3.3	Histologische Analyse	31-32	
3.3.1	Lichtmikroskopie und Fotografie	31	
3.3.2	Scion Image	32	
3.4	Studiendesign	32	
3.5	Statistische Analyse	33	
3.5.1	SPSS	33	
3.5.2	Student T-Test	33	
3.5.3	PostHoc Bonferroni-Test	33	
4	Ergebnisse	34-66	
4.1	Histologische Ergebnisse	35-52	
4.1.1	Distales Pulpenhorn	35-40	
4.1.2	Pulpencavum	41-46	
4.1.3	Mesiale Wurzel	47-52	
4.2	Statistische Datenanalyse	53-66	
4.2.1	Distales Pulpenhorn	53-56	
4.2.2	Pulpencavum	56-60	
4.2.3	Mesiale Wurzel	60-64	

4.2.4	Vergleich der Untersuchungsgebiete	64-66
5	Diskussion	
5.1	Interpretation der Ergebnisse	67-83
5.2	Schlussfolgerung	84-85
6	Literaturverzeichnis	86-98
7	Anhang	
8	Danksagung	

- 9 Curriculum vitae
- 10 Abstract

1. Einleitung

1.1 Allgemein

Diese Studie befasst sich mit der Physiologie der Dentin-Pulpa-Einheit. Für die Vitalerhaltung eines Zahnes ist die Pulpa mit ihren verschiedenen Zell- und Nervenfasertypen verantwortlich (Goldberg & Smith, 2004; Lesot et al., 1993; Mjör et al., 2002; Pashley & Liewehr, 2006). Auch das Dentin ist involviert, da es dort durch einen externer Stimulus Freisetzung von chemotaktischen Molekülen zur wie Wachstumsfaktoren kommt, welche an die Zellen der Pulpa weitergeleitet werden (Goldberg & Smith. 2004: Ruch et al., 1995: Tziafas et al., 2000). Daraufhin können die Zellen, Nervenfasern und Blutgefäße der Pulpa reagieren (Byers, 1994; Goldberg & Smith, 2004; Gronthos et al., 2000; Mjör et al., 2002; Pashley & Liewehr, 2006). Die daraus resultierenden Schutz-Reaktionen der Pulpa sind vielfältig (Lesot et al., 1993; Sloan & Smith, 1999; Smith et al., 1995). Es sind bis heute noch nicht alle physiologischen Aspekte der Vitalerhaltung der Pulpa bekannt (Goldberg & Smith, 2004). Der Zusammenhang der verschiedenen physiologischen Reaktionen innerhalb der Dentin-Pulpa-Einheit ist noch unzureichend erforscht (Goldberg & Smith, 2004).

Für diese Studie wurde die Pulpaphysiologie mit Hilfe eines Tierstudienmodells untersucht. Dabei dienten Wistar-Ratten als Versuchstiere. Die systemische Desensibilisierung mit Capsaicin (Buck & Burks, 1986; Lawson, 1987; Szolcsanyi, 2004) wurde als Studienmodell gewählt. Der Einfluss der daraus resultierenden Veränderungen des sensorischen Nervensystems (Caviedes-Bucheli et al., 2005; Heyeraas et al., 1996; Jacobsen & Heyeraas, 1996; Krage et al., 2002a und c) auf die Entwicklung der sympathischen Fasern sollte erforscht werden. Die Ausschüttung des sympathischen Neuropeptid Y wurde immunhistochemisch nachgewiesen. Es wurde die

Neuropeptid Y-Ausschüttung verschiedener Pulparegionen untersucht und miteinander verglichen. Dazu wurde das Pulpengewebe von Ratten verschiedener Altersklassen analysiert. So sollte erforscht werden, ob es zu einer Veränderung im Innervationsmuster der sympathischen Fasern im Verlauf der Zahnalterung in den verschiedenen Pulparegionen nach sensorischer Desensibilisierung kommt.

1.2 Pulpa-Dentin-Komplex

1.2.1 Anatomie

<u>Abbildung 1:</u> Zahnaufbau



Der Pulpa-Dentin-Komplex funktioniert als eine Einheit (Pashley, 1996), die Verbindung zwischen Dentin und Pulpa wird durch die Odontoblastenschicht hergestellt (Abb. 1). Die Zellkörper der Odontoblasten liegen einschichtig und palisadenartig im Pulpencavum direkt unterhalb des Dentins, sie bilden die Verbindung von Pulpa und Dentin. Die Odontoblastenfortsätze ziehen entlang des frisch sezernierten Prädentins bis tief in die mineralisierte Dentinmatrix (Jean et al., 1986). Das

Pulpengewebe selbst besteht größtenteils aus extrazellulärer Matrix, in die verschiedene Zelltypen eingelagert sind. Der organische Hauptbestandteil ist Kollagen Typ I und III (Magloire et al., 1982). Es kommen aber auch Elastin, Fibronektin, Glycosaminoglykane

und Proteoglykane als organische Bestandteile der Pulpamatrix vor (Mangkornkarn & Steiner, 1992; Lukinmaa et al., 1991).

In der Schicht der Odontoblasten befinden sich sowohl ein terminales Gefäßnetz als auch einige terminale Nervenendigungen (Byers, 1994). Zwischen den Odontoblasten konnten auch Kollagenfibrillen (Salomon et al., 1991) und Proteoglycane nachgewiesen werden (Yoshiba et al., 1996). Direkt unterhalb der Odontoblastenschicht liegt die zellfreie Zone nach Weil (Gotjamanos, 1969a). Hier gibt es ein großes Netzwerk unmyelinisierter Nervenfasern und viele Blutgefäße. Tiefer pulpenwärts schließt sich die zellreiche Zone nach Höhl an (Gotjamanos, 1969b). Dort findet man Fibroblasten, undifferenzierte Mesenchymzellen, Stammzellen, immunkompetente Zellen sowie Nervenfasern und Blutgefäße. Diese Zone ist in der Kronenpulpa stärker ausgeprägt als in der Wurzelpulpa. Unterhalb der zellreichen Zone befindet sich der Pulpenkern. Dort liegen hauptsächlich Fibroblasten, große Blutgefäße und Nerven (Pashley & Liewehr, 2006).

Das Dentin selbst besteht aus einer Kollagenmatrix, in die Apatitkristalle eingelagert werden (Linde, 1989). Die Bildung von Dentin kann zeitlebens erfolgen, wobei man drei Arten von Dentin unterscheiden kann. Das Primärdentin wird regulär während der Zahnentwicklung vor dem Zahndurchbruch von den Odontoblasten gebildet (Morse, 1991). Im weiteren Verlauf nach Durchbruch der Zähne entwickelt sich sekundäres Dentin (Morse, 1991), welches ebenfalls eine gleichmäßige Struktur aufweist, aber langsamer gebildet wird. Es wird hauptsächlich am Dach und Boden der Pulpakammer gebildet, wodurch diese flacher wird (Pashley & Liewehr, 2006).

Kommt es zu einer Reizung des Pulpengewebes entwickelt sich Tertiärdentin lokal an der Stelle des Reizes. Ist der Reiz schwach und es gibt noch verbleibende postmitotische Odontoblasten wird reaktives Dentin gebildet (Lesot et al., 1993; Smith et al., 1995). Gewebewachstums-Faktoren, wie TGF-B, sindüff die Erhöhung der Sekretionsrate der Odontoblasten verantwortlich (Sloan & Smith, 1999). Sind die Odontoblasten durch einen starken Reiz oder eine Verletzung untergegangen, wird reparatives Dentin gebildet (Lesot et al., 1993). Odontoblastenähnliche Zellen, auch sekundäre Odontoblasten genannt, sind für die Sezernierung dieser Dentinart zuständig. Dazu zählen die Zellen der zellreichen Zone nach Höhl, wie Fibroblasten und undifferenzierte Mesenchymzellen. In der Literatur wird auch über die Existenz pulpaler Stammzellen diskutiert, die in der Lage seien sollen, Gewebe wie Dentin, zu ersetzen (Gronthos et al., 2000). Zur Bildung von Reparaturdentin müssen Progenitorzellen des Pulpengewebes rekrutiert und zu odontoblastenähnlichen Zellen umgewandelt werden. welche wiederum zur Bildung der Dentinmatrix angeregt werden müssen. Dieser Vorgang wird durch die Anwesenheit von TGF-B, BMPs und andere Wachstumsfaktoren gesteuert (Sloan & Smith, 1999; Tziafas et al., 1998). Die Struktur dieser Dentinform ist sehr unregelmäßig und variationsreich (Mjör & Nordahl, 1996). Zum Teil ist das Reparaturdentin atubulär aufgebaut und wird auch Fibrodentin genannt. Dadurch verringert sich die Permeabilität des Dentins (Tziafas et al., 2000), so dass die Pulpa vor äußeren Einflüssen geschützt wird.

1.2.1.1 Zelltypen

Im Pulpengewebe gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Zellen (Goldberg & Smith, 2004; Mjör et al., 2002; Pashley & Liewehr, 2006). Die Odontoblasten sind dabei die höchst differenzierten Zellen in der Pulpa (Pashley & Liewehr, 2006). Der häufigste Zelltyp ist jedoch der Fibroblast (Mjör et al., 2002). Es kommen aber ebenso undifferenzierte Mesenchymzellen, Stammzellen, immunkompetente Zellen und Endothelzellen vor (Goldberg & Smith, 2004; Gronthos et al., 2000; Mjör et al., 2002; Pashley & Liewehr, 2006; Roberts-Clark & Smith, 2000). Zu den immunkompetenten Zellen zählen Lymphozyten, Makrophagen, Mastzellen und Dendritenzellen (Goldberg & Smith, 2004; Pashley & Liewehr, 2006).

1.2.1.2 Nervenfasertypen

Der Pulpa-Dentin-Komplex zählt zu den am dichtesten innervierten Geweben des Körpers. Die sensorischen Nervenfasern der Pulpa entstammen dem Ganglion trigeminale. Sie ziehen vom Apex bis in die koronale Odontoblastenschicht und in das Prädentin. Einige Fasern reichen bis in das Dentin (Byers, 1984; Byers et al., 1988; Byers & Närhi, 1999). Die meisten sensorischen Fasern der Pulpa sind nozizeptive Fasern (Hargreaves el al., 2006) Um eine Schmerzsensation hervorzurufen muss nur eine kleine Anzahl dieser sensorischen Fasern aktiviert werden (Närhi et al., 1992).

Tabelle 1:

Fasertyp	Lokalisation der Nervendigungen	Schmerz- Charakteristik	Myelinisation	Leitungs- geschwindigkeit
Α-β	Hauptsächlich entlang der Pulpa-Dentin- Grenze	scharf	vorhanden	30-70 m/sec
Α-δ	Hauptsächlich entlang der Pulpa-Dentin- Grenze	scharf, stechend	vorhanden	6-30 m/sec
С	Vermutlich in der ganzen Pulpa verteilt	dumpf	nicht vorhanden	0,5-2 m/sec
sympathisch	Als Nervenplexus entlang der Blutgefäße überwiegend in der Wurzelpulpa		nicht vorhanden	0,7-2,3 m/sec

Nervenfasern der Pulpa (modifiziert nach Pashley & Liewehr, 2006)

Ein geringer Teil der sensorischen Nervenfasern besteht aus mittelgroßen Aβ-Fasern. Sie innervieren hauptsächlich das Dentin und die Dentin-Pulpagrenze an den Pulpenhornspitzen. Sie sind die Nerven, die auf die mechanische Stimulation des Dentins reagieren (Närhi, 1985).

Zwischen 25 und 40 Prozent der dentalen Nervenfasern sind dünn-myelinisierte Aδ-Fasern, die vom Nervus trigeminus abstammen und von Schwannzellen umgeben sind. Die Leitungsgeschwindigkeit dieser Fasern liegt bei 6-30 Metern pro Sekunde. Sie innervieren das Dentin, das Prädentin und die Odontoblastenschicht im koronalen Bereich (Byers et al., 1990; Fristad et al., 1994). Die Aδ-Fasern reagieren auf eine Stimulation des Dentinliquors in den Dentintubuli. Sie vermitteln einen scharfen, spitzen Schmerz (Närhi, 1985; Närhi et al., 1992). Die höchste Innervationsdichte der Aδ-Fasern liegt in der Spitze des Pulpenhorns vor. Es gibt in der Pulpa einige langsam leitende dünne Aδ-Fasern, die auf Capsaicin empfindlich reagieren (Ikeda et al., 1997).

Der Hauptteil der Nervenfasern der Pulpa sind jedoch dünne unmyelinisierte, langsamleitende C-Fasern. Diese werden durch chemische, thermische oder mechanische Reize aktiviert. Sie sind also polymodale Nervenfasern, die den dumpfen Schmerz bei einer Pulpa-Inflammation vermitteln (Närhi et al., 1992). Ihre Leitungsgeschwindigkeit liegt unter 2,5 Metern pro Sekunde. Sie reagieren auch auf Capsaicin (Ikeda et al., 1997) und Entzündungsmediatoren wie Histamin und Bradykinin (Närhi 1985; Närhi et al., 1992) durch den Rezeptor TRPV. Dieser reagiert auf thermische und Säurestimulation und vermittelt eine Hitzeempfindung, woraus eine Freisetzung von Neurotransmittern resultiert (Hargreaves et al., 2006). C-Fasern werden im Falle einer Entzündung aktiviert und rufen eine Schmerzsensation hervor. Sie schütten bei einer Aktivierung proinflammatorische Neuropeptide wie Substance P (SP). Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) oder Neurokinin A aus (Byers, 1994). Daraufhin wird der Heilungsprozess im Pulpengewebe durch eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität und eine Erhöhung des Blutvolumens eingeleitet (Mjör et al., 2002). Die C-Fasern verlaufen in der Pulpaperipherie oder entlang von Blutgefäßen und werden bei Pulpaschädigung aktiviert (Pashley & Liewehr, 2006). Die Größe der Nervenfasern nimmt in der Kronenpulpa ab. In der Odontoblastenschicht und im Dentin gibt es nur unmyelinisierte Nervenendigungen (Pashley & Liewehr, 2006). Durch die Ausschüttung von CGRP und SP sind die sensorischen Nervenfasern an der Gefäßdilatation beteiligt (Andrew & Matthews, 1996).

Einleitung

Die sympathischen Nervenfasern entstammen dem Ganglion cervicale superius. Sie üben durch die Freisetzung sympathischer Neuropeptide eine Vasokonstriktion aus (Berggreen & Heyeraas, 2000; Heyeraas et al., 1994). Ihr Vorkommen ist weniger häufig als das der sensorischen Fasern (Mjör et al., 2002). Die Anordnung der sympathischen Fasern unterscheidet sich von der der sensorischen Nervenfasern. Sie sind am häufigsten netzförmig um die Blutgefäße geschlungen (Pashley & Liewehr, 2006). Zu lokalisieren sind sie in den Pulpenhörnern, aber auch tiefer in der Kronen- und Wurzelpulpa (Avery et al., 1980). Die sympathischen Fasern liegen als freie Nervendigungen vor, die hauptsächlich die Arteriolen in der Pulpa innervieren (Zhang et al., 1998). Bei einer Depolarisation dieser Nervenfasern kommt es zu einer lokalen Ausschüttung von verschiedenen Neurotransmittern wie Norepinephrin, Neuropeptid Y (NPY). Die Aktivierung des sympathischen Nervensystems führt dadurch zu einer Reduktion des pulpalen Blutflusses und einer Konstriktion der Arteriolen (Pashley & Liewehr, 2006). Das parasympathische Nervensystem hat keinen Einfluss auf den pulpalen Blutfluss. Die Funktion der parasympathischen Fasern in der Pulpa ist bis heute nicht geklärt (Olgart, 1996b).

1.2.2 Physiologie

Die Pulpaphysiologie ist sehr breit gefächert. Interessante Aspekte der Pulpaphysiologie sind die Mikrozirkulation zur Aufrechterhaltung der Homöostase, die Physiologie der Odontoblasten und der odontoblastenähnlichen Zellen und die Ausschüttung von Neuropeptiden im Pulpengewebe und deren Funktion. Einige Bereiche sind noch unzureichend erforscht und daher noch unbekannt.

Die Physiologie der Dentin-Pulpa-Einheit spielt aus zahnärztlicher Sicht eine große Rolle bei der Erhaltung der Pulpavitalität und auch bei der Lokalanästhesie. Bei einer Lokalanästesie wird die Reizleitung der nozizeptiven Fasern unterbrochen (Pashley & Liewehr, 2006). Daraus resultiert eine verminderte Ausschüttung der Neuropeptide Substance P und CGRP mit daraus resultierender Vasokonstriktion. Bei einer Reizung der Pulpa durch eine Karies, Hitze- oder Kältereize oder durch die Eröffnung der Dentintubuli durch eine zahnärztliche Behandlung entsteht ein gegenteiliger Effekt. Hier kommt es zu einer Depolarisation der sensorischen Fasern. Dadurch werden die vasodilatativen Neuropeptide freigesetzt, es kommt zu einer Erhöhung des Blutvolumens und zu einer erhöhten Permeabilität der Blutgefäße (Hargreaves et al., 2006). Es beginnt die anti-inflammatorische Abwehrreaktion der Dentin-Pulpa-Einheit mit der neurogenen Entzündung, der Immunabwehr und den Reparaturprozessen. Kommt ein Reiz über einen längeren Zeitraum vor, so reagieren die sensorischen Fasern der Pulpa mit dem sogenannten Nerv-Sprouting, was als Immunreaktion der Pulpa angesehen wird (Pashley & Liewehr, 2006). Dabei sprossen vermehrt Nervenfasern an der Stelle des Reizes ein. Für den Erfolg der zahnärztlichen Therapie ist eine intakte Physiologie des Pulpa-Dentin-Komplexes unerlässlich. Eine große Bedeutung spielt auch die Bildung von reaktivem und reparativen Dentin. Es dient als Schutzbarriere für die Vitalerhaltung der pulpalen Zellen.

1.2.2.1 Mikrozirkulation

Die Pulpa enthält ein eigenes dichtes Mikrozirkulationsnetz, dessen Hauptfunktion die Regulation der interstitiellen Umgebung durch den Transport von Nährstoffen,

Hormonen, Gasen und der Abtransport von metabolischen Abfallprodukten ist (Mjör et al., 2002). Es handelt sich dabei um ein dynamisches System, welches sich an die metabolischen Bedürfnisse anpasst.

Bei Entzündungsreaktionen ist das Gefäßsystem ebenfalls beteiligt. Dann steigt der interstitielle hydrostatische Druck in der Pulpa stark an (Stenvik et al., 1972). Das Gefäßnetz ist im subodontoblastischen Raum in drei Lagen unterteilt, das terminale Netz ist in der äußersten Schicht zu finden. Die mittlere Schicht besteht aus prä- und postkapillären Gefäßen, die dritte Schicht enthält ein venöses Gefäßsystem (Kishi et al., 1989). Im Laufe des Lebens kommt es zu einer Reduktion des pulpalen Metabolismus, daher verändert sich dieser Aufbau. Im adulten Zustand gibt es nur noch eine Lage von Kapillaren die direkt in Venolen übergehen (Kishi et al., 1989).

Der Blutfluss in der Pulpa ist höher als in anderen oralen Geweben. Er ist annähernd so hoch wie im Gehirn. Die höchste Kapillardichte ist koronal zu finden. Der koronale Blutfluss ist verglichen mit dem apikalen doppelt so hoch. 14 Prozent des Pulpenvolumens bestehen aus Blutgefäßen (Zhang et al, 1998). Es gibt zwei Faktoren, die die arterielle Vasokonstriktion beeinflussen und damit einen Effekt auf den pulpalen Blutfluss ausüben. Diese Faktoren sind neuronaler und parakriner Natur.

Die neuronale Regulation des Blutflusses erfolgt durch die Ausschüttung von Neuropeptiden durch die sensorischen und sympathischen Nervenfasern (Pashley & Liewehr, 2006). Der Einfluss kann je nach Neuropeptid vasokonstriktiver oder vasodilatatorischer Natur sein. Parakrine Faktoren wie Bradykinin (Olgart, 1992), Prostaglandin oder Histamin werden lokal produziert (Okabe et al., 1989). Sie alle führen zu einer Erhöhung des pulpalen Blutflusses.

