

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

Westdeutsche Kieferklinik  
Poliklinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Endodontologie  
Komm. Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. T. Beikler

# **Neuronale Veränderungen im Pulpa-Dentin-Komplex nach neonataler Desensibilisierung durch systemische Capsaicinapplikation**

**Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Zahnmedizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
vorgelegt von

**Susanne Hahner**

2012

Als Inauguraldissertation gedruckt  
Mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. W.H.-M. Raab

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. U. Stüttgen

In Liebe und Dankbarkeit meiner Mutter gewidmet.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>6</b>
1.1	Allgemein.....	6
1.2	Pulpa dentis.....	7
1.2.1	Anatomie.....	7
1.2.2	Zelltypen.....	9
1.2.3	Nervenfasertypen.....	14
1.2.4	Mikrozirkulation.....	17
1.3	Neuropeptide.....	19
1.3.1	Calcitonin gene-related peptide (CGRP).....	20
1.3.1.1	Vorkommen.....	20
1.3.1.2	Wirkungsweise.....	22
1.3.2	Substance P (SP).....	24
1.3.2.1	Vorkommen.....	24
1.3.2.2	Wirkungsweise.....	25
1.4	Capsaicin.....	28
1.4.1	Lokale Wirkung.....	29
1.4.2	Systemische Wirkung.....	31
1.4.3	Auswirkungen auf dentale Strukturen .....	33
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER STUDIE.....</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODE.....</b>	<b>36</b>
3.1	Tierstudienmodell.....	36
3.2	Capsaicin-Applikation.....	37
3.3	Intravitalperfusion und Fixierung.....	38
3.4	Gewebevorbereitung.....	40
3.5	Immunhistochemische Darstellung von Nervenfasern.....	41
3.6	Immunhistochemische Analyse.....	45
3.6.1	Lichtmikroskopie und Fotografie.....	45
3.6.2	Scion Image.....	45
3.6.3	Statistische Auswertung.....	46
3.6.3.1	SPSS.....	46
3.6.3.2	Student T-Test.....	46

3.6.3.3	Bonferroni Post-Hoc Test.....	46
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>47</b>
4.1	CGRP.....	47
4.1.1	Histologische Ergebnisse.....	47
4.1.2	Statistische Datenanalyse.....	56
4.2	Substance P.....	63
4.2.1	Histologische Ergebnisse.....	63
4.2.2	Statistische Datenanalyse.....	72
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>78</b>
5.1	Allgemein.....	78
5.2	Innervation der dentalen Pulpa unter physiologischen Bedingungen.....	81
5.3	Vergleich des Vorkommens und Verteilungsmusters CGRP- und SP-immunreaktiver Nervenfasern unter physiologischen Bedingungen .....	84
5.4	Auswirkungen einer neonatalen systemischen Desensibilisierung auf CGRP- und SP-immunreaktive Nervenfasern in der dentalen Pulpa.....	86
5.5	Auswirkung einer neonatalen systemischen Desensibilisierung auf dentale Gewebe... ..	89
5.6	Schlussfolgerung.....	91
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>92</b>
<b>7</b>	<b>CURICULUM VITAE.....</b>	<b>106</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>107</b>
<b>9</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>108</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Allgemein

Die dentale Pulpa stellt ein komplexes physiologisches Netzwerk aus verschiedenen Geweben und Zellen dar. Umgeben wird diese vom von Odontoblasten gebildeten Dentin. Aufgrund der engen topographischen Lage und der Interaktion zwischen der Pulpa und dem Dentin spricht man häufig vom so genannten Pulpa-Dentin-Komplex (Pashley 1996; Torneck 1998). Dieser bildet eine funktionelle Einheit, dessen genaue Aufgabe und Auswirkung auf andere Zellen bis heute noch nicht vollständig geklärt werden konnte.

So können äußere Reize zu einer Stimulierung von innerhalb der Pulpa gelegenen Nervenfasern führen, welche daraufhin Neuropeptide freisetzen (Kvinnsland and Heyeraas 1992; Byers and Taylor 1993; Awawdeh, Lundy et al. 2002) und somit eine pulpale Entzündung initiieren. In diesem Zusammenhang nehmen die sensorischen Nervenfasern eine besondere Rolle ein, da sie an verschiedenen regulatorischen Prozessen, unter anderem an der Regulation der Blutzirkulation, maßgeblich beteiligt sind (Kim 1990; Olgart, Edwall et al. 1991; Heyeraas and Kvinnsland 1992).

Die neonatale Applikation von Capsaicin zeigte bereits in vergangenen Studien eine selektive Desensibilisierung von nozizeptiven Fasern innerhalb der dentalen Pulpa. Zudem wurde beobachtet, dass eine Reduktion von funktionsfähigen nozizeptiven Fasern in der Pulpa zu einer Veränderung der Dentinstruktur führt (Krage, Lambrichts et al. 2001).

Weiterführend sollte nun in dieser Studie anhand des gleichen Studienmodells untersucht werden, wie sich das nozizeptive System der Pulpa über einen längeren Beobachtungszeitraum entwickelt und inwieweit eine neonatale Desensibilisierung mittels Capsaicin in Abhängigkeit von der Zeit, Einfluss auf dieses System nimmt.

## **1.2 Pulpa dentis**

### **1.2.1 Anatomie**

Die Zahnpulpa, aufgebaut aus stark vaskularisiertem Bindegewebe, Nervengewebe und Lymphgefäßen, befindet sich in der allseits von Zahnhartsubstanz umschlossenen Pulpahöhle und beschreibt die verkleinerte Form eines Zahnes. Makroskopisch kann die Kronenpulpa mit ihren Pulpenhörnern von der Wurzelpulpa unterschieden werden. Im apikalen Bereich verzweigt sich die Pulpa in Ramifikationen und steht über das Foramen apicale und zahlreiche akzessorische Kanäle mit dem umliegenden Gewebe in Verbindung (Hellwig, Klimek et al. 2007).

Mikroskopisch zeigt sich ein strukturierter Aufbau der Pulpa. Die äußere Begrenzung wird durch die Odontoblastenzellschicht gebildet, welche von einem Netzwerk von Kapillaren (Kishi and Takahashi 1990) und freien Nervenendigungen aus dem Raschkowschen Plexus (Byers 1994) durchzogen wird. Zudem finden sich zwischen den Odontoblasten Kollagenfibrillen (Wigglesworth, Longmore et al. 1986; Bishop, Malhotra et al. 1991; Salomon, Septier et al. 1991), Proteoglykane (Takagi, Hishikawa et al. 1990; Yoshiba, Yoshiba et al. 1996) und Fibronektin (Yoshiba, Yoshiba et al. 1994; Yoshiba, Yoshiba et al. 1995) als Bestandteil fibrillärer Strukturen.

Unterhalb der Odontoblastenzellschicht schließt sich eine Zone an, in der wenige Zellen anzutreffen sind. Daher wird sie als zellfreie oder Weilsche Zone bezeichnet. Dominiert wird die Weilsche Zone von einem Netzwerk aus zumeist unmyelinisierten Nervenfasern, Blutkapillaren und Fibroblastenfortsätzen (Pashley and Liewehr 2006). Die meisten dieser Strukturen scheinen diese Zone auf dem Weg zur Odontoblastenzellschicht zu durchkreuzen (Byers, Neuhaus et al. 1982). Das Ausmaß der zellarmen Zone ist abhängig vom funktionellen Status der Pulpa (Coure

1986). Während der Dentinbildung ist diese Zone zumeist nicht sichtbar. Zentralwärts lagert sich eine zellreiche Zone, die so genannte bipolare Zone, an. Sie ist durch das Vorkommen einer hohen Zelldichte gekennzeichnet, so dass hier vermehrt Fibroblasten, undifferenzierte Mesenchymzellen, Makrophagen, dendritische Zellen oder Stammzellen zu finden sind (Pashley and Liewehr 2006).

Unterhalb der bipolaren Zone befindet sich der Raschkowsche Plexus. Innerhalb dieses Plexus können Fibroblasten, Bündel aus unmyelinisierten Axonen in Verbindung mit Schwannzellen und Kapillaren nachgewiesen werden. Myelinisierte Axone befinden sich nahe am, jedoch nur spärlich innerhalb des Plexus (Byers, Neuhaus et al. 1982). Das Zentrum der Pulpa beinhaltet Fibroblasten, größere Blutgefäße und Nervenfasern (Pashley and Liewehr 2006). Undifferenzierte Mesenchymzellen und immunkompetente Zellen, unter anderem Makrophagen, sind hauptsächlich perivaskulär lokalisiert (Okiji 2002).

### 1.2.2 Zelltypen

Die Pulpa besteht aus lockerem Bindegewebe. Hauptbestandteile des Bindegewebes sind die extrazelluläre Matrix und die darin befindlichen Bindegewebszellen. Die wichtigsten Zellen der Pulpa sind Odontoblasten, Fibroblasten, undifferenzierte Mesenchymzellen und Abwehrzellen.

**Odontoblasten** sind hochdifferenzierte Zellen, deren Aufgabe es ist, die Dentinmatrix zu bilden (Pashley and Liewehr 2006). Entwicklungsgeschichtlich sind Odontoblasten ektomesenchymaler Herkunft, also der Neuralleiste entstammend. Während der Zahnentwicklung werden die undifferenzierten Zellen der Zahnpapille durch die Freisetzung von Signalmolekülen und Wachstumsfaktoren aus Zellen des inneren Schmelzepithels zur Differenzierung angeregt. Über Präodontoblasten entwickeln sie sich zu Odontoblasten (Nanci 2008) und liegen außerhalb des Dentins in einer palisadenförmigen Zellschicht an der Pulpa-Dentin-Grenze vor. Ihre Zellkörper unterscheiden sich je nach Lokalisation und Aktivität in ihrer Morphologie. In der Kronenpulpa sind sie lang und hochprismatisch, im mittleren Bereich eher kurz und hochprismatisch und erscheinen letztendlich in der Wurzelpulpa als kuboidal bis flach (Coure 1986). Die Odontoblasten sind untereinander durch zahlreiche gap junctions und Desmosomen, vor allem entlang der Pulpa-Dentin-Grenze, verbunden (Byers, Neuhaus et al. 1982).

Jeder Odontoblast besitzt apikal einen kräftigen, zytoplasmareichen Fortsatz (Tomes'sche Faser), der in einen der radiär angeordneten Dentinkanälchen eintritt und sich unterschiedlich weit durch das unmineralisierte Prädentin bis in die mineralisierten Bereiche der Dentinmatrix erstreckt (Jean, Kerebel et al. 1986).

Innerhalb des Dentins sind die Odontoblasten über Seitenäste ausgehend von den einzelnen Hauptfortsätzen miteinander verbunden (Mjor and Nordahl 1996).

Wie bereits erwähnt synthetisieren Odontoblasten die organische Matrix des Prädentins und des Dentins. Hierzu gehören Kollagen, hauptsächlich des Typen I (Lesot, Osman et al. 1981), und verschiedene Proteoglykane (Breschi, Lopes et al. 2002). Neben diesen zählen mehrere nichtkollagene Proteine, unter anderem Knochen-Sialoprotein (Chen, McCulloch et al. 1993), Dentin-Sialoprotein (Butler, D'Souza et al. 1992), Phosphophorin (Butler, D'Souza et al. 1992), Osteocalcin (Bronckers, Gay et al. 1987; Gorter de Vries, Quartier et al. 1987), Osteonektin (Reichert, Storkel et al. 1992) und Osteopontin (Bronckers, Lyaruu et al. 1989) zu den Produkten der Odontoblasten. Schließlich synthetisieren sie noch Enzyme, welche lysosomal wirken bzw. der Mineralisation des Dentins dienen (Pashley and Liewehr 2006).

Eine hohe Aktivität der Odontoblasten zeigt sich speziell während des frühen Stadiums der Dentinformaion, in dem die Zellkörper hochprismatisch mit einem Durchmesser von 5 bis 7  $\mu\text{m}$  und einer Länge von 40  $\mu\text{m}$  in Erscheinung treten. Nach diesem Stadium verringert sich ihre Aktivität und es kommt zu einer Abflachung der Zellkörper (Coure 1986).

**Fibroblasten** stellen die am häufigsten vertretene Art von Zellen in der Pulpa dar (Pashley and Liewehr 2006). Wie bei den Odontoblasten spiegelt sich auch bei den Fibroblasten ihr Aktivitätsstadium in ihrem äußeren Erscheinungsbild wieder. In einer jungen Pulpa synthetisieren sie Matrix, so dass sie zu diesem Zeitpunkt ein plumpes Zytoplasma und eine erhebliche Menge an Organellen, welche für die Synthese und Sekretion erforderlich sind, aufweisen. Mit zunehmendem Alter reduziert sich der

Bedarf und die Fibroblasten treten als abgeflachte, spindelförmige Zellen in Erscheinung (Nanci 2008).

Fibroblasten sind als dreidimensionales Netzwerk innerhalb des gesamten Pulpagewebes angeordnet und besitzen viele irreguläre Fortsätze, mit denen sie bis in die unterhalb der Odontoblastenzellschicht gelegene kernarme Weilsche Zone reichen.

Die höchste Dichte an Fibroblasten zeigt sich in der zellreichen Zone der Kronenpulpa (Pashley and Liewehr 2006). In ihrer aktiven Form dienen sie der Bildung des Kollagentypen I und III, sowie der Synthese von Bestandteilen der extrazellulären Matrix, Proteoglykane, Glycosaminoglykane (Pashley and Liewehr 2006) und Fibronectin (van Amerongen, Lemmens et al. 1984). Des Weiteren sind sie zur Phagozytose und zum Abbau von Kollagen fähig, so dass durch sie der Turn over des Kollagens innerhalb der Pulpa bestimmt wird (Pashley and Liewehr 2006).

Fibroblasten sind maßgeblich an der Pathogenese der pulpalen Inflammation beteiligt, indem sie proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 und IL-8 als Antwort auf bakterielle Reize produzieren (Yang, Huang et al. 2003; Coil, Tam et al. 2004). Killough et al. (2009) konnten in ihrer in vitro Studie zeigen, dass Fibroblasten durch die Expression von Substance P, sowie dem NK1-Rezeptor bei der Entstehung einer neurogenen Entzündungen der Pulpa mitwirken (Killough, Lundy et al. 2009).

**Undifferenzierte Mesenchymzellen** sind ebenfalls in der Pulpa zu finden. Sie repräsentieren den Pool, aus dem sich die Bindegewebszellen der Pulpa ableiten. Lokalisiert sind diese in der zellreichen Zone und im Zentrum der Pulpa und sind meistens in der näheren Umgebung von Gefäßen anzutreffen. Das anhaltende

Einwirken unphysiologischer Reize auf die Pulpa kann bei Erreichen einer bestimmten Intensität zu einer Umwandlung der Mesenchymzellen zu Odontoblasten oder Fibroblasten führen, welche dann den Verlust dieser Zellen kompensieren. Vermindert sich in einer älteren Pulpa die Zahl der so genannten Ersatzzellen, so reduziert sich das Regenerationspotential der Pulpa und somit auch die Fähigkeit zur Reparaturdentinbildung (Nanci 2008).

Zu den **immunkompetenten Zellen** der Pulpa gehören Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. Die Familie der **Lymphozyten** umfasst Zellen, die der spezifischen Entzündungsreaktion dienen. Funktionell und immunhistochemisch werden die T-Lymphozyten von den B-Lymphozyten unterschieden.

T-Lymphozyten sind entscheidend für die spezifische zelluläre Abwehr. Sie produzieren antigenspezifische Oberflächenrezeptoren, die fremde Antigene an der Oberfläche körpereigener Zellen erkennen. Es werden vier verschiedene T-Lymphozyten unterschieden. Diese sind T-Gedächtniszellen, T-Helferzellen, T-Suppressorzellen und T-Killerzellen. Bereits in der gesunden Pulpa des Menschen können T-Lymphozyten vorwiegend entlang von Blutgefäßen und in zentralen Anteilen der Pulpa nachgewiesen werden (Jontell, Gunraj et al. 1987), wohingegen B-Lymphozyten in der gesunden Pulpa nicht (Jontell, Gunraj et al. 1987) oder nur vereinzelt angetroffen werden können (Hahn, Falkler et al. 1989; Izumi, Kobayashi et al. 1995).

B-Lymphozyten differenzieren sich zu antikörperproduzierenden Zellen, den so genannten Plasmazellen, und übernehmen eine tragende Rolle in der humoralen Abwehr. Das Vorkommen von Lymphozyten in der Pulpa ist vergleichbar mit dem in

anderen Geweben. Sie erscheinen entlang der Blutgefäße im Pulpenzentrum und in reduzierter Zahl auch entlang zellulärer Strukturen.

**Makrophagen** sind Bestandteil des mononukleären Phagozytosesystems und daher der Phagozytose von Fremdkörpern und körpereigenen zerstörten oder degenerierten Zellen befähigt. Innerhalb der Pulpa sind sie im Zentrum lokalisiert (Nanci 2008). Durch Bildung von parakrinen Faktoren besitzen sie die Fähigkeit, Entzündungsreaktionen und spätere Reparaturvorgänge zu steuern, sowie mittels Prostaglandinen und Leukotrienen die Durchblutung zu regulieren. In der Pulpa treten sie vor allem in der Nähe von Blutgefäßen in Erscheinung (Pashley and Liewehr 2006).

### **Dendritische Zellen**

In noch nicht durchgebrochenen Zähnen können sie rund um, in Pulpen bereits durchgebrochener Zähne unterhalb der Odontoblastenzellschicht nachgewiesen werden. Dabei stehen sie in enger Beziehung zu den vaskulären und neuronalen Komponenten der Pulpa. In ihrer Funktion ähneln die dendritischen Zellen den Langerhanszellen des Epithels, wobei sie körperfremde Antigene erfassen und diese den T-Lymphozyten präsentieren (Nanci 2008).

### 1.2.3 Nervenfasertypen

Der Zahn und seine umgebenden Gewebe werden von einer großen Zahl sensorischer Fasern, deren Zellkörper im Ganglion trigeminale lokalisiert sind, innerviert (Fink, Kish et al. 1975; Marfurt and Turner 1983; Byers 1984; Fried, Aldskogius et al. 1988). Einen geringeren Anteil der Innervation machen sympathische Fasern des autonomen Nervensystems aus dem Ganglion cervicale superior aus (Edwall, Gazelius et al. 1985; Fried, Aldskogius et al. 1988; Wakisaka 1990).

Die Nervenfasern treten gebündelt über das Foramen apicale und akzessorische Kanäle in die Pulpenkammer ein, fächern sich im koronalen Anteil der Pulpa stark auf und erreichen mit freien Nervenendigungen sowohl die Odontoblastenzellschicht, als auch das Prädentin und die inneren Anteile des Dentins (Byers, Närhi et al. 1988; Byers 1994).

Morphologisch lassen sich hier sechs verschiedene Typen sensorischer Nervenfasern unterscheiden. Es handelt sich um A-beta Fasern, schnell leitende A-delta, polymodal langsam leitende A-delta Fasern, nozizeptive C-Fasern, Neurotrophic-Faktor regulierte C-Fasern und polymodale nozizeptive C-Fasern (Fearnhead 1961; Byers, Neuhaus et al. 1982; Gunji 1982; Byers 1984; Maeda, Iwanaga et al. 1986; Byers, Narhi et al. 1987; Byers, Närhi et al. 1988; Byers 1990; Byers 1994; Byers and Narhi 1999).

A-beta Fasern sind myelinisiert und in der Pulpa verhältnismäßig gering vertreten. Hauptsächlich innervieren diese das Dentin und das Areal der Pulpa-Dentin-Grenze im Bereich der Spitze der Pulpenhörner. Auf eine mechanische Stimulation des Dentins reagieren sie von allen Fasertypen am empfindlichsten (Dong, Chudler et al. 1985; Narhi 1985).

25 bis 50% der nervösen Versorgung der Pulpa machen jedoch schnellleitende myelinisierte A-delta Fasern aus. Ihr Innervationsgebiet erstreckt sich von der Odontoblastenzellschicht im koronalen Bereich der Pulpa bis zum Prädentin und Dentin. Am häufigsten treten A-delta Fasern an der Spitze der Pulpenhörner auf. Die Nervenendigungen innerhalb des Dentins zeigen eine enge Lagebeziehung zu den in den Dentintubuli befindlichen Odontoblastenfortsätzen. Auf Stimuli reagieren sie an ihren Axonendigungen mit der Freisetzung des Neuropeptides calcitonin gene-related peptide (CGRP) und exprimieren einen Rezeptor für den nerve growth factor (NGF).

Neben den schnellleitenden A-delta Fasern finden sich auch in geringem Maß langsam leitende dünne A-delta Fasern, die sich durch eine Capsaicin-Sensibilität auszeichnen. Sie enden vornehmlich innerhalb des Pulpagewebes (Ikeda, Tokita et al. 1997).

Den Hauptvertreter der Nervenfasern innerhalb des Pulpa-Dentin-Komplexes bilden unmyelinisierte, langsam leitende C-Fasern. Die meisten dieser Fasern scheinen trotz der Variationen in ihrer Morphologie und terminalen Verzweigung in ihrer Funktion überein zustimmen. Die Nervenendigungen der C-Fasern befinden sich vor allem in peripheren Bereichen der Pulpa oder entlang von Blutgefäßen (Awawdeh, Lundy et al. 2002).

Alle C-Fasern exprimieren NGF-Rezeptoren und Neuropeptide, wie Substance P, CGRP oder Neurokinin A (Silverman and Kruger 1987; Wakisaka 1990; Fristad, Heyeraas et al. 1994; Fried, Nosrat et al. 2000; Pan, Naftel et al. 2000).

Verschiedene Studien konnten bereits in der Vergangenheit zeigen, dass eine Stimulation der sensorischen Nervenfasern in der Pulpa zu einer Vasodilatation der

Gefäße führt (Kim 1990; Olgart, Edwall et al. 1991; Heyeraas and Kvinnsland 1992), der die Freisetzung von Neuropeptiden wie SP und CGRP zugrunde liegt.

Der Eigenschaft zur Bildung vasodilatatorischer Neuropeptide der sensorischen Nervenfasern steht die Eigenschaft zur Bildung vasokonstriktorischer Neuropeptide der sympathischen Nervenfasern entgegen. Diese unterliegen zahlenmäßig den sensorischen Fasern und sind vorwiegend zentral in der Pulpa und entlang der Blutgefäße lokalisiert (Pohto and Antila 1972). Die Stimulation dieser Fasern führt zu einer Konstriktion der Arteriolen und somit zu einer Verminderung des Blutflusses (Edwall and Kindlova 1971; Aars, Brodin et al. 1993).

Die Zahl und das Ausmaß der Nervenfasern können abhängig von verschiedenen Faktoren wie dem Alter (Fried 1992; Swift and Byers 1992), der Verletzung des Zahnes (Byers 1996; Byers and Narhi 1999; Byers 2002; Byers, Suzuki et al. 2003) oder aufgrund einer Karies (Rodd and Boissonade 2001) variieren. So kommt es im entzündeten Gewebe als Reaktion auf einen Reiz zu einem so genannten „nerve sprouting“, wobei Nervenfasern vermehrt in das entzündete Gebiet einsproßen und der Gehalt an den Neuropeptiden CGRP und SP enorm zunimmt (Byers 1992; Byers 1996; Byers and Narhi 1999; Byers 2002; Byers, Suzuki et al. 2003). Klingt die Entzündung ab, reduziert sich auch die Zahl an Nervenfasern wieder.

#### 1.2.4 Mikrozirkulation

Die dentale Pulpa stellt ein mikrovaskuläres System dar, welches durch das Vorkommen von Arteriolen und Venolen gekennzeichnet ist. Arterien und Venen sind hingegen nicht zu finden (Zhang, Nagata et al. 1998).

Ein oder manchmal auch zwei Arteriolen (Durchmesser 150µm) treten gemeinsam mit sensorischen und sympathischen Nervenfaserbündeln über das Foramen apicale in die Pulpa ein. Die kleineren Gefäße ohne begleitende Nervenfaserbündel erreichen das Innere des Zahnes über die kleineren Foramina (Nanci 2008). Innerhalb der Pulpa gelangen die Arteriolen über den zentralen Teil der radikulären Pulpa nach koronal und geben dort Äste ab, welche Richtung Odontoblastenzellschicht ziehen und unterhalb dieser Schicht einen Kapillarplexus bilden (Kramer 1968; Corpron, Avery et al. 1973; Yoshida and Ohshima 1996). Den efferenten Teil der Blutzirkulation macht ein ausgedehntes System aus Venolen, welches über arteriovenöse Anastomosen mit den Arteriolen verbunden ist, aus. Die Venolen zeigen gegenüber den Arteriolen einen vergleichbaren Durchmesser, sind jedoch bezüglich der Gefäßwände deutlich dünner, wodurch ihr Lumen verhältnismäßig größer ist. Beim Austritt über das apikale Foramen liegen die Gefäße in enger topographischer Beziehung zu den eintretenden Arteriolen und Nervenbündeln (Nanci 2008).

Die Wände der Arteriolen und Venolen sind von glatten Muskelzellen umgeben, welche von unmyelinisierten sympathischen Nervenfasern innerviert werden. Sie zeichnen sich durch eine hohe Sensibilität gegenüber vielen vasoaktiven Substanzen aus (Aars, Brodin et al. 1993; Yu, Boyd et al. 2002; Yu, Boyd et al. 2002). Die Stimulation der Nervenfasern führt dabei zu einer Kontraktion der glatten Muskelzellen und damit zu einer Vasokonstriktion.

Bei der pulpalen Mikrozirkulation handelt es sich um ein dynamisches System, welches in Abhängigkeit laufender metabolischer Prozesse den Blutfluss regulieren und durch Änderung der Blutzirkulation, durch die Freisetzung von Proteinen aus dem Endothel sowie der Rekrutierung von Zellen des Immunsystems auf inflammatorische Stimuli reagieren kann.

Der Austausch der verschiedenen Stoffe zwischen den Kapillaren und dem interstitiellen Raum wird durch zwei verschiedene Determinanten bestimmt. Durch die Kontrolle der Mikrozirkulation kann zum einen der Blutfluss lokal in den pulpalen Regionen mit dem höchsten metabolischen Umsatz erhöht werden. Zum anderen kann durch verschiedene regulatorische Prozesse der Stoffaustausch zwischen vaskulärem und interstitiellem Raum kontrolliert werden. Die Höhe des Austausches wird durch die Anatomie der Gefäße und durch die Zusammensetzung und den Konzentrationsgradienten der Substanzen bestimmt.

Im Rahmen einer Entzündungsreaktion kann es durch die Freisetzung von vasoaktiven Substanzen zu einer Vasodilatation kommen. Die Gefäße können sich jedoch aufgrund der Anatomie der Pulpenkammer nur begrenzt ausdehnen, so dass dies zwangsläufig zu einer Erhöhung des Gewebedruckes führt (Heyeraas and Kvinnsland 1992; Heyeraas and Berggreen 1999).

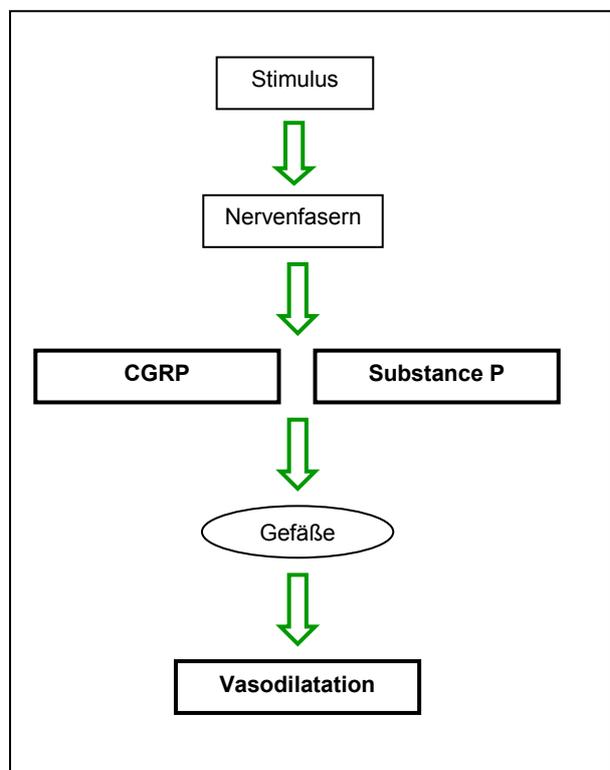


Abb.2: Auswirkungen der Neuropeptide CGRP und SP auf die Mikrozirkulation (Caviedes-Bucheli et al. 2008)

### **1.3 Neuropeptide**

Neuropeptide repräsentieren die größte Gruppe der Neurotransmittersubstanzen. Typischerweise bestehen sie aus Polypeptidketten von 3-100 Aminosäuren und sind bis zu 50mal größer als die klassischen Neurotransmitter (Caviedes-Bucheli, Munoz et al. 2008). Neuropeptide können im gesamten menschlichen Körper nachgewiesen werden und sind in jedem Ast, vom zentralen bis hin zum peripheren Nervensystem, sowohl in autonomen als auch somatosensorischen Neuronen, anzutreffen (Fallgren, Ekblad et al. 1989; Edvinsson, Mulder et al. 1998). Neuropeptide können auch als Neurotransmitter oder Neuromodulatoren definiert werden, da sie von Neuronen synthetisiert und freigesetzt werden. Durch die Aktivierung von Rezeptoren, lokalisiert auf der Zielzelle können sie biologische Effekte hervorrufen (Hoyle 1995). Sie erfüllen verschiedene Funktionen, da sie sowohl als Neurotransmitter, als Wachstumsfaktor, als Hormon oder Signalmolekül innerhalb des Immunsystems agieren können. Daraus kann geschlossen werden, dass das Nervensystem über die Ausschüttung von Neuropeptiden an der Pathophysiologie peripherer Entzündungsprozesse mitwirkt und viele entzündliche Prozesse einschließlich der oralen Erkrankungen wie Parodontitis oder der Pulpitis eine neurogene Komponente enthält (Lundy and Linden 2004).

Die Neuropeptide der sensorischen Nervenfasern in der Pulpa nehmen eine bedeutende Rolle für die Aufrechterhaltung des Pulpa-Dentin-Komplexes ein.

Daher soll nun ein Augenmerk auf eine ausgewählte Gruppe sensorischer Neuropeptide geworfen werden, die mittels immunhistochemischer Analysen in der dentalen Pulpa nachgewiesen werden konnten (Byers 1992; Awawdeh, Lundy et al. 2002; Caviedes-Bucheli, Lombana et al. 2006).

### 1.3.1 Calcitonin gene-related peptide (CGRP)

Calcitonin gene-related peptide (CGRP) ist ein aus 37 Aminosäuren aufgebautes Peptid, das als Resultat alternierenden Spleißens aus dem Calcitonin Gen hervorgeht. Bis jetzt konnten zwei Formen des Peptids isoliert werden, CGRP- $\alpha$  und CGRP- $\beta$  (oder auch CGRP-I und CGRP-II). Diese unterscheiden sich innerhalb der Ratte (s.Abb.3) durch eine (Amara, Arriza et al. 1985), beim Menschen durch 3 Aminosäuren (Steenbergh, Hoppener et al. 1985). Innerhalb der sensorischen Nervenfasern liegt die Konzentration an CGRP- $\alpha$  drei- bis sechsmal höher als an CGRP- $\beta$  (Mulderry, Ghatei et al. 1988).

<b>CGRP <math>\alpha</math> S-C-N-T-A-T-C-V-T-H-R-L-A-G-L-L-S-R-S-G-G-V-V-K-D-N-F-V-P-T-N-V-G-S-K-E-F</b>
<b>CGRP <math>\beta</math> S-C-N-T-A-T-C-V-T-H-R-L-A-G-L-L-S-R-S-G-G-V-V-K-D-N-F-V-P-T-N-V-G-S-K-A-F</b>

Abb.3: Aminosäuresequenz des Neuropeptides calcitonin gene-related peptide (CGRP) der Ratte (Amara, Arriza et al. 1985)

CGRP ist eines der am meisten verbreiteten Peptide innerhalb des Nervensystems.

#### 1.3.1.1 Vorkommen

Calcitonin gene-related peptide (CGRP) ist im zentralen und peripheren Nervensystem weit verbreitet und häufig gemeinsam mit Substance P lokalisiert. Besonders in sensorischen Nerven tritt es in hohen Konzentrationen auf. 40-50% der Neurone des Ganglion spinale machen CGRP-immunreaktive Zellen aus (Gibson, Polak et al. 1984). Primär afferente Neurone beinhalten CGRP, welche aus dem Ganglion trigeminale stammend in die dentale Pulpa ziehen (Wakisaka 1990; Uddman, Kato et al. 1999; Caviedes-Bucheli, Camargo-Beltran et al. 2004). CGRP gelangt dabei via axonalem Transport in die oralen Gewebe (Amara, Jonas et al. 1982; Silverman and Kruger 1987).

CGRP-positive sensorische Neurone sind zumeist relativ langsam leitend (unmyelinisierte C-Fasern und dünn myelinisierte A-delta Fasern). Nur bei etwa 10-15% der CGRP-positiven Zellen konnte eine schnellere Leitfähigkeit im Bereich von dick myelinisierten A-alpha/ -beta Fasern nachgewiesen werden (Alvarez, Kavookjian et al. 1993). In der Rattenpulpa gelang es Byers et al. 1992, CGRP enthaltende myelinisierte A-Fasern, sowie unmyelinisierte C-Fasern zu identifizieren (Byers 1992).

Mittels immunhistochemischer Nachweise konnte gezeigt werden, dass sich die CGRP-immunreaktiven Neurone in der koronalen Pulpa im Bereich der Spitzen der Pulpenhörner extrem verzweigen und bis zu 0,1mm in das Dentin reichen (Byers, Taylor et al. 1990). Zudem konnte CGRP innerhalb des Sulcusfluids der Gingiva nachgewiesen werden (Lundy, Lamey et al. 1999).

CGRP agiert mit zwei Rezeptorsubtypen, dem CGRP1- und dem CGRP2-Rezeptor (van Rossum, Hanisch et al. 1997). Das Neuropeptid zeigt eine hohe Affinität zum CGRP1-Rezeptor (Wimalawansa 1992). Dieser konnte jedoch nicht auf Odontoblasten innerhalb eines in der Entwicklung abgeschlossenen Rattenmolars nachgewiesen werden. Es ist zu vermuten, dass CGRP1-Rezeptoren in der Pulpa hauptsächlich mit Blutgefäßen assoziiert sind (Fristad, Vandevska-Radunovic et al. 2003).

Eine Untersuchung zur CGRP-Rezeptorexpression in einer gesunden Pulpa im Vergleich zur Freisetzung während einer induzierten Inflammation und einer akuten irreversiblen Pulpitis zeigte, dass die Rezeptorexpression während einer klinisch nachweisbaren Entzündung zunimmt (Caviedes-Bucheli, Arenas et al. 2005).

### 1.3.1.2 Wirkungsweise

Die Freisetzung von CGRP führt zu breit gefächerten biologischen Effekten innerhalb verschiedener Gewebe, wie des Gehirns, des Herzens, der glatten oder auch der Skelettmuskulatur. Diese Effekte werden über die Aktivierung spezifischer Plasmamembranrezeptoren vermittelt. CGRP wird gleichzeitig mit SP freigesetzt und gehört zu einem der stärksten Vasodilatoren (Brain, Williams et al. 1985; de Hoon, Pickkers et al. 2003). Auch in der dentalen Pulpa und den umgebenden periodontalen Geweben hat sich gezeigt, dass CGRP vasoaktive Eigenschaften besitzt und eine wichtige hämodynamische Funktion übernimmt (Games, Holzer et al. 1980; Gazelius, Edwall et al. 1987; Olgart, Edwall et al. 1991). Während eines Entzündungsprozesses kommt es innerhalb des Gewebes zu einer Zunahme von afferenten Nervenfasern („nerve sprouting“) (Byers 1990; Byers 2002). Durch Ansammlung inflammatorischer Mediatoren im Entzündungsgebiet wird die Freisetzung von Neuropeptiden wie CGRP aus den Nervenfasern getriggert, was wiederum zu einer neurogenen Entzündung mit daraus resultierender Vasodilatation, Plasmaextravasation und der Rekrutierung bzw. Regulation von Immunzellen wie Makrophagen, Mastzellen und Lymphozyten führt.

Neben der Auswirkung auf die Mikrozirkulation konnten vielfältige Interaktionen von CGRP und verschiedenen Zellpopulationen in der Pulpa beschrieben werden (s.Abb.4). Dabei kommt es oft zu einer Immunsuppression, da CGRP die mitogen-induzierte Zellproliferation von T-Lymphozyten inhibiert, die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion von Makrophagen blockiert und die Antigenpräsentation der Klasse II Antigen-exprimierenden Zellen reduziert (Umeda, Takamiya et al. 1988; Nong, Titus et al. 1989). Es konnte bereits gezeigt werden, dass CGRP mit Mastzellen interagiert und sie zu der Freisetzung von Histamin induziert, was zu einer erhöhten vaskulären

Permeabilität führt und somit den Blutdruck im Gewebe erhöht (Hargreaves, Swift et al. 1994). Darüber hinaus verändert CGRP die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren, wie z.B. die Expression des Monozytenchemotaktik Proteins-1 (MCP-1) (Park, Hsiao et al. 2004). Neben den vasodilatatorischen und den immunmodulierenden Effekten üben CGRP und SP stimulatorische Effekte auf das Wachstum pulpaler Zellen wie Fibroblasten und odontoblastenähnlicher Zellen aus (Bongehiellm, Haegerstrand et al. 1995; Trantor, Messer et al. 1995).

CGRP erhöht die Expression von bone morphogenetic protein-2 Transkripten, was zu einer Differenzierung odontoblastenähnlicher Zellen und somit zur Induzierung der Dentinregeneration und der Verringerung der Dentinpermeabilität führt (Calland, Harris et al. 1997). Diese Interaktionen zwischen Neuropeptiden und pulpalen Zellen deuten darauf hin, dass Neuropeptide auch eine wichtige Rolle im Rahmen pulpaler Reparaturprozesse übernehmen.

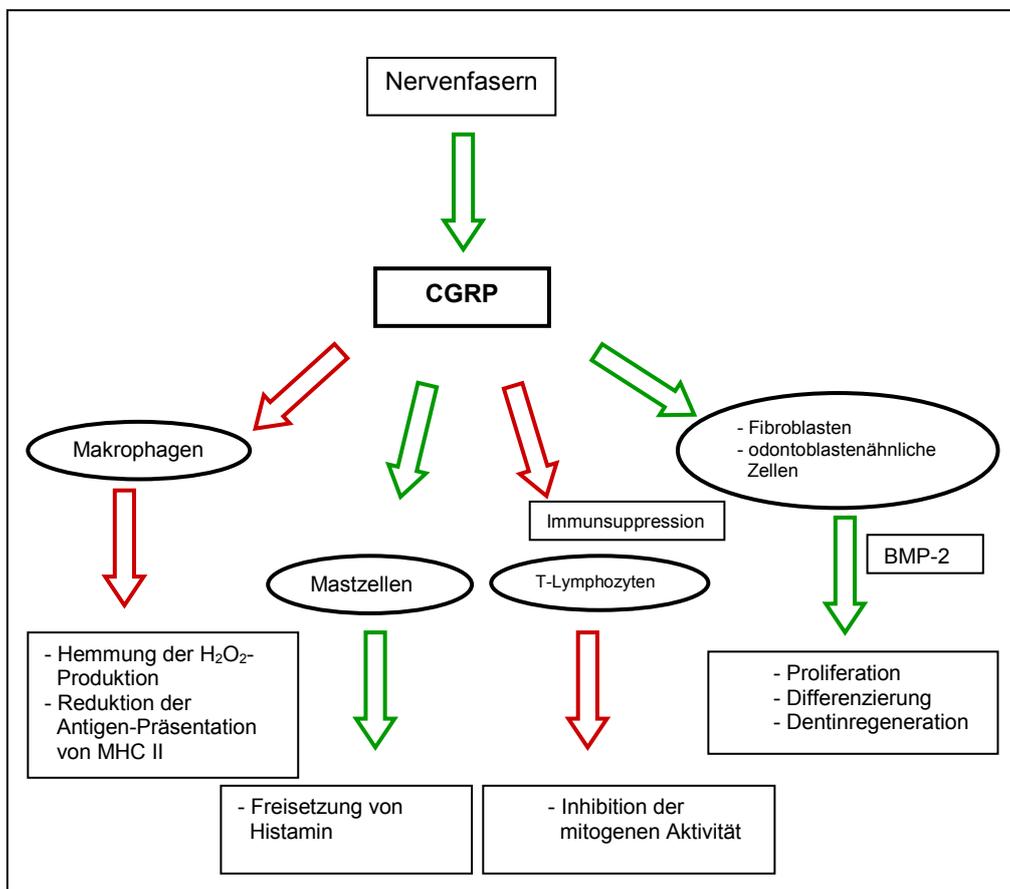


Abb.4: Interaktion zwischen CGRP und den verschiedenen Zellpopulationen in der Pulpa (Caviedes-Bucheli et al. 2008)

### 1.3.2 Substance P (SP)

Substance P (SP) ist ein aus 11 Aminosäuren aufgebautes Neuropeptid und gehört zur Familie der Tachykinine (Chang, Leeman et al. 1971). Es entsteht als Resultat alternierenden Spleißens des Präprotachykinin A-Gens (PPT-A) (Nawa, Kotani et al. 1984) und konnte im dentalen Gewebe als erstes Neuropeptid identifiziert werden (Olgart, Gazelius et al. 1977).

**Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met**

Abb.5 : Aminosäuresequenz des Neuropeptides Substance P (SP) (Chang, Leeman et al. 1971)

#### 1.3.2.1 Vorkommen

SP enthaltende Nervenfasern sind sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem weit verbreitet (Bongenhielm, Haegerstrand et al. 1995). Die die Pulpa innervierenden SP-positiven Fasern stammen aus dem Ganglion trigeminale und sind innerhalb der dentalen Pulpa in den zentralen Anteilen des Gewebes in enger Nachbarschaft zu Blutgefäßen zu finden. In der Peripherie der Pulpa sind viele dieser Fasern direkt mit kleinen Blutgefäßen assoziiert (Rodd and Boissonade 2003).

SP-positive Fasern können zudem innerhalb der Subodontoblastenzellschicht nachgewiesen werden, wo sie sich aufzweigen, Richtung Prädentin ziehen und dort mit einigen Fasern das Dentin erreichen (Wakisaka, Ischikawa et al. 1984).

Das Neuropeptid Substance P wird in den Zellkörpern der schmerzleitenden C- und A-delta Fasern synthetisiert und erreicht die terminalen Anteile der Fasern via axonalem Transport, wo es gelagert oder mittels Exozytose freigesetzt wird.

SP interagiert überwiegend mit den Neurokinin (NK) Rezeptoren, (Transmembran G Protein-gekoppelte Rezeptoren), welche in allen Bereichen des zentralen und peripheren Nervensystems gefunden werden können. Man unterscheidet drei verschiedene NK-Rezeptoren, den NK-1, NK-2 und NK-3 Rezeptor, wobei der NK-1 Rezeptor die größte Affinität zu Substance P aufweist. NK-1 Rezeptoren werden auf den meisten inflammatorischen Zellen, wie Mastzellen und Makrophagen und anderen Bindegewebszellen gefunden (Takahashi, Tanaka et al. 1992).

Es zeigte sich, dass SP eine wichtige Rolle in verschiedenen physiologischen Prozessen einnimmt, so unter anderem bei neurogenen Entzündungen (Lembeck and Holzer 1979), der Modulation von Immunzellfunktionen (McGillis, Organist et al. 1987) oder der Regulation des Wachstums von Endothelzellen (Nilsson, von Euler et al. 1985). Zudem geht man davon aus, dass SP eine tragende Rolle in der Neurotransmission von nozizeptivem Input spielt (Fleetwood-Walker 1995).

#### 1.3.2.2 Wirkungsweise

Substance P wird durch verschiedene Stimuli aus Neuronen freigesetzt. Diese können thermischen, mechanischen oder chemischen Ursprungs sein, welche dann auf den Pulpa-Dentin-Komplex wirken (Byers, Taylor et al. 1990; Takamori 2000; Caviedes-Bucheli, Correa-Ortíz et al. 2005). Zudem zeigte sich, dass die elektrische Stimulation von dünnen, unmyelinisierten afferenten C-Fasern oder auch die Verabreichung von Capsaicin zu einer Freisetzung von SP führt (Jacobsen and Heyeraas 1996). Oftmals wird SP zusammen mit CGRP und NKA am selben terminalen Ende von Nervenfasern freigesetzt. Generell führen die selben Stimuli, die eine SP-Freisetzung bewirken auch zu einer Freisetzung von NKA und CGRP (Grutzner, Garry et al. 1992; Goodis, Bowles et al. 2000; Flores, Leong et al. 2001).