Das Gefäßsystem der Pulpa weist eine Besonderheit auf. Da die Pulpa von Dentin umgeben ist, kann sich das Gewebe nicht ausdehnen (Pashley & Liewehr, 2006). Kommt es zu einer Vasodilatation und erhöhten Gefäßpermeabilität auf Grund einer Entzündung, resultiert ein erhöhter hydrostatischer Druck in Teilen des Pulpengewebes (Heyeraas & Kvinnsland, 1992). Dieser Druck wird teilweise kompensiert durch eine Absorption der Gewebeflüssigkeit durch Lymphgefäße (Heyeraas & Kvinnsland, 1992).

1.2.2.2 Odontoblasten

Die Odontoblasten sind die höchstdifferenzierten Zellen der Pulpa (Pashley & Liewehr, 2006). Es sind postmitotische sekretorische Zellen mit basalem Zellkern, die von der Neuralleiste abstammen (Imai et al., 1996). Fibronektin bewirkt eine terminale Differenzierung der Odontoblasten zu sekretorischen Zellen (Ruch et al., 1996).

Odontoblasten produzieren die Bestandteile der organischen Matrix von Pädentin und Dentin einschließlich der Kollagene und Proteoglykane. Interzellulär können sie Calciumionen für den Mineralisationsprozess im Dentin transportieren (Linde, 1995; Linde & Lundgren, 1995). Sie schütten Matrix Metalloproteinasen aus, wodurch eine Umwandlung von Prädentin in Dentin erfolgt (Caron et al., 1998).

Im Laufe ihrer Aktivität verändern Odontoblasten ihr Aussehen (Romagnoli et al., 1990). Sie flachen bei abnehmender Aktivität ab. Die Größe und Anzahl der Zellorganellen wird ebenfalls mit abnehmender Aktivität reduziert (Mjör et al., 2002). Die größte Aktivität zeigen die Odontoblasten während der Bildung von Primärdentin. Dann besitzen sie ein ausgeprägtes Endoplasmatisches Retikulum, einen gut entwickelten Golgiapparat und eine Vielzahl von Mitochondrien und Vesikeln (Goldberg & Smith, 2004). Ihre Zellkörper

liegen im Pulpencavum, ihre Fortsätze ziehen entlang des frisch sezernierten Prädentins bis tief in die mineralisierte Dentinmatrix (Jean et al., 1986).

Große säulenförmige Zellkörper findet man in der Kronenpulpa (Schellenberg et al., 1992), im Mittelteil der Pulpa entlang des Wurzelkanals sind sie klein und säulenförmig (Marion et al., 1991) und in der Wurzelpulpa sind die Zellkörper kubisch flach.

Der Durchmesser eines aktiven Odontoblasten beträgt 5-7 µm, die Länge beträgt durchschnittlich 40 µm. Die vaskuläre Versorgung der Odontoblasten ist für ihre Funktionsfähigkeit von großer Bedeutung. Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Status der Blutversorgung und dem Ausmaß der Dentinmineralisation (Tobin, 1972).

1.2.2.3 Odontoblastenähnliche Zellen

Die Fibroblasten sind die in der Pulpa am häufigsten vertretenen Zellen (Mjör et al., 2002). Sie sind hauptsächlich in der Kronenpulpa lokalisierte spindelförmige Zellen. Fibroblasten bilden sowohl Kollagen Typ-I und Typ-III als auch Proteoglykane und Fibronektin für die extrazelluläre Matrix (Pashley & Liewehr, 2006). Sie dienen als eine Quelle für die Matrix-Metalloproteinasen der Pulpa (Pashley & Liewehr, 2006). Es wird vermutet, dass sich Fibroblasten in odontoblastenähnliche Zellen umwandeln können (Fitzgerald et al., 1990).

Die undifferenzierten Mesenchymzellen kommen in der zellreichen Zone unterhalb der Odontoblastenschicht und im Pulpazentrum in der Nähe der Gefäße vor (Goldberg & Smith, 2004). Es wird vermutet, dass diese Zellen wie Stammzellen fungieren (Gronthos et al., 2000). Dabei kommt es zu einer Zellteilung, eine Zelle differenziert sich, die

andere wandert zurück in die zellreiche Zone und behält ihre Teilungsfähigkeit (Ruch et al., 1995). Man vermutet, dass sie die Fähigkeit besitzen, sich zu Fibroblasten oder odontoblastenähnlichen Zellen umzuwandeln (Goldberg & Smith, 2004). Ein chemotaktischer Reiz, die Ausschüttung von TGF-β2 (Tzaifas et al., 1998), Zytokinen oder Bone Morphogenic Proteins (Nakashima 1994) können die Migration und Proliferation dieser Progenitorzellen auslösen. Die Wachstumsfaktoren und Zytokine leiten die Differenzierung zu odontoblastenähnlichen Zellen ein (Tzaifas et al., 1998) und regen die Sezernierung von Reparaturdentin an.

1.2.2.4 Sonstige Zellen

In der gesunden Pulpa konnten viele immunkompetente Zellen nachgewiesen werden (Goldberg & Smith, 2004). Makrophagen befinden sich hauptsächlich in der Nachbarschaft von Blutgefäßen. Ihre Aufgabe in der Pulpa ist einerseits die Phagozytose, andererseits die Weiterleitung von Antigenen an T-Zellen (Pashley & Liewehr, 2006). Kommt es in der Pulpa zu einer Entzündungsreaktion, reagieren die mit Makrophagen der Ausschüttung verschiedener Entzündungsund Wachstumsfaktoren (Pashley & Liewehr, 2006). Die Dendritenzellen werden auch Antigen-präsentierende Zellen genannt. Sie besitzen Typ II-Antigene (Pashley & Liewehr, 2006). Ein Großteil der Lymphozyten sind T- Lymphozyten (Pashley & Liewehr, 2006). B-Lymphozyten kommen nur vereinzelt vor (Goldberg & Smith, 2004). Mastzellen kommen selten in der gesunden Pulpa vor. Sie sind bei Entzündungsprozessen in der Nähe der Blutgefäße gehäuft zu finden (Pashley & Liewehr, 2006).

In der Pulpa kommen auch Endothelzellen vor (Roberts-Clark & Smith, 2000). Kommt es durch eine Präparation, eine Karies, eine irreversible Pulpitis oder einer Nekrose zum Untergang von pulpalen Zellen, wird der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) freigesetzt (Tran-Hung et al., 2006). Dadurch werden die Endothelzellen aktiviert, es kommt zu einer Angiogenese (Roberts-Clark & Smith, 2000), die den Heilungsprozess in der Pulpa unterstützt (Roberts-Clark & Smith, 2000). Kommt es zu einer Verletzung der Endothelzellen, schütten diese ebenfalls Moleküle aus, die eine Entzündungsreaktion und die Einleitung des Heilungsprozesses initiieren (Tran-Hung et al., 2006).

1.2.2.5 Neuropeptide

In der Pulpa kommen einige Neuropeptide vor, die von verschiedenen Nervenfasertypen freigesetzt werden. Die sensorischen C-Fasern und Aδ-Fasern setzen SP und CGRP frei (Närhi et al., 1992; Ikeda et al., 1997). Die Pulpa besitzt die höchste SP-Konzentration außerhalb des zentralen Nervensystems (Brodin et al., 1981). SP und CGRP bewirken eine Vasodilatation (Heyeraas & Kvinnsland, 1992; Andrew & Matthews, 1996), eine Plasmaextravasation (Kerezoudis et al., 1993b) und sie beeinflussen die Proliferation von T-Lymphozyten (Okiji et al., 1997). Während einer Entzündungsreaktion kommt es neben einer Nervenaussprossung auch zu einer erhöhten Expression von CGRP und SP in direkter Nachbarschaft zum Entzündungsgeschehen (Kimberly & Byers, 1988; Byers, 1992).

Eine Aktivierung der Nozizeptoren durch Capsaicin ruft eine periphere Freisetzung dieser Neurotransmitter hervor (Hargreaves et al., 1994). Einige Studien unterstützen daher die Schlussfolgerung, dass Capsaicin-sensitive Nervenfasern eine Hauptquelle

von SP und CGRP darstellen, um die Mikrozirkulation der Pulpa zu regulieren (Olgart, 1996a; Ikeda et al., 1997).

Die sympathischen Fasern schütten bei einer Aktivierung an ihren terminalen Endigungen NPY aus (Uddmann et al., 1984). Diese Ausschüttung reduziert den pulpalen Blutfluss um mehr als 80 Prozent, da NPY eine Vasokonstriktion auslöst (Kim et al., 1996b). Fristad und Kollegen (1995b) fanden heraus, dass es nach einer Denervation des Nervus alveolaris inferior zu einem verringerten Gehalt an SP und CGRP, aber nicht von NPY kommt. Daher wird vermutet, dass die sympathischen Fasern in der Pulpa auch dazu dienen, die Ausschüttung von SP und CGRP durch eine präsynaptische Inhibition zu verhindern (Kerezoudis et al., 1993a).

1.3 Capsaicin

1.3.1 Vorkommen

Bei Capsaicin handelt es sich um ein Hauptalkaloid unter den Capsaicinoiden, welches nur aus Früchten der Pflanzengattung Capsicum gewonnen wird (Buck & Burks, 1986). Seine Anwendung ist in der Nahrungszubereitung, der pharmazeutischen Industrie und der Medizin weit verbreitet (Prasad et al., 2005). Capsaicin ist der Hauptbestandteil von Chilischoten (Buck & Burks, 1986). Chili wird seit 7000 Jahren angebaut und als Nahrungsmittelzusatz in vielen Regionen der Welt aufgrund seiner einzigartigen Schärfe und seiner konservierenden Eigenschaft verwendet (Kang et al., 2001). Eine Wirkung auf spezifische Rezeptoren übt Capsaicin bei Säugetieren und Menschen in Form eines Hitze- oder Schärfereizes beim Verzehr von Chilischoten aus (Wu et al., 2005).

1.3.2 Pharmakologie

Capsaicin ist ein Vanillylamid der 8-Methyl-6-nonensäure (Abb. 2).

<u>Abbildung 2:</u> Strukturformel des Capsaicins



Der pharmakologische Wirkungsmechanismus von Capsaicin läuft in zwei Phasen ab. Initial kommt es zu einer exzitatorischen Phase verbunden mit Schmerzen und/oder Entzündungszeichen. Darauf folgt die Phase der Analgesie (Szallasi & Blumberg, 1999) (Abb. 3). Durch Capsaicin kommt es zur selektiven Reizung bestimmter Nozizeptoren (Närhi et al., 1992), die normalerweise auf thermische oder chemische Reize reagieren. Capsaicin bindet an einem ligandengesteuerten Ionen-Kanal, dem Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) (Kim et al., 2006).

Der oft schmerzhaften Erhitzung am Ort der Capsaicin-Applikation wird durch eine vermehrte Durchblutung des Gewebes entgegengewirkt (Barrett et al., 2003). Zweck ist die Wärmeabfuhr, wobei es zu einer lokalen Rötung und sogar zur Ödembildung kommen kann, ähnlich einer Verbrennung (Tang et al., 2004).

Einige Studien haben gezeigt, dass es durch Capsaicingabe zu einer Apoptose von kanzerogenen Zellen kommen kann (Lee et al., 2004; Kim et al., 2004), wobei die Wirkung zeit- und dosisabhängig ist (Kim et al., 2005). Capsaicin stimuliert die Lipid-Freisetzung aus dem Fettgewebe und hat dadurch eine anti-adipöse Wirkung (Kawada

et al., 1986). Die pharmazeutische Verabreichung von Capsaicin ist seiner antiarthritischen und analgetischen Wirkung zuzuordnen, welche durch eine Desensibilisierung der Nozizeptoren zustande kommt (Kress & Zeilhofer, 1999).

Wird Capsaicin oberflächlich auf die Haut oder Mucosa aufgetragen, ruft es eine lokale Desensibilisierung hervor, die nach einigen Tagen abklingt (Szolcsanyi et al., 1990; Maggi, 1991). Unter einer systemischen Desensibilisierung versteht man eine langanhaltende Chemoanalgesie und Schwächung der Thermoregulation gegen Hitze (Buck & Burks, 1986; Szolcsanyi, 2004). Die Dauer der Desensibilisierung ist dosisabhängig (Ikeda et al., 1997). Oberflächlich aufgetragenes Capsaicin depolarisiert und erregt polymodale C-Fasern (Marsh et al., 1987), aber es erregt keine C-mechanooder C-thermoempfindliche Rezeptoren (Szolcsanyi et al., 1988).

Eine neonatal verabreichte systemische Gabe wiederum führt zu einem Ausfall von 89% der unmyelinisierten C-Fasern und 36% der myelinisierten A-Fasern (Lawson, 1987). Capsaicin scheint allerdings keine Wirkung auf schnellleitende Aδ-Fasern und Aβ-Fasern auszuüben (Ikeda et al., 1997).

Abbildung 3:

Wirkungsmechanismus von lokal appliziertem Capsaicin



1.3.3 Transient receptor potential vanilloid 1

Der Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) gehört zur Gruppe der TRP-Känale (*Transient receptor potential channels*). Diese werden in sechs Unterfamilien gegliedert. Der TRPV1 zählt dabei zur Gruppe der Vanilloidrezeptor-verwandten TRP-Kanäle (Clapham, 2003). Alle Rezeptoren dieser Unterfamilie bestehen aus sechs Transmembransegmenten und einer Porenregion, welche einen hydrophoben Abschnitt besitzt (Vannier et al., 1998). Damit ist die Struktur ähnlich wie die der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle. Alle Mitglieder der TRPV-Subfamilie sind an der Hitze- und Schmerzwahrnehmung beteiligt (Clapham, 2003).

Der TRPV1 ist ein nicht-selektiver Kationenkanal (Caterina et al., 1999). Eine Aktivierung dieses Rezeptors wird durch Temperaturen über 42°C und durch Capsaicin ausgelöst. Ein saures extrazelluläres Milieu kann dazu noch stimulierend auf den TRPV1 einwirken (Caterina et al., 1997). Entzündungsmediatoren lösen bei diesem Rezeptor ebenfalls einen Stimulus aus (Prescott & Julius; 2003; Cesare et al., 1999). Da der Rezeptor sowohl für die Hitze-, als auch für die Reizwahrnehmung durch Capsaicin verantwortlich ist, wird derselbe Transduktionsmechanismus aktiviert wie bei einer Verbrennung (Caterina et al., 1997). Ein thermisches oder chemisches Signal löst einen Ionenfluss aus, wodurch Nervenzellen depolarisiert werden, und ein Signal an das Zentralnervensystem gesandt wird (Wu et al., 2005).

Der TRPV1 wurde in den Neuronen der dentalen Pulpa nachgewiesen, wo er vermutlich an der Schmerzwahrnehmung beteiligt ist (Chaudhary et al., 2001; Ichikawa & Sugimoto, 2000a und b; Renton et al., 2003). Es zeigt sich auch, dass 37% der primären sensorischen Neuronen vom Ganglion trigeminale, die die Pulpa versorgen, TRPV1immunoreaktiv sind (Ichikawa & Sugimoto, 2000a). Lee und Kollegen (2004) fanden heraus, dass bei Ratten nach neonataler Desensibilisierung mit einer hohen Capsaicindosis eine reduzierte Anzahl an TRPV1 nachweisbar ist.

1.3.4 Auswirkung auf die Pulp

Wenige Studien haben sich mit der Auswirkung von Capsaicin auf den Dentin-Pulpakomplex auseinandergesetzt. Dabei wurde sowohl die lokale als auch die systemische Capsaicinwirkung untersucht.

Raab und Kollegen (1996) fanden heraus, dass es nach einer systemischen Capsaicingabe zu einer Veränderung in der Zahnhartsubstanz kommt. Es findet einerseits ein Verlust ganzer Odontoblastengruppen statt, andererseits kommt im Vergleich zur Kontrollgruppe bis zu dreimal mehr Prädentin vor. Der Verlauf der Dentintubuli scheint gestört (Raab et al., 1996). Es ist anzunehmen, dass die capsaicinsensitiven Fasern der Pulpa einerseits einen Einfluss auf die Dentinreifung und andererseits auf die Bildung von Reparaturdentin ausüben (Raab et al., 1996).

Weitere Studien zeigten einen destruktiven Effekt der systemischen Capsaicingabe auf die Zahnhartsubstanzbildung anhand kraterförmiger Defekte im Dentin (Krage et al., 2002b; Seltmann et al., 2007). Dabei wurde gleichzeitig der Einfluss der Mikrozirkulation mit Hilfe von NOS-3 Knockout-Mäusen untersucht (Krage et al., 2002b). Es zeigte sich ein größerer Einfluss auf die Entstehung von Dentindefekten nach systemischer Capsaicin-Applikation (Krage et al., 2002b). Die Dentinbildung kann an den Pulpenhörnern und am zentralen Pulpenboden um bis zu 75 Prozent vermindert sein (Heyeraas et al., 1996; Jacobsen & Heyeraas, 1996). In seltenen Fällen kommt die Dentinbildung komplett zum Erliegen (Heyeraas et al., 1996). Nach neonataler Desensibilisierung zeigt sich ein signifikanter Abfall der Vickers Mikrohärte im Dentin, wobei angenommen werden kann, dass dieser Effekt durch eine Beeinträchtigung der Dentinapposition zustande kommt (Krage et al., 2005). Es ist anzunehmen, dass ein Fehlen der nozizeptiven Neuropeptide die Aktivität der Odontoblasten einschränkt

(Krage et al., 2005). Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass das Neurotoxin Capsaicin eine direkte toxische Wirkung auf die Odontoblasten ausübt (Krage et al., 2005).

Des Weiteren kommt es zu einem funktionellen Verlust der sensorischen Fasern in der Pulpa. Sowohl die Aδ- als auch die C-Fasern sind zahlenmäßig stark reduziert (Krage et al., 2002a und c). Sowohl der Verlust der sensorischen Fasern als auch die reduzierte Mikrozirkulation nach der Desensibilisierung üben einen negativen Einfluss auf die Odontoblasten und somit auf die Dentinbildung aus (Krage et al., 2002c).

Ein weiterer Effekt der neonatalen Desensibilisierung ist die Reduktion der Neurotransmitter-Ausschüttung. Es kommt zu einer Reduktion der Expression von SP und CGRP um bis zu 50 Prozent (Caviedes-Bucheli et al., 2005; Jacobsen & Heyeraas, 1996; Heyeraas et al., 1996). In der Odontoblastenschicht und deren Umgebung konnten nach systemischer Capsaicingabe keine nozizeptiven Neuropeptide nachgewiesen werden (Krage et al., 2005). Das Capsaicin bindet an den spezifischen TRPV1-Rezeptor der Zellmembran der C-Neuronen (Ichikawa & Sugimoto, 2000a).

Eine lokale Applikation niedrig konzentrierten Capsaicins auf das Pulpengewebe übt einen exzitatorischen Effekt auf die Leitungsfähigkeit der pulpalen langsam leitenden Aδ- und C-Fasern aus (Ikeda et al., 1997). Eine hohe Konzentration blockiert diese und die schnellleitenden Aδ-Fasern (Ikeda et al., 1997).

Okumara und Kollegen (2005) konnten nachweisen, dass die Odontoblasten von Wistar-Ratten über TRPV1-Kanäle verfügen, womit Capsaicin wahrscheinlich einen direkten Einfluss auf die Odontoblastenfunktion ausüben kann.

1.4 Neuropeptid Y

1.4.1 Vorkommen

Das Neuropeptid Y (NPY) ist ein 36-Peptidamid (Abb.4) und gehört zur Familie der pankreatischen Polypeptide (McCullough et al., 1998). Es ist ein Neurotransmitter des zentralen und peripheren Nervensystems, der seine Wirkung durch Aktivierung bestimmter Rezeptoren (Y1-Y6) ausübt (McCullough et al., 1998). NPY ist in sympathischen Nervendigungen mit Noradrenalin co-lokalisiert (Uddman et al., 1998).