Die Freisetzung von SP bewirkt eine Vasodilatation, indem es sowohl direkt auf die glatten Muskelzellen als auch indirekt abhängig von der Konzentration stimulierend auf die Histaminfreisetzung von Mastzellen wirkt (Shibata, Mio et al. 1985).

Neben der Vasodilatation (Rosell, Olgart et al. 1981) gehört die neurogene Plasmaextravasation zu den in der Pulpa beobachteten Effekten (Kerezoudis, Olgart et al. 1994).

Die SP-induzierte Kontraktion der Endothelzellen und die spätere Plasmaextravasation befähigen Substanzen wie Bradykinin oder Histamin zum Ort der Verletzung und zu afferenten Nervenendigungen zu gelangen.

Eine klinische Studie hat die Rezeptorexpression für SP an Zähnen mit irreversibler Pulpitis im Vergleich zu Zähnen mit einer gesunden Pulpa untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine deutlich höhere Rezeptorexpression während einer klinisch sichtbaren Entzündung (Caviedes-Bucheli, Gutierrez-Guerra et al. 2007). NK-1 Rezeptoren werden von den meisten inflammatorischen Zellen, wie Mastzellen und Makrophagen oder anderen Bindegewebszellen exprimiert (Takahashi, Tanaka et al. 1992).

SP wird im Gegensatz zu CGRP eine immunstimulierende Aufgabe zugeschrieben (s.Abb.6). Durch die Bindung des Neuropeptides an Makrophagen kommt es zu einer erhöhten Chemotaxis und Phagozytose dieser Zellpopulation (Bar-Shavit, Goldman et al. 1980; Ruff, Wahl et al. 1985). Zudem wird durch SP die Produktion von Arachidonsäuremetaboliten und Zytokinen durch Makrophagen gesteigert (Kimball, Persico et al. 1988; Lotz, Vaughan et al. 1988) und darüber hinaus die mitogene Aktivität und die Produktion von Zytokinen der T-Lymphozyten stimuliert (Payan, Brewster et al. 1983; Calvo, Chavanel et al. 1992).

Wie CGRP induziert auch SP die im pulpalen Gewebe befindlichen Mastzellen zur Freisetzung von Histamin mit den bereits erwähnten Folgen für den Gewebedruck (Hargreaves, Swift et al. 1994). In Zellkulturen von dentalen Pulpazellen der Ratte konnte gezeigt werden, dass durch CGRP die Zahl an T-Lymphozyten reduziert wird, wohingegen SP die Proliferation dieser steigert (Okiji, Jontell et al. 1997).

Neuropeptide modifizieren die Freisetzung anderer inflammatorischer Mediatoren. So induziert SP die Interleukin-8 Sekretion (Patel, Park et al. 2003) und steigert die Expression von lipopolysaccharidinduzierten inflammatorischen Faktoren in pulpalen Zellen (Tokuda, Miyamoto et al. 2004). Zudem reguliert SP die Expression des Monozytenchemotaktik Proteins-1 (MCP-1) (Park, Hsiao et al. 2004).

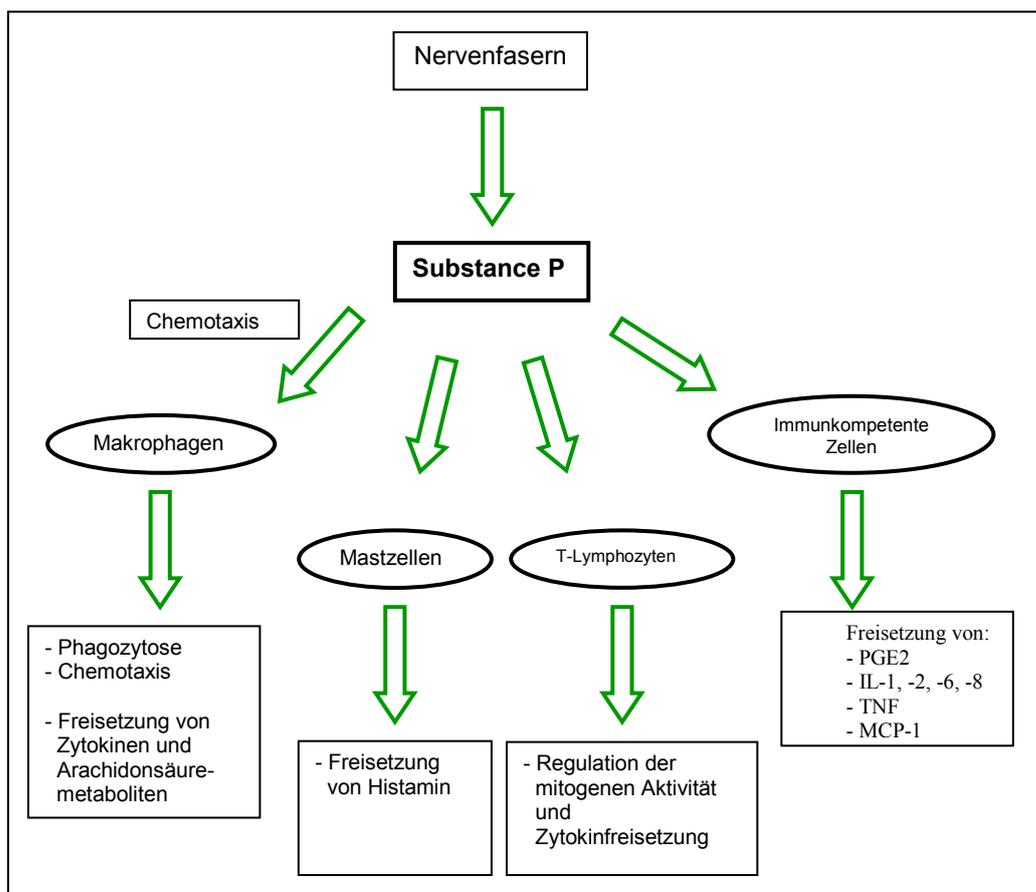


Abb.6: Interaktion zwischen Substance P und den verschiedenen Zellpopulationen in der Pulpa (Caviedes-Bucheli et al. 2008)

## 1.4 Capsaicin

Capsaicin (8-Methyl-N-vanillyl-trans-6-nonen-amid) ist ein aus Pflanzen der Gattung *Capsicum*, einer Unterart der Solanaceae, gewonnenes Alkaloid, welches bei Säugetieren zum Beispiel beim Verzehr von Paprika und Chilischoten durch Wirkung auf TRPV1-Rezeptoren einen Hitze-, bzw. Schärfereiz, hervorruft. Capsaicin und andere aus *Capsicum* gewonnene, Schmerz durch Schärfe verursachende Stoffe, werden als Capsaicinoide bezeichnet.

Die biologische Wirksamkeit des Capsaicins wird unter anderem durch die alkoholische Seitengruppe des Phenolrings vermittelt (Walpole, Wrigglesworth et al. 1993).

TRPV1 (transient receptor potential channel type 1) ist ein nichtselektiver Kationenkanal der von etwa 50% der Schmerzzellen exprimiert wird (Szallasi and Blumberg 1999). Er wurde aufgrund seiner Aktivierbarkeit durch das Vanilloid Capsaicin entdeckt und ist mittels einer cDNA-Bibliothek aus sensorischen Neuronen der Hinterwurzel- und Trigeminalganglien der Ratte kloniert worden (Caterina, Schumacher et al. 1997). TRPV1 wird neben Capsaicin auch durch noxische Hitze von über 42°C und Protonen aktiviert (Caterina, Schumacher et al. 1997; Welch, Simon et al. 2000).

### **1.4.1 Lokale Wirkung**

Wird Capsaicin oberflächlich auf die Haut aufgetragen, löst dies juckende und stechende Sensationen sowie ein Brennen auf der Haut aus. Initial kommt es dabei zu einer Vasodilatation innerhalb der Haut gelegener Gefäße, gefolgt von einer Hyperalgesie gegenüber Wärme und mechanischer Stimuli (Szolcsanyi 1977; Carpenter and Lynn 1981; Green and Flammer 1988; Culp, Ochoa et al. 1989; Simone and Ochoa 1991). Es wird angenommen, dass diese sensorischen Phänomene zum Teil das Ergebnis einer Aktivierung und Sensibilisierung von innerhalb der Haut gelegener Nozizeptoren von A- und C-Fasern sind, welche auf Hitzereize, sowie auf mechanische und chemische Stimuli reagieren (Konietzny, Perl et al. 1981; Kenins 1982; Szolcsanyi, Anton et al. 1988; Baumann, Simone et al. 1991; LaMotte, Shain et al. 1991) und daraufhin Neuropeptide, wie CGRP und Substance P, freisetzen. Eine wiederholte oberflächliche Applikation von Capsaicin führt dabei zu einer persistierenden Desensibilisierung polymodaler Nozizeptoren (Carpenter and Lynn 1981; Szolcsanyi, Anton et al. 1988) was sich durch eine Erhöhung der Reizschwelle und durch eine verminderte Empfindsamkeit gegenüber Wärmereizen äußert ohne dabei die Reizschwelle gegenüber Druck oder Kältereizen zu beeinflussen. Die Sensibilität gegenüber Hitze kehrt normalerweise zwei Wochen nach Beendigung der Anwendung wieder (Carpenter and Lynn 1981; Lynn 1990; Simone and Ochoa 1991).

Die Desensibilisierung der Nozizeptoren bildet die Grundlage für den therapeutischen Nutzen von Capsaicin. Dieser beinhaltet Veränderungen sowohl im Bereich der Physiologie als auch Morphologie der primären sensorischen Neurone. Die Auswirkungen hängen dabei von der Dosis und der Art der Verabreichung des Capsaicins, sowie von der Empfindlichkeit der Neurone und ihrer Nervenfortsätze

gegenüber der Substanz, ab. Es ist bereits bekannt, dass Capsaicin zu einer Degeneration sensorischer Neurone mit kleinem Durchmesser führt, wenn es systemisch und in hohen Dosen neugeborenen und adulten Ratten verabreicht oder direkt in den Nervenstrang appliziert wird (Lynn 1990; Holzer 1991). Es deutet vieles darauf hin, dass eine durch oberflächliche Capsaicinapplikation bedingte Desensibilisierung eher als Folge einer physiologischen Desensibilisierung als durch morphologische Veränderungen herbeigeführt wird, da kein Hinweis auf eine Degeneration von Nervenfasern oder von Zellen des Hinterwurzelganglions proximal der Capsaicinapplikation nachgewiesen werden konnte (McMahon, Lewin et al. 1991). Die Morphologie der meisten oberflächlich gelegenen Nervenfaserverendigungen innerhalb der Haut, welche dem Capsaicin direkt ausgesetzt sind, konnten jedoch bis jetzt aufgrund ihrer geringen Größe nicht untersucht werden.

Indikationen für eine lokale Capsaicin-Therapie stellen bisher neuropathische Schmerzen, wie z.B. die postzosterische Neuralgie (PZN) oder Schmerzen bei diabetischer Neuropathie, sowie entzündliche Gelenkschmerzen dar. Erklärt wurden die auftretenden positiven Effekte zum einen durch eine Desensibilisierung hypersensitiver Nozizeptoren und zum anderen durch eine Modulation eines veränderten zentralen Inputs (Dubner 1991). Bereits niedrige Konzentrationen führen zur Freisetzung von Substance P aus den Nervenendigungen, einem wichtigen Mediator bei entzündlichen Reaktionen und anderer Neurotransmitter. Wird die Anwendung über einen längeren Zeitraum fortgesetzt, kommt es zur Depletion der Neuropeptide. Diese wird als Erklärung dafür, dass auch nicht neuropathische Schmerzsyndrome wie Gelenkschmerzen bei Arthritis durch Capsaicin positiv beeinflussbar sind, angeführt (Deal, Schnitzer et al. 1991; McCarthy and McCarty 1992).

### 1.4.2 Systemische Wirkung

Wird Capsaicin Ratten (50mg/ kg KG) neonatal am zweiten Lebenstag subkutan verabreicht, führt dies zum Untergang kleiner sensorischer Ganglienzellen des B-Typen (Jancso, Kiraly et al. 1977). Die größeren A-Typ Neurone bleiben indes unberührt. Die Wirkung setzt rapide ein und bereits 30 Minuten nach Applikation können in den kleineren Neuronen strukturelle Veränderungen nachgewiesen werden. Jansco et al. berichteten, dass vier Stunden nach Capsaicinapplikation eine Degeneration der unmyelinisierten Fasern der Hinterwurzel und nach acht Stunden diese bereits in Axonterminalen in Lamina 1 und 2 des Hinterhorns eintritt (Jancso, Kiraly et al. 1977). Die Destruktion der Ganglienzellen vom B-Typ ist dabei irreversibel. An neonatal mit Capsaicin behandelten Ratten konnte durch Lawson et al. anhand morphometrischer Techniken nach zehn Lebenswochen ein Verlust von 70% dieser Zellen gezeigt werden. Die größeren Zellpopulationen blieben dabei quantitativ unverändert (Lawson and Nickels 1980).

Die Frage bestand weiter, ob es ausschließlich zu einer Degeneration von C-Fasern kommt oder auch einige dünn myelinisierte A-delta Fasern von der Degeneration betroffen sind.

Lawson konnte in neonatal capsaicinbehandelten Ratten einen Verlust von 30% A-delta Fasern und einen Verlust von 90-95% an C-Fasern im Bereich der Hinterwurzel (L4-T13) feststellen. Jancso und Kiraly berichteten über einen Verlust von 60-70% an C-Fasern und einen kleineren Verlust an dünn myelinisierten Fasern von 10% innerhalb des N. saphenus (Jancso and Kiraly 1980). Nagy et al. zeigten eine durch neonatale Capsaicinapplikation (50mg/kg KG) bedingte Reduktion von 85-95% an C-Fasern in der lumbalen Region der Hinterwurzel ohne einen Verlust an myelinisierten Fasern zu registrieren (Nagy, Hunt et al. 1981). In späteren Untersuchungen fanden

sie jedoch in manchen Fällen einen signifikanten Verlust an myelinisierten Nervenfasern mit einem Durchmesser kleiner  $3\mu\text{m}$  (Fitzgerald 1983).

Die durch Capsaicin ausgelöste Degeneration von C-Fasern kann nur bei einer Verabreichung bis zum vierzehnten Lebenstag nachgewiesen werden (Jancso and Kiraly 1980). In ausgewachsenen Tieren findet keine Degeneration von primären sensorischen Neuronen statt.

### **1.4.3 Auswirkungen auf dentale Strukturen**

Holje et al. beschrieben 1983 als erstes die Effekte einer neonatalen Capsaicinapplikation (50mg/kg KG, s.c.) auf die innerhalb der Pulpa gelegenen Nervenfasern eines Molaren am Rattenmodell (Holje, Hildebrand et al. 1983). Seit den Anfängen in den achtziger Jahren hat sich die neonatale Applikation von Capsaicin in der Forschung als ein effektives Mittel etabliert, um die nozizeptiven Fasern innerhalb der dentalen Pulpa selektiv zu desensibilisieren. Im Gegensatz zu einer Axotomie des Nervus alveolaris inferior, bei der sich ein vollständiger Verlust an Nervenfasern zeigt, führt eine neonatale Capsaicinapplikation zu einer irreversiblen Desensibilisierung, die in einer Reduktion immunoreaktiver Nervenfasern der Pulpa resultiert (Jacobsen and Heyeraas 1996). Jacobsen und Heyeraas konnten zudem zeigen, dass der Ausfall dieser Fasern zu einer verminderten Dentinbildung führt. Lawson und Nickels bewiesen durch die neonatale Gabe von Capsaicin eine verminderte Sekundärdentinbildung in Rattenmolaren (Lawson and Nickels 1980). Durch eine Studie von Krage et al. konnte gezeigt werden, dass eine capsaicinbedingte Reduktion nozizeptiver Fasern, vermutlich durch den damit verbundenen Ausfall der Odontoblastenfunktion, zu einer Veränderung der Qualität der Dentinstrukturen mit einer dadurch einhergehenden signifikanten Reduktion der Vickers Mikrohärte führt (Krage, Stiefel et al. 2005).

Die Stimulation sensorischer Fasern in der Pulpa bewirkt eine Vasodilatation, die durch Neuropeptide, wie CGRP vermittelt wird (Kim 1990). Durch den funktionellen Ausfall der Fasern nach einer Capsaicinapplikation kann dieser Prozess nicht mehr ablaufen, wodurch es zu einer verminderten Mikrozirkulation in den pulpalen Geweben kommt (Lawson 1987; Raab 1997). Erfährt die Pulpa eine elektrische Stimulation, folgt eine Veränderung der Mikrozirkulation. Diese beinhaltet initial eine

Durchblutungsminde rung gefolgt von einer Durchblutungssteigerung. Wird derselbe Reiz an zuvor mit Capsaicin behandelten Zähnen durchgeführt, kann lediglich eine Durchblutungsminde rung festgestellt werden (Raab 1992). Caviedes-Buchelli et al. untersuchten den Effekt von Capsaicin auf die Substance P-Freisetzung während einer pulpalen Entzündung. Sie konnten zeigen, dass durch eine lokale Capsaicininfiltration mit anschließender Pulpaexposition, im Gegensatz zur Kontrollgruppe eine verminderte Substance P-Freisetzung erfolgt (Caviedes-Buchelli, Azuero-Holguin et al. 2005).

Auch auf die Aktivität von Osteoklasten scheinen die CGRP- und SP-immunreaktiven Fasern Einfluss zu haben. So konnte durch Adam et al. gezeigt werden, dass eine Extraktion eines Molaren an im Vorfeld mit Capsaicin behandelten Ratten zu einer verminderten Resorptionsoberfläche post extractionem sowie zu einer reduzierten Zahl an aktiven Osteoklasten führt (Adam, Llorens et al. 2000).

Aus all diesen Ergebnissen kann zusammenfassend geschlossen werden, dass die Nervenfasern einen entscheidenden Einfluss auf die Physiologie der Pulpa-Dentin-Einheit sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch während eines Entzündungsprozesses haben und deren Ausfall Auswirkungen auf die Entwicklung dentaler Strukturen zeigen.

## 2 FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER STUDIE

Die Pulpa-Dentin-Einheit stellt ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen Geweben und Zellen dar, deren genaues Zusammenspiel bis heute noch nicht vollständig geklärt werden konnte. In diesem Zusammenhang nehmen die aus dem Ganglion trigeminale stammenden sensorischen Nervenfasern (C- und A-delta Fasern) sowohl unter physiologischen wie auch pathologischen Bedingungen durch die Freisetzung verschiedener Neuropeptide wie Calcitonin gene-related peptide (CGRP) oder Substance P (SP) eine entscheidende Rolle ein.

In dieser Studie soll nun am Modell der Wistar-Ratte über einen Beobachtungszeitraum von 30-155 Lebenstagen untersucht werden, wie sich die neonatale, systemische Applikation einer Capsaicinlösung auf das quantitative Vorkommen von CGRP- und SP-immunreaktiven Nervenfasern innerhalb der dentalen Pulpa auswirkt. Als Kontrollgruppe dienen dabei Wistar-Ratten, die neonatal eine Lösung ohne enthaltenes Capsaicin appliziert bekommen.

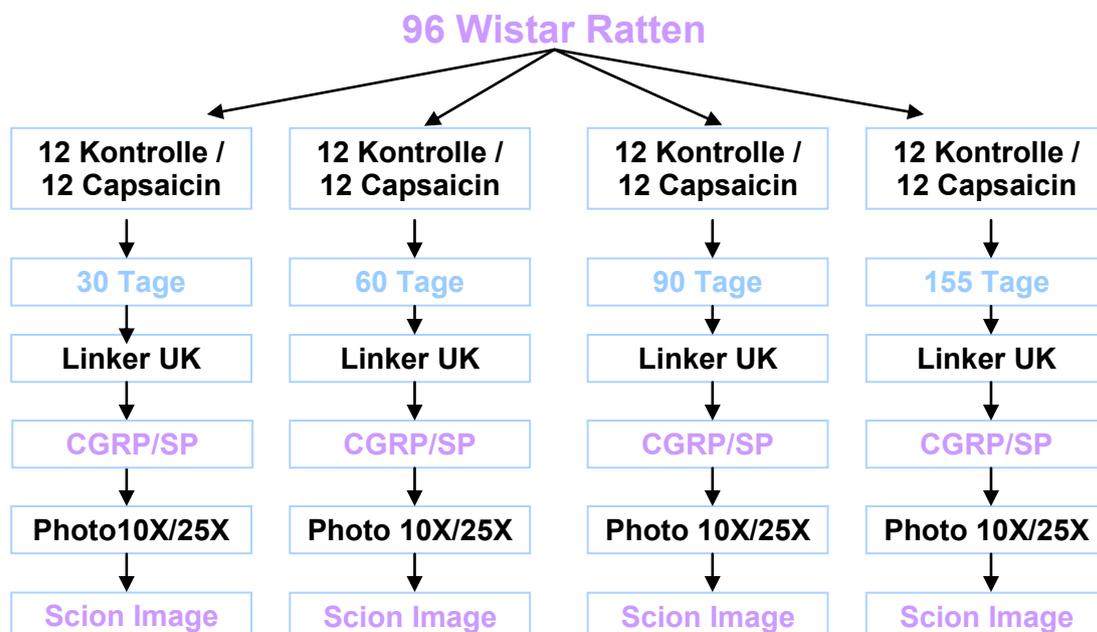
Folgendes wird dabei angenommen:

- während der Entwicklung verändert sich das quantitative Vorkommen an CGRP- und SP-immunreaktiven Nervenfasern
- die systemische Applikation von Capsaicin hat einen Einfluss auf die Zahl CGRP- und SP-immunreaktiver Nervenfasern

### 3 MATERIAL UND METHODE

#### 3.1 Tierstudienmodell

Zur immunhistologischen Untersuchung des Pulpa-Dentin-Komplexes und seiner neurologischen Komponenten wurde bereits vielfach die Ratte als Studienmodell verwandt (Byers and Taylor 1993; Jacobsen and Heyeraas 1996). In der vorliegenden Arbeit wurden nach Genehmigung durch die Bezirksregierung Düsseldorf Wistar Ratten aus der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bezogen und unter Einhaltung der ethischen Richtlinien und der Direktiven des europäischen Gemeinschaftsrates gehalten. Die Hälfte der Tiere wurde mit Capsaicin behandelt, die andere Hälfte diente der Kontrolle. Die Gesamtheit der Tiere wurde in vier Gruppen unterteilt und dann zu verschiedenen Zeitpunkten geopfert. Die erste Gruppe sowohl der Capsaicin- als auch der Kontrolltiere lebte 30 Tage, die zweite Gruppe entsprechend 60, die dritte 90 Tage und die vierte Gruppe 155 Tage (s. Tab.1).