Abbildung 4:

Strukturformel: Neuropeptid Y Tyr - Pro - Ser - Lys - Pro - Asp - Asn - Pro - Gly - Glu -Asp - Ala - Pro - Ala - Glu - Asp - Met - Ala - Arg - Tyr -Tyr - Ser - Ala - Leu - Arg - His - Tyr - Iso - Asn - Leu -Iso - Thr - Arg - Gln - Arg - Tyr – NH

1.4.2 Funktion

Das Neuropeptid Y ist physiologisch an der zentralnervösen Steuerung von Hunger, Angst, Stress und Schmerz beteiligt (Hansel et al, 2001). Es beeinflusst den zirkadianen Rhythmus, die Angiogenesis (Zukowska-Grojec et al., 1998), die Immunantwort, die Modulation von Entzündungsreaktionen (Haug & Heyeraas, 2003; Caviedes-Bucheli et al., 2006), die präsynaptische Regulation von Neurotransmittern, die Steuerung der Motilität im Gastrointestinaltrakt und die Blutgefäßkontraktion (Wahlestedt & Reis, 1993). NPY ist ein potenter Inhibitor der SP-induzierten Vasodilatation (Fallgren et al., 1989). Es potenziert dabei auch die Wirkung anderer Vasopressoren und spielt dadurch eine zentrale Rolle bei der Blutdruckregulation (Zukowska-Grojec et al., 1998). NPY kann seine Wirkung durch sechs verschiedene an G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Y1 – Y6) vermitteln (Zukowska-Grojec et al., 1998). Durch deren Aktivierung kommt es zu einer Inhibition der Adenylatzyklasen und dadurch zu einer Steigerung der intrazellulären Kalziumkonzentration, wobei der genaue Mechanismus bis jetzt noch unbekannt ist (Zukowska-Grojec et al., 1998).

1.4.3 Auswirkung auf die Pulpa

NPY ist das zweithäufigst ausgeschüttete Neuropeptid der humanen Pulpa (Caviedes-Bucheli et al., 2006). Die pulpalen Blutgefäße exprimieren den NPY-Rezeptor Y1, durch den das NPY seine Wirkung entfalten kann (Uddman et al., 1998). NPY kommt in gleicher Konzentration bei Milchzähnen und permanenten Zähnen vor (Rodd & Boissonade, 2002). Die sympathischen freien Nervenendigungen, die es ausschütten, sind überwiegend entlang der größeren Blutgefäße in der Wurzel (Heyeraas et al., 1993) und mittleren koronaren Region zu finden, ohne dass sie die Odontoblastenschicht erreichen (Rodd & Boissonade, 2002).

Es gibt eine enge Beziehung zwischen den pulpalen Blutgefäßen und dem NPYimmunreaktive perivaskulären Plexus (Zhang et al., 1998). Man nimmt an, dass eine Konstriktion dieser Gefäße durch NPY ausgelöst wird (Olgart et al., 1989). Rodd und Boissonade (2003) fanden heraus, dass 80 Prozent der Blutgefäße durch ein prominentes perivaskuläres Netzwerk NPY-immunreaktiver Fasern begleitet werden. Eine hohe Innervationsdichte hängt mit dickwandigen Arteriolen zusammen. Allerdings zeigen sich im Pulpenhorn neben den dünnen Arteriolen ebenfalls NPY-assoziierte Fasern (Rodd & Boissonade, 2003).

Appliziert man NPY auf die dentale Pulpa, so kommt es zu einer Reduktion des pulpalen Blutflusses durch eine Vasokonstriktion ähnlich der, die durch eine elektrische Stimulation der sympathischen Fasern ausgelöst wird (Kim et al., 1996a und b). Eine gesunde Pulpa zeigt eine geringe Ausschüttung von NPY, die höchste Freisetzung zeigt sich bei einer akuten irreversiblen Pulpitis (Caviedes-Bucheli et al., 2006). Während des Entzündungsprozesses steigt die NPY-Freisetzung an. Sie spielt eine wichtige Rolle in der sympathischen Vasoregulation (Caviedes-Bucheli et al., 2006). Es kommt zu einer Steigerung der durch Noradrenalin hervorgerufenen Vasokonstriktion als Antwort auf die Vasodilatation, die durch die Neuropeptidfreisetzung sensorischer Fasern hervorgerufen wird (Kim et al., 1996a).

In kariösen Zähnen steigt die NPY-Ausschüttung (Rodd & Boissonade, 2002), wobei bei milder Karies signifikant mehr NPY freigesetzt wird als bei profunder Karies (El Karim et al., 2006). Hier verlaufen die NPY-immunoreaktiven Fasern eher frei und unabhängig von Gefäßen und in den Pulpenhörnern sogar durch die Odontoblastenschicht hindurch bis in das Dentin (El Karim et al., 2006). Dasselbe Bild zeigt sich sechs Tage nach Axotomie des Nervus alveolaris inferior (Fristad et al., 1995a). Bei einer experimentell herbeigeführten Pulpitis zeigt sich ein erhöhtes Sprouting der NPY-freisetzenden Fasern in direkter Nachbarschaft zum neugebildeten Reizdentin (Haug & Heyeraas, 2003). Diese Tatsache unterstützt die Hypothese, dass NPY eine regulierende Rolle bei der Bildung von Reizdentin besitzt.

Desweiteren zeigt sich, dass NPY die Migration und Proliferation von Endothelzellen und darüber hinaus die Kapillarentstehung begünstigt (Zukowska-Grojec et al., 1998). Eine Neubildung der Blutgefäße ist ausschlaggebend für jeden Heilungsprozess. Da

durch die NPY-Freisetzung eine Hemmung der SP-Ausschüttung in der Pulpa erfolgt, ist anzunehmen, dass NPY dadurch eine anti-inflammatorische Wirkung auf das Pulpengewebe ausübt (El Karim et al., 2006). Interessanterweise zeigt sich nach einer Kavitätenpräparation kein Sprouting der NPY-immunoreaktiven Fasern (Haug et al., 2001). Nach Verletzungen mit Freilegung des Pulpengewebes verändert sich ebenfalls die Morphologie der NPY-freisetzenden sympathischen Fasern nicht (Oswald & Byers, 1993).

2. Fragestellung und Ziel der Studie

In der Pulpa dentis gibt es eine Vielzahl von Zellen, die alle zusammen den Dentinpulpakomplex bilden. Dieser Komplex wird durch die darin befindliche Innervation und Mikrozirkulation in seiner Physiologie beeinflusst und aufrechterhalten. Kommt es zu einer Veränderung im Innervationsmuster oder der Mikrozirkulation, so kann die gesamte Pulpaphysiologie nachhaltig verändert werden.

In dieser Studie sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Entwicklung der Dentinpulpa-Einheit über die Zeit von 30-155 Tagen auf die Reduktion oder Elimination der sympathischen Nervenfasern der Pulpa in der mit Capsaicin behandelten Ratte hat. Zum einen sollte der Einfluss der Altersstufen auf die NPY-Ausschüttung der sympathischen Nervenfasern dargestellt werden. Zum anderen wurde die Rolle der systemischen Desensibilisierung durch Capsaicin in diesem Zusammenhang untersucht. Dies soll dazu beitragen, die Physiologie des Dentin-Pulpakomplexes besser zu verstehen und neue Wege in der Therapie von Pulpaerkrankungen zu finden.

Arbeitshypothesen:

- Nach einer systemischen Desensibilisierung kommt es in der Rattenpulpa zu einer Veränderung der NPY-Freisetzung.
- In den verschiedenen Altersstufen wird es Unterschiede in der Quantität der Immunreaktionen f
 ür NPY geben.

3. Material und Methode

3.1 Tierstudienmodell

Die Versuche fanden mit Genehmigung der Bezirksregierung Düsseldorf (Projektnummer G86/2003) in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf statt. Als Versuchstiere wurden Wistar-Ratten herangezogen.

3.1.1 Capsaicin-Applikation

Es wurde eine Capsaicin-Lösung wie folgend beschrieben hergestellt: 50mg Capsaicin 95% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) wurden in 0,5ml Ethanol 96% gelöst und 0,5ml Tween® 80 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) hinzugefügt. Danach wurde die Lösung mit 4 ml physiologischem Natriumchlorid aufgefüllt und steril filtriert. Die Vehicle-Lösung für die Kontrollgruppen wurde genauso hergestellt, wobei auf das Capsaicin verzichtet wurde. Die Applikationsmenge betrug 50mg Capsaicin je Kilogramm Körpergewicht. Für den Versuch wurde neugeborenen Wistar-Ratten beider Geschlechter am dritten postnatalen Tag die Capsaicin-Lösung appliziert. Die Lösung wurde dabei subkutan in die Nackenfalte injiziert. Danach erhielten die Jungtiere Sauerstoff über eine Sauerstoffmaske. Durch die Capsaicingabe kam es zur Entwicklung von Asthmaanfällen. Daher wurde beim ersten Anzeichen eines Anfalls ein Hub Asthmaspray mit dem Wirkstoff Fenoterolhydrobromid (Berotec® N 100µg Dosier-Aerosol, Boehringer Ingelheim, Deutschland) verabreicht. Unter weiterer Sauerstoffgabe erfolgte eine Brustmassage. Während dieser Prozedur lagen die Tiere unter einer Wärmelampe, um einer Unterkühlung vorzubeugen. Sobald der Asthmaanfall komplett einsetzte, wurde ein weiterer Hub Asthmaspray gegeben. Nach Beendigung des Anfalls wurden die Jungtiere wieder zum Muttertier gesetzt

und nach einer und nach sechs Stunden kontrolliert. Eine weitere Kontrolle erfolgte 24 Stunden nach der Desensibilisierung. Danach wurde eine Woche täglich eine Kontrolle durchgeführt, danach erfolgten wöchentlich zwei Kontrollen der Tiere. Genau dasselbe Vorgehen wurde bei den Tieren der Kontrollgruppe angewendet. Obwohl diese Tiere keinen Asthmaanfall erlitten, wurde auch ihnen das Asthmaspray verabreicht. Insgesamt wurden 71 Tiere mit Capsaicin und 62 Tiere mit der Vehicle-Lösung behandelt.

3.1.2 Intravitalperfusion und Fixierung

Zum Zeitpunkt von 30, 60, 90 und 155 Lebenstagen wurden jeweils 12 Tiere der Kontroll- und der Capsaicin-Gruppe geopfert. Vor der Intravitalperfusion wurden die Tiere mit 100mg Ketaminhydrochlorid (Ketavet® 100mg/ml, Pharmacia&Upjohn, Erlangen, Deutschland) und 5g Xylazinhydrochlorid 2% (Rompun® 2%, Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) pro Kilogramm Körpergewicht intraperitoneal anästhesiert. Für die Perfusion wurde der Thorax mit einem medianen Schnitt eröffnet und die Rippen und das Sternum entfernt. Dabei wurde vorsichtig das Herz freipräpariert. Mit einer stumpfen Kanüle wurde der Herzmuskel an der Herzspitze sondiert, und es folgte dann die Perfusion durch den linken Ventrikel. Zunächst wurde mit 0,1M pH 7,4 Phosphatpuffer das Blut aus den Blutgefäßen ausgewaschen, wozu das rechte Herzohr aufgeschnitten wurde. Danach erfolgte die Fixierung nach Zamboni bestehend aus 4% Paraformaldehyd und 0,2% Pikrinsäure in 0,1M pH 7,4 Phosphatpuffer. Das Erreichen des gewünschten Fixierungsgrades der Gewebe zeigte sich daran, dass die Schleimhäute der Tiere gelb gefärbt waren. Sobald der gewünschte Fixierungsgrad erreicht war, wurden die Kiefer präpariert, halbiert und in 4% neutral gepuffertem Paraformaldehyd für 24 Stunden nachfixiert. Danach erfolgte

eine Auswaschung in Phosphatpuffer für weitere 24 Stunden. Die Kiefer wurden für 2-4 Wochen, je nach Alter der Tiere, in 25% Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) entkalkt. Danach wurden die Kiefer wieder für 24 Stunden in Phosphatpuffer ausgewaschen. Es folgte eine 24-stündige Einlage in Phosphatpuffer gelöster Sucrose (10%) bevor die Kiefer in 30% Sucrose, gelöst in Phosphatpuffer, bei -80°C eingefroren und gelagert wurden.

3.2 Immunhistochemie

3.2.1 Gewebevorbereitung

Zur Immunhistochemie wurden von den linken Unterkieferhälften von jeweils 12 Tieren je Gruppe am Kryostat Leica CM 3050 (Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland) bei -18°C Sagittal-Schnitte von je 50µm angefertigt und in Phosphatpuffer als flotierende Schnitte gesammelt.

3.2.2 Anti-Neuropeptid Y

Es erfolgten zwei Waschgänge für je fünf Minuten in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS). Danach wurden die Schnitte für 30 Minuten in 0,3% Hydrogen-Peroxid (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) in PBS und Zusatz von 0,5% TritonX 100® (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) inkubiert. Es schlossen sich sechs Waschgänge mit PBS-TritonX 100® (PBS-TX) an. Die Blockierung von unspezifischen Bindungen wurde für 60 Minuten mit 5% Normalserum von der Ziege (Vektor Laboratories, Burlingame, USA) durchgeführt. In eine Lösung aus 1% Rinderserum Albumin (Calbiochem, La Jolla, USA) und 5% Normalserum von der Ziege wurde der polyklonale Primärantikörper Kaninchen Anti-Neuropeptide Y

(Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) hinzugefügt. Die Schnitte wurden für 72 Stunden in dieser Lösung bei 4°C inkubiert. Es folgten sechs Waschgänge mit PBS-TX. Zur Inkubation mit dem Sekundärantikörper Ziege Anti Kaninchen, 1:500 (Vektor Laboratories, Burlingame, USA) wurde dieser in der Blockierungslösung verdünnt und die Schnitte für 90 Minuten hinzugefügt. Es schlossen sich wieder sechs Waschgänge mit PBS-TX an. Danach wirkte für vier Stunden der Avidin-Biotinperoxidase-Komplex (ABC Standardkit, Vektor Laboratories, Burlingame, USA) auf das Gewebe ein. Nach dieser Inkubationszeit wurden drei Pufferbäder mit PBS und drei Pufferbäder mit Tris-Puffer (TBS) durchgeführt. Für die Chromogen-Reaktion wurde eine Lösung aus in Tris-Puffer gelöstem nickelverstärktem 3,3'-Diaminobenzidin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) und Hydrogen-Peroxid (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) hergestellt. Die Schnitte für die NPY-Reaktion verblieben fünf Minuten in dieser Lösung. Es folgten zur Unterbrechung der Chromogen-Reaktion drei Waschgänge in Tris-Puffer. Anschließend wurden drei Waschgänge in PBS vorgenommen. Die Schnitte wurden anschließend in Phosphatpuffer gesammelt und auf mit Chrom-Alaun-Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen und getrocknet. Es folgte die Gegenfärbung für 1 Minute, bestehend aus gleichen Teilen 1% Azur II und 1% Methylenblau gelöst in 1% Boraxlösung in einer Verdünnung 1:250 in destilliertem Wasser. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Isopropanolreihe dehydriert, zweimal für je 5 Minuten in Xylol geklärt und mit dem Einschlussmittel DePeX (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) und Deckgläsern abgedeckt. Es wurden während der Versuche Negativkontrollen durchgeführt, indem die Primärantikörper-Lösung, bestehend aus 1% Rinderserum-Albumin und 5% Normalserum von der Ziege ohne Antikörperzusatz verwendet wurde. Diese Negativ-Kontrollen zeigten durchweg keine Immunfärbung.
3.3 Histologische Analyse

3.3.1 Lichtmikroskopie und Fotografie

Mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Laborlux D, Leitz, Deutschland) wurden geeignete Schnitte für die Analyse ausgewählt. Die Schnitte sollten den ersten Molaren mit vollständigem Pulpalängsschnitt von mesial nach distal aufweisen. Mit der Leica DC200-Kamera (Leica Microsystems, Heerbrugg, Schweiz) wurden dann jeweils die ausgewählten Schnitte digital fotografiert. Es wurde je ein Foto in 100-facher und 250-facher Vergrößerung des distalen Pulpenhorns, des Pulpencavums und der mesialen mittleren Wurzelpulpa angefertigt (Abb 5).

Abbildung 5:

Fotografierte Pulparegionen des ersten Molars a) distales Pulpenhorn b) Pulpencavum

c) mesiale Wurzelpulpa



3.3.2 Scion Image

Die Bildanalyse wurde mit Hilfe des Scion Image-Programms, Version 4.0.3.2 (Scion Corporation, Frederick, MD, USA), durchgeführt. Zuerst wurde für jeden Schnitt ein Grenzbereich der Immuno-Färbung für NPY festgelegt. Die Anzahl der Pixel pro Quadrat-Inch, welche die NPY-Immunfärbung repräsentieren, wurden in jedem Schnitt gemessen. Die Messung erfolgte in jedem Schnitt in einer definierten Pulpa-Region, welche für alle Schnitte identisch war. Dabei stellte eine höhere Anzahl von Pixeln pro Quadrat-Inch einen höheren Gehalt an NPY in den Nervenfasern dar.



3.4 Studiendesign

3.5 Statistische Analyse

3.5.1 SPSS

Statistische Unterschiede in der Anzahl der Pixel pro Quadrat-Inch der NPY-positiven Immunfärbungen wurden mit Hilfe eines SPSS-Programms (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), Version 12.0.1, berechnet. Dazu wurden der Student T-Test und der PostHoc Bonferroni-Test angewendet.

3.5.2 Student T-Test

Mit Hilfe des Student T-Testes wurden jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung für die Anzahl der Pixel pro Quadrat-Inch der Versuchs- und Kontrollgruppen miteinander verglichen. Der Vergleich erfolgte pro Altersgruppe. Es handelt sich dabei um einen Vergleich der Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben bei Normalverteilung. Die Fallzahl muss dabei als bekannt vorausgesetzt werden. Bei einem Signifikanzniveau von p <0,05 spricht man von einem signifikanten Unterschied.

3.5.3 PostHoc Bonferroni-Test

Bei dem PostHoc Bonferroni-Test handelt es sich um einen Mittelwertvergleich mehrerer unabhängiger Stichproben. Es werden paarweise die Gruppenmittelwerte des T-Tests verglichen. Dabei wird auch eine Gesamtfehlerrate ermittelt. Dadurch wird das Signifikanzniveau an den Mehrfachvergleich angepasst. Als signifikant wird ein Signifikanzniveau von p<0,05 angesehen.

Es wurden so die unterschiedlichen Altersklassen der Versuchs- bzw. der Kontrollgruppe miteinander verglichen, um eine Veränderung der Pixelanzahl zwischen den verschiedenen Altersklassen darzustellen.

33

4. Ergebnisse

<u>**Tabelle 2:</u>** Verteilung der Versuchstiere auf die Versuchsgruppen</u>

Altersstufe	Capsaicingruppe	Kontrollgruppe
30 Tage	Nr. 45, Nr. 46, Nr. 47,	Nr. 7, Nr. 8, Nr. 9,
	Nr. 48, Nr. 49, Nr. 50,	Nr. 10, Nr. 11, Nr. 13,
	Nr. 51, Nr. 52, Nr. 53,	Nr. 14, Nr. 15, Nr. 16,
	Nr. 54, Nr. 55, Nr. 56	Nr. 25, Nr. 26, Nr. 27
60 Tage	Nr. 29, Nr. 30, Nr. 31,	Nr. 39, Nr. 41, Nr. 42,
	Nr. 32, Nr. 33, Nr. 34,	Nr. 43, Nr. 44, Nr. 70,
	Nr. 35, Nr. 36, Nr. 37,	Nr. 71, Nr. 72, Nr. 73,
	Nr. 38, Nr. 61, Nr. 62	Nr. 74, Nr. 76, Nr. 77
90 Tage	Nr. 82, Nr. 83, Nr. 84,	Nr. 94, Nr. 95, Nr. 96,
	Nr. 85, Nr. 86, Nr. 87,	Nr. 97, Nr. 98, Nr. 99,
	Nr. 88, Nr. 89, Nr. 90,	Nr. 100, Nr. 101, Nr. 102,
	Nr. 91, Nr. 92, Nr. 93	Nr. 103, Nr. 104, Nr. 105
155 Tage	Nr. 113, Nr. 114, Nr. 115,	Nr. 107, Nr. 108, Nr. 109,
	Nr. 116, Nr. 117, Nr. 118,	Nr. 110, Nr. 111, Nr. 112,
	Nr. 128, Nr. 129, Nr. 130,	Nr. 119, Nr. 120, Nr. 121,
	Nr. 131, Nr. 132, Nr. 133	Nr. 122, Nr. 123, Nr. 124

4.1 Histologische Ergebnisse

4.1.1 Distales Pulpenhorn

Im distalen Pulpenhorn findet man sowohl in den Kontroll- als auch in den Versuchsgruppen sehr wenig NPY-immunreaktive Fasern. Die Reaktionen in den Pulpenhörnern sind generell sehr schwach. In den Versuchsgruppen ist die Anzahl der Immunreaktionen im Vergleich zu den Kontrollgruppen nochmals reduziert. In der 30-Tage Kontrollgruppe finden sich nur wenige feine NPY-immunoreaktive Fasern im distalen Pulpenhorn der Tiere Nr. 11, 13 (Abb.6b), 15, 26 und 27. Diese Immunreaktionen sind sehr zart, zum Teil punktförmig. In der 30-Tage Versuchsgruppe sind nur vereinzelt diskrete Immunreaktionen bei den Tieren Nr. 46, 47 und 51 (Abb.6a) zu erkennen, alle anderen Pulpenhörner zeigen keine sichtbaren NPY-immunreaktiven Fasern.

Man findet nach 60 Tagen in den Pulpenhörnern der Kontrollgruppe schwache Immunreaktionen in Form von strangförmigen Fasern bei den Tieren Nr. 42, 44, 71, 72 und 77. Zum Teil zeigen sich auch punktförmige Immunreaktionen (Tier Nr. 76, Abb.7b). In den restlichen Pulpenhörnern der Kontrolltiere treten nur wenig NPYpositive Fasern auf. In den Schnitten der 60-Tage Versuchsgruppen sieht man einige körnige NPY-positive Fasern bei den Tieren Nr. 29, 33, 35 (Abb.7a), 37 und 38. Die Pulpenhörner der restlichen Versuchstiere zeigen nur vereinzelt sehr zarte Immunreaktionen.

Die Tiere Nr. 95, 97, 98, 100, 102 und 105 (Abb.8b) der 90-Tage Kontrollgruppe zeigen starke perlschnurartige Immunreaktionen im Pulpenhorn. In den anderen Schnitten dieser Gruppe sind die NPY-positiven Fasern nur sehr fein ausgebildet, wohingegen bei der Capsaicin-Gruppe dieser Altersstufe nur vereinzelt punktförmige

35

NPY-positive Fasern auftreten (Tier 83, 84, 86, 87(Abb.8a), 88, 90), welche zum Teil nur schwach angefärbt erscheinen.

Die Pulpenhörner der Kontrollgruppe im Alter von 155 Tagen enthalten wenige punktförmige immunreaktive Fasern (Tier Nr. 107, 109, 111, 112, 120 (Abb.9b)) mit ungleichmäßigem Verteilungsmuster. Die restlichen Pulpenhörner enthalten nur sehr vereinzelte schwach gefärbte NPY-positive Fasern. Die Pulpenhörner der Capsaicin-Tiere im gleichen Alter zeigen nur diskret immun-positive Fasern, welche bei den Tieren 113, 114, 116, 128 (Abb.9a), 130 und 133 punktförmig über das gesamte Pulpenhorn verstreut sind. Die restlichen Schnitte dieser Gruppe zeigen keine Immunreaktion.

<u>Abbildung Nr.6</u>
a) Capsaicin 30 Tage Nr.51, distales Pulpenhorn, 250-fach vergrößert
b) Kontrolle 30 Tage Nr.13, distales Pulpenhorn, 250-fach vergrößert





<u>Abbildung Nr.7</u>
a) Capsaicin 60 Tage Nr.35, distales Pulpenhorn, 250-fach vergrößert
b) Kontrolle 60 Tage Nr.76, distales Pulpenhorn, 250-fach vergrößert



<u>Abbildung Nr.8</u>
a) Capsaicin 90 Tage Nr.87, distales Pulpenhorn, 250-fach vergrößert
b) Kontrolle 90 Tage Nr.105, distales Pulpenhorn, 250-fach vergrößert





<u>Abbildung Nr.9</u>
a) Capsaicin 155 Tage Nr.128, distales Pulpenhorn, 250-fach vergrößert
b) Kontrolle 155 Tage Nr.120, distales Pulpenhorn, 250-fach vergrößert





4.1.2 Pulpencavum

Die Tiere der 30-Tagegruppen zeigen insgesamt eine schwache Immunreaktion im Gewebe des Pulpencavums. Die Schnitte der Kontrollgruppe zeigen leichte Stränge immunreaktiver Fasern im Zentrum des Pulpencavums bei den Tieren Nr. 9, 10, 14, 15, 16, 25, 26 und 27. Bei den Tieren Nr. 11 und 13 (Abb.10b) finden sich starke netzartige NPY-positive Fasern im Pulpencavum. In den Schnitten der Tiere Nr. 7 und 8 sind keine Immunreaktionen sichtbar. In den Pulpen der Versuchsgruppe befinden sich nur einzelne Reaktionsbündel (Tier Nr. 45, 48, 51 (Abb.10a), 53, 54, 55, 56) welche im Vergleich zur Kontrollgruppe dünn erscheinen. Bei dem Tier Nr. 47 sind netzförmige Fasern zu erkennen. Die übrigen Schnitte enthalten keine Immunreaktionen.

In der 60-Tage Kontrollgruppe zeigt sich die stärkste Immunreaktion in diesem Pulpagebiet. Man findet bei den Tieren Nr. 39, 41, 42, 73, 76 und 77 (Abb.11b) perlschnurartige Reaktionen, welche zum Teil netzförmig angeordnet erscheinen. Auch hier ist der Ort der Immunreaktion das Zentrum des Pulpencavums. Die restlichen Schnitte dieser Gruppe enthalten nur vereinzelt feine immunreaktive Fasern. Die korrespondierende Versuchsgruppe zeigt ein komplett anderes Bild. Hier stellen sich die Immunreaktionen körnig und auch punktförmig dar (Abb.11a). Die NPY-positiven Fasern liegen sowohl im Zentrum der Pulpakammer (Tier Nr. 33, 36, innerhalb Odontoblastenschicht des 38. 61, 62) als auch direkt der Pulpenkammerbodens und -daches (Tier Nr. 30, 31, 32 (Abb.11a), 34). Im Pulpencavum des Tieres Nr. 37 sind die Immunreaktionen netzförmig ausgebildet. Bei den Tieren Nr. 29, 32 und 35 sind keine NPY-immunreaktiven Fasern nachweisbar.

41

Man findet nach 90 Tagen in der Kontrollgruppe weniger immunreaktive Fasern. Diese sind wie auch nach 60 Tagen zentral lokalisiert. Es handelt sich um perlschnurartige Fasern (Tier Nr. 94, 95 (Abb.12b), 96, 97, 105), welche zum Teil netzförmig angeordnet sind (Tier Nr. 98, 100, 104). In den übrigen Schnitten der Kontrollgruppe sind die Immunreaktionen nur schwach ausgeprägt. In der entsprechenden Capsaicingruppe finden sich nur wenige Immunreaktionen (Tier Nr. 82, 83, 84, 85, 86, 89, 91), welche auch hier perlschnurartig geformt sind. Bei den Tieren Nr. 84 und 85 (Abb.12a) reichen diese Fasern bis an die Odontoblastenschicht des Pulpenkammerbodens heran. Im Pulpencavum der Tiere 87, 88 und 90 sind die NPY-immunreaktiven Fasern am stärksten ausgeprägt. Bei den Tieren 92 und 93 ist keine Immunreaktion zu erkennen.

Nach 155 Tagen sieht man im Zentrum des Pulpencavums der Tiere Nr. 109, 119 und 121 (Abb.13b) netzförmige NPY-immunreaktive Fasern im Pulpagewebe der Kontrollgruppe. Beim Tier Nr. 111 sind die Immunreaktionen bündelförmig und beim Tier Nr. 120 punktförmig angeordnet. Die anderen Schnitte der Kontrolltiere weisen nur vereinzelt NPY-positive Fasern auf, bei Tier Nr. 110 sind keine Reaktionen nachweisbar. In der Versuchsgruppe gibt es wenig immun-positive Fasern. Sie befinden sich in erster Linie am Boden der Pulpenkammer und ziehen perlschnurartig innerhalb und oberhalb der Odontoblastenschicht entlang (Tier Nr. 114 (Abb.13a), 115, 128, 129, 130, 131, 132). Bei den Tieren Nr. 113, 116, 128 und 131 kommen auch netzförmige Immunreaktionen vor. Die restlichen Tiere zeigen im Pulpencavum schwache Immunreaktionen.

42

<u>Abbildung Nr.10</u>
a) Capsaicin 30 Tage Nr.51, Pulpencavum, 250-fach vergrößert
b) Kontrolle 30 Tage Nr.13, Pulpencavum, 250-fach vergrößert



<u>Abbildung Nr.11</u>
a) Capsaicin 60 Tage Nr.32, Pulpencavum, 250-fach vergrößert
b) Kontrolle 60 Tage Nr.77, Pulpencavum, 250-fach vergrößert



<u>Abbildung Nr.12</u>
a) Capsaicin 90 Tage Nr.85, Pulpencavum, 250-fach vergrößert
b) Kontrolle 90 Tage Nr.95, Pulpencavum, 250-fach vergrößert





<u>Abbildung Nr.13</u>
a) Capsaicin 155 Tage Nr.114, Pulpencavum, 250-fach vergrößert
b) Kontrolle 155 Tage Nr.121, Pulpencavum, 250-fach vergrößert





4.1.3 Mesiale Wurzel

In der Wurzelregion sind die Immunreaktionen für NPY am stärksten. Sowohl die Versuchs-, als auch die Kontrollgruppen zeigen eine hohe Konzentration an NPYpositiven Fasern, wobei die Kontrollgruppe die stärkere Färbung aufweist. Die immunreaktiven Fasern verlaufen von apikal nach koronal im inneren Drittel der Wurzelpulpa.

Die Tiere Nr. 7 (Abb.14b), 11, 14, 15 und 27 der 30-Tage Kontrollgruppe zeigt feine strangförmige Reaktionsbündel, welche fast mittig in der Wurzel verlaufen. In der Wurzel des Tieres Nr. 26 sind die Immunreaktionen netzförmig angeordnet. Bei den übrigen Tieren der Kontrollgruppe können nur vereinzelt NPY-immunreaktive Fasern nachgewiesen werden. In den Schnitten der entsprechenden Capsaicingruppe verlaufen an derselben Stelle wie in der Kontrollgruppe dezente immunreaktive Fasern, welche bei den Tieren Nr. 48, 49, 53 und 55 (Abb.14a) ein netzförmiges Aussehen besitzen. Die Wurzelpulpa der Tier Nr. 47 und 50 enthält strangförmige NPY-positive Fasern. Alle restlichen Wurzeln zeigen schwache Reaktionen, nur bei Tier Nr. 51 zeigt sich keine Immunreaktion.

Nach 60 Tagen findet man in der Kontrollgruppe bei den Tieren Nr. 39, 41, 42, 44, 70, 71 (Abb.15b) und 77 Reaktionen mit perlschnurartigen Fasern, welche sich zum Teil netzförmig aneinander lagern. Es kommen auch bündelförmige Reaktionen vor (Tier Nr. 42, 73, 76). Die Wurzelpulpa der Tiere 43, 72 und 74 beinhaltet nur schwache Immunreaktionen. Die Tiere Nr. 29, 30, 32, 36, 37, 38, 61 und 62 der entsprechenden Versuchsgruppe zeigen ebenfalls zum Teil perlschnurartige, netzförmige Reaktionen. Beim Tier Nr. 35 gibt es bündelartige Faserstränge. Die NPY-positiven Fasern verlaufen in der Wurzelpulpa von Tier 36 hauptsächlich

47

entlang der inneren Odontoblastenschicht (Abb.15a). Die Schnitte der Tiere 31, 33 und 34 weisen wenig immunreaktive Fasern auf.

Die 90-Tage Gruppen zeigen die größte Immunaktivität. In der Kontrollgruppe sind die NPY-positiven Fasern zum Teil perlschnurartig ausgebildet (Tier Nr. 97, 100). Überwiegend bilden sie jedoch untereinander netzförmige Verbindungen aus (Tier Nr. 94, 95, 96, 98 (Abb.16b), 99, 102, 103, 104 und 105). In der Versuchsgruppe findet man ebenfalls überwiegend netzförmige Fasern (Tier Nr. 82, 83, 84, 86, 87, 89), welche jedoch zarter erscheinen. Vereinzelt verlaufen auch Immunreaktionen entlang der inneren Odontoblastenschicht (Tier Nr. 84, 85 (Abb.16a)). Sehr wenig NPY-positive Fasern sind bei den Tieren 88, 91, 92 und 93 zu sehen.

In der Kontrollgruppe der 155-Tage Tiere sieht man viele netzförmige Immunreaktionen (Tier Nr. 107, 109, 110, 111, 119, 120, 121 (Abb.17b), 124). Es sind auch punktförmige Fasern zu finden (Tier Nr. 108, 112, 122, 123), welche zum Teil mehr im Zentrum der Wurzelpulpa liegen, als in den anderen Gruppen. Die Capsaicingruppe zeigt feine NPY-positive Fasern. Es handelt sich meistens um netzförmige Fasern (Tier Nr. 113, 114, 115, 116, 117, 128, 129, 130, 131, 133), welche direkt unterhalb und bei den Tieren Nr. 115, 129, 130 (Abb.17a), 131 und 132 auch innerhalb der Odontoblastenschicht verlaufen. Hier ist sowohl die innere als auch die äußere Odontoblastenschicht betroffen (Abb.17a).

<u>Abbildung Nr.14</u>
a) Capsaicin 30 Tage Nr.55, mesiale Wurzelpulpa, 250-fach vergrößert
b) Kontrolle 30 Tage Nr.7, mesiale Wurzelpulpa, 250-fach vergrößert



<u>Abbildung Nr.15</u>
a) Capsaicin 60 Tage Nr.36, mesiale Wurzelpulpa, 250-fach vergrößert
b) Kontrolle 60 Tage Nr.71, mesiale Wurzelpulpa, 250-fach vergrößert



<u>Abbildung Nr.16</u>
a) Capsaicin 90 Tage Nr.93, mesiale Wurzelpulpa, 250-fach vergrößert
b) Kontrolle 90 Tage Nr.98, mesiale Wurzelpulpa, 250-fach vergrößert



<u>Abbildung Nr.17</u>
a) Capsaicin 155 Tage Nr.130, mesiale Wurzelpulpa, 250-fach vergrößert
b) Kontrolle 155 Tage Nr.121, mesiale Wurzelpulpa, 250-fach vergrößert





4.2 Statistische Datenanalyse

4.2.1 Distales Pulpenhorn

Die statistische Auswertung mit Hilfe von Scion Image zeigt, dass es deutliche Unterschiede in der Immunreaktion für NPY zwischen einigen Kontroll- und Versuchsgruppen gibt. Ein *p-Wert* von unter 0,05 wurde dabei als signifikant betrachtet (*). Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Pixel pro Quadrat-Inch zwischen der Kontroll- und Versuchsgruppe bei 60 (p = 0,000) und 90 (p = 0,002) Tagen an Hand der Durchführung des Student T-Tests (Abb.18). Dabei wurden die Mittelwerte der Kontroll- und Versuchsgruppe der jeweiligen Altersstufe miteinander verglichen.

Abbildung Nr.18

Student-T	Test für das distale Pulpenhorn
Pixel/inch,	unabhängige Stichproben

Capsaicin			Kontrolle			p
	Mittel-	Standard-		Mittel-	Standard-	
	wert	abweichung		wert	abweichung	
30 Tage	0,001	0,001	30 Tage	0,001	0,001	0,681
60 Tage	0,000	0,000	60 Tage	0,020	0,015	0,000*
90 Tage	0,000	0,000	90 Tage	0,011	0,011	0,002*
155 Tage	0,001	0,002	155 Tage	0,003	0,002	0,090

In der Abbildung Nr. 19 wird die Freisetzung von NPY im distalen Pulpenhorn grafisch dargestellt. Die Kurve der Kontrollgruppe besitzt eine starke Steigung. Sie weist die stärkste Immunreaktion für NPY nach 60 Tagen mit 0,02 Pixeln pro Quadrat-Inch auf. Die Werte der 30 und 155 Tage nähern sich einander an. Bei den Versuchsgruppen ist die NPY-Ausschüttung nahezu konstant, die Konzentration fällt nach 30 Tagen leicht ab und steigt erst nach 155 Tagen wieder zum anfänglichen Wert an (Abb.19).

Abbildung Nr.19

Verteilung von NPY im distalen Pulpenhorn



Der Vergleich der einzelnen Altersstufen innerhalb der Versuchs- bzw. der Kontrollgruppen untereinander zeigt signifikante Unterschiede in der Konzentration immunreaktiver Fasern lediglich zwischen den Kontrollgruppen. Dies betrifft den Vergleich der 30 und 60 Tage (p = 0,000) und der 60 und 155 Tage (p = 0,000) mit Hilfe des Post Hoc/Bonferroni-Tests (Abb.20). In der Versuchsgruppe gibt es keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Pixel zwischen den verschiedenen Altersklassen (Abb.21).

Abbildung Nr.20

Post Hoc / Bonferroni für das distale Pulpenhorn der Kontrollgruppe

Abhängige Variable: NPYDH Kontrollgruppe

(I) Alter	(J) Alter	Mittlere Differenz	Standardfehler	Signifikanz	95% Konfidenzintervall	
		(I-J)			Untergrenze	Obergrenze
30,00	60,00	-,019040*	,0038914	,000*	-,029803	-,008277
	90,00	-,010061	,0037103	,058	-,020323	,000201
	155,00	-,002118	,0036382	1,000	-,012180	,007945
60,00	30,00	,019040*	,0038914	,000*	,008277	,029803
	90,00	,008979	,0038914	,155	-,001784	,019742
	155,00	,016922*	,0038227	,000*	,006349	,027495
90,00	30,00	,010061	,0037103	,058	-,000201	,020323
	60,00	-,008979	,0038914	,155	-,019742	,001784
	155,00	,007943	,0036382	,207	-,002119	,018006
155,00	30,00	,002118	,0036382	1,000	-,007945	,012180
	60,00	-,016922*	,0038227	,000*	-,027495	-,006349
	90,00	-,007943	,0036382	,207	-,018006	,002119

* Die mittlere Differenz ist auf der Stufe ,05 signifikant.

Post Hoc / Bonferroni für das distale Pulpenhorn der Capsaicingruppe

(I) Alter	(J) Alter	Mittlere Differenz	Standardfehler	Signifikanz	95% Konfidenzintervall	
		(I-J)			Untergrenze	Obergrenze
30,00	60,00	,006891	,0043863	,743	-,005270	,019051
	90,00	,006696	,0043863	,807	-,005464	,018857
	155,00	,005452	,0047377	1,000	-,007683	,018586
60,00	30,00	-,006891	,0043863	,743	-,019051	,005270
	90,00	-,000194	,0043863	1,000	-,012355	,011966
	155,00	-,001439	,0047377	1,000	-,014574	,011696
90,00	30,00	-,006696	,0043863	,807	-,018857	,005464
	60,00	,000194	,0043863	1,000	-,011966	,012355
	155,00	-,001245	,0047377	1,000	-,014379	,011890
155,00	30,00	-,005452	,0047377	1,000	-,018586	,007683
	60,00	,001439	,0047377	1,000	-,011696	,014574
	90,00	,001245	,0047377	1,000	-,011890	,014379

Abhängige Variable: NPYDH Capsaicingruppe

Basiert auf beobachteten Mittelwerten.

4.2.2 Pulpencavum

Im Vergleich zwischen den Versuchs- und Kontrollgruppen zeigt sich auch im Pulpencavum ein signifikanter Unterschied in der Anzahl NPY-immunpositiver Fasern zwischen den 60 Tagen Versuchs- und Kontrollgruppen (p = 0,001) und zwischen den 90 Tagen Versuchs- und Kontrollgruppengruppen (p = 0,003) bei der Durchführung des Student-T Tests (Abb.22).