Tab. 1: Studiendesign

### 3.2 Capsaicin-Applikation

Die Tiere der Capsaicin-Gruppe wurden am dritten postnatalen Tag mittels subkutaner Verabreichung einer sterilen Capsaicinlösung desensibilisiert. Zur Herstellung der Lösung wurden 50 mg Capsaicin ( $\geq 95\%$  Capsicum; Sigma, Saint Louis, Missouri) in 0,5 mL 96%igem Ethanol gelöst und nach Zugabe von 0,5 mL Tween 80 (Sigma, Saint Louis, Missouri) durch eine physiologische NaCl-Lösung auf insgesamt 5 mL aufgefüllt. Nach gründlicher Vermischung wurde die Lösung mit Stericup (Millipore) Vacuum Driven Filtration System, 0,22 $\mu$ m, GP Express Plus Membrane, 150ml (Millipore) gefiltert und steril aufbewahrt.

Für eine ausreichende Desensibilisierung war pro kg Körpergewicht eine Dosis von 50 mg Capsaicin erforderlich. Hierzu wurden die Tiere gewogen und die benötigte Menge an Capsaicinlösung berechnet.

Formel zur Berechnung der benötigten **Injektionslösung**:

$$\frac{5\text{mL Capsaicinlösung} \times \text{Gewicht des Tieres (g)}}{1000\text{g}}$$

Nach subkutaner Injektion der Lösung in die Nackenfalte der Ratten war es notwendig, den Tieren Sauerstoff mittels einer Maske zuzuführen. Durch das Capsaicin ausgelöste Asthmaanfälle wurden mit einem Asthmaspray (Berotec® N 100  $\mu$ g Dosier-Aerosol, Boehringer Ingelheim, Deutschland) behandelt und die Atmung durch Brustmassage unterstützt.

Die Tiere der zweiten Gruppe dienten der Kontrolle. Die Lösung wurde nach selbem Verfahren (s.o.) jedoch ohne Capsaicin zu enthalten, hergestellt und den Tieren entsprechend ihrem Körpergewicht injiziert.

Um einer möglichen Unterkühlung entgegenzuwirken fand der gesamte Ablauf unter Wärmelampen statt.

Im weiteren Verlauf wurde regelmäßig der Gesundheitszustand der Tiere kontrolliert und etwaige Veränderungen protokolliert.

### **3.3 Intravitalperfusion und Fixierung**

Nach jeweils 30, 60, 90 und 155 Tagen wurde der Tod der Tiere mittels einer Intravitalperfusion herbeigeführt. Bei diesem Verfahren wird das Gefäßsystem der Tiere durchspült und auf diesem Wege auch anschließend fixiert.

**Anästhesie** Zu Beginn wurden die Tiere kurzzeitig durch Kohlenmonoxid betäubt und gewogen. Entsprechend dem Körpergewicht erfolgte die Verabreichung von 100mg/kg KG Ketaminhydrochlorid (Ketavet®, Pharmacia&Upjohn, Erlangen, Deutschland) zwecks einer Kurzzeitanästhesie mit anschließender Injektion von 5mg/kg KG Xylazinhydrochlorid 2% (Rompun® 2%, Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland), welches zu einer Sedierung, Analgesie und Muskelrelaxation führt.

**Operatives Vorgehen** Nach der Kontrolle einer ausreichenden Narkotisierung wurde der Thorax der Tiere nach medianem Schnitt und seitlichem Abschieben der Brusthaut eröffnet. Das Sternum wurde entfernt und das Herz durch Eröffnung des Herzbeutels freigelegt.

**Perfusion** Durch eine Knopfkanüle, welche über einen Schlauch mit einem Phosphatpuffer nach Lillie pH 7,4, (PB, in dem auch die Fixierlösung angesetzt ist; s.u.), beinhaltenden Vorratsgefäß verbunden war, wurde das Gefäßsystem

ausgehend vom linken Ventrikel durchspült. Ein Abfluss wurde durch die Eröffnung des rechten Herzohres gewährleistet.

**Phosphatpuffer nach Lillie (PB), pH-Wert 7,4**

1. 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
2. 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

Die Pufferkomponenten wurden entsprechend der Angaben in der pH-Wert Tabelle titriert. Die Pufferherstellung erfolgte unter pH-Kontrolle.

Durch ein parallel geschaltetes Vorratsgefäß konnte direkt nach der Durchspülung des Gefäßsystems mit der Perfusion begonnen werden.

Als Fixiermittel diente dabei Zamboni, welches aus 4%igem Paraformaldehyd in einem Phosphatpuffer nach Lillie (s.o.) und 0,2Vol%iger Pikrinsäure besteht.

Die Tiere wurden für 15-20 Minuten perfundiert und eine ausreichende Fixierung durch die in der Fixierlösung enthaltene Pikrinsäure resultierenden Gelbfärbung der Schleimhäute kontrolliert.

**Präparation**      Anschließend erfolgte die Präparation der Kiefer. Nach Decapitierung und Freipräparation von Ober- und Unterkiefer wurden diese zwischen den Inzisivi getrennt und das so gewonnene Untersuchungsmaterial für 24 Stunden bei 4°C in phosphatgepuffertem 4%igem Paraformaldehyd immersionsfixiert (diese Lösung gleicht der o.g. Perfusionslösung, jedoch ohne Pikrinsäurezusatz).

### **3.4 Gewebepvorbereitung**

Nach 24 Stunden wurden die Kieferfragmente mit einem Phosphatpuffer nach Lillie ausgewaschen und mit 25%iger Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) pH 7,4 entkalkt. Letzteres erfolgte durch mehrmaliges Wechseln der Lösung über einen Zeitraum von zwei bis vier Wochen je nach Alter des Tieres. Um die physiologischen Verhältnisse in den Geweben aufrechterhalten zu können, mussten diese stets kühl bei 4°C gehalten werden.

Das Auswaschen des EDTA wurde zuerst durch Phosphatpuffer, dann durch 10%ige Sucrose, folgend von 30%iger Sucrose, beides in einem Phosphatpuffer nach Lillie gelöst, vorgenommen. Die Spülung erfolgte jeweils über 24 Stunden bei einer Temperatur von 4°C und diente dem Erhalt bzw. der Steigerung der gewebsspezifischen Enzymaktivität.

Die Kieferfragmente wurden dann zur Aufbewahrung schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur weiteren Untersuchung wurde das Gewebe einzeln aufgeblickt und bei -18°C 50µm dicke Kryostatschnitte (Leica CM 3050; Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland), wobei die jeweiligen Molaren vertikal in mesio-distaler Richtung geschnitten wurden, angefertigt. Diese wurden anschließend in mit Phosphatpuffer gefüllten Multiwellplatten gesammelt.

### 3.5 Immunhistochemische Darstellung von Nervenfasern

**Inkubation** Zu Beginn erfolgte eine zweimalige Waschung der Schnitte für jeweils 5 Minuten in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS).

#### **PBS Lösung (phosphate-buffer-salin), pH-Wert 7,4**

- |  |   |   |
|--|---|---|
| 1. 0,1M $\text{KH}_2\text{PO}_4$                             | } | Pufferkomponenten:                          |
| 2. 0,1M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ |   | Herstellung unter pH-Kontrolle              |
| 3. 0,25M NaCl  |   | Zugabe erfolgt nach Herstellung des Puffers |

Alle weiteren für die Immunhistochemie als Grundpuffer verwendeten PBS Lösungen entsprechen dieser Zusammensetzung.

Als Nächstes folgte die Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität. Über diese verfügen alle Hämoproteine, wie z.B. das Hämoglobin der Erythrozyten und führen zur Freisetzung von molekularem Sauerstoff. Um diese unspezifische Reaktion zu unterbinden wurden die Schnitte für 30 Minuten in einer 0,3%igen Wasserstoffperoxidlösung (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) mit Triton X-100® (TX; Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) als Detergens inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte gründlich in sechs Umläufen für jeweils 5 Minuten mit PBS-TX gespült.

Zur weiteren Reduzierung möglicher Hintergrundfärbung wurde im Anschluss eine Blockierung mit 5%igem Normalserum der Ziege (NGS; derselben Spezies, aus der der Sekundärantikörper stammt; Vector Laboratories, Burlingame, USA) gelöst in PBS-TX für eine Stunde durchgeführt, um so eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers zu verhindern.

**Primärantikörper** Zwischenzeitlich wurden die Lösungen für die primären Antikörper, bestehend aus 1%igem Rinderserumalbumin (BSA; Calbiochem, La

Jolla, USA) zur weiteren Hintergrundreduktion und 5%igem NGS in PBS-TX gelöst, hergestellt (entspricht der Zusammensetzung der o.g. Blockierungslösung).

Anschließend wurden die primären Antikörper in der in Vorversuchen bestimmten optimalen Verdünnung zugegeben, die Schnitte in die Inkubationslösung überführt und auf einem Schüttler für 72 Stunden bei 4°C inkubiert.

Folgende Antikörper kamen dabei zur Anwendung:

Antikörper	Antigen	Verdünnung	Quelle
Rabbit Anti- Calcitonin Gene Related Peptide	CGRP (A- / C-Fasern)	1:5000	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Rabbit Anti- Substance P	SP (A- / C-Fasern)	1 :5000	Serotec, Kidlington, Oxford, UK

Tab.2: Auflistung der verwendeten Primärantikörper

Der zweite Teil des Versuchsablaufs diente der Visualisierung der bis dahin abgelaufenen Reaktionen. Nach Ablauf der 72 Stunden folgte eine sechsmalige Waschung der Schnitte durch PBS-TX.

**Sekundärantikörper** Der sekundäre Brückenantikörper „Goat-anti-Rabbit“ (GAR; Vektor Laboratories, Burlingame, USA) wurde dann in einer Konzentration von 1:500 (2µl/ mL) in einer 5%igen NGS Blockierungslösung (s.o.) gelöst und den Schnitten für 90 Minuten zugeführt. Im Anschluss erfolgte eine erneute sechsmalige Waschung mittels PBS-TX.

**ABC** In der Zwischenzeit wurde der Avidin-Biotinperoxidase-Komplex (ABC Standardkit, Vektor Laboratories, Burlingame, USA) bestehend aus zwei Komponenten, A und B, in PBS verdünnt und für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur präinkubiert. Danach wurde die Lösung den Schnitten zugeführt. Die Einwirkzeit auf das Gewebe betrug vier Stunden, sich daran anschließend eine dreimalige PBS- und eine dreimalige Trispuffer-(TBS) Waschung.

**TBS Lösung (Tris-gepufferte Kochsalzlösung), pH-Wert 7,4**

1. 0.05M  $C_4H_{11}NO_3$
2. 0,15M NaCl

**DAB** Die folgende DAB- Reaktion diente der Farbentwicklung.

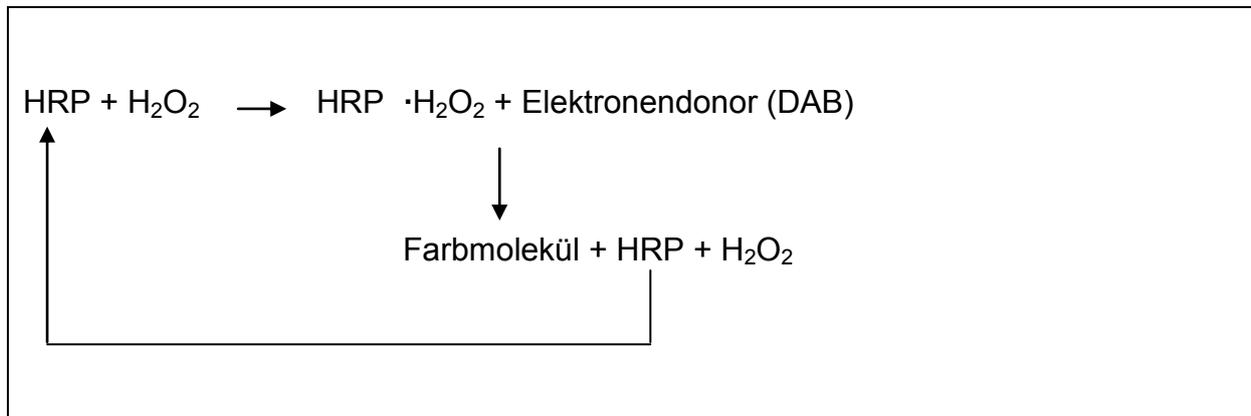


Abb.7: Das Enzym Biotinperoxidase reagiert mit Wasserstoffperoxid und bildet einen Komplex. Durch die Zugabe eines Elektronendonors, in diesem Fall DAB, kommt es zur Bildung eines Farbmoleküls. Das Peroxidase-Enzym wird nicht verbraucht, so dass es mit weiterem  $H_2O_2$  reagieren kann (Verstärkungsfaktor). Es gibt verschiedene Chromogene, die bei der Enzymreaktion als Elektronendonator fungieren können. DAB ruft bei dieser Reaktion eine braune Farbe hervor. Eine Verstärkung der Braunfärbung kann durch die Zugabe von Ammonium Nickel (II) Sulfat (s.u.) erzielt werden (Boenisch, Farmilo et al. 2003).

Zur Herstellung der Substrat-Chromogenlösung wurde zuerst Ammonium Nickel (II) Sulfat in TBS für 7 Minuten in einem im Ultraschallbad gelagerten Gefäß gelöst und im Anschluss  $5\mu\text{g}$  3, 3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB; Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) pro 20 mL Lösung zugegeben. Zuletzt, unmittelbar vor der

Entwicklung erfolgte die Zugabe von 5µL 3%igem Wasserstoffperoxid (→Substrat; Sigma- Aldrich, Saint Louis, USA) pro 10 mL hergestellter Nickel-DAB Lösung.

Die mit CGRP behandelten Schnitte verblieben für eine Minute und vierzig Sekunden, die mit SP für neun Minuten und dreißig Sekunden in dieser Lösung.

Nach Ablauf der Zeit wurde um eine ausreichende, jedoch nicht übermäßige Reaktion zu erzielen, eine sofortige dreimalige Waschung der Schnitte mit TBS gefolgt von einer dreimaligen Waschung mit PBS für wiederum jeweils fünf Minuten durchgeführt.

**Färbung** Die bis zu diesem Zeitpunkt flottierend behandelten Schnitte wurden auf mit Chrom-Alaun-Gelatine beschichtete Objektträger aufgebracht und für mindestens 24 Stunden getrocknet. Mit einer schwachen Gegenfärbung, zur besseren Orientierung innerhalb des zu untersuchenden Gewebes, bestehend aus einer Mischung zu gleichen Teilen 1%igem Methylenblau in 1% Borax gelöst, 1%igem Azur II in Aqua dest. gelöst, auf 1:200 verdünnt, wurden die Schnitte für eine Minute gegen gefärbt. Durch eine aufsteigende Isopropanolreihe wurden diese dehydriert, dann zweimal für jeweils fünf Minuten in Xylol geklärt und anschließend dauerhaft mit DePeX (Serva, Heidelberg, Deutschland) eingedeckt.

Um eine unspezifische Reaktion ausschließen zu können wurden jeweils Negativkontrollen durchgeführt, bei denen wie oben beschrieben, jedoch ohne die Zugabe des Primärantikörpers vorgegangen wurde.

## **3.6 Immunhistochemische Analyse**

### **3.6.1 Lichtmikroskopie und Fotografie**

Die Ansicht der Präparate erfolgte mit einem Lichtmikroskop (Laborlux D, Leitz, Deutschland). Zur statistischen Auswertung wurde der erste Molar des Unterkiefers herangezogen, da bereits Kvinnsland et al. zeigen konnten, dass der Bereich des Dentins bzw. der Odontoblastenzellschicht des ersten Molaren einer Ratte von zahlreichen CGRP- und SP-immunreaktiven Fasern innerviert wird (Kvinnsland, Heyeraas et al. 1991). Ausgewählt wurden dabei Schnitte mit den nachfolgend aufgeführten Kriterien. Die Pulpa des ersten unteren Molaren sollte vollständig sowohl in der Längs- als auch in mesiodistaler Richtung getroffen sein. Die zu vergleichenden Schnitte sollten möglichst in der gleichen Ebene liegen. Heyeraas et al. konnten am Modell der Katze nachweisen, dass im koronalen Anteil der Pulpa eine höhere Dichte an CGRP-immunreaktiven Fasern als im apikalen Bereich vorliegt (Heyeraas, Kvinnsland et al. 1993), so dass sich die Untersuchungen auf den Bereich der Pulpenhörner konzentrierten. Fotografien des distalen Pulpenhorns wurden mit der Leica DC 200-Kamera (Leica Microsystems, Heerbrugg, Schweiz) jeweils mit einer 100-fachen bzw. 250-fachen Vergrößerung angefertigt.

### **3.6.2 Scion Image**

Die Untersuchung mit Scion Image (Version 4.0.3.2 Scion Corporation, Frederick, MD, USA) erfolgte jeweils am distalen Pulpenhorn eines jeden ersten Molaren des linken Unterkiefers. Hier wurde die Anzahl der Pixel pro Inch<sup>2</sup> der immunhistologisch positiven Areale erfasst.

### **3.6.3 Statistische Auswertung**

#### 3.6.3.1 SPSS

Die durch Scion Image ermittelten Daten wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS ausgewertet. Für jede Altersgruppe wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Nach Überprüfung der Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Abweichungstest fand für die induktive Statistik der Student T-Test für gepaarte Stichproben (Test vs. Kontrolle) Verwendung. Beobachtete Unterschiede wurden ab einem Signifikanzlevel von  $P < 0,05$  als statistisch signifikant definiert.

#### 3.6.3.2 Student T-Test

Mittels des Student T-Testes konnten die Unterschiede zwischen der experimentellen und der Kontrollgruppe innerhalb der jeweiligen Altersgruppen analysiert werden.

#### 3.6.3.3 Bonferroni Post-Hoc Test

Im Gegensatz zum Student T-Test erfasst der Bonferroni Post-Hoc Test die Unterschiede innerhalb der verschiedenen Altersgruppen sowohl der mit Capsaicin behandelten als auch der Kontrolltiere.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 CGRP**

#### **4.1.1 Histologische Ergebnisse**

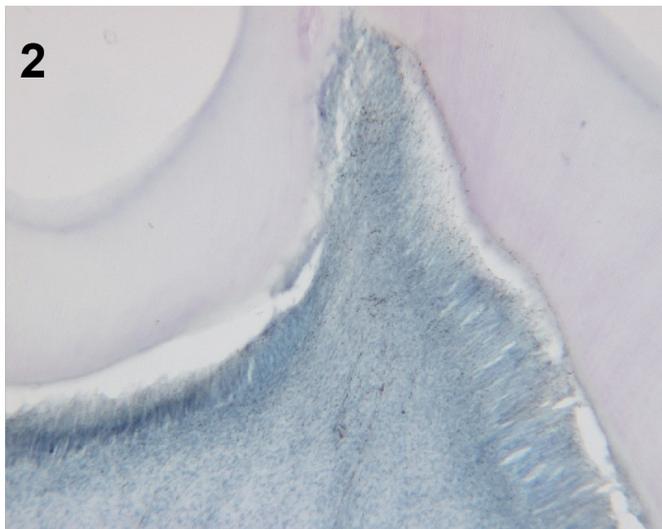
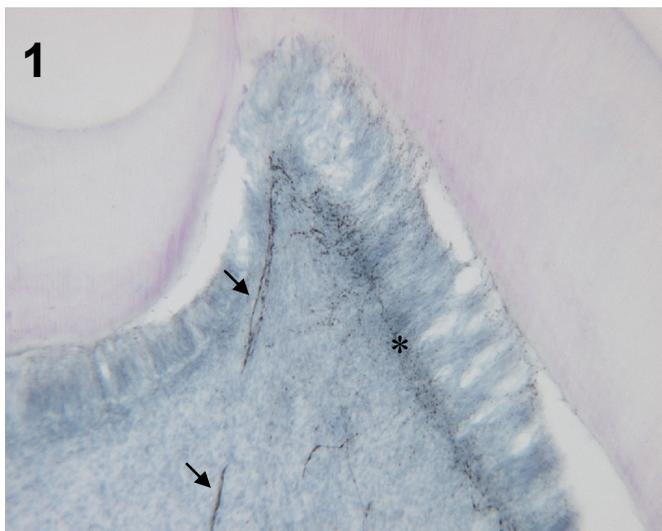
Bei dem histologischen Vergleich der mit Capsaicin behandelten Tiere zu den Kontrolltieren ohne Capsaicinapplikation wurde von jedem Tier das distale Pulpenhorn des ersten Molaren des linken Unterkiefers untersucht.

Nachstehend ist für jede Altersgruppe sowohl der Capsaicin als auch der Kontrolltiere exemplarisch eine Pulpa aufgezeigt.