Student-T Test für das Pulpencavum Pixel/inch, unabhängige Stichproben

Capsaicin			Kontrolle			p
	Mittel-	Standard-		Mittel-	Standard-	
	wert	abweichung		wert	abweichung	
30 Tage	35,24	46,83	30 Tage	27,80	35,17	0,670
60 Tage	48,03	143,31	60 Tage	452,15	352,91	0,001*
90 Tage	13,05	13,26	90 Tage	243,46	242,60	0,003*
155 Tage	42,39	37,58	155 Tage	66,74	54,67	0,261

Im Pulpencavum ist die Anzahl der Pixel pro Quadrat-Inch im Vergleich zum Pulpenhorn deutlich erhöht. Die höchste Anzahl immunreaktiver Fasern findet man auch hier in der 60 Tage Kontroll-Gruppe mit 453,46 Pixel/Inch². Der Verlauf der Kurve ist mit dem im Horn (Abb.23) nahezu identisch, abgesehen von der Pixelanzahl. Von den Versuchsgruppen zeigt ebenfalls die 60 Tage-Gruppe die höchste Konzentration NPY-positiver Fasern (Abb.23), nach 90 Tagen sinkt die Anzahl, um nach 155 Tagen wieder leicht anzusteigen. Der Verlauf dieser Kurve ist allerdings sehr flach im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Verteilung von NPY im Pulpencavum





Ein Vergleich innerhalb der Altersklassen der Kontrollgruppe zeigt einen signifikanten Unterschied in der Reaktionsdichte zwischen den 30 und 60 Tagen (p = 0,000) und zwischen den 60 und 155 Tagen (p = 0,000) (Abb.24). Innerhalb der Altersstufen der Versuchsgruppe gibt es auch hier keinen signifikanten Unterschied in der Konzentration NPY-immunreaktiver Fasern nach der Überprüfung mit dem Post Hoc/Bonferroni Test (Abb.25).

Post Hoc / Bonferroni für das Pulpencavum der Kontrollgruppe

(I) Alter	(J) Alter	Mittlere Differenz	Standardfehler	Signifikanz	95% Konfidenzintervall	
		(I-J)			Untergrenze	Obergrenze
30,00	60,00	-424,3400*	88,03653	,000*	-667,8349	-180,8451
	90,00	-215,6542	83,93954	,082	-447,8175	16,5092
	155,00	-38,9388	82,30949	1,000	-266,5937	188,7160
60,00	30,00	424,3400*	88,03653	,000*	180,8451	667,8349
	90,00	208,6858	88,03653	,134	-34,8091	452,1808
	155,00	385,4012*	86,48373	,000*	146,2010	624,6013
90,00	30,00	215,6542	83,93954	,082	-16,5092	447,8175
	60,00	-208,6858	88,03653	,134	-452,1808	34,8091
	155,00	176,7153	82,30949	,225	-50,9395	404,3702
155,00	30,00	38,9388	82,30949	1,000	-188,7160	266,5937
	60,00	-385,4012*	86,48373	,000*	-624,6013	-146,2010
	90,00	-176,7153	82,30949	,225	-404,3702	50,9395

Abhängige Variable: NPYC Kontrollgruppe

* Die mittlere Differenz ist auf der Stufe ,05 signifikant.

Post Hoc / Bonferroni für das Pulpencavum der Capsaicingruppe

(I) Alter	(J) Alter	Mittlere Differenz	Standardfehler	Signifikanz	95% Konfidenzintervall	
		(I-J)			Untergrenze	Obergrenze
30,00	60,00	1856,4242	1371,848	1,000	-1946,8248	5659,6732
	90,00	1894,4000	1371,848	1,000	-1908,8490	5697,6490
	155,00	1865,0594	1481,766	1,000	-2242,9190	5973,0379
60,00	30,00	-1856,4242	1371,848	1,000	-5659,6732	1946,8248
	90,00	37,9758	1371,848	1,000	-3765,2732	3841,2248
	155,00	8,6353	1481,766	1,000	-4099,3432	4116,6137
90,00	30,00	-1894,4000	1371,848	1,000	-5697,6490	1908,8490
	60,00	-37,9758	1371,848	1,000	-3841,2248	3765,2732
	155,00	-29,3406	1481,766	1,000	-4137,3190	4078,6379
155,00	30,00	-1865,0594	1481,766	1,000	-5973,0379	2242,9190
	60,00	-8,6353	1481,766	1,000	-4116,6137	4099,3432
	90,00	29,3406	1481,766	1,000	-4078,6379	4137,3190

Abhängige Variable: NPYC Capsaicingruppe

Basiert auf beobachteten Mittelwerten.

4.2.3 Mesiale Wurzel

Der Vergleich der Versuchs- und Kontrollgruppen zeigt in der Wurzelpulpa ein anderes Ergebnis als in den vorher untersuchten Gebieten. Hier stellt sich ein signifikanter Unterschied in der Anzahl NPY-positiver Fasern zwischen der Kontrollund Versuchsgruppe bei 30 Tagen ein (p = 0,01) (Student-T Test, Abb.26).

Capsaicin			Kontrolle			p
	Mittel-	Standard-		Mittel-	Standard-	
	wert	abweichung		wert	abweichung	
30 Tage	32,85	63,49	30 Tage	140,40	115,17	0,010*
60 Tage	275,54	242,60	60 Tage	267,55	170,66	0,931
90 Tage	333,27	262,23	90 Tage	558,92	418,52	0,128
155 Tage	166,16	154,94	155 Tage	231,09	232,66	0,470

Student-T Test für die mesiale Wurzelpulp Pixel/inch, unabhängige Stichproben

Die Anzahl der Pixel pro Quadrat-Inch ist im Vergleich zum Pulpencavum nochmals erhöht (Abb.27). Die höchste Anzahl der Pixel findet man hier in der 90 Tage Kontrollgruppe mit 558,92 Pixel/Inch². Die Kurve steigt sehr steil an und fällt nach 90 Tagen wieder etwas unterhalb des Wertes für 60 Tage ab. Es zeigt sich eine geringere Differenz zwischen den Versuchs- und Kontrollgruppen als in den anderen Gebieten. In den Versuchsgruppen ist die höchste Konzentration der immunreaktiven Fasern ebenfalls bei 90 Tagen zu finden. Der Verlauf der Kurve ähnelt der der Kontrollgruppe. Interessanterweise ist die Anzahl der Pixel pro Quadrat-Inch nach 60 Tagen in beiden Gruppen ungefähr gleich hoch.



Verteilung von NPY in der mesialen Wurzel

Beim Vergleich der verschiedenen Altersstufen in der Kontrollgruppe untereinander findet sich in diesem Gebiet ein signifikanter Unterschied zwischen 30 und 90 Tagen (p = 0,02) und zwischen 90 und 155 Tagen (p = 0,02) (Abb.28). Weiterhin zeigen sich auch signifikante Unterschiede in der Konzentration NPY-positiver Fasern bei der Versuchsgruppe. Diese Signifikanzen findet man zwischen der 30 und 60 Tage-Gruppe (p = 0,03) und auch zwischen der 30 und 90 Tage-Gruppe (p = 0,04) bei der Anwendung des Post Hoc/Bonferroni Tests (Abb.29).

<u>Abbildung 28</u>

Post Hoc / Bonferroni für die mesiale Wurzel der Kontrollgruppe

(I) Alter	(J) Alter	Mittlere Differenz	Standardfehler	Signifikanz	95% Konfidenzintervall	
		(I-J)			Untergrenze	Obergrenze
30,00	60,00	-242,6869*	81,65565	,030*	-469,0652	-16,3085
	90,00	-300,4198*	81,65565	,004*	-526,7982	-74,0415
	155,00	-133,3049	88,19819	,830	-377,8215	111,2117
60,00	30,00	242,6869*	81,65565	,030*	16,3085	469,0652
	90,00	-57,7330	81,65565	1,000	-284,1113	168,6454
	155,00	109,3820	88,19819	1,000	-135,1346	353,8985
90,00	30,00	300,4198*	81,65565	,004*	.74,0415	526,7982
	60,00	57,7330	81,65565	1,000	-168,6454	284,1113
	155,00	167,1149	88,19819	,391	-77,4016	411,6315
155,00	30,00	133,3049	88,19819	,830	-111,2117	377,8215
	60,00	-109,3820	88,19819	1,000	-353,8985	135,1346
	90,00	-167,1149	88,19819	,391	-411,6315	77,4016

Abhängige Variable: NPYROOT Kontrollgruppe

* Die mittlere Differenz ist auf der Stufe ,05 signifikant.

Post Hoc / Bonferroni für das Pulpencavum der Capsaicingruppe

(I) Alter	(J) Alter	Mittlere Differenz	Standardfehler	Signifikanz	95% Konfidenzintervall	
		(I-J)			Untergrenze	Obergrenze
30,00	60,00	-127,1496	112,80255	1,000	-439,1434	184,8442
	90,00	-418,5198*	107,55301	,002*	-715,9942	-121,0454
	155,00	-90,6976	105,46440	1,000	-382,3953	201,0000
60,00	30,00	127,1496	112,80255	1,000	-184,8442	439,1434
	90,00	-291,3702	112,80255	,080	-603,3640	20,6236
	155,00	36,4520	110,81293	1,000	-270,0389	342,9428
90,00	30,00	418,5198*	107,55301	,002*	121,0454	715,9942
	60,00	291,3702	112,80255	,080	-20,6236	603,3640
	155,00	327,8222*	105,46440	,020*	36,1245	619,5198
155,00	30,00	90,6976	105,46440	1,000	-201,0000	382,3953
	60,00	-36,4520	110,81293	1,000	-342,9428	270,0389
	90,00	-327,8222*	105,46440	,020*	-619,5198	-36,1245

Abhängige Variable: NPYC Capsaicingruppe

Basiert auf beobachteten Mittelwerten.

4.2.4 Vergleich der Untersuchungsgebiete

Die Grafik Nr.30 zeigt den direkten Vergleich der Quantität der NPY-immunreaktiven Fasern innerhalb der drei Untersuchungsgebiete in der Kontrollgruppe. Die größte Pixel-Anzahl ist in der Wurzel nach 90 Tagen zu finden. Im Pulpenhorn sind kaum nachweisbare Mengen NPY-positiver Fasern zu finden. In der Wurzelpulpa sind in allen Altersstufen, ausgenommen der 60 Tage, die meisten Pixel pro Quadrat-Inch zu messen. Nach 60 Tagen ist im Pulpencavum die größte Anzahl von Immunreaktionen zu finden.



Vergleich der Ergebnisse für die Kontrollgruppen

Sieht man sich die Grafik für die Versuchsgruppe an (Abb.31), erkennt man, dass nach 30 Tagen die Menge der Pixel pro Quadrat-Inch in der Wurzel und im Cavum nahezu identisch sind. Wie auch in der Kontrollgruppe sind Immunreaktionen im Pulpenhorn kaum nachweisbar.

In der Capsaicingruppe ist auch die größte Anzahl an Pixeln nach 90 Tagen in der Wurzelpulpa zu finden. Die Werte in der Wurzel liegen in den Altersstufen ab 60 Tagen deutlich über denen des Pulpencavums.

Vergleich der Ergebnisse für die Capsaicingruppen


5. Diskussion

5.1 Interpretation der Ergebnisse

Die systemische Desensibilisierung mit Capsaicin dient als Studienmodell für die Untersuchung der Einflüsse nozizeptiver Fasern auf den Dentin-Pulpa-Komplex. Um die Physiologie von Nervenfasern zu untersuchen, gibt es zwei mögliche Forschungsansätze. Man kann einerseits einzelne Nerven blockieren, indem man eine Axotomie durchführt (Jacobsen & Heyeraas, 1996). Die andere Möglichkeit ist die chemische Desensibilisierung (Krage et al., 2002a und b; Krage et al., 2005; Raab et al., 1996). Dabei wird eine Substanz verabreicht, die die sensorischen Fasern blockiert. In der vorliegenden Studie wurde die neonatale Desensibilisierung mit Capsaicin als Versuchsmodell ausgewählt. Es gibt zahlreiche Studien, die belegen, dass es nach neonataler Capsaicingabe zu einer irreversiblen Blockierung der Aδ- und der C-Fasern kommt (Buck & Burks, 1986; Lawson 1987; Krage et al., 2002a).

Daraus resultieren im Dentin-Pulpa-Komplex viele Veränderungen. Die sensorischen Nervenfasern werden irreversibel blockiert (Krage et al., 2002a). Dadurch kommt es zu einer starken Reduktion der Ausschüttung der nozizeptiven Neuropeptide, wie CGRP und SP (Caviedes-Bucheli et al., 2005; Jacobsen & Heyeraas, 1996; Heyeraas et al., 1996). Nach Capsaicingabe resultiert eine Herabsetzung der Mikrozirkulation (Raab et al., 1988). Die Physiologie des Dentin-Pulpa-Komplexes nach neonataler Capsaicin-Applikation wird so komplett verändert. Es gehen ganze Odontoblastengruppen zugrunde (Raab et al., 1996), wodurch sich die Struktur des Dentins verändert (Krage et al., 2005; Krage et al., 2002a; Raab et al., 1996). Es zeigen sich kraterähnliche Defekte im Dentin. Sowohl in der Bifurkation als auch am Pulpenhorn ist die Dentinbildung reduziert und das Dentin weist eine reduzierte Härte auf (Krage et al., 2005; Krage et al., 2002b, Jacobsen & Heyeraas, 1996; Heyeraas

et al., 1996). Diese ganzen Prozesse werden aber auch vom physiologischen Alterungsprozess des Zahnes beeinflusst.

sensorischen Nervenfasern der Pulpa sind für die Entstehung von Die Schmerzsensationen verantwortlich (Pashley & Liewehr, 2006). Nach einer neonatalen Capsaicin-Applikation kommt es nun zu einer irreversiblen Blockade der nozizeptiven Fasern (Buck & Burks, 1986), wodurch keine Schmerzempfindung mehr ausgelöst werden kann. Dadurch ist die Desensibilisierung mit Capsaicin für den Zahnarzt als Studienmodell interessant. Der Einsatz von Lokalanästhetika bringt denselben Effekt, allerdings ist die Blockade hier reversibel (Pashley & Liewehr, 2006). In dieser Zeit ist auch die Ausschüttung der nozizeptiven Neuropeptide unterbunden (Pashley & Liewehr, 2006). Dieses Fehlen der Neuropeptide beeinflusst die Pulpaphysiologie zwar nur kurzfristig, allerdings ist auch hier eine negative Veränderung in der Pulpaphysiologie nicht ausgeschlossen. Als interessanter Ansatz zur Therapie von Schmerzen ausgehend von der Dentin-Pulpa-Einheit kann die langfristige Capsaicin-Applikation auf das Pulpengewebe angesehen werden. Die vorliegende Studie soll dazu beitragen, uns ein besseres Verständnis über die Wirkung von Capsaicin auf den Dentin-Pulpa-Komplex zu vermitteln. Dadurch soll der Ansatz zur Entwicklung einer neuen Therapieform zur Behandlung von Zahnschmerzen gegeben werden.

Der physiologische Alterungsprozess des Dentin-Pulpa-Komplexes wird bei der Beobachtung der vier Altersstufen der Kontrollgruppe der vorliegenden Studie verdeutlicht. Im Laufe der Alterung von 30 bis zu 155 Tagen verändert sich die Anzahl der NPY-immunreaktiven Fasern (Abb.30). Veerayutthwilai und Kollegen zeigen in einer Studie aus dem Jahr 2006, dass das Wurzelwachstum bei Rattenmolaren und die Apexifikation einen großen Einfluss auf die Pulpa-Dentin-Einheit ausüben. Das Wurzelwachstum beginnt bei Ratten ab der vierten

Lebenswoche. Die Apexifikation beginnt mit der siebten Woche und endet mit dem Schluss des Foramen apicale nach der zwölften Lebenswoche (Abb. 32). Die höchste Innervationsdichte der sensorischen Fasern findet man in den Pulpenhörnern und im Pulpencavum (Mjör et al., 2002). Die höchste Empfindlichkeit zeigen nozizeptiven Fasern bei der Ratte nach 60 Tagen, danach nimmt sie mit dem Alter kontinuierlich ab (Veerayutthwilai et al., 2006).

Abbildung Nr.32



Stadien des Wurzelwachstums von Ratten-Molaren



a) zweiten Lebenswoche



b) dritte Lebenswoche



c) vierte Lebenswoche

d) siebte Lebenswoche



e) zwölfte Lebenswoche

Auch in der menschlichen Pulpa tritt eine Innervation mit nozizeptiven Fasern erst nach dem Zahndurchbruch, aber vor Beendigung der Apexifikation auf (Pashley & Liewehr, 2006). Daher ist eine elektrische Testung der Pulpasensibilität an sehr jungen Zähnen nicht erfolgreich (Pashley & Liewehr, 2006). Allerdings kommt es durch die Bildung von Sekundär- und Tertiärdentin im Laufe der Zeit zu einer Reduktion des Pulpencavums (Morse, 1991). Durch das eingeschränkte Platzangebot nimmt auch die Quantität der nozizeptiven Nervenfasern in der Dentin-Pulpa-Einheit ab (Morse, 1991). Auch mit dem Fortschreiten der Apexifikation ist die Innervationsdichte der nozizeptiven Fasern rückläufig (Veerayutthwilai et al., 2006). Die Odontoblasten werden ebenfalls vom Alterungsprozess des Zahnes beeinflusst. Mit zunehmendem Alter der Dentin-Pulpa-Einheit ist die Anzahl der Pulpa-Zellen, besonders der Odontoblasten, rückläufig (Murray et al., 2002). Dadurch ist die Möglichkeit der Heilung nach einer Verletzung oder einer Entzündung stark eingeschränkt (Murray et al., 2002).

In einer noch unveröffentlichten, parallel verlaufenden Studie (Studiengruppe Raab et al.) ist der Einfluss des Alterungsprozesses auf den Dentin-Pulpa-Komplex zu erkennen. Es wurde die Ausschüttung von CGRP im distalen Pulpenhorn über einem Zeitraum von bis zu 155 Tagen in mit Capsaicin desensibilisierten Ratten und Kontrolltieren untersucht. In der Abbildung 33 sind diese Ergebnisse grafisch dargestellt.

Abbildung Nr.33



Verteilung von CGRP im distalen Pulpenhorn (unveröffentlichte Daten Studiengruppe Raab et al.)

Man kann erkennen, dass im distalen Pulpenhorn sowohl der Kontroll-, als auch der Versuchstiere ein Anstieg in der CGRP-Freisetzung bis zum 60. Tag erfolgt (unveröffentlichte Daten der Studiengruppe Raab et al.). Die Konzentration fällt in der Kontrollgruppe nach dieser Zeit ab, bleibt aber bis zum 155. Tag stabil. Dieser Effekt kann sowohl durch die Reduktion der nozizeptiven Fasern durch die zunehmende Sekundärdentinbildung, als auch durch die Einschnürung am Apex durch den Abschluss der Apexifikation beeinflusst werden. In der Versuchsgruppe zeigt sich ebenfalls ein Abfall der Konzentration nach 60 Tagen, nach 90 Tagen kommt es zu einem Tiefpunkt bevor die Konzentration wieder leicht ansteigt. Dass die Anzahl der Immunreaktionen für CGRP in der Versuchsgruppe reduziert ist, erklärt sich durch

die irreversible Blockierung der sensorischen Fasern im Dentin-Pulpa-Komplex (Jacobsen & Heyeraas, 1996; Heyeraas et al., 1996).

Es ist zu erkennen, dass der physiologische Alterungsprozess einen Einfluss auf die sensorische Innervation der Pulpa sowohl bei den Kontroll- als auch bei den desensibilisierten Tieren hat. Allerdings ist die Ausschüttung der Neurotransmitter CGRP und SP in den neonatal desensibilisierten Ratten insgesamt vermindert (Jacobsen & Heyeraas, 1996; Heyeraas et al., 1996). Die Apexifikation und Sekundärdentinbildung übt indirekt auch einen Einfluss auf die Odontoblasten aus. Dadurch, dass es nach 60 Tagen zu einer Reduktion der sensorischen Innervation in der Ratten-Pulpa kommt, erhalten die Odontoblasten weniger Signale der sensorischen Fasern. Hier gibt es scheinbar einen Zusammenhang zwischen der Ausschüttung der nozizeptiven Neuropeptide und der Dentinbildung.