## 1. CGRP 30 Tage

### a) 100fache Vergrößerung

Bereits in der 100fachen Vergrößerung zeigt sich in den mit Capsaicin desensibilisierten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Verringerung der immunreaktiven Fasern. Im Detail können diese wie folgt beschrieben werden:



**Abb.8: CGRP-positive Nervenfasern im distalen Pulpenhorn**

1: Kontrolle, 30 Tage, 100x

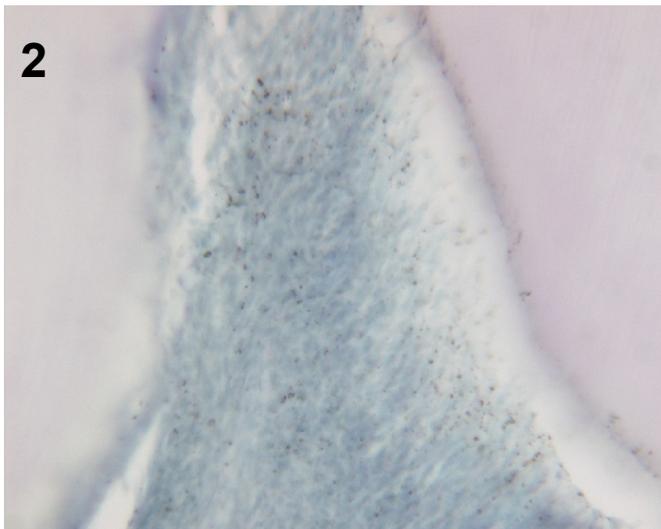
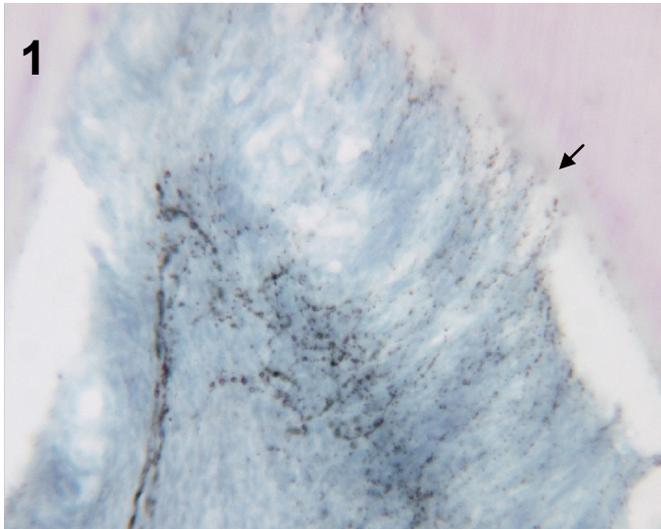
2: mittels Capsaicin desensibilisierte Ratte, 30 Tage, 100x

Innerhalb der Pulpa der Kontrolltiere sind die durch immunhistochemische Behandlung schwarz gefärbten CGRP-reaktiven Nervenfasern deutlich sichtbar (s.Abb.8.1). Diese ziehen innerhalb der Pulpa strangförmig nach koronal bis in das distale Pulpenhorn (→). Dort bilden sie in der Subodontoblastenzellschicht ein Nervenfasergeflecht (\*).

Im Vergleich dazu findet sich in der Pulpa der capsaicinbehandelten Tiere eine reduzierte Zahl an immunreaktiven Fasern. Die Nervenfasern treten hier nur noch vereinzelt in Erscheinung.

Insgesamt scheint ihre immunhistochemische Reaktion schwächer zu sein.

b) 250fache Vergrößerung



**Abb.9: CGRP-positive Nervenfasern im distalen Pulpenhorn**

1: Kontrolle, 30 Tage, 250x

2: mittels Capsaicin desensibilisierte Ratte, 30 Tage, 250x

In der 250fachen Vergrößerung zeigen sich die Nervenfasern als perlenschnurartige Strukturen.

Feine Linien mit granulaartigen Verdickungen prägen das histologische Bild.

Aus dem subodontoblastisch gelegenen Nervengeflecht ziehen einzelne Fasern zwischen den Odontoblasten bis zum Dentin, wo sie zum Teil bis in die Tubuli des Prädentins reichen (→).

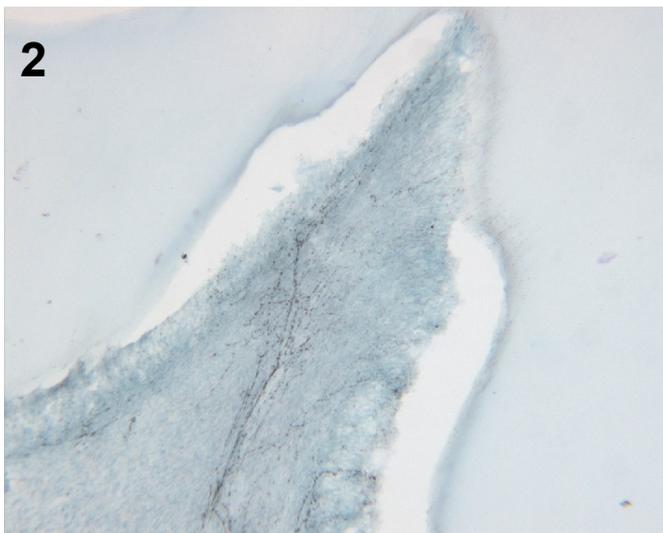
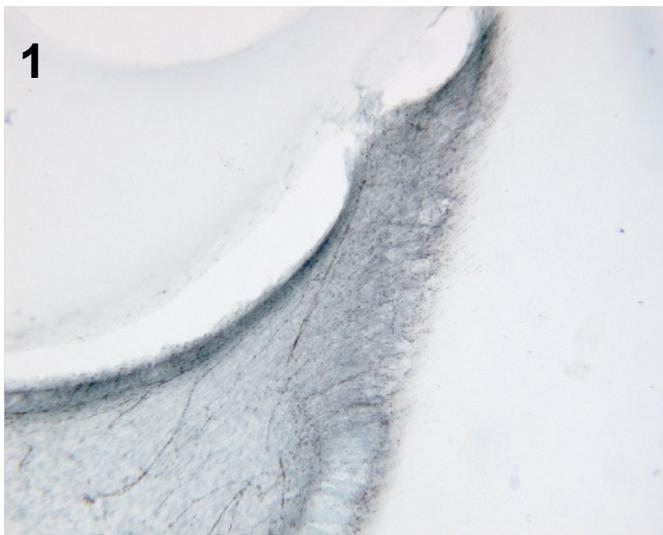
Im Vergleich dazu findet sich in der Pulpa der mit Capsaicin behandelten Tiere eine reduzierte Zahl an immunreaktiven Fasern, welche eher als Einsprenkelungen beschrieben werden können. Vor

allem in der Subodontoblastenzellschicht zeigt sich eine deutlich schwächere Reaktion als bei den Kontrolltieren.

## 2. CGRP 60 Tage

### a) 100fache Vergrößerung

Im Vergleich zur Pulpa der 30 Tage alten Tiere zeigt die Pulpa der doppelt so alten Tiere ein verändertes Erscheinungsbild. Das Lumen des Pulpencavums ist kleiner, das Pulpenhorn erstreckt sich weiter nach koronal und verjüngt sich zunehmend, so dass die Pulpa in diesem Bereich graziler erscheint.



**Abb.10: CGRP-positive Nervenfasern im distalen Pulpenhorn**

**1: Kontrolle, 60 Tage, 100x**

**2: mittels Capsaicin desensibilisierte Ratte, 60 Tage, 100x**

Innerhalb der Pulpa der Kontrolltiere sind die CGRP-reaktiven Nervenfasern weiterhin sowohl im Pulpencavum als auch im distalen Pulpenhorn deutlich zu erkennen.

Sowohl in der Pulpa der Kontroll- als auch der Capsaicin-Gruppe ist im Vergleich zu den korrespondierenden 30 Tage alten Tieren eine Zunahme an immunreaktiven Fasern zu beobachten.

Bei der Pulpa des capsaicin-behandelten Tieres zeigt sich ein vermehrtes Auftreten vor allem im Übergang vom Cavum zum distalen Pulpenhorn.

b) 250fache Vergrößerung

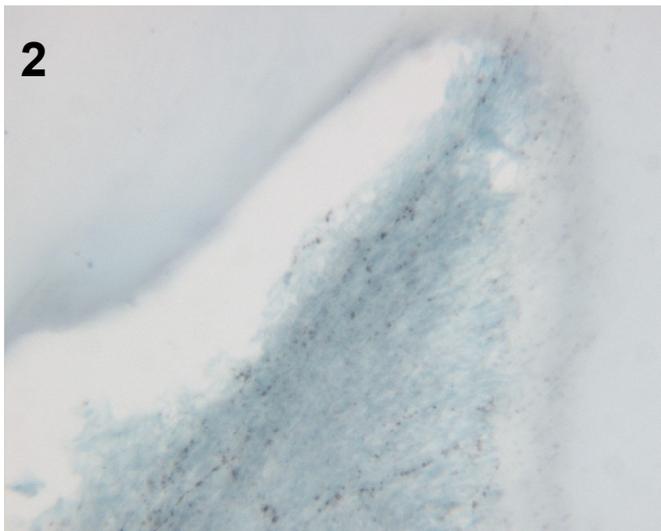
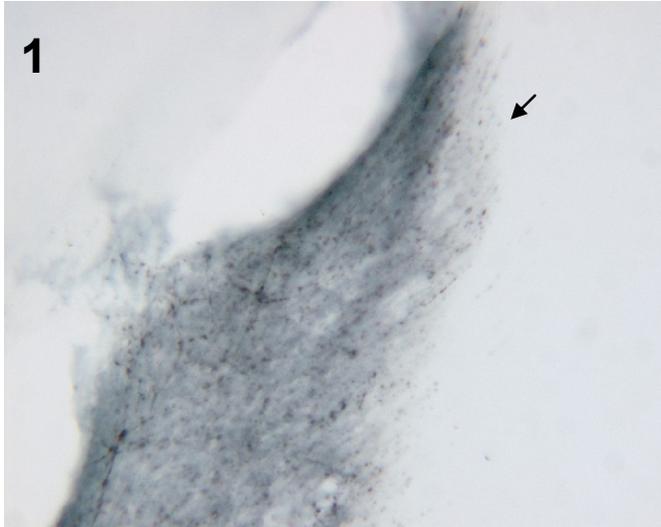


Abb.11: CGRP-positive Nervenfasern im distalen Pulpenhorn

1: Kontrolle, 60 Tage, 250x

2: mittels Capsaicin desensibilisierte Ratte, 60 Tage, 250x

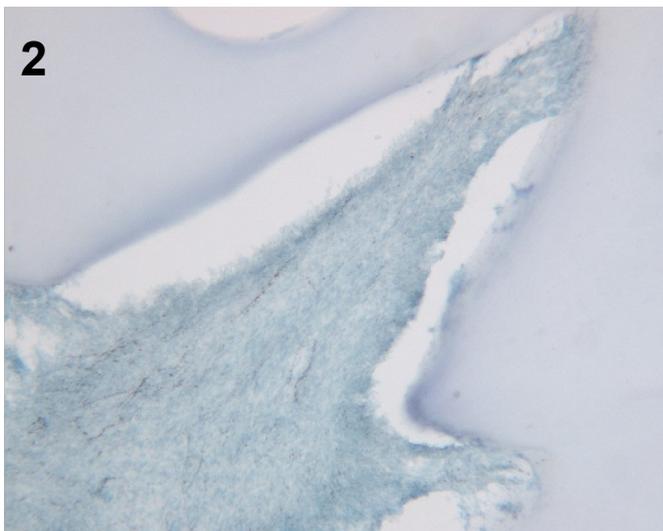
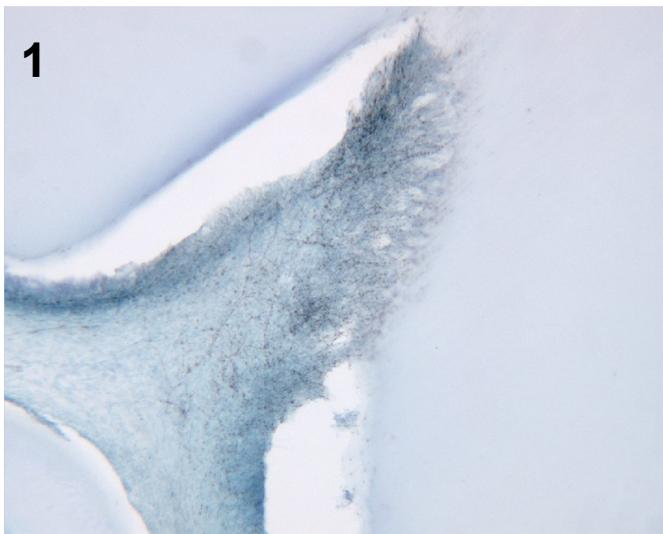
In der 250fachen Vergrößerung sind die Nervenfasern wiederum als perlenschnurartige Strukturen dargestellt. Auch hier erkennt man deutlich, dass die einzelnen Nervenfasern über die Odontoblastenzellschicht hinaus bis ins Prädentin reichen (→).

Die Reaktion in der Pulpa der mit Capsaicin behandelten Tiere stellt sich wieder schwächer dar. Die einzelnen Nervenfasern sind immer noch in allen Bereichen zu erkennen und weisen eine gewisse Struktur auf, jedoch wie bereits oben erwähnt in deutlich reduzierter Zahl.

### 3. CGRP 90 Tage

#### a) 100fache Vergrößerung

Die Pulpa der untersuchten Wistar-Ratten zeigt im Verlauf ihrer Entwicklung eine stetige Größenzunahme. Durch die fortlaufende Dentinbildung verengen sich das Pulpencavum und die -hörner zunehmend, so dass die Pulpa selbst in Relation zu der sie umgebenden Hartsubstanz an Volumen verliert.



**Abb.12: CGRP-positive Nervenfasern im distalen Pulpenhorn**

**1: Kontrolle, 90 Tage, 100x**

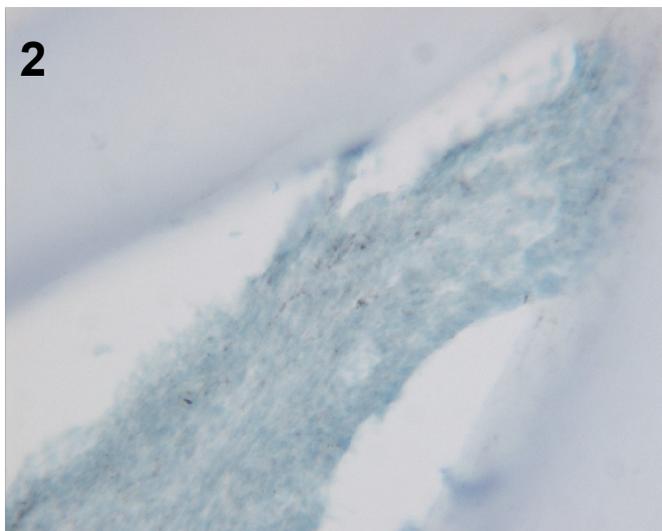
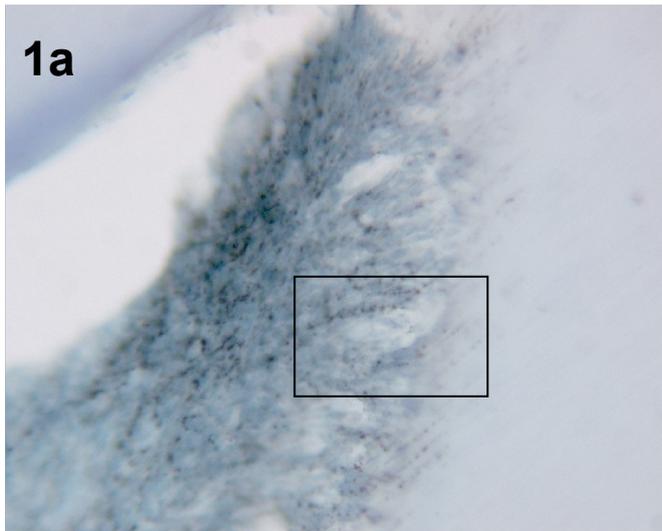
**2: mittels Capsaicin desensibilisierte Ratte, 90 Tage, 100x**

Im Vergleich zu der 100fachen Vergrößerung der Pulpa der 60 Tage alten Kontrolltiere, zeigt sich hier insgesamt eine verminderte Zahl an CGRP-reaktiven Nervenfasern.

In der 100fachen Vergrößerung der Pulpa der capsaicinbehandelten 90 Tage alten Tiere ist im Vergleich zu den Kontrolltieren eine reduzierte Zahl an CGRP-reaktiven Fasern ersichtlich. Gegenüber der Reaktion der capsaicinbehandelten Tiere der 60 Tage-Gruppe ist der Unterschied noch deutlicher. Während nach 60 Tagen eine

Zunahme der Fasern beobachtet werden konnte, zeigt sich hier nun eine klare Reduktion.

b) 250fache Vergrößerung



In der 250fachen Vergrößerung der 90 Tage Kontrollen zeigt sich eine eindeutige und klare immunhistochemische Reaktion.

Besonders im Detailausschnitt wird die perlstrangartige Struktur der immunreaktiven Nervenfasern deutlich. Nahezu parallel scheinen die einzelnen Nervenfasern durch die Odontoblastenzellschicht in das Prädentin einzutreten.

Die 250fache Vergrößerung des

distalen Pulpenhorns der mit Capsaicin behandelten Tiere weist dahingegen so gut wie gar keine Reaktion mehr auf. Hier wird der quantitative Unterschied an

**Abb.13: CGRP-positive Nervenfasern im distalen Pulpenhorn**

**1a: Kontrolle, 90 Tage, 250x**

**1b:Detailausschnitt**

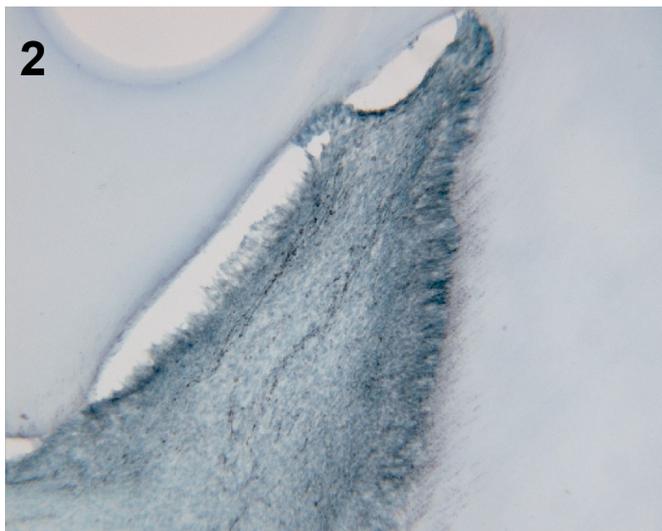
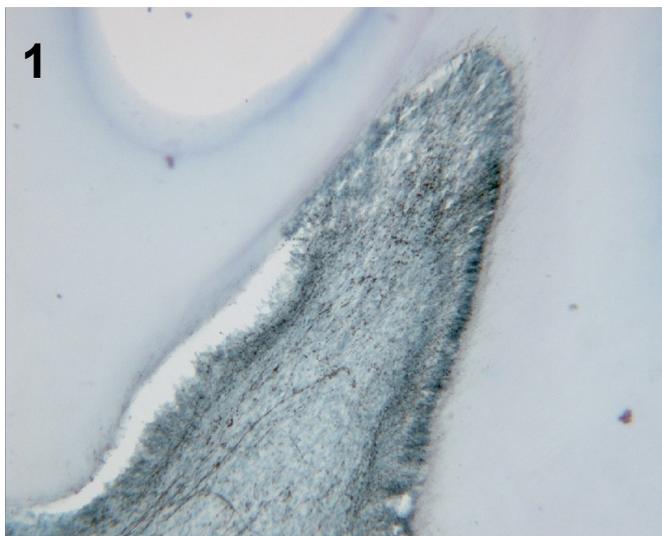
**2: mittels Capsaicin desensibilisierte Ratte, 90Tage, 250x**

Nervenfaser zwischen den desensibilisierten und den Kontrolltieren besonders deutlich.

#### 4. CGRP 155 Tage

##### a) 100fache Vergrößerung

Nach 155 Tagen zeigt sich das Gewebe der Pulpa voll strukturiert. Deutlich zu erkennen sind die einzelnen Zonen innerhalb der Pulpa.



**Abb.14: CGRP-positive Nervenfaser im distalen Pulpenhorn**  
1: Kontrolle, 155 Tage, 100x  
2: mittels Capsaicin desensibilisierte Ratte, 155 Tage, 100x

Die immunreaktiven Fasern ziehen durch das Innere entlang bis in das distale Pulpenhorn, wo sie sich auffächern zu scheinen. Vor allem im Bereich der Spitze des Pulpenhorns lässt sich die Interaktion der Nervenfaser mit dem umliegenden Prädentin erahnen.

Deutlich wird der quantitative Unterschied an Nervenfaser zwischen den Kontrolltieren zur Capsaicin behandelten 155 Tage-Gruppe. Auch hier zeigt sich zwar eine klare Strukturierung des pulpalen Gewebes, jedoch eine eindeutige Reduktion der

immunreaktiven Fasern.

b) 250fache Vergrößerung

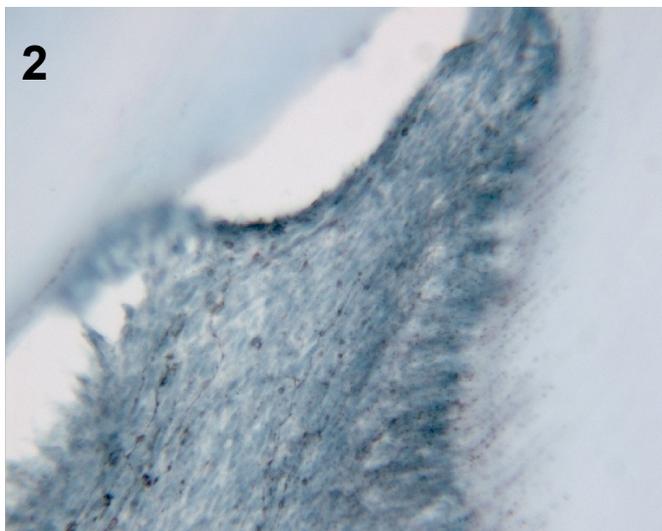
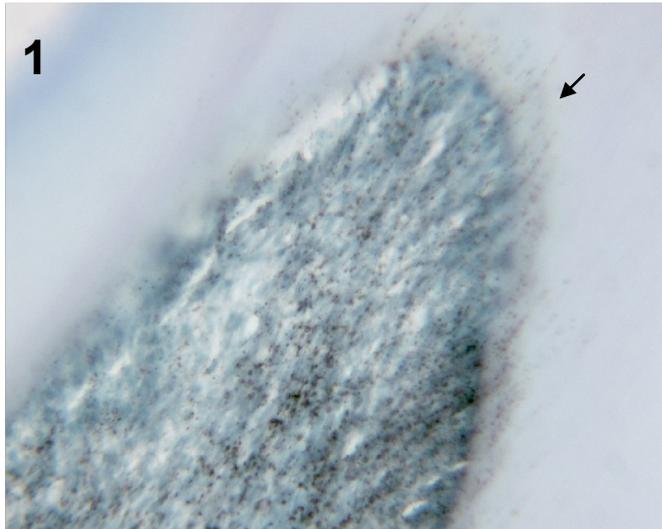


Abb.15: CGRP-positive Nervenfasern im distalen Pulpenhorn

1: Kontrolle, 155 Tage, 250x

2: mittels Capsaicin desensibilisierte Ratte, 155 Tage, 250x

Das immunhistologische Bild der Kontrollpulpa erscheint deutlich strukturierter als die Pulpa des capsaicinbehandelten Tieres.