In einer weiteren parallel verlaufenden Studie konnte gezeigt werden, dass das Dentin der Versuchsgruppen Defekte aufweist (Seltmann et al., 2007). Diese Defekte treten nach 60 Tagen zum ersten Mal auf, werden nach 90 Tagen stärker und bilden sich nach 155 Tagen mengenmäßig langsam zurück (Abb.34). Interessanterweise unterscheidet sich das Dentin der Versuchs- und Kontrollgruppe nach 30 Tagen nicht. Innerhalb der ersten 30 Tage gibt es scheinbar keinen Einfluss der neonatalen Desensibilisierung auf die Odontoblastenfunktion. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die höchste Innervationsdichte der nozizeptiven Fasern im Pulpenhorn erst nach 60 Tagen erreicht wird (Veerayutthwilai et al., 2006). Nun tritt jedoch die Frage auf, welchen Effekt das Capsaicin auf die Odontoblasten ausübt.

Es kommt nach neonataler Capsaicin-Applikation zu einer Destruktion einzelner Odontoblastengruppen (Raab et al., 1996). Allerdings scheint dieser Defekt nicht in einem direkten Zusammenhang mit dem Zeitpunkt der Desensibilisierung zu stehen.

Ansonsten müssten nach 30 Tagen bereits Dentindefekte auftreten. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass nicht das Capsaicin selbst die Odontoblasten schädigt, sondern dass der Verlust der sensorischen Fasern (Krage et al., 2002a) und somit das Fehlen der nozizeptiven Neuropeptide Substanz P und CGRP (Heyeraas et al., 1996) einen destruktiven Einfluss auf die Odontoblasten ausübt. Denn zu dem Zeitpunkt der höchsten Innervationsdichte, nämlich nach 60 Tagen, treten die ersten Defekte im Dentin auf. Sie bleiben auch für den restlichen Untersuchungszeitraum bestehen. Eine leichte Rückbildung nach 155 Tagen lässt die Bildung von Reparaturdentin vermuten.

Abbildung Nr.34

Elektronenmikroskopische Untersuchung des Dentins im Pulpenhorn (Seltmann et al., 2007)



Dies spricht dafür, dass die Odontoblasten auf die sensorischen Neuropeptide angewiesen sind, um reguläres Dentin bilden zu können.

In der vorliegenden Studie sollte nun einerseits der Einfluss des Alterungsprozesses von 30 bis zu 155 Tagen auf die sympathischen Fasern der dentalen Pulpa untersucht werden. Andererseits sollte analysiert werden, welche Rolle die systemische sensorische Desensibilisierung bei der Entwicklung der sympathischen Nervenfasern in der dentalen Pulpa spielt. Um die Entwicklung der sympathischen Fasern zu analysieren, wurde der Antikörper Anti-NPY ausgewählt. Bei NPY handelt es sich um ein Neuropeptid, welches durch sympathische Nervenendigungen ausgeschüttet wird (Uddmann et al., 1998). Es wirkt als Inhibitor der durch Substanz P hervorgerufenen Vasodilatation (Fallgren et al., 1989). NPY ist einerseits für die Vasokonstriktion der pulpalen Blutgefäße verantwortlich (Kim et al., 1996a). Andererseits kommt es bei einem Entzündungsprozess in der Pulpa zu einer erhöhten Freisetzung von NPY (Haug & Heyeraas, 2003). Daher gibt es vermutlich auch einen positiven Einfluss von NPY auf die Regenerationsprozesse der Dentin-Pulpa-Einheit.

Für die Studie erhielten 48 Wistar-Ratten am ersten bis dritten postnatalen Tag eine subkutane Injektion von 50 mg Capsaicin je Kilogramm Körpergewicht. Zum Zeitpunkt von 30, 60, 90 und 155 Tagen wurden je 12 Kontroll- und 12 Versuchstiere einer Intravitalperfusion und Fixation unterzogen. Nach der Entkalkung wurden Sagittalschnitte der linken Unterkiefer angefertigt und die Immunhistochemie mit Anti-NPY durchgeführt. Zur Analyse wurden drei Gebiete des ersten Molars fotografiert. Dabei handelte es sich um das distale Pulpenhorn, das Pulpencavum und die mesiale Wurzelpulpa. Statistisch wurde die Anzahl der Pixel pro Quadrat-Inch der NPY-immunreaktiven Fasern für jeden Schnitt gemessen und ausgewertet.

Zur Klärung des ersten Teils der Fragestellung dienten die Kontrolltiere, die in die vier Altersgruppen 30, 60, 90 und 155 Tage eingeteilt und untersucht wurden. Anhand der NPY-Ausschüttung in den verschiedenen Altersklassen konnte nun der Einfluss des physiologischen Alterungsprozesses auf die drei verschiedenen Pulpagebiete untersucht werden. Die untersuchten Gebiete waren das distale Pulpenhorn, das Pulpencavum und die mittlere mesiale Wurzelpulpa. Das Pulpenhorn und das Pulpencavum sind als Orte mit der größten Ausschüttung der nozizeptiven Neuropeptide in der Pulpa bekannt (Veerayutthwilai et al., 2006). Daher sind diese Gebiete von großem Interesse.

In der Wurzelregion ist die Ausschüttung von NPY in der Pulpa physiologisch am größten, gefolgt vom Pulpencavum (Haug et al., 2001, Oswald & Byers, 1993). In den Pulpenhörnern sind nur einige Fasern zu finden, die NPY-immunreaktiv sind (Haug et al., 2001). Um den Einfluss des physiologischen Prozesses der Alterung auf die Entwicklung der sympathischen Nervenfasern zu untersuchen, wurden die vier Altersgruppen der Kontrolltiere miteinander verglichen. So kann man für jede einzelne Pulparegion den Prozess der Alterung analysieren.

Die Ergebnisse zeigten einen signifikanten Unterschied im Pulpenhorn und Pulpencavum zwischen der NPY-Ausschüttung der 30 und 60 Tage (jeweils P=0,000) und der 60 und 155 Tage (jeweils P=0,000). Die Wurzelregion zeigt ein anderes Bild: Hier besteht eine Signifikanz zwischen den 30 und 90 Tagen (P=0,02) und zwischen den 90 und 155 Tagen (P=0,02). Einen grafischen Vergleich der NPY-Ausschüttung in den drei Pulpagebieten zeigt die Abbildung 30. Dort sieht man einerseits den Vergleich der NPY-Konzentration der verschiedenen Altersgruppen, andererseits den direkten Vergleich der NPY-Konzentration in den untersuchten Pulpagebieten. Es wird deutlich, dass es im Pulpenhorn nur eine sehr geringe, kaum

messbare NPY-Freisetzung gibt. Dahingegen zeigt sich ein interessanter Verlauf in der NPY-Ausschüttung sowohl im Pulpencavum als auch in der Wurzelpulpa. Nach 30 Tagen ist die NPY-Konzentration in der Wurzel fast vierfach höher als im Pulpencavum. Nach 60 Tagen wechselt das Verhältnis, nun ist die Konzentration im Cavum 1,7-fach im Vergleich zur Wurzelregion erhöht. Im Vergleich dazu zeigen sich nach 90 Tagen ein Rückgang im Pulpencavum und ein Anstieg in der Wurzel um das 2,3-fache im Vergleich zum Cavum. In der Gruppe der 155 Tage zeigt sich in beiden Gebieten eine Reduktion der NPY-Ausschüttung, wobei die Menge in der Wurzel 3,5fach höher ist im Vergleich zum Cavum.

Es lässt sich daraus folgern, dass die sympathischen Nervenfasern im Pulpencavum ebenfalls durch den Alterungsprozess beeinflusst werden, genau wie die sensorischen Fasern. Vor Beendigung der Apexifikation nimmt die Konzentration der Ausschüttung des sympathischen Neuropeptids NPY genauso zu wie die Ausschüttung des sensorischen Neuropeptids CGRP (Veerayutthwilai et al., 2006). Im Pulpenhorn wird NPY fast gar nicht freigesetzt, aber auch dort ist die höchste Konzentration nach 60 Tagen zu finden. Nach dem Schluss des Foramen apikale fällt die Konzentration von NPY stetig ab. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass es einen Zusammenhang zwischen der Ausschüttung der sensorischen und der sympathischen Neuropeptide gibt. Es ist anzunehmen, dass auch die zunehmende Verkleinerung des Pulpencavums durch die Sekundärdentin-Bildung (Morse, 1991) einen negativen Einfluss auf die Quantität der sympathischen Fasern ausübt.

Um die physiologische Bedeutung der sympathischen Nerven in Dentin-Pulpa-Komplex zu analysieren, wurden einige Untersuchen an Tieren nach chirurgischer Sympathektomie durchgeführt (Haug et al., 2001; Jacobsen et al., 1998; Uddmann et al., 1984). Eine chemische oder chirurgische Sympathektomie führt zu einer fast

vollständigen Elimination der sympathischen Fasern in der dentalen Pulpa (Haug et al., 2001; Uddman et al., 1984). Ein wichtiger Aspekt aller Studien, die mit einer sympathischen oder sensorischen Denervation einhergehen ist, dass die Pulpa die Fähigkeit besitzt, eine kollaterale Innervation zur Rekrutierung heranzuziehen (Haug et al., 2001; Holland 1996). Daher eignet sich das Studienmodell mit einer neonatalen Desensibilisierung durch Capsaicin besonders gut zur Beobachtung der Wirkung der sensorischen Nervenfasern auf die gesamte Dentin-Pulpaeinheit. Hierbei kann es nicht zu einer Aussprossung kollateraler Fasern kommen.

Einige Studien an Ratten haben gezeigt, dass es nach Axotomie des Nervus alveolaris inferior nicht nur zu einem Verlust sensorischer Fasern kommt. Einige dieser Fasern zeigten im Ganglion trigeminale gleichzeitig eine Immunreaktion für CGRP und NPY (Fristad et al., 1996a; Wakisaka et al., 1993). Dies lässt den Verdacht aufkommen, dass nicht alle der NPY-immunreaktiven Fasern vom Ganglion cervicale superius abstammen (Fristad et al., 1996a). Jacobsen und Kollegen (1998) haben eine Studie veröffentlicht, die gezeigt hat, dass es nach der Axotomie des Nervus alveolaris inferior zu einer deutlichen Reduktion der sympathischen Fasern kam. Eine weitere Studie konnte diese Beobachtung bestätigen (Haug et al., 2001). Es gibt unterschiedliche Studien, welche alle besagen, dass eine selektive Denervation einer Nervenfasergruppe zu einer Aussprossung der gegensätzlichen Nervenfasergruppen führt (Aberdeen et al., 1990; Terenghi et al., 1986; Schon et al., 1985). Dieses könnte zu der Vermutung verleiten, dass nach einer kompletten nozizeptiven Desensibilisierung, wie in dieser Studie, die Anzahl der sympathischen Fasern drastisch ansteigt. Allerdings haben Oswald und Byers schon im Jahre 1993 zeigen können, dass es in der Pulpa nach sympathischer Denervation nicht zu einem Anstieg der sensorischen Innervation kommt.

In einer gesunden Pulpa führt eine Aktivierung der sympathischen Fasern zu einer Inhibition der Freisetzung sensorischer Neuropeptide (Kerezoudis et al., 1993a). In dieser Studie konnte anhand der NPY-Immunreaktionen gezeigt werden, dass ein Verlust der sensorischen Innervation in der desensibilisierten Rattenpulpa nicht zu einer Vermehrung der NPY-positiven Fasern führt. Es wurde festgestellt, dass die Anzahl dieser Fasern nach der neonatalen Capsaicin-Behandlung in allen Pulparegionen im Vergleich zu den Kontrollgruppen deutlich reduziert wurde. Dabei zeigen sich in der Wurzelpulpa deutlich mehr Immunreaktionen als in den anderen Untersuchungsgebieten. Es lassen sich sowohl im distalen Pulpenhorn als auch im Pulpencavum signifikante Unterschiede in der Anzahl NPY-immunreaktiver Fasern zwischen den Versuchs- und Kontrolltieren nach 60 (P=0,000 und P=0,001) und 90 (P=0,002 und P=0,003) Tagen feststellen. Dabei ist die Quantität der Immunreaktionen bei den Kontrolltieren zu diesen Zeitpunkten deutlich über der der Versuchsgruppe.

Es ist nun anzunehmen, dass eine nozizeptive Desensibilisierung ebenfalls einen Einfluss auf die Anzahl der NPY-immunreaktiven Fasern ausübt. Anhand der vorliegenden Studie lässt sich jedoch nicht eindeutig erklären, wodurch dieser Einfluss entsteht. Einerseits kann es einen Rückkopplungsmechanismus geben, der die dentale Pulpa vor einer zu großen Wirkung des sympathischen Nervensystems schützt. Denn ein Überhandnehmen der sympathischen Neuropeptide würde in der Pulpa bei vermindertem Vorhandensein von SP und CGRP unweigerlich zu einer stark erhöhten Vasokonstriktion führen. Dies würde wiederum zu einer Veränderung der gesamten Pulpaphysiologie durch eine Minderdurchblutung führen. Es hat sich aber interessanterweise in dieser Studie gezeigt, dass es nicht zu einer vermehrten Freisetzung von NPY in der Versuchsgruppe kommt. Dennoch kommt es nach

neonataler Capsaicin-Behandlung zu einer Herabsetzung der Mirkozirkulation (Buck & Burks, 1986), welche mit der Reduzierung der vasodilatativen Neuropeptide SP und CGRP erklärt werden kann (Caviedes-Bucheli et al., 2005; Jacobsen & Heyeraas, 1996; Heyeraas et al., 1996). Eine Vermutung dieser Studie legt daher nahe, dass es nach neonataler Desensibilisierung trotz reduzierter NPY-Ausschüttung zu einer Reduktion der Mikrozirkulation kommt. Um diese Vermutung zu beweisen, sollten weitere Untersuchungen der Pulpa zur Mikrozirkulation nach Capsaicinapplikation durchgeführt werden.

In einer Studie haben Fristad und Kollegen (1994) herausgefunden, dass in der physiologischen Pulpa keine NPY-immunreaktiven Fasern in der Odontoblastenschicht nachweisbar sind. Sie sind hauptsächlich entlang der großen Blutgefäße in der Wurzelpulpa und im Zentrum des Pulpencavums lokalisiert (Jacobsen et al., 1998). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass als Folge einer sensorischen Denervation NPY-positive Fasern entlang der Odontoblastenschicht und sogar zum Teil noch im Dentin nachgewiesen werden konnten (Fristad et al., 1996b; Fristad et al., 1995a). Dabei lässt sich der Effekt der fehlenden sensorischen Neuropeptide auf die Pulpaphysiologie gut studieren. Damit kann vermutet werden, dass die sympathischen Fasern den Platz der fehlenden sensorischen Fasern zum Teil übernehmen. Auch in kariösen Zähnen konnte NPY in der Odontoblastenschicht nachgewiesen werden (El Karim et al., 2006). Sogar in unmittelbarer Nachbarschaft zu neugebildetem Reizdentin während einer Pulpitis konnten NPY-ausschüttende Fasern entdeckt werden (Haug & Heyeraas, 2003). Es ist anzunehmen, dass es durch eine vermehrte NPY-Ausschüttung mit der daraus resultierenden Hemmung der SP-Freisetzung einen anti-inflammatorischen Effekt innerhalb der Dentin-Pulpa-Einheit gibt (El Karim et al., 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie

unterstützen diese Vermutungen nur teilweise. In der Odontoblastenschicht der Kontrolltiere wurden wie erwartet keine NPY-immunreaktiven Fasern nachgewiesen (Abb.12b, Abb.13b, Abb.15b, Abb.16b, Abb.17b). Bei den mit Capsaicin behandelten Tieren konnte mehrfach in verschiedenen Altersstufen eine Lokalisation dieser Fasern innerhalb der Odontoblastenschicht gefunden werden (Abb.12a, Abb.13a, Abb.15a, Abb.16a, Abb.17a).

Diese NPY-immunreaktiven Fasern übernehmen somit nach Desensibilisierung zum Teil den Platz der sensorischen Fasern. Dieser Effekt wurde auch nach der Axotomie des Nervus alveolaris inferior beobachtet (Fristad et al., 1995a). Welche Funktion diese Fasern übernehmen ist jedoch nicht geklärt. Man kann aber vermuten, dass eine direkte NPY-Freisetzung an den Odontoblasten zu einer Einleitung von Heilungs- und Reparaturprozessen führt (Haug & Heyeraas, 2003), denn wie die Studie von Seltmann und Kollegen (2007) gezeigt hat, kommt es nach neonataler Desensibilisierung zwar zu Dentindefekten, welche aber nach 155 Tagen eine geringe regenerative Tendenz aufweisen.

Ein weiterer Grund für die Reduktion der NPY-Freisetzung könnte darin gesehen werden, dass eventuell einige NPY-positive Fasern ihren Ursprung im Ganglion trigeminale statt im Ganglion cervicale superius haben (Haug et al., 2001; Fristad et al., 1996a). Diese Vermutung könnte sich bestätigen, da es in allen hier untersuchten Pulparegionen eine Reduktion in der Anzahl NPY-immunreaktiver Fasern nach systemischer Capsaicinbehandlung im Vergleich zu den Kontrollgruppen gab. Um diese Vermutung zu bestätigen, reicht diese Studie allerdings nicht aus. Es sollten weiterführende Untersuchungen erfolgen, die eine Doppelfärbung für den Nachweis von NPY und sensorische Fasern beinhalten.

Den Verlauf für die Anzahl der nachgewiesenen Immunreaktionen für die Versuchsgruppen in den verschiedenen Untersuchungsgebieten stellt die Abbildung 31 dar. Im Pulpenhorn findet man nach systemischer Desensibilisierung kaum NPY-positive Fasern. Im Pulpencavum und der Wurzel ist die Konzentration dieser Fasern nach 30 Tagen fast identisch. Es kommt im Laufe der Reifung jedoch zu einem drastischen Unterschied in der Menge der Immunreaktionen. Nach 60 Tagen sind die Konzentrationen in beiden Regionen zwar erhöht, jedoch in der Wurzel um das fünffache zum Cavum. Nach 90 Tagen fällt der Wert im Pulpencavum ab, in der Wurzel steigt er weiter an und ist jetzt 25-fach höher als die nachweisbare Menge im Cavum. In der letzten Altersstufe, die untersucht wurde, konnte ein erneuter Anstieg der NPY-Freisetzung im Pulpencavum um das 3,3-fache zur 90-Tage Gruppe nachgewiesen werden.

In der Wurzel ist die NPY-Freisetzung merklich zurückgegangen; sie hat sich halbiert. Trotzdem liegt der Wert noch vierfach über dem des Cavums. Signifikante Unterschiede in der Menge der NPY-Ausschüttung zwischen den Altersstufen zeigten die Versuchstiere nur in der Wurzelregion zwischen 30 und 60 Tagen (P=0,03) und zwischen 30 und 90 Tagen (P=0,04).

In einer Studie von Heyeraas und Kollegen (1996) hat sich gezeigt, dass weder eine Trennung des Nervus alveolaris inferior noch eine neonatale Capsaicin-Applikation zu einer Veränderung der Dentinentwicklung in der Wurzel bei Rattenmolaren führt. Dieser Punkt spiegelt sich auch in den Ergebnissen dieser Studie wider. Im Bereich der Wurzelpulpa ist der Verlauf der NPY-Ausschüttung zwischen der Kontroll- und Versuchsgruppe ähnlich. Es gibt nur einen Unterschied in der Menge der NPYimmunreaktiven Fasern. Der Student-T Test zeigt einen signifikanten Unterschied in

der Anzahl der Immunreaktionen nach 30 Tagen zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe (*P*=0,01).

Dies lässt vermuten, dass die Wirkung der sensorischen Neuropeptide keinen großen Einfluss auf diesen Bereich der Dentin-Pulpa-Einheit ausübt. Die NPYpositiven Fasern zeigen hier in beiden Gruppen ihre höchste Konzentration nach 90 Tagen. Zu diesem Zeitpunkt fällt die Konzentration der sensorischen Neuropeptide schon wieder. Dies lässt vermuten, dass die NPY-Freisetzung in der Wurzelregion erst erfolgen kann, wenn der Einfluss der sensorischen Neuropeptide fällt. Daraus könnte man schließen, dass es einen Mechanismus der Rückkopplung zwischen der Ausschüttung sensorischer und sympathischer Neuropeptide in der dentalen Pulpa gibt. Andererseits kommt es in der Wurzel zu keiner so stark ausgeprägten Reduktion der Pulpakammer durch Sekundärdentinbildung wie in der Kronenpulpa (Morse, 1991). Diese Einschränkung der Pulpakammer ist ein beachtenswerter Effekt in der Beobachtung der Innervationsdichte des Dentin-Pulpa-Komplexes.

Physiologisch kommt es in der Aufrechterhaltung der Pulpahomeostase zu einem Gleichgewicht zwischen den sensorischen Neuropeptiden, welche eine Vasodilatation verursachen, und den sympathischen Neuropeptiden, welche wiederum eine Vasokonstriktion hervorrufen (Raab et al., 1988). So kann einem Überangebot einer Gruppe der Neuropeptide entgegengewirkt werden. Dieser Mechanismus könnte die Pulpa vor einer kompletten Vasokonstriktion schützen, die theoretisch durch ein Überangebot sympathischer Neuropeptide nach einer sensorische Denervation entstehen müsste (Aberdeen et al., 1990; Terengi et al., 1986; Schon et al., 1985). Allerdings konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass sowohl nach Axotomie des Nervus alveolaris inferior als auch nach Sympathektomie kein Überangebot der gegensätzlich wirkenden Neuropeptide auftritt (Haug et al.,

2001; Oswald & Byers, 1993; Fristad et al, 1996a; Wakisaka et al., 1993). In der hier vorliegenden Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es nach einer sensorischen Desensibilisierung mit der daraus resultierenden Reduktion der vasodilativen Neuropeptide (unveröffentlichte Daten der Studiengruppe Raab et al.) zu einer gleichzeitigen Reduktion von NPY-immunreaktiven Fasern kommt. Es sollten daher weiterführende Studien zum Rückkopplungsmechanismus zwischen den sensorischen und den sympathischen Nervenfasern durchgeführt werden, um die Pulpaphysiologie besser kennen zu lernen.

5.2 Schlussfolgerungen

Die vorliegende Studie deutet an Hand der Ergebnisse der Kontrollgruppen an, dass die NPY-Freisetzung in der Ratten-Pulpa ein altersabhängiger Prozess ist. Dieser Einfluss ist in der Wurzelregion wesentlich geringer als im Pulpenhorn und im Pulpencavum. Es sollte in weiteren Studien untersucht werden, welche Rolle dabei die Apexifikation und die Einschränkung der Pulpenkammer durch die Sekundärdentin-Bildung spielt.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die NPY-Ausschüttung der sympathischen Nervenfasern durch eine systemische Capsaicin-Gabe gehemmt wird. Die neonatale Desensibilisierung führt zu einer Reduktion der sensorischen Neuropeptide (Caviedes-Bucheli et al., 2005; Jacobsen & Heyeraas 1996; Heyeraas et al., 1996). Hier gibt es vermutlich einen rückkoppelnden inhibitorischen Effekt auf die Freisetzung von NPY, um ein Überangebot von NPY in der Pulpa zu verhindern. Es konnten NPY-immunreaktive Fasern innerhalb der Odontoblastenschicht von Pulpenhorn und Pulpencavum der Versuchstiere nachgewiesen werden. Das spricht dafür, dass die NPY-immunreaktiven Fasern zum Teil den Platz der sensorischen Nervenfasern einnehmen. Welche Funktion sie bei dieser Lokalisation spielen, sollte in weiteren Studien analysiert werden.

Diese Studie regt zu weiteren Studien an, da noch nicht hinreichend geklärt werden konnte, ob NPY nur von sympathischen Fasern oder eventuell auch von einigen sensorischen Fasern freigesetzt werden kann. Dazu sollten weiterführende immunhistologische Studien mit Hilfe einer Doppelfärbung für NPY (Anti-NPY) einerseits und einem Antikörper für die Detektion von sensorischen Fasern andererseits (z.B. Anti-Nozizeptin, Anti-Peripherin) durchgeführt werden. Nur so kann sichergestellt werden, ob NPY in der Pulpa ein rein sympathisches Neuropeptid ist.

Des Weiteren sollte der Einfluss des sympathischen Nervensystems auf die Odontoblastenfunktion und -entwicklung besser untersucht werden. Die Wirkungsweise und das Zusammenspiel der verschiedenen Neuropeptide des Dentin-Pulpa-Komplexes und deren Auswirkung auf die Odontoblasten muss besser untersucht und verstanden werden.

Diese Studie hat uns zu einem besseren Verständnis über die Entwicklung der sympathischen Nervenfasern der dentalen Pulpa geführt und deren Zusammenhang mit den verschiedenen Altersstufen von Rattenmolaren aufgezeigt.

6. Literaturverzeichnis

Aberdeen J, Corr L, Milner P, Lincoln J, Burnstock G. (1990) Marked increases in calcitonin gene-related peptide-containing nerves in the developing rat following long-term sympathectomy with guanethidine. *Neuroscience*, 35(1): 175-184

Andrew D, Matthews B. (1996) Some properties of vasodilatory nerves innervating tooth pulp in the cat. *Proceedings to the International Conference on Dentin/Pulp Complex 1995,* Quintessence Publishing, Editor: Shimono M et al, Tokyo: 254-257

Avery JK, Cox CF, Chiego DJ. (1980) Presence and location of adrenergic nerve endings in the dental pulps of mouse molars. *Anat Rec*, 198(1): 59-71

Barrett AC, Smith ES, Picker MJ. (2003) Capsaicin-induced hyperalgesia and μ -opioid-induced antihyperalgesia in male and female fischer 344 rats. *JPET*, 307(1): 237-245

Berggreen E, Heyeraas KJ. (2000) Effect of the sensory neuropeptide antagonists h-CGRP((8-37)) and SR 140.33 on pulpal and gingival blood flow in ferrets. *Arch Oral Biol*, 45(7): 537-542

Brodin E, Gazelius B, Lundberg JM, Olgart L. (1981) Substance P in trigeminal nerve endings: occurrence and release. *Acta Physiol Scand*, 111(4): 501-503

Buck SH, Burks TF. (1986) The neuropharmacology of capsaicin: review of some recent observations. *Pharmacol Rev*, 38(3): 179-226

Byers MR. (1984) Dental sensory receptors. *Int Rev Neurobiol*, 25: 39-94

Byers MR, Närhi MV, Mecifi KB. (1988) Acute and chronic reactions of dental sensory nerve fibers to cavities and desiccation in rat molars. *Anat Rec*, 221(4): 872-883

Byers MR, Taylor PE, Khayat BG, Kimberly CL. (1990) Effects of injury and inflammation on pulpal and periapical nerves. *J Endod*, 16(2): 78-84

Byers MR. (1992) Effects of inflammation on dental sensory nerves and vice versa. *Proc Finn Dent Soc*, 88 Suppl 1: 499-506 Byers MR. (1994) Dynamic plasticity of dental sensory nerve structure and cytochemistry. *Arch Oral Biol*, 39 Suppl:1 3S-21S

Byers MR, Närhi MV. (1999) Dental injury models: experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions. *Crit Rev Oral Biol Med*, 10(1): 4-39

Caron C, Xue J, Bartlett JD. (1998) Expression and localization of membrane type 1 matrix metalloproteinase in tooth tissues. *Matrix Biol*, 17(7): 501-511

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653): 816-824

Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D. (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*, 398(6726): 436-441

Caviedes-Bucheli J, Azuero-Holguin MM, Munoz HR. (2005) The effect of capsaicin on substance P expression in pulp tissue inflammation. *Int Endod J*, 38: 30-35

Caviedes-Bucheli J, Lombana N, Azuero-Holguin MM, Munoz HR. (2006) Quantification of neuropeptides (calcitonin gene-related peptide, substance P, neurokinin A, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide) expressed in healthy and inflamed human dental pulp. *Int Endod J*, 39(5): 394-400

Chaudhary P, Martenson ME, Baumann TK. (2001) Vanilloid receptor expression and capsaicin excitation of rat dental primary afferent neurons. *J Dent Res*, 80(6): 1518-1523

Cesare P, Moriondo A, Vellani V, McNaughton PA. (1999) Ion channels gated by heat. *Proc Natl Acad Sci U S A, 96*(14): 7658-7663

Clapham DE. (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature,* 426(6966): 517-524

El Karim IA, Lamey P-J, Linden GJ, Awawdeh L, Lundy FT. (2006) Caries-induced changes in the expression of pulpal neuropeptide Y. *Eur J Oral Sci*, 114(2): 133-137 Fallgren B, Ekblad E, Edvinsson L. (1989) Co-existence of neuropeptides and differential inhibition of vasodilator responses by neuropeptide Y in guinea pig uterine arteries. *Neurosci Lett*, 100(1-3): 71-76

Fitzgerald M, Chiego JD, Heys DR. (1990) Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Arch Oral Biol*, 35(9):707-715

Fristad I, Heyeraas KJ, Kvinnsland IH. (1994) Nerve fibres and cells immunoreactive to neurochemical markers in developing rat molars and supporting tissues. *Arch Oral Biol*, 39(8): 633-646

Fristad I, Heyeraas KJ, Kvinnsland IH, Jonsson R. (1995a) Recruitment of immunocompetent cells after dentinal injuries in innervated and denervated young rat molars: an immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem*, 43(9): 871-879

Fristad I, Heyeraas KJ, Jonsson R, Kvinnsland IH. (1995b) Effect of inferior alveolar nerve axotomy on immune cells and nerve fibers in young rat molars. *Arch Oral Biol*, 40(11): 1053-1062

Fristad I, Heyeraas KJ, Kvinnsland IH. (1996a) Neuropeptide Y expression in the trigeminal ganglion and mandibular division of the trigeminal nerve after inferior alveolar nerve axotomy in young rats. *Exp Neurol*, 142(2): 276-286

Fristad I, Heyeraas KJ, Jonsson R, Kvinnsland IH. (1996b) Sensory denervation – effect on inflammation and neuropeptide expression in young rat molars. *Proceedings to the International Conference on Dentin/Pulp Complex 1995,* Quintessence Publishing, Editor: Shimono et al, Tokyo: 234-240

Goldberg M, Smith AJ. (2004) Cells and extracellular matrices or dentin and pulp: A biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med*, 15(1): 13-27

Gotjamanos T., (1969a)

Cellular organization in the subodontoblastic zone of the dental pulp. I. A study of cell-free and cell-rich layers in pulps of adult rat and deciduous monkey teeth. *Arch Oral Biol*, 14(9): 1007-1010

Gotjamanos T., (1969b) Cellular organization in the subodontoblastic zone of the dental pulp. II. Period and mode of development of the cell-rich layer in rat molar pulps. *Arch Oral Biol*, 14(9): 1011-1019 Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S., (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*;97(25): 13625-13630

Hansel DE, Eipper BA, Ronnett GV. (2001) Neuropeptide Y functions as a neuroproliferative factor. *Nature*, 410, 940-944

Hargreaves KM, Swift JQ, Roszkowski MT, Bowles W, Garry MG, Jackson DL. (1994) Pharmacology of peripheral neuropeptide and inflammatory mediator release. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 78(4): 503-510

Hargreaves KM, Keiser K, Byrne BE. (2006) Structure and Function of the Dentin-Pulp Complex. *Pathways of the Pulp, 9. Edition* Mosby Elsevier, Editor: Cohen ST, Hargreaves KM., Canada: 668-690

Haug SR, Berggreen E, Heyeraas KJ. (2001) The effect of unilateral sympathectomy and cavity preparation on peptidergic nerves and cells in rat dental pulp. *Exp Neurol*, 169(1): 182-190

Haug SR, Heyeraas KJ. (2003) Effects of sympathectomy on experimentally induced pulpal inflammation and periapical lesions in rats. *Neuroscience*, 120(3): 827-836

Heyeraas KJ, Kvinnsland I. (1992) Tissue pressure and blood flow in pulpal inflammation. *Proc Finn Dent Soc*, 88 Suppl 1:393-401

Heyeraas KJ, Kvinnsland I, Byers MR, Jacobsen EB. (1993) Nerve fibers immunoreactive to protein gene product 9.5, calcitonin gene-related peptide, substance P and neuropeptide Y in the dental pulp, periodontal ligament and gingiva in cats. *Acta Odontol Scand*, 51(4): 207-221

Heyeraas KJ, Kim S, Raab WH, Byers MR, Liu M. (1994) Effect of electrical tooth stimulation on blood flow, interstitial fluid pressure and substance P and CGRP-immunoreactive nerve fibers in the low compliant cat dental pulp. *Microvasc Res*, 47(3): 329-343

Heyeraas KJ, Jacobsen EB, Fristad I. (1996) Vascular and immunoreaktive nerve fibre reactions in the pulp after stimulation and denervation.

Proceedings to the International Conference on Dentin/Pulp Complex 1995, Quintessence Publishing, Editor: Shimono et al, Tokyo: 90-92 Holland GR. (1996) Experimental trigeminal nerve injury. *Crit Rev Oral Biol Med*, 7(3): 237-258

Ichikawa H, Sugimoto T. (2000a) VR1-immunoreactive primary sensory neurons in the rat trigeminal ganglion. *Brain Res*, 890(1): 184-188

Ichikawa H, Sugimoto T. (2000b) Vanilloid receptor 1-like receptor-immunoreactive primary sensory neurons in the rat trigeminal nervous system. *Neuroscience*, 101(3): 719-725

Ikeda H, Tokita Y, Suda H. (1997) Capsaicin-sensitive Aδ fibers in cat tooth pulp. *J Dent Res*, 76(7): 1341-1349

Imai H, Osumi-Yamashita N, Ninomiya Y, Eto K. (1996) Contribution of early-emigrating midbrain crest cells to the dental mesenchyme of mandibular molar teeth in rat embryos. *Dev Biol*, 176(2): 151-165

Jacobsen EB, Heyeraas KJ. (1996) Effect of capsaicin treatment or inferior alveolar nerve resection on dentine formation and calcitonin gene-related peptide- and substance p-immunoreactive nerve fibres in rat molar pulp. *Arch Oral Biol*, 41(12): 1121-1131

Jacobsen EB, Fristad I, Heyeraas KJ. (1998) Nerve fibers immunoreactive to calcitonin gene-related peptide, substance P, neuropeptide Y, and dopamine beta-hydroxylase in innervated and denervated oral tissues in ferrets. *Acta Odontol Scand*, 56(4): 220-228

Jean A, Kerebel B, Kerebel LM. (1986) Scanning electron microscope study of the predentin-pulpal border zone in human dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 61(4):392-398

Kang BC, Nahm SH, Huh JH, Yoo HS, Yu JW, Lee MH, Kim BD. (2001) An interspecific (Capsicum annuum ×C. chinese) F2 linkage map in pepper using RFLP and AFLP markers *Theor Appl Genet*, 102: 521-539

Kawada t, Hagihara KI, Iwai K. (1986) Effects of capsaicin on lipid metabolism in rats fed a high fat diet. *J Nutr,* 116: 1272-1278 Kerezoudis NP, Funato.A, Edwall L, Olgart L. (1993a) Activation of sympathetic nerves exerts an inhibitory influence on afferent nerveinduced vasodilation unrelated to vasoconstriction in rat dental pulp. *Acta Physiol Scand*, 147: 27-35

Kerezoudis NP, Olgart L, Funato A, Edwall L. (1993b) Inhibitory influence of sympathetic nerves on afferent nerve-induced extravasation in the rat incisor pulp upon direct electrical stimulation of the tooth. *Arch Oral Biol*, 38(6): 483-490

Kim SK, Ang L, Hsu YY, Dorscher-Kim J, Kim S. (1996a) Antagonistic effect of D-myo-inositol-1, 2,6-triphosphate (PP56) on neuropeptide Yinduced vasocostriction in the feline dental pulp. *Arch Oral Biol*, 41(8-9): 791-798

Kim SK, Ang L, Hsu YY, Kim S. (1996b) Effects of sympathetic nerve stimulation, norepinephrine and neuropeptide Y on vasomotor control in the feline dental pulp. *Proceedings to the International Conference on Dentin/Pulp Complex 1995,* Quintessence Publishing, Editor: Shimono et al, Tokyo: 232-233

Kim CS, Park WH, Park JY, Kang JH, Kim MO, Kawada T, Yoo H, Han IS, Yu R. (2004)

Capsaicin, a spicy component of hot pepper, induces apoptosis by activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma in HT-29 human colon cancer cells.

J Med Food, 7(3): 267-273

Kim JA, Kang YS, Lee YS. (2005) A phospholipase C-dependent intracellular Ca2+ release pathway mediates the capsaicin-induced apoptosis in HepG2 human hepatoma cells. *Arch Pharm Res*, 28(1): 73-80

Kim MS, Park CK, Yeon KY, Li HY, Jung SJ; Choi SY, Lee SJ, Park K, Kim JS, Oh SB. (2006) Involvement of transient receptor potential vanilloid-I in calcium current inhibition by Capsaicin. *Neuroreport,* 17(2): 145-149

Kimberly CL, Byers MR. (1988) Inflammation of rat molar pulp and periodontium causes increased calcitonin generelated peptide and axonal sprouting. *Anat Rec*, 222(3): 289-300

Kishi Y, Shimozato N, Takahashi K. (1989) Vascular architecture of cat pulp using corrosive resin cast under scanning electron, microscopy. *J Endod*, 15(10): 478-483 Krage T, Vandenabeele F, Lambrichts I, Raab WH. (2002a) A TEM analysis of pulpal sensory content in capsaicin-treated rats. *Proceedings to the International Conference on Dentin/Pulp Complex 2001,* Quintessence Publishing, Editor: Ishikawa et al., Tokyo: 185-186

Krage T, Lambrichts I, Zanger K, Raab WH. (2002b) Capsaicin-treated animals vs. the NOS-3 knockout mouse: a SEM and TEM comparison.

Proceedings to the International Conference on Dentin/Pulp Complex 2001, Quintessence Publishing, Editor: Ishikawa et al., Tokyo: 187-189

Krage T, Lambrichts I, Raab WH. (2002c) Capsaicin-treated animals vs. the NOS-3 knockout mouse: an immunohistological comparison *Proceedings to the International Conference on Dentin/Pulp Complex 2001*.