Präsentiert wird ein Netzwerk aus Fasern, welche zentral akkumuliert

auftreten und in Richtung Odontoblastenzellschicht parallel ausstrahlen zu scheinen, bis sie letztendlich mit einigen Fasern das Prädentin penetrieren (→).

Die immunreaktiven Nervenfasern in der Pulpa des Capsaicintieres sind deutlich reduziert. Die feine Struktur, die bei dem Kontrolltier noch beschrieben werden konnte,

wirkt hier eher plump. Deutlich sind die bis ins Prädentin ausstrahlenden Fasern zu erkennen.

## **4.1.2 Statistische Datenanalyse**

### **Student T-Test**

Mittels des Programms Scion Image (Version 4.0.3.2 Scion Corporation, Frederick, MD, USA) erfolgte jeweils am distalen Pulpenhorn eines jeden ersten Molaren des linken Unterkiefers die Messung der Anzahl der Pixel pro Inch<sup>2</sup> der immunhistologisch positiven Areale.

Die daraus resultierenden Werte der capsaicinbehandelten Tiere einer jeden Altersgruppe (30, 60, 90 und 155 Tage) wurden im Anschluss mit den Werten der Kontrolltiere ohne Capsaicinapplikation verglichen.

Nachfolgend sind die vergleichenden Statistiken für jede Altersgruppe aufgeführt.

## 1. CGRP 30 Tage

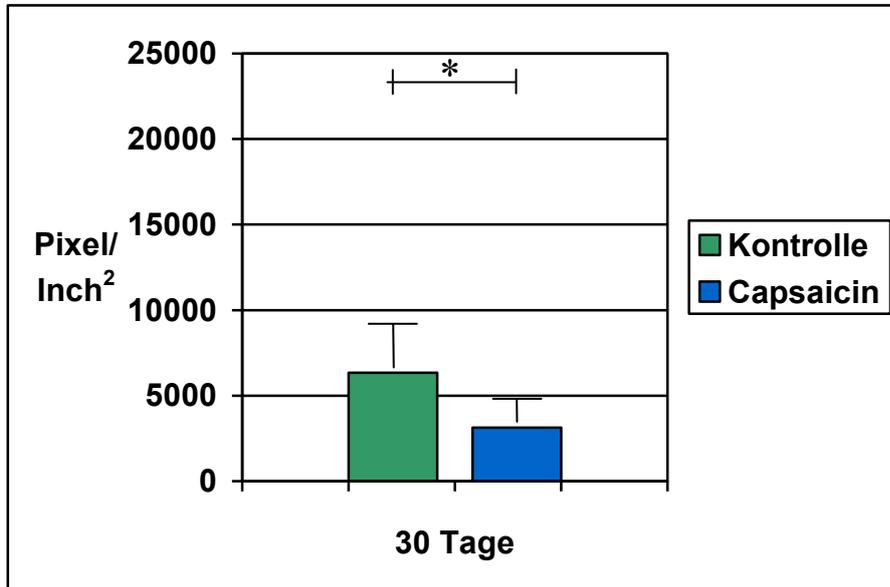


Abb.16: Graphische Darstellung der Anzahl der Pixel pro Inch<sup>2</sup> der immunhistologisch positiven Areale der mit Capsaicin desensibilisierten Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe (30 Tage)

			N	Mittelwert	Standardabweichung	P
CGRP: Pixel/Inch <sup>2</sup>	30 Tage	Kontrolle	12	6331,1642	2095,39964	<0,001
		Capsaicin	12	3131,0142	1613,60399	

Tab.3: Auswertung des Student T-Test

In der 30-Tage Gruppe zeigt sich zwischen den capsaicinbehandelten Tieren und den Kontrolltieren ein deutlicher Unterschied am Vorkommen von CGRP-immunreaktiven Fasern. Der Mittelwert am Vorkommen von CGRP-positiven Fasern innerhalb der Pulpa der Kontrolltiere ist etwa doppelt so groß wie der der capsaicinbehandelten Tiere. Die Signifikanz liegt bei <0,001 und ist damit als hochsignifikant einzustufen.

## 2. CGRP 60 Tage

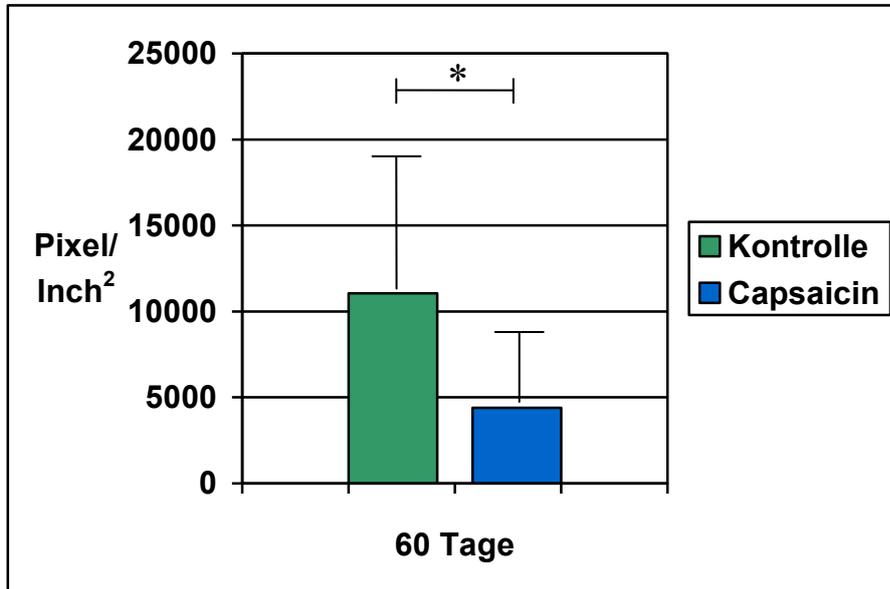


Abb.17: Graphische Darstellung der Anzahl der Pixel pro Inch<sup>2</sup> der immunhistologisch positiven Areale der mit Capsaicin desensibilisierten Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe (60 Tage)

			N	Mittelwert	Standardabweichung	P
CGRP: Pixel/Inch <sup>2</sup>	60 Tage	Kontrolle	12	11047,308	8328,82287	<0,05
		Capsaicin	12	4386,6185	3370,86987	

Tab.4: Auswertung des Student T-Test

Innerhalb der Pulpa der 60 Tage-Tiere ist im Vergleich zu den 30 Tage alten Tieren eine Zunahme von immunreaktiven Fasern sowohl in der Kontroll- als auch in der Capsaicin-Gruppe ersichtlich. Auch zu diesem Zeitpunkt zeigt sich ein vermehrtes Auftreten an CGRP-positiven Fasern innerhalb der Kontrollgruppe im Vergleich zu den mit Capsaicin behandelten Tieren. Dabei liegt das Signifikanzniveau bei <0,05.

### 3. CGRP 90 Tage

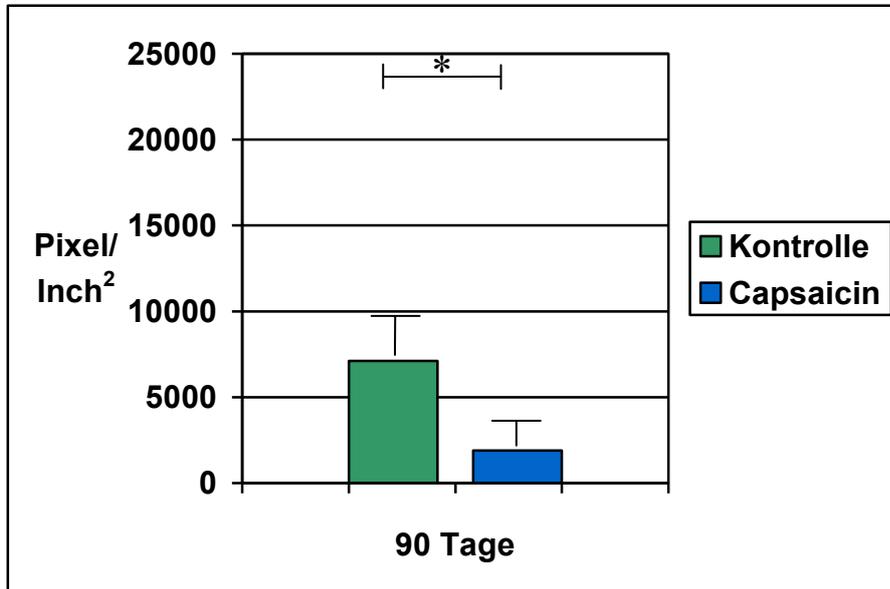


Abb.18: Graphische Darstellung der Anzahl der Pixel pro Inch<sup>2</sup> der immunhistologisch positiven Areale der mit Capsaicin desensibilisierten Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe (90 Tage)

			N	Mittelwert	Standardabweichung	P
CGRP: Pixel/Inch <sup>2</sup>	90 Tage	Kontrolle	12	7118,6108	2149,57211	<0,001
		Capsaicin	12	1891,5392	1096,46092	

Tab.5: Auswertung des Student T-Test

Nach 90 Tagen zeigt sich ein deutlicher Unterschied an der Zahl von immunreaktiven Fasern. Auch hier ist wieder eindeutig das vermehrte Vorkommen an CGRP-positiven Fasern innerhalb der Kontrolltiergruppe im Vergleich zu den capsaicinbehandelten Ratten mit einer Signifikanz von <0,001 ersichtlich.

#### 4. CGRP 155 Tage

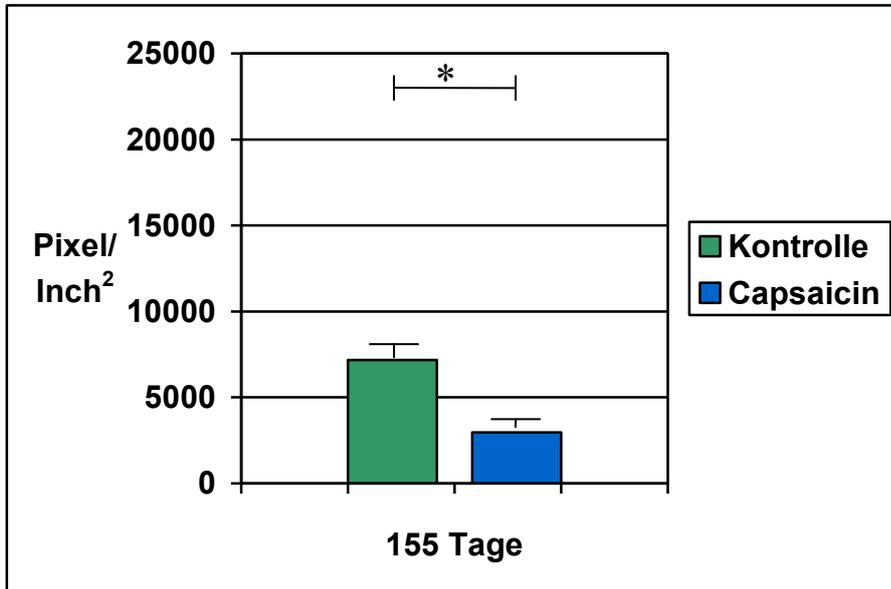


Abb.19: Graphische Darstellung der Anzahl der Pixel pro Inch<sup>2</sup> der immunhistologisch positiven Areale der mit Capsaicin desensibilisierten Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe (155 Tage)

			N	Mittelwert	Standardabweichung	P
CGRP: Pixel/Inch <sup>2</sup>	155	Kontrolle	12	7175,8992	881,58565	<0,001
	Tage	Capsaicin	12	2966,6189	823,86870	

Tab.6: Auswertung des Student T-Test

Schließlich zeigt sich bei der 155-Tage Gruppe ein erneuter hochsignifikanter Unterschied am Vorkommen immunreaktiver Fasern Kontrolle versus capsaicinbehandelte Tiere. Auch hier ist die deutlich reduzierte Zahl an immunreaktiven Fasern bedingt durch die neonatale Capsaicinapplikation eindeutig.

## Bonferroni Post-Hoc Test

Mittels des Bonferroni Post-Hoc Tests wurden die verschiedenen Altersgruppen sowohl der Capsaicin- als auch der Kontrolltiere untereinander verglichen.

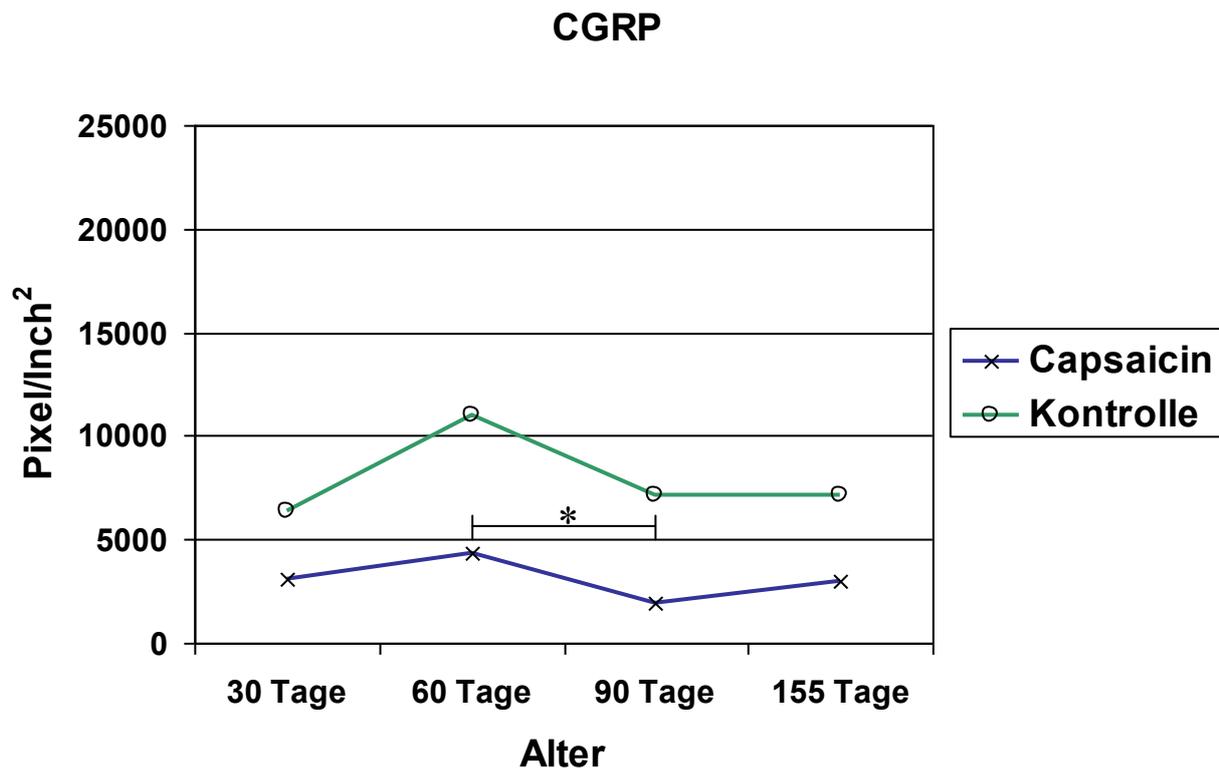


Abb.20: Graphischer Verlauf des Vorkommens an CGRP-positiven Fasern innerhalb der Kontrolltiere und der capsaicinbehandelten Tiere in Abhängigkeit von der Zeit dessen Einwirkung.

Das Vorkommen an CGRP-positiven Fasern innerhalb der Kontrolltiere zeigt zwischen 30 und 60 Tagen eine deutliche Zunahme, wohingegen diese bis zum 90. Lebensstag wieder abnehmen und sich dann bis zum Untersuchungszeitpunkt von 155 Tagen auf diesem Level einpendeln zu scheinen. Jedoch zeigt sich zwischen keinem untersuchten Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied an der Zahl des Vorkommens von immunreaktiven Fasern.

In den capsaicinbehandelten Tieren verhält es sich ähnlich den Kontrolltieren. Auch hier ist ein leichter Anstieg an der Zahl von immunreaktiven Fasern zwischen 30 und

60 Tagen zu erkennen, wohingegen das Vorkommen dann bei 90 Tagen wieder abnimmt und nach 155 Tagen wieder zunehmen zu scheint. Hier zeigt sich allein ein signifikanter Unterschied ( $<0,05$ ) am Vorkommen von CGRP-positiven Fasern zwischen 60 und 90 Tagen.

(I) Alter	(J) Alter	Mittlere Differenz (I-J)	Standartfehler	Signifikanz
30,00	60,00	-4716,1438	1767,5503	,064
	90,00	-787,4467	1685,2931	1,000
	155,00	-844,7351	1652,5658	1,000
60,00	30,00	4716,1438	1767,5503	,064
	90,00	3928,6972	1767,5503	,189
	155,00	3871,4088	1736,3741	,186
90,00	30,00	787,4467	1685,2931	1,000
	60,00	-3928,6972	1767,5503	,189
	155,00	-57,2884	1652,5658	1,000
155,00	30,00	844,7351	1652,5658	1,000
	60,00	-3871,4088	1736,3741	,186
	90,00	57,2884	1652,5658	1,000

Kontrolle

Basiert auf beobachteten Mittelwerten

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

(I) Alter	(J) Alter	Mittlere Differenz (I-J)	Standartfehler	Signifikanz
30,00	60,00	-1255,6043	837,09916	,847
	90,00	1239,4750	853,67699	,924
	155,00	164,3953	922,07654	1,000
60,00	30,00	1255,6043	837,09916	,847
	90,00	2495,0793*	837,09916	,029
	155,00	1419,9996	906,75010	,749
90,00	30,00	-1239,4750	853,67699	,924
	60,00	-2495,0793*	837,09916	,029
	155,00	-1075,0797	922,07654	1,000
155,00	30,00	-164,3953	922,07654	1,000
	60,00	-1419,9996	906,75010	,749
	90,00	1075,0797	922,07654	1,000

Capsaicin

Basiert auf beobachteten Mittelwerten

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

Tab.7: CGRP-Auswertung (Scion Image)

## **4.2 Substance P**

### **4.2.1 Histologische Ergebnisse**

Bei dem histologischen Vergleich der mit Capsaicin behandelten Tiere zu den Kontrolltieren ohne Capsaicinapplikation wurde von jedem Tier das distale Pulpenhorn des ersten Molaren des linken Unterkiefers untersucht.

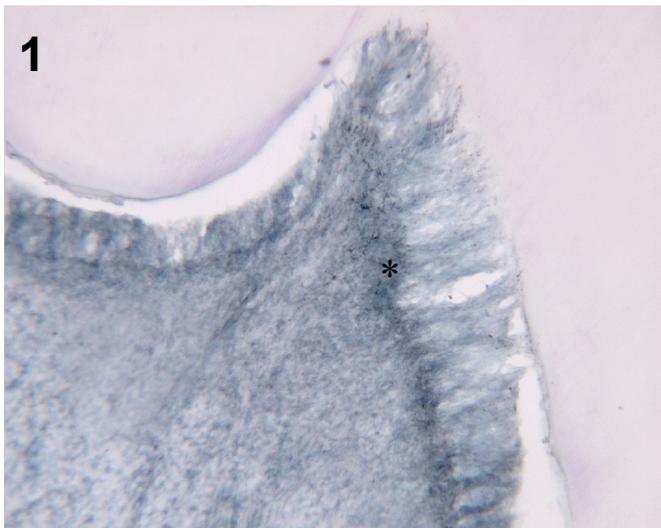
Nachstehend ist für jede Altersgruppe sowohl der Capsaicin als auch der Kontrolltiere exemplarisch eine Pulpa aufgezeigt.

Insgesamt zeigt sich ein anderes histologisches Erscheinungsbild, vergleicht man die beiden Antikörper SP und CGRP. Quantitativ gesehen ist das Vorkommen an SP-positiven Fasern geringer als das der CGRP-positiven Fasern. Die immunhistologische Reaktion wirkt bei den CGRP-immunreaktiven Fasern etwas strukturierter und feiner als bei den SP-reaktiven Fasern.

## 1. SP 30 Tage

### a) 100fache Vergrößerung

Innerhalb der Pulpa der 30 Tage alten Tiere zeigt sich in den mit Capsaicin desensibilisierten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Verringerung der immunreaktiven Fasern.