Quintessence Publishing, Editor: Ishikawa et al., Tokyo: 119-122

Krage TL, Stiefel A, Stephan BM, Zimmer S, Lambrichts I, Raab WH. (2005) Microhardness changes in dentine after neonatal capsaicin application. *Int Endod J*, 38(8): 570-574

Kress M, Zeilhofer HU. (1999) Capsaicin, protons and heat: new excitement about nociceptors. *Trends Pharmacol Sci*, 20(3): 112-118

Lawson SN. (1987) The morphological consequences of neonatal treatment with capsaicin on primary afferent neurones in adult rats. *Acta Physiol Hung*, 69(3-4): 315-321

Lee JS, Chang JS, Lee JY, Kim JA. (2004) Capsaicin-induced apoptosis and reduced release of reactive oxygen species in MBT-2 murine bladder tumor cells. *Arch Pharm Res*, 27(11): 1147-1153

Lesot H, Beguekirn C, Kubler MD, Meyer JM, Smith AJ, Cassidy N, Ruch JV. (1993) Experimental induction of odontoblast differentiation and stimulation during reparative processes. *Cell Mater,* 3(2): 201-217

Linde A. (1989) Dentin matrix proteins: composition and possible functions in calcification. *Anat Rec*, 224(2): 154-166

Linde A. (1995) Dentin mineralization and the role of odontoblasts in calcium transport. *Connect Tissue Res*, 33(1-3): 163-170 Linde A, Lundgren T. (1995) From serum to the mineral phase. The role of the odontoblast in calcium transport and mineral formation. *Int J Dev Biol*, 39(1): 213-222

Lukinmaa PL, Mackie EJ, Thesleff I. (1991) Immunohistochemical localization of the matrix glycoproteins--tenascin and the EDsequence-containing form of cellular fibronectin--in human permanent teeth and periodontal ligament. *J Dent Res*, 70(1): 19-26

Maggi CA. (1991) The pharmacology of the efferent function of sensory nerves. *J Auton Pharmacol*, 11: 173-208

Magloire H, Joffre A, Grimaud JA, Herbage D, Couble ML, Chavrier C. (1982) Distribution of type III collagen in the pulp parenchyma of the human developing tooth. Light and electron microscope immunotyping. *Histochemistry*, 74(3): 319-328

Mangkornkarn C, Steiner JC. (1992) In vivo and in vitro glycosaminoglycans from human dental pulp. *J Endod*, 18(7): 327-331

Marion D, Jean A, Hamel H, Kerebel LM, Kerebel B. (1991) Scanning electron microscopic study of odontoblasts and circumpulpal dentin in a human tooth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 72(4): 473-478

Marsh SJ, Stansfeld CE, Brown DA, Davey R, McCarthy D. (1987) The mechanism of action of capsaicin on sensory C-type neurons and their axons in vitro. *Neuroscience*, 23(1): 275-289

McCullough LA, Egan TM, Westfall TC. (1998) Neuropeptid Y receptors involved in calcium channel regulation in PC12 cels. *Reg Pept*, 75-76: 101-107

Mjör IA, Nordahl I (1996) The density and branching of dentinal tubules in human teeth. *Arch Oral Biol*, 41(5): 401-412

Mjör IA, Sveen OB, Heyeraas KJ. (2002) Normal structure and physiology. Quintessence Publishing, *Pulp-Dentin Biology in restorative Dentistry. Editor: Mjör IA*, Chicago: 1-22

Morse DR. (1991) Age-related changes of the dental pulp complex and their relationship to systemic aging. *Oral Surg Oral Med Oral Patho*, 72(6): 721-745 Murray PE, Matthews JB, Sloan AJ, Smith AJ. (2002) Analysis of incisor pulp cell populations in wistar rats of different ages. *Arch Oral Biol*, 47: 709-715

Nakashima M. (1994) Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 and -4. *J Dent Res*, 73(9): 1515-1522

Närhi MV. (1985) The characteristics of intradental sensory units and their responses to stimulation. *J Dent Res*, 64 Spec No:564-571

Närhi M, Jyväsjärvi E, Virtanen A, Huopaniemi T, Ngassapa D, Hirvonen T. (1992) Role of intradental A- and C-type nerve fibres in dental pain mechanisms. *Proc Finn Dent Soc*, 88(Suppl 1): 507-516

Okabe E, Todoki K, Ito H. (1989) Direct pharmacological action of vasoactive substances on pulpal blood flow: an analysis and critique. *J Endod*, 15(10): 473-477

Okiji T, Jontell M, Belichenko P, Dahlgren U, Bergenholtz G, Dahlström A. (1997) Structural and functional association between substance P- and calcitonin generelated peptide-immunoreactive nerves and accessory cells in the rat dental pulp. *J Dent Res*, 76(12): 1818-1824

Okumura R, Shima K, Muramatsu T, Nakagawa K, Shimono M, Suzuki T, Magloire H, Shibukawa Y. (2005) The odontoblast as a sensory receptor cell? The expression of TRPV1 (VR-1) channels. *Arch Histol Cytol,* 68(4): 251-257

Olgart L, Edwall B, Gazelius B. (1989) Neurogenic mediators in control of pulpal blood flow. *J Endodont,* 15: 409-412

Olgart L. (1992) Involvement of sensory nerves in hemodynamic reactions. *Proc Finn Dent Soc*, 88 Suppl 1: 403-410

Olgart L. (1996a) Neurogenic components of pulp inflammation. *Proceedings to the International Conference on Dentin/Pulp Complex 1995,* Quintessence Publishing, Editor: Shimono M et al, Tokyo: 169-175

Olgart L. (1996b) Neural control of pulpal blood flow. *Crit Rev Oral Biol*, 7(2): 159-171 Oswald RJ, Byers MR. (1993) The injury response of pulpal NPY-IR sympathetic fibers differs from that of sensory afferent fibers. *Neurosci Lett*, 164(1-2): 190-194

Pashley DH. (1996) Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med*, 7(2):104-133

Pashley DH, Liewehr FR. (2006) Structure and Function of the Dentin-Pulp Complex. *Pathways of the Pulp, 9. Edition* Mosby Elsevier, Editor: Cohen ST, Hargreaves KM., Canada: 460-513

Prasad BCN, Shrivastava R, Ravishankar GA. (2005) Capsaicin: A promising multifaceted drug from capsicum spp. *Evidence Based Integrative Med*, 2(3): 147-166

Prescott ED, Julius D. (2003) A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science*, 300(5623): 1284-1288

Raab WH, Magerl W, Müller H. (1988) Changes in dental blood flow following electrical tooth pulp stimulation--influences of capsaicin and guanethidine. *Agents Actions*, 25(3-4): 237-239

Raab WH-M, Stiefel A, Müller-Raab K. (1996) Changes in the formation of dental hard tissues after desensitization with capsaicin. *Proceedings to the International Conference on Dentin/Pulp Complex 1995,* Quintessence Publishing, Editor: Shimono M et al, Tokyo: 90-92

Renton T, Yiangou Y, Baecker PA, Ford AP, Anand P. (2003) Capsaicin receptor VR1 and ATP purinoceptor P2X3 in painful and nonpainful human tooth pulp. *J Orofac Pain*, 17(3): 245-250

Roberts-Clark DJ, Smith AJ. (2000) Angiogenic growth factors in human dentin matrix. Arch *Oral Biol,* 45:1013-1016

Rodd HD, Boissonade FM. (2002) Comparative immunohistochemical analysis of the peptidergic innervation of human primary and permanent tooth pulp. *Arch Oral Biol*, 47(5): 375-385

Rodd HD, Boissonade FM. (2003) Immunocytochemical investigation of neurovascular relationships in human tooth pulp. *J Anat*, 202(2): 195-203 Romagnoli P, Mancini G, Galeotti F, Francini E, Pierleoni P. (1990) The crown odontoblasts of rat molars from primary dentinogenesis to complete eruption. *J Dent Res*, 69: 1857-1862

Ruch JV, Lesot H, Bègue-Kirn C. (1995) Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol*, 39(1):51-68

Ruch JV, Lesot H, Cam Y, Meyer J-M, Bloch-Zupan A, Bègue-Kirn C. (1996) Control of odontoblast differentiation: Current hypotheses. *Proceedings to the International Conference on Dentin/Pulp Complex 1995,* Quintessence Publishing, Editor: Shimono M et al, Tokyo: 105-111

Salomon JP, Septier D, Goldberg M. (1991) Ultrastructure of inter-odontoblastic fibres in the rat molar. *Arch Oral Biol*, 36(3): 171-176

Schellenberg U, Krey G, Bosshardt D, Nair PNR (1992) Numerical density of dentinal tubules at the pulpal wall of human permanent premolars and third molars. *J Endod*, 18(3): 104-109

Schon F, Ghatei M, Allen JM, Mulderry PK, Kelly JS, Bloom SR. (1985) The effect of sympathectomy on calcitonin gene-related peptide levels in the rat trigeminovascular system. *Brain Res*, 348(1): 197-200

Seltmann M, Krage T, Zanger K, Struys T, Lambrichts I, Raab WHM. (2007) Changes observed over time in dentin development after neonatal desensitisation. *European Cells and Materials*, 14(2): 128

Sloan AJ, Smith AJ. (1999) Stimulation of the dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in vitro. *Arch Oral Biol*, 44(2):149-156

Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. (1995) Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol*, 39(1): 273-280

Stenvik A, Iversen J, Mjör IA. (1972) Tissue pressure and histology of normal and inflamed tooth pulps in macaque monkeys. *Arch Oral Biol*, 17(11): 1501-1511

Szallasi A, Blumberg PM. (1999) Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev*, 51(2): 159-212 Szolcsanyi J, Anton F, Reeh PW, Handwerker HO. (1988) Selective excitation by capsaicin of mechano-heat sensitive nociceptors in rat skin. *Brain Res*, 446(2): 262-268

Szolcsanyi J, Szallasi A, Szallasi Z, Joo F, Blumberg PM. (1990) Resiniferatoxin: an ultrapotent selective modulator of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, 255(2): 923-928

Szolcsanyi J. (2004) Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides*, 38(6): 377-384

Tang ML, Haas DA, Hu JW. (2004) Capsaicin-induced joint inflammation is not blocked by local anesthesia. *Anesth Prog*, 51(1): 2-9

Terenghi G, Zhang SQ, Unger WG, Polak JM. (1986) Morphological changes of sensory CGRP-immunoreactive and sympathetic nerves in peripheral tissues following chronic denervation. *Histochemistry*, 86(1): 89-95

Tobin CE. (1972) Correlation of vascularity with mineralization in human fetal teeth. *Anat Rec*, 174(3): 371-379

Tran-Hung L, Mathieu S, About I. (2006) Role of human pulp fibroblasts in Angiogenesis. *J Dent Res*, 85(9): 819-823

Tziafas D, Alvanou A, Papadimitriou S, Gasic J, Komnenou A. (1998) Effects of recombinant basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-II and transforming growth factor-beta 1 on dog dental pulp cells in vivo. *Arch Oral Biol*, 43(6):431-444

Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. (2000) Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent*, 28(2):77-92

Uddman R, Grunditz T, Sundler F. (1984) Neuropeptide Y: occurrence and distribution in dental pulps. *Acta Odontol Scand*, 42(6): 361-365

Uddman R, Kato J, Cantera L, Edvinsson L. (1998) Localization of neuropeptide YY1 receptor mRNA in human tooth pulp. *Arch Oral Biol,* 43: 389-394

Vannier B, Zhu X, Brown D, Birnbaumer L. (1998) The membrane topology of human transient receptor potential 3 as inferred from glycosylation-scanning mutagenesis and epitope immunocytochemistry. *J Biol Chem*, 273(15): 8675-8679 Veerayutthwilai O, Luis NA, Crumpton RM, MacDonald GH, Byers MR. (2006) Peripherin- and CGRP-immunoreactive nerve fibers in rat molars have different locations and developmental timing. *Arch Oral Biol*, 51(9): 748-760

Wahlestedt C, Reis DJ. (1993) Neuropeptide Y-related peptides and their receptors- Are the receptors potential therapeutic drug targets? *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 33: 309-352

Wakisaka S, Takikita S, Sasaki Y, Kato J, Tabata MJ, Kurisu K. (1993) Cell size-specific appearance of neuropeptide Y in the trigeminal ganglion following peripheral axotomy of different branches of the mandibular nerve of the rat. *Brain Res*, 620(2): 347-350

Wu ZZ, Chen SR, Pan HL. (2005) Transient receptor potential vanilloid type 1 activation down-regulates voltage-gated calcium channels through calcium-dependent calcineurin in sensory neurons. *J Biol Chem*, 280(18): 18142.18151

Yoshiba N, Yoshiba K, Iwaku M, Ozawa H. (1996) Immunolocalization of the small proteoglycan decorin in human teeth. *Arch Oral Biol*, 41(4): 351-357

Zhang J, Nagata K, lijima T. (1998) Scanning electron microscopy and immunohistochemical observations of the vascular nerve plexuses in the dental pulp of rat incisor. *Anat Rec*, 251(2): 214-220

Zukowska-Grojec Z, Karwatowska-Prokopczuk, Fisher TA, Ji H. (1998) Mechanisms of vascular growth-promoting effects of neuropeptide Y: role of its inducible receptors. *Regul Pept*, 75-76: 231-238

7. Anhang

<u>Anhang 1:</u> Capsaicin 30 Tage, distales Pulpenhorn, 100-fach vergrößert



Capsaicin Nr.45



Capsaicin Nr.49



Capsaicin Nr.53



Capsaicin Nr.46



Capsaicin Nr.50



Capsaicin Nr.54



Capsaicin Nr.47



Capsaicin Nr.48



Capsaicin Nr.51



Capsaicin Nr.52



Capsaicin Nr.55



Capsaicin Nr.56

<u>Anhang 2:</u> Kontrolle 30 Tage, distales Pulpenhorn, 100-fach vergrößert



Kontrolle Nr.7



Kontrolle Nr.8



Kontrolle Nr.9



Kontrolle Nr.10



Kontrolle Nr.11



Kontrolle Nr.13



Kontrolle Nr.14



Kontrolle Nr.15



Kontrolle Nr.16



Kontrolle Nr.25



Kontrolle Nr.26



Kontrolle Nr.27

Anhang 3: Capsaicin 60 Tage, distales Pulpenhorn, 100-fach vergrößert



Anhang 4: Kontrolle 60 Tage, distales Pulpenhorn, 100-fach vergrößert


<u>Anhang 5:</u> Capsaicin 90 Tage, distales Pulpenhorn, 100-fach vergrößert



Anhang 6: Kontrolle 90 Tage, distales Pulpenhorn, 100-fach vergrößert



Anhang 7: Capsaicin 155 Tage distales Pulpenhorn, 100-fach vergrößert



Anhang 8: Kontrolle 155 Tage distales Pulpenhorn, 100-fach vergrößert



Anhang 9: Capsaicin 30 Tage, Pulpencavum, 100-fach vergrößert



<u>Anhang 10:</u> Kontrolle 30 Tage, Pulpencavum, 100-fach vergrößert



<u>Anhang 11:</u> Capsaicin 60 Tage, Pulpencavum, 100-fach vergrößert



<u>Anhang 12:</u> Kontrolle 60 Tage, Pulpencavum, 100-fach vergrößert



Anhang 13: Capsaicin 90 Tage, Pulpencavum, 100-fach vergrößert



Anhang 14: Kontrolle 90 Tage, Pulpencavum, 100-fach vergrößert



<u>Anhang 15:</u> Capsaicin 155 Tage, Pulpencavum, 100-fach vergrößert



Anhang 16: Kontrolle 155 Tage, Pulpencavum, 100-fach vergrößert



<u>Anhang 17:</u> Capsaicin 30 Tage, mesiale Wurzelpulpa, 100-fach vergrößert



<u>Anhang 18:</u> Kontrolle 30 Tage, mesiale Wurzelpulpa, 100-fach vergrößert



<u>Anhang 19:</u> Capsaicin 60 Tage, mesiale Wurzelpulpa, 100-fach vergrößert



<u>Anhang 20:</u> Kontrolle 60 Tage, mesiale Wurzelpulpa, 100-fach vergrößert



<u>Anhang 21:</u> Capsaicin 90 Tage, mesiale Wurzelpulpa, 100-fach vergrößert



<u>Anhang 22:</u> Kontrolle 90 Tage, mesiale Wurzelpulpa, 100-fach vergrößert



<u>Anhang 23:</u> Capsaicin 155 Tage, mesiale Wurzelpulpa, 100-fach vergrößert



<u>Anhang 24:</u> Kontrolle 155 Tage, mesiale Wurzelpulpa, 100-fach vergrößert



8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. W. H.-M. Raab, dem Ärztlichen Direktor des Universitätsklinikums Düsseldorf, für das Überlassen dieses Dissertationsthemas in der Poliklinik für Zahnerhaltung und Präventiven Zahnheilkunde der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bedanken.

Für die Betreuung bei der Durchführung und dem Schreiben dieser Arbeit möchte ich mich besonders herzlich bei Frau Dr. Tracy de Peralta bedanken, die mittlerweile als Associate Director of Clinical Dentistry an die Peninsula Dental School der Universität von Plymouth, UK berufen wurde.

Ohne die unermüdliche Unterstützung und die vielen aufmunternden Worte von Frau Judit Hahner hätte diese Studie nicht durchgeführt werden können.

Weiterhin bedanke mich auch bei Frau Dr. Marion Seltmann, die immer ein offenes Ohr und einen guten Rat für mich hatte. Herrn Kurt Schneider danke ich für die wirklich schnelle Korrektur.

Meinen Eltern Moni und Walter gilt ein spezieller Dank, da sie mich sowohl im Studium als auch danach immer so liebevoll unterstützt haben.

Meinem Mann Sascha danke ich für den Rückhalt und seine Geduld in jeder Phase meiner Promotion.

Und nicht zuletzt in Andenken an meine liebe Oma.

9. Curriculum vitae

Schulausbildung

Persönliche Angeben		
Name:	Nora Bergmann	
Geburtsdatum:	09.03.1977	
Geburtsort:	Hilden	
Staatsangehörigkeit	deutsch	

1983-1987	Gumbert-Grundschule, Düsseldorf
1987-1996	Annette-von-Droste-Hülshoff-Gymnasium, Düsseldorf, Abschluss: Abitur

Berufsausbildung	
1996-1999	Ausbildung zur Zahnarzthelferin
1999-2000	Studium der Zahnmedizin, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg
2000-2005	Studium der Zahnmedizin, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
November 2005	Staatsexamen und Approbation

<u>Berufserfahrung</u>

Seit Februar 2006

Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Poliklinik für Zahnerhaltung und Präventiven Zahnheilkunde der Westdeutschen Kieferklinik, Düsseldorf

Immunolokalisation von Neuropeptid Y in der dentalen Pulpa unterschiedlicher Altersklassen nach neonataler, systemischer Capsaicin-Applikation

Das Pflanzenextrakt Capsaicin bindet an einen unselektiven Kationenkanal, den so genannten Vanilloidrezeptor. Nach Capsaicingabe kommt es in peripheren Axonendigungen zu einer Ausschüttung von Substanz P und Cotransmittern. Dabei hohe Konzentrationen capsaicinempfindliche Nervenfasern können selektiv zerstören. In der Pulpa dentis werden durch die Applikation von Capsaicin sowohl Aδ als auch C-Fasern irreversibel blockiert. Die genaue physiologische Auswirkung der daraus resultierenden Innervationsblockade auf die Funktion der pulpalen Zellen ist bis heute ungeklärt. In einer Vorstudie hat sich gezeigt, dass es durch den funktionellen Ausfall der nozizeptiven Fasern nach neonataler Capsaicingabe eine Störung in der Dentinbildung gibt. In einer weiteren Untersuchung zeigte sich eine Veränderung der pulpalen Mikrozirkulation durch eine Ausschüttung von Neuropeptiden nach Aktivierung des vegetativen Nervensystems. Unter dem Einfluss von Capsaicin kommt es zu einer Abnahme des Blutflusses.

In dieser Studie sollte die Ausschüttung von Neuropeptid Y im Alterungsprozess zwischen 30 und 155 Tagen bei mit Capsaicin desensibilisierten Wistar-Ratten beobachtet werden. Es wurde das Pulpengewebe von vier Versuchsgruppen und vier Kontrollgruppen zur Untersuchung herangezogen. Jede Gruppe besteht aus zwölf Wistar-Ratten. Alle Tiere der Versuchsgruppen erhielten bis zum dritten Lebenstag eine subkutane Capsaicinapplikation von 50 mg/kg Körpergewicht. Die Tiere jeweils einer Versuchsgruppe und einer Kontrollgruppe wurden zum gleichen Zeitpunkt mittels Intravitalperfusion nach 30, 60, 90 und 155 Tagen geopfert. Das Pulpengewebe des linken ersten Unterkiefermolars wurde zur Immunhistochemie mittels Avidin-Biotin-Peroxidasemethode herangezogen und drei Pulpengebiete (das distale Pulpenhorn, das Pulpencavum und die mesiale mittlere Wurzelpulpa) analysiert. Um die Ausschüttung von Neuropeptid Y zu untersuchen, wurde Anti-Neuropeptid Y als Antikörper herangezogen.

Die Auswertung zeigte, dass es in den untersuchten Pulpengebieten der unterschiedlichen Altersstufen eine verschieden hohe NPY-Ausschüttung gab. Die Menge der NPY-Immunreaktionen war bei den Kontrollgruppen höher als in den Versuchsgruppen. Die geringste Ausschüttung erfolgte im Pulpenhorn, gefolgt vom Pulpencavum. Diese beiden Gebiete zeigten in der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine starke Reduktion in der NPY-Freisetzung. In der Wurzelregion fand sich die größte Menge NPY-immunoreaktiver Fasern. Die höchste Ausschüttung von NPY erfolgte in der Kontrollgruppe im Pulpenhorn und –cavum nach 60 Tagen, in der Wurzel nach 90 Tagen.

Daraus lässt sich folgern, dass die NPY-Ausschüttung in der Pulpa vom physiologischen Alterungsprozess beeinflusst wird. Der Einfluss von Capsaicin auf die Wurzelregion ist gegenüber der Kronenpulpa gering. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine systemische Capsaicin-Gabe die Ausschüttung von NPY signifikant hemmt. Die fehlenden sensorischen Neuropeptide nach einer systemischen Desensibilisierung üben vermutlich einen hemmenden Effekt auf die Aktivität sympathischer Nervenfasern in der Pulpa aus.

Düsseldorf, den 18. März 2009

Ch here