**Abb.21: SP-positive Nervenfasern im distalen Pulpenhorn**

**1: Kontrolle, 30 Tage, 100x**

**2: mittels Capsaicin desensibilisierte Ratte, 30 Tage, 100x**

In der 100fachen Vergrößerung sind die SP-reaktiven Nervenfasern durch die immunhistochemische Behandlung als schwarze Einsprenkelungen zu erkennen. Diese treten vor allem in der Subodontoblastenzellschicht in Erscheinung (\*). In den zentralen Bereichen der Pulpa zeigen sich die Fasern als filigrane Linien. Im Vergleich dazu findet sich in der Pulpa der capsaicinbehandelten Tiere eine reduzierte Zahl an immunreaktiven Fasern, welche im Vergleich zu der Kontrollgruppe kaum mehr nachweisbar sind (s.o.).

b) 250fache Vergrößerung

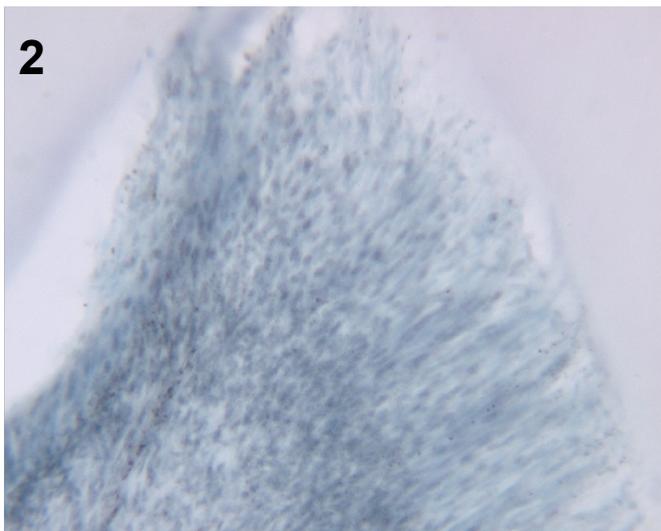
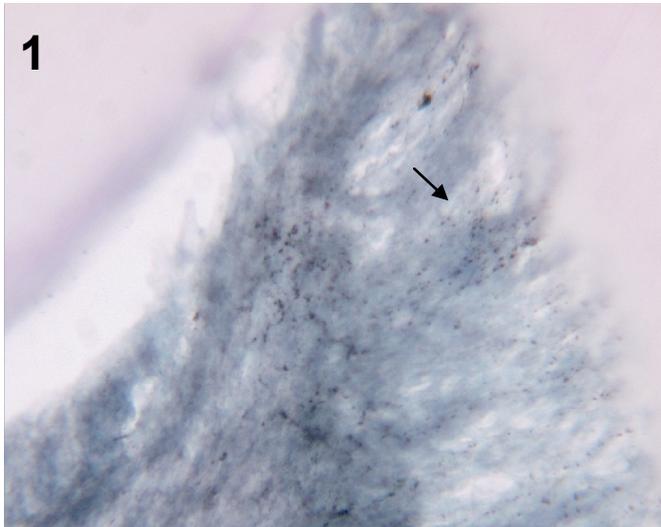


Abb.22: SP-positive Nervenfasern im distalen Pulpenhorn

1: Kontrolle, 30 Tage, 250x

2: mittels Capsaicin desensibilisierte Ratte, 30 Tage, 250x

In der 250fachen Vergrößerung des distalen Pulpenhorns ist ein deutliches Netzwerk aus SP-positiven Fasern innerhalb der Subodontoblastenzellschicht zu erkennen. Die einzelnen Fasern stellen sich etwas filigraner dar als in der oben beschriebenen Immunreaktion mittels CGRP. Aus dem Netz von immunreaktiven Fasern lösen sich wiederum einzelne und ziehen durch die Odontoblastenzellschicht (→).

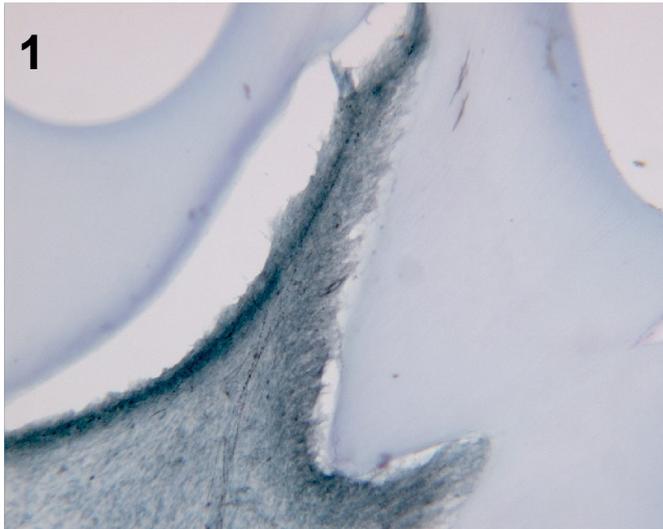
Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigt sich in der Pulpa der mit Capsaicin behandelten Tiere eine sehr feine immunhistochemische

Reaktion innerhalb der Subodontoblastenzellschicht.

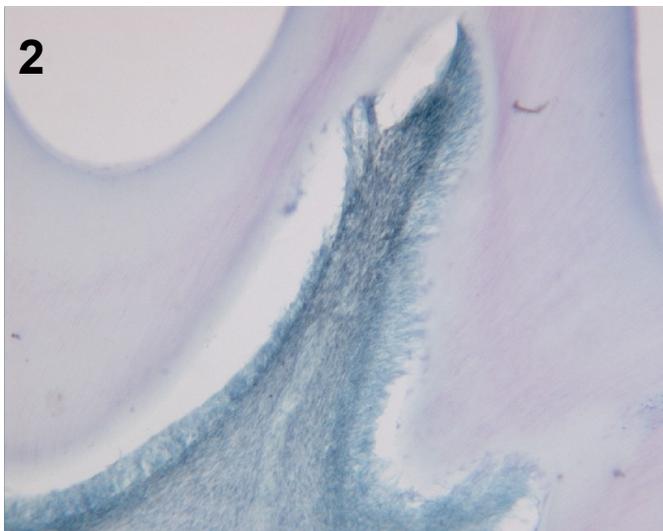
## 2. SP 60 Tage

### a) 100fache Vergrößerung

Die Pulpa der 60 Tage alten Tiere weist bedingt durch die fortschreitende Entwicklung ein verändertes morphologisches Erscheinungsbild auf.



Durch die Verjüngung des dargestellten distalen Pulpenhorns scheint die Immunreaktion im Bereich der Odontoblastenzellschicht etwas zu akkumulieren. Im zentralen Bereich des Pulpenhorns ist dahingegen eine deutliche Reaktion entlang der SP-positiven Nervenfasern zu beobachten.



In der Pulpa des capsaicin-behandelten Tieres ist in der 100fachen Vergrößerung wieder keine klare immunhistochemische Reaktion zu erkennen.

**Abb.23: SP-positive Nervenfasern im distalen Pulpenhorn**

**1: Kontrolle, 60 Tage, 100x**

**2: mittels Capsaicin desensibilisierte Ratte, 60 Tage, 100x**

b) 250fache Vergrößerung

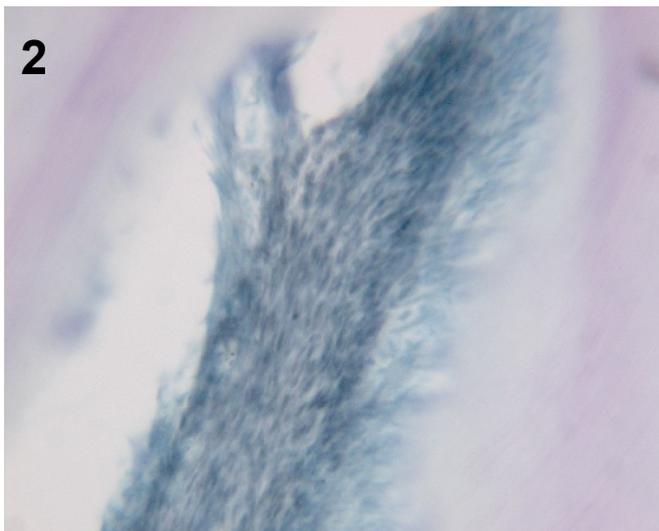
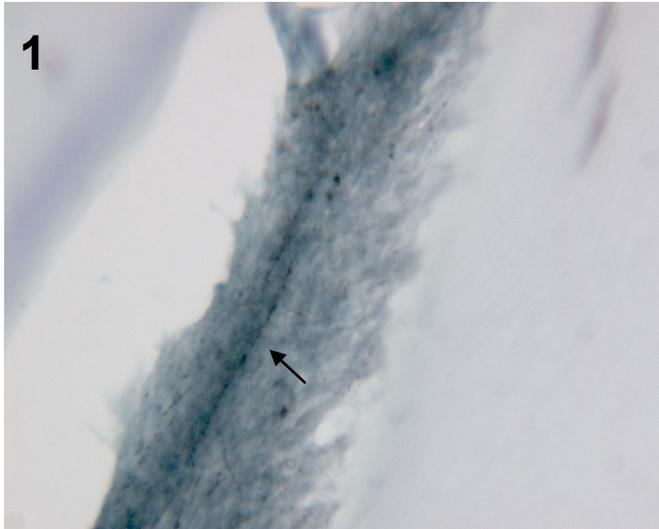


Abb.24: SP-positive Nervenfasern im distalen Pulpenhorn

1: Kontrolle, 60 Tage, 250x

2: mittels Capsaicin desensibilisierte Ratte, 60 Tage, 250x

In der 250fachen Vergrößerung wird die feine immunhistochemische Reaktion der SP-positiven Fasern etwas deutlicher. Innerhalb des Pulpenhorns des Kontrolltieres ist ein deutlicher Nervenstrang Richtung Spitze ziehend (→) zu sehen, sowie weitere feine Verästelungen im Bereich der Odontoblastenzellschicht. Fasern, welche bis in das Dentin ziehen, können hier nicht nachgewiesen werden.

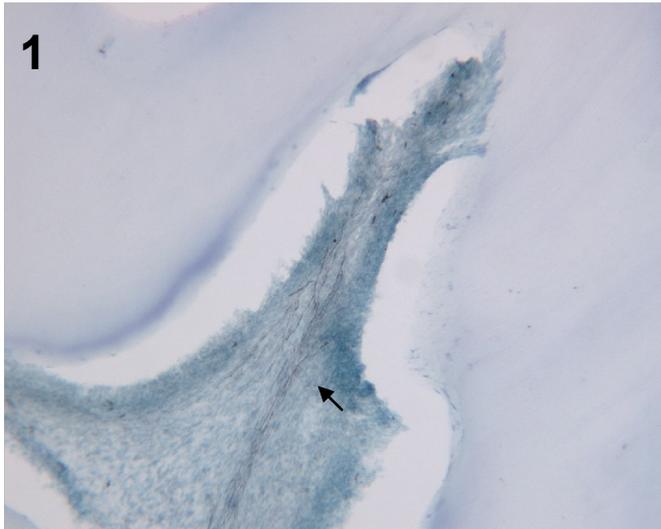
Deutlich wird dahingegen die reduzierte Zahl an SP-positiven Fasern innerhalb der Pulpa der capsaicinbehandelten Tiere. Hier ist

keine immunhistochemische Reaktion von Nervenfasern ersichtlich.

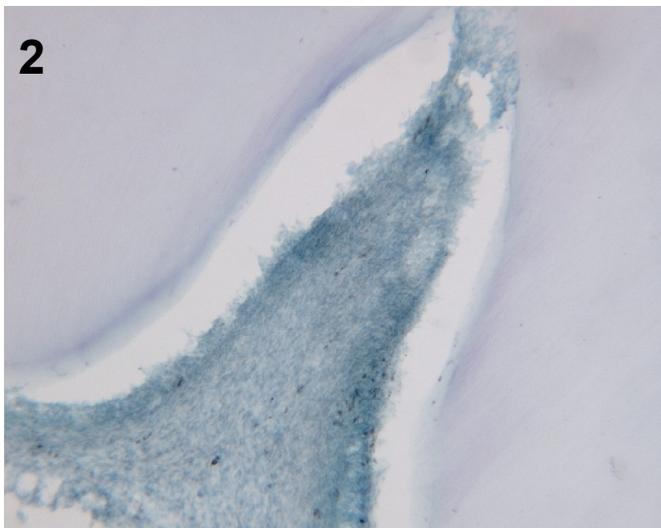
### 3. SP 90 Tage

#### a) 100fache Vergrößerung

In der 100fachen Vergrößerung der 90 Tage alten Tiere zeigen sich die SP-positiven im Gegensatz zu den CGRP-positiven Fasern als graue, fadenförmige Strukturen.



Diese ziehen strangförmig vom Pulpencavum zur Spitze des distalen Pulpenhorns (→), wo vereinzelte Einsprenkelungen sichtbar werden.



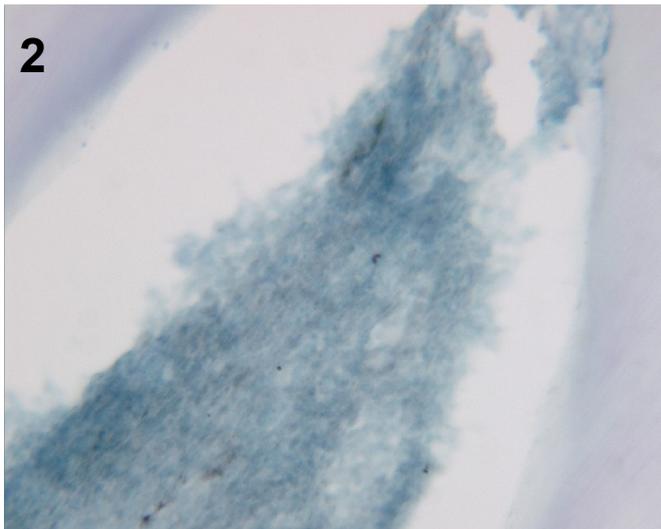
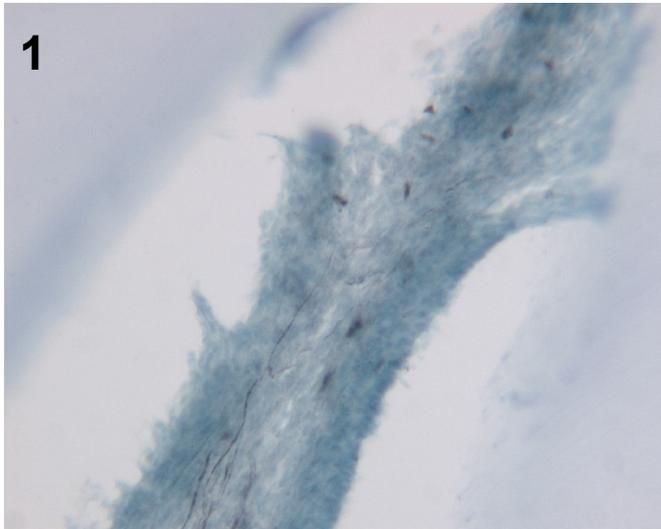
Diese Einsprenkelungen zeigen sich auch in den mit Capsaicin behandelten Tieren. Hier liegen diese jedoch vermehrt innerhalb des Pulpencavums vor. Die in den Kontrolltieren noch deutlich sichtbaren Nervenstränge treten hier nicht mehr so klar in Erscheinung.

**Abb.25: SP-positive Nervenfasern im distalen Pulpenhorn**

**1: Kontrolle, 90 Tage, 100x**

**2: mittels Capsaicin desensibilisierte Ratte, 90 Tage, 100x**

b) 250fache Vergrößerung



**Abb.26: SP-positive Nervenfasern im distalen Pulpenhorn**

**1: Kontrolle, 90 Tage, 250x**

**2: mittels Capsaicin desensibilisierte Ratte, 90 Tage, 250x**

In der 250fachen Vergrößerung des distalen Pulpenhorns wird die Struktur der SP-positiven Fasern noch deutlicher.

Exakt zeigt sich der fadenförmige Verlauf der Nervenfasern entlang der Subodontoblastenzellschicht, welche in den Bereich der Spitze des Pulpenhorns einmünden zu scheinen.

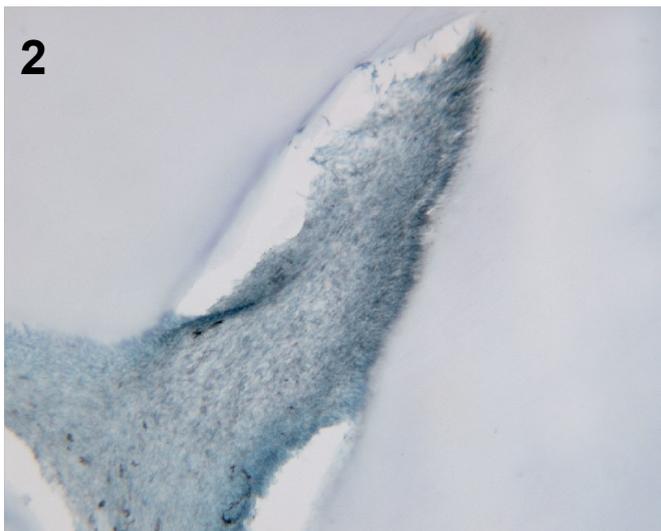
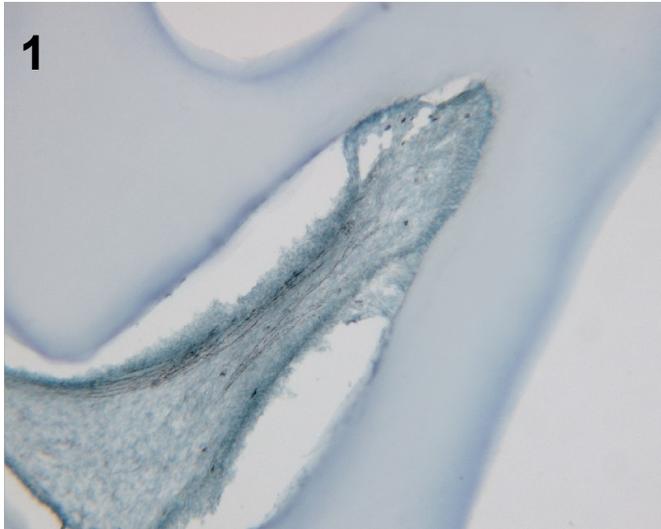
Die SP-positiven Fasern in der Pulpa der Capsaicintiere treten fast vollständig in den Hintergrund.

Ein Hauch einer immunhistochemischen Reaktion kann in einigen vereinzelt Bereichen als blasser Schatten noch erahnt werden. Vereinzelt Anhäufungen

von Farbpigmenten können auch hier gezeigt werden.

#### 4. SP 155 Tage

##### a) 100fache Vergrößerung



**Abb.27: SP-positive Nervenfasern im distalen Pulpenhorn**

**1: Kontrolle, 155 Tage, 100x**

**2: mittels Capsaicin desensibilisierte Ratte, 155Tage, 100x**

Noch deutlicher als in allen bisher beschriebenen Altersgruppen zeigt sich hier der Verlauf der SP-Fasern als dickes Faserbündel entlang der Subodontoblastenzellschicht im Bereich des Pulpencavums, von wo aus sie sich bis in das distale Pulpenhorn erstrecken.

Auch in der Pulpa der mit Capsaicin behandelten Tiere kann zu diesem Zeitpunkt eine deutliche Zunahme an immunreaktiven Fasern beschrieben werden. Jedoch unterschreitet diese Zahl deutlich die Zahl der Fasern innerhalb der Kontrollgruppe. Die Reaktion wirkt hier auch eher plump.

b) 250fache Vergrößerung

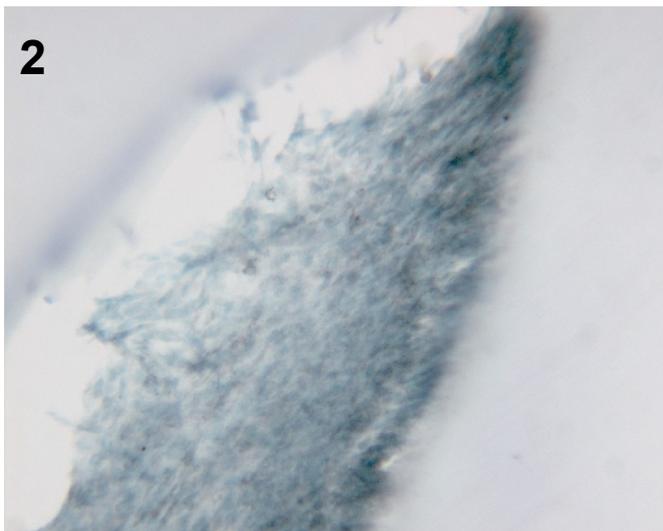
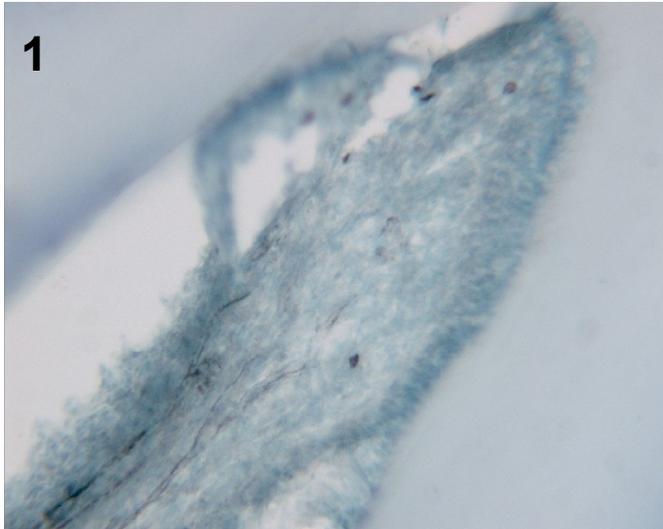


Abb.28: SP-positive Nervenfasern im distalen Pulpenhorn

1: Kontrolle, 155 Tage, 250x

2: mittels Capsaicin desensibilisierte Ratte, 155 Tage, 250x

Deutlich zu sehen ist der strangförmige Verlauf der Fasern, welche zum Teil in enger Beziehung zueinander und beinahe parallel entlang der Subodontoblastenzellschicht verlaufen.

Hier weisen die Fasern entsprechend den CGRP-positiven Fasern eine annähernd perlschnurartige Struktur auf.

Auch hier zeigt sich wieder das bekannte Bild der körnerförmigen Farbreaktionen im Bereich der Spitze des Pulpenhorns.

Dahingegen kann im Pulpenhorn des capsaicinbehandelten Tieres keine eindeutige Immunreaktion nachgewiesen werden.

### 3.1.2 Statistische Datenanalyse

#### Student T-Test

##### 1. SP 30 Tage

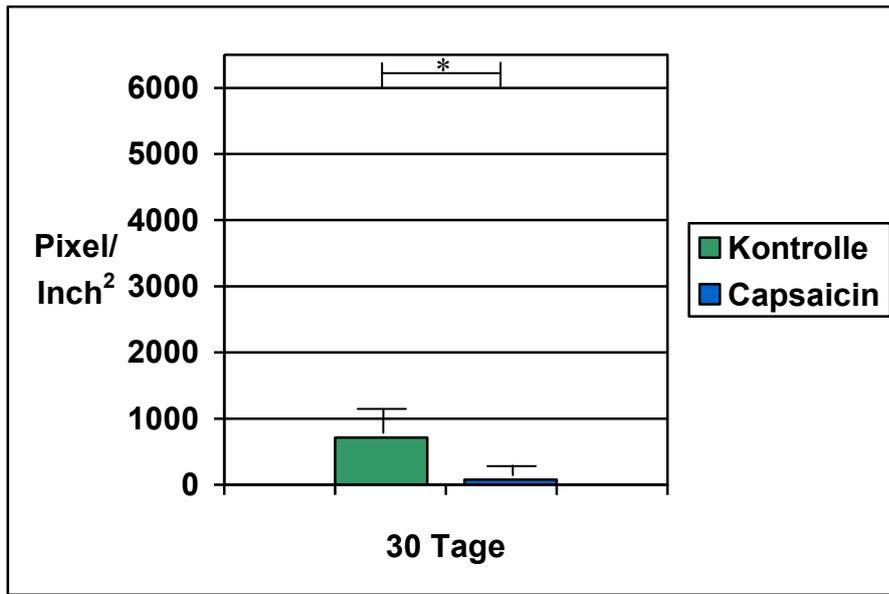


Abb.29: Graphische Darstellung der Anzahl der Pixel pro Inch<sup>2</sup> der immunhistologisch positiven Areale der mit Capsaicin desensibilisierten Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe (30 Tage)

			N	Mittelwert	Standardabweichung	P
SP: Pixel/Inch <sup>2</sup>	30	Kontrolle	12	712,7025	346,43950	<0,001
	Tage	Capsaicin	12	75,4025	175,01119	

Tab.8: Auswertung des Student T-Test

Innerhalb der 30-Tage Gruppe zeigen die capsaicinbehandelten Tiere vergleichend zu den Kontrolltieren eine deutlich reduzierte Zahl an immunreaktiven Fasern. Der Unterschied kann als hochsignifikant beschrieben werden.

## 2. SP 60 Tage

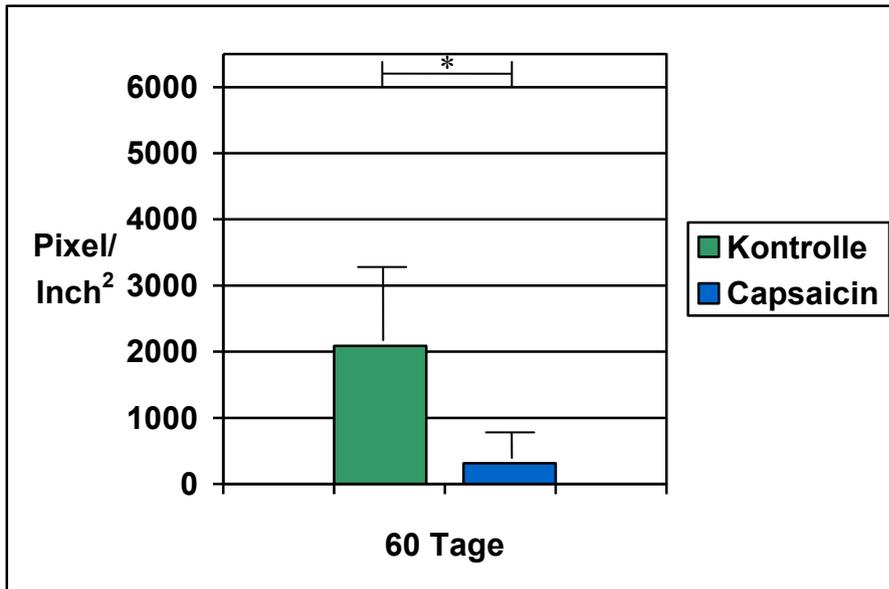


Abb.30: Graphische Darstellung der Anzahl der Pixel pro Inch<sup>2</sup> der immunhistologisch positiven Areale der mit Capsaicin desensibilisierten Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe (60 Tage)

			N	Mittelwert	Standardabweichung	P
SP: Pixel/Inch <sup>2</sup>	60 Tage	Kontrolle	12	2089,5560	1224,89896	<0,001
		Capsaicin	12	313,0423	509,92969	

Tab.9: Auswertung des Student T-Test

Auch nach 60 Tagen zeichnet sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den capsaicinbehandelten Tieren und den korrespondierenden Kontrolltieren ab. Auch hier liegt das Signifikanzniveau erneut bei <0,001.

### 3. SP 90 Tage

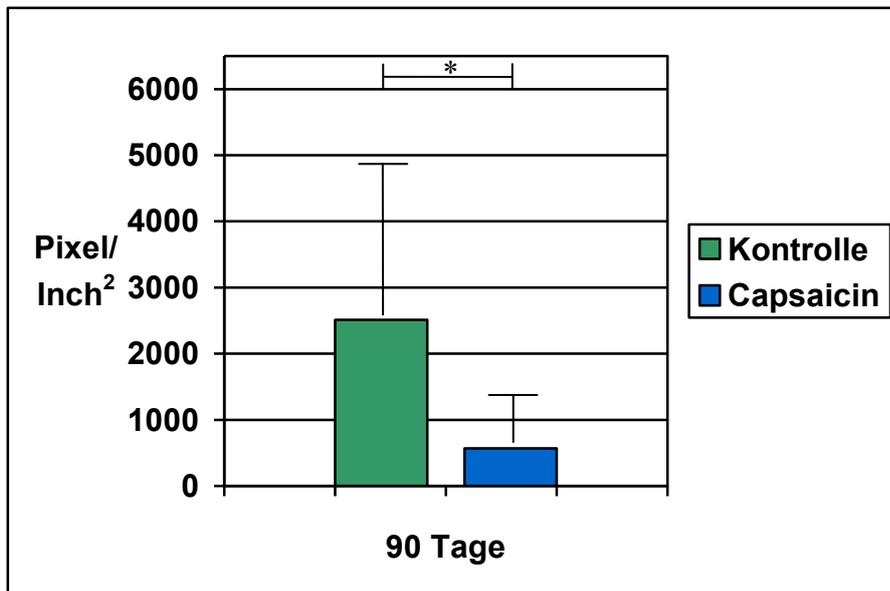


Abb.31: Graphische Darstellung der Anzahl der Pixel pro Inch<sup>2</sup> der immunhistologisch positiven Areale der mit Capsaicin desensibilisierten Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe (90 Tage)

			N	Mittelwert	Standardabweichung	P
SP: Pixel/Inch <sup>2</sup>	90 Tage	Kontrolle	12	2513,5175	2362,73092	<0,05
		Capsaicin	12	568,2608	646,56183	

Tab.10: Auswertung des Student T-Test

Innerhalb der 90 Tage-Gruppe ist der Unterschied zwischen der Zahl an SP-positiven Fasern zwischen den Kontrolltieren und capsaicinbehandelten Tieren mit einer Signifikanz von <0.05 deutlich.

#### 4. SP 155 Tage

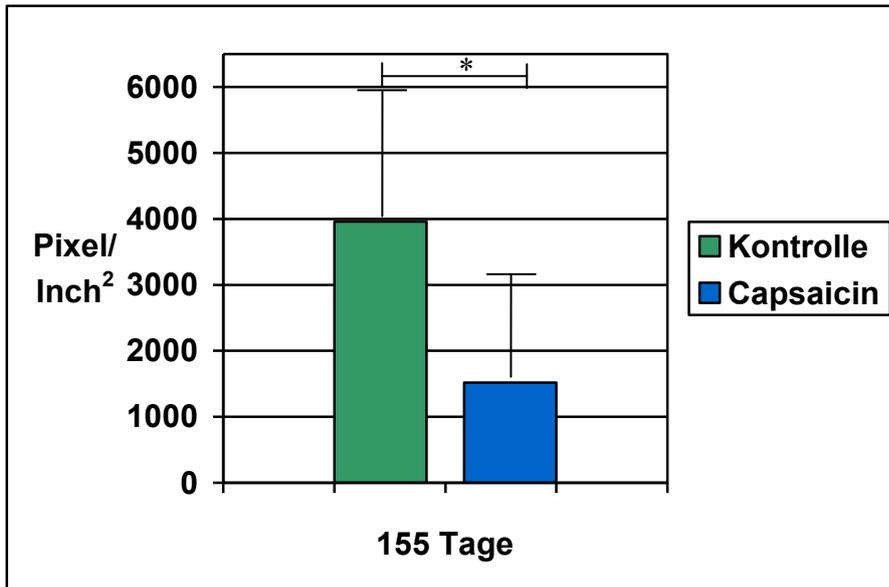


Abb.32: Graphische Darstellung der Anzahl der Pixel pro Inch<sup>2</sup> der immunhistologisch positiven Areale der mit Capsaicin desensibilisierten Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe (155 Tage)

			N	Mittelwert	Standardabweichung	P
SP: Pixel/Inch <sup>2</sup>	155 Tage	Kontrolle	12	3962,2838	2037,44432	>0,05
		Capsaicin	12	1519,6333	1440,93212	

Tab.11: Auswertung des Student T-Test

Nach 155 Tagen ändert sich das Verhältnis zwischen dem Vorkommen von immunreaktiven Fasern innerhalb der Gruppe der Capsaicin- und Kontrolltiere kaum. Auch hier zeigt sich ein mit <0,05 deutlich signifikanter Unterschied.

## Bonferroni Post-Hoc Test

Mittels des Bonferroni Post-Hoc Tests wurden die verschiedenen Altersgruppen sowohl der Capsaicin- als auch der Kontrolltiere untereinander verglichen.

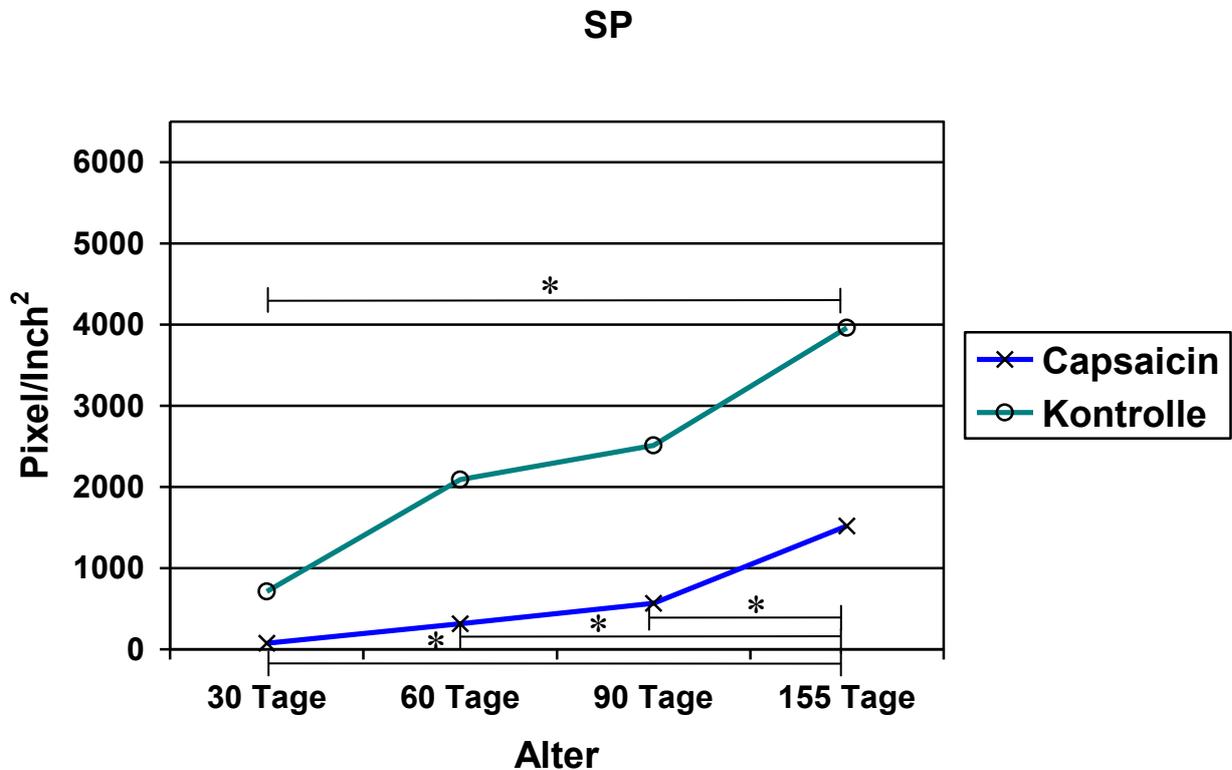


Abb.33: Graphischer Verlauf des Vorkommens an SP-positiven Fasern innerhalb der Kontrolltiere und der capsaicinbehandelten Tiere in Abhängigkeit von der Zeit dessen Einwirkung.

Anhand des graphischen Verlaufs des Vorkommens an immunreaktiven Fasern zeichnet sich eine deutliche Tendenz zur Zunahme an SP-positiven Fasern im Zuge der Alterung ab. Insgesamt kann innerhalb der CapsaicinGruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung eine reduzierte Zahl an SP-positiven Fasern nachgewiesen werden. Innerhalb der CapsaicinGruppe unterscheidet sich das Vorkommen immunreaktiver Fasern sowohl zwischen der 30- und 155-Tage Gruppe, der 60- und 155-Tage Gruppe, als auch der 90- und 155-

Tage Gruppe, während sich in der Kontrollgruppe nur ein signifikanter Unterschied zwischen der 30- und 155-Tage Gruppe zeigt (s. Tab.12).

(I) Alter	(J) Alter	Mittlere Differenz (I-J)	Standartfehler	Signifikanz
30,00	60,00	-1376,8535	733,07722	,403
	90,00	-1800,8150	698,96170	,081
	155,00	-3249,5813*	685,38834	,000
60,00	30,00	1376,8535	733,07722	,403
	90,00	-423,9615	733,07722	1,000
	155,00	-1872,7278	720,14715	,076
90,00	30,00	1800,8150	698,96170	,081
	60,00	423,9615	733,07722	1,000
	155,00	-1448,7663	685,38834	,242
155,00	30,00	3249,5813*	685,38834	,000
	60,00	1872,7278	720,14715	,076
	90,00	1448,7663	685,38834	,242

Kontrolle

Basiert auf beobachteten Mittelwerten

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

(I) Alter	(J) Alter	Mittlere Differenz (I-J)	Standartfehler	Signifikanz
30,00	60,00	-237,6398	306,78383	1,000
	90,00	-492,8583	312,85935	,736
	155,00	-1444,2308*	337,92672	,001
60,00	30,00	237,6398	306,78383	1,000
	90,00	-255,2185	306,78383	1,000
	155,00	-1206,5910*	332,30982	,005
90,00	30,00	492,8583	312,85935	,736
	60,00	255,2185	306,78383	1,000
	155,00	-951,3725*	337,92672	,044
155,00	30,00	1444,2308*	337,92672	,001
	60,00	1206,5910*	332,30982	,005
	90,00	951,3725*	337,92672	,004

Capsaicin

Basiert auf beobachteten Mittelwerten

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

Tab.12: SP-Auswertung (Scion Image)

## 5 Diskussion

### 5.1 Allgemein

Bei der dentalen Pulpa handelt es sich um ein bereits sehr gut untersuchtes Gewebe, welches durch die umliegende Zahnhartsubstanz begrenzt wird. Aufgrund der engen topographischen Lage und der Interaktion zwischen der Pulpa und dem umliegenden Dentin werden diese häufig zum Pulpa-Dentin-Komplex zusammengefasst (Pashley 1996; Torneck 1998). Die sensorische Innervation des Zahnes und seiner umliegenden Gewebe erfolgt durch Nervenfasern, welche aus dem Ganglion trigeminale stammen. Diese treten gebündelt über das Foramen apicale und akzessorische Kanäle in die Pulpenkammer ein. Dort fächern sie sich im koronalen Anteil der Pulpa auf und durchziehen mit ihren freien Nervenendigungen sowohl die Odontoblastenzellschicht als auch das Prädentin und die inneren Anteile des Dentins (Byers, Närhi et al. 1988; Byers 1994).

Bei den sensorischen Nervenfasern handelt es sich vornehmlich um dünn myelinisierte A-delta, sowie um unmyelinisierte C-Fasern (Byers, Wheeler et al. 1992), welche Neuropeptide wie Substance P und CGRP enthalten.

Es ist bereits bekannt, dass eine Aktivierung sensorischer Nervenfasern zu einer Vasodilatation innerhalb der dentalen Pulpa führt (Kim 1990; Olgart, Edwall et al. 1991). Diese Vasodilatation ist zumeist auf die Freisetzung der Neuropeptide CGRP und SP zurückzuführen (Olgart, Gazelius et al. 1977; Heyeraas, Kim et al. 1994). Zudem konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass diese Neuropeptide eine erhöhte Permeabilität der Gefäße für Proteine nach sich ziehen (Raab 1989; Fazekas, Vindisch et al. 1990). Andere Studien konnten eine Vielzahl von direkten Effekten von CGRP und SP auf die verschiedenen Zellen der dentalen Pulpa nachweisen, wobei dem Neuropeptid CGRP eine überwiegend immunmodulierende

und SP eine eher immunstimulierende Funktion zugeschrieben wird (Bar-Shavit, Goldman et al. 1980; Ruff, Wahl et al. 1985; Umeda, Takamiya et al. 1988; Nong, Titus et al. 1989; Hosoi, Murphy et al. 1993).

Da die den Zahn versorgenden Nervenfasern und Blutgefäße hauptsächlich über das Foramen apicale in die Pulpa eintreten und diese auch auf selbem Weg wieder verlassen, kann eine kollaterale Innervation und Blutversorgung nahezu ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund stellt die dentale Pulpa ein adäquates Modell zur Untersuchung der Entwicklung, des Auftretens und Verteilungsmusters von Nervenfasern dar. Durch eine Blockierung der Nervenfasern kann deren Interaktion mit den umliegenden Zahnstrukturen und deren Auswirkung auf die Mikrozirkulation untersucht werden. Die Blockierung kann zum einen durch eine Axotomie erfolgen, bei der der Nervus alveolaris inferior durchtrennt wird (Retief and Dreyer 1969). So ist es beispielsweise möglich, das dentale Gewebe fast vollständig zu denervieren und damit die Auswirkungen einer fehlenden Innervation zu untersuchen. Jacobsen und Heyeraas (1996) zeigten in ihrer Studie an Ratten, dass eine Axotomie des Nervus alveolaris inferior zu einem nahezu vollständigen Verlust von CGRP- und SP-immunreaktiven Nervenfasern innerhalb der Pulpa des ersten Unterkiefermolaren führt. Hierbei zeigte sich im mesialen Pulpenhorn eine fast vollständige Denervation, wohingegen im distalen Pulpenhorn verstreut noch einige wenige immunreaktive Nervenfasern nachgewiesen werden konnten.

Eine andere Alternative bietet die Desensibilisierung mittels systemischer Capsaicinapplikation, bei der gezielt etwa 30% der A-delta Fasern und 90-95% der C-Fasern ausgeschaltet werden können (Lawson and Nickels 1980). Im Gegensatz zu einer Axotomie, bei der durch einen chirurgischen Eingriff lokal die Innervation

unterbunden wird, kann durch die systemische Gabe einer Capsaicinlösung die Innervation chemisch unterbunden werden (Jacobsen and Heyeraas 1996).

Eine wiederholte lokale Applikation von Capsaicin führt zu einer Desensibilisierung polymodaler Nozizeptoren (Carpenter and Lynn 1981; Szolcsanyi, Anton et al. 1988). Hier kehrt die Sensibilität gegenüber Hitzereizen jedoch im Gegensatz zur systemischen Applikation zwei Wochen nach Beendigung der Anwendung wieder (Carpenter and Lynn 1981; Lynn 1990; Simone and Ochoa 1991). Dieser Ansatz wäre von Bedeutung, um die therapeutische Wirkung einer lokalen Capsaicinapplikation zu untersuchen. So werden in der Zahnmedizin Lokalanästhetika zur reversiblen Nervblockierung eingesetzt (Pashley and Liewehr 2006). Diese sind während einer zahnärztlichen Behandlung essentiell für die Schmerzausschaltung, indem sie die neuronale Weiterleitung durch Bindung an die Natriumkanäle der Nervenfasern reversibel blockieren. Um eine längere Wirkung erzielen zu können werden Lokalanästhetika oft in Kombination mit Vasokonstriktoren verabreicht. Diese binden an die alpha-adrenerge Rezeptoren der Blutgefäße, verursachen so eine Reduktion des Blutflusses und führen folglich zu einer verzögerten Absorption des Lokalanästhetikums (White and Durieux 2005). Es konnte gezeigt werden, dass Vasokonstriktoren den pulpalen Blutfluss beeinflussen, indem sie den Durchmesser der Arteriolen und Venolen reduzieren (Simard-Savoie, Lemay et al. 1979; Yu, Boyd et al. 2002). Zudem bewiesen Hargreaves et al., dass auch C-Fasern alpha- und beta-adrenerge Rezeptoren besitzen, an denen Vasokonstriktoren wirken und so die Freisetzung von CGRP reduzieren können (Hargreaves, Jackson et al. 2003).

Viele klinische Behandlungen werden nach Applikation eines Lokalanästhetikums durchgeführt. Eine Kavitätenpräparation oder chemische Irritationen durch dentale

Materialien können durch eine vermehrte Ausschüttung von Neuropeptiden Auswirkungen auf den Pulpa-Dentin-Komplex haben. Diese Auswirkungen können durch die Verabreichung von Lokalanästhetika beeinflusst werden. Die genauen Zusammenhänge konnten bis heute noch nicht eindeutig geklärt werden, so dass die Thematik Gegenstand weiterer Untersuchungen sein sollte, um ein besseres Verständnis für die reizabhängigen Reaktionen des Pulpa-Dentin-Komplexes und die therapeutischen Möglichkeiten, die sich durch die Verabreichung von Capsaicin ergeben könnten, zu bekommen.

## **5.2 Innervation der dentalen Pulpa unter physiologischen Bedingungen**

Die dentale Pulpa der ersten Unterkiefermolaren der untersuchten Ratten wies unter physiologischen Bedingungen eine große Dichte an immunohistochemisch reaktiven Nervenfasern auf. Sowohl CGRP- als auch SP-immunreaktive Nervenfasern konnten in allen Bereichen der Pulpa nachgewiesen werden. Eine besonders hohe Dichte zeigte sich hier, wie auch bereits durch Heyeraas et al. 1993 gezeigt werden konnte, im Bereich der koronalen Pulpa. Die vorliegende Untersuchung konzentriert sich daher auf diesen Bereich der Pulpa-Dentin-Einheit. Jacobsen et al. (1996) stellten fest, dass in der dentalen Pulpa insgesamt mehr CGRP-positive als SP-positive Nervenfasern anzutreffen sind. Diese Aussage deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie. So zeigte sich, dass unter physiologischen Bedingungen zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung mehr CGRP-immunreaktive als SP-immunreaktive Nervenfasern anzutreffen sind. Der größte Unterschied zeigte sich dabei innerhalb der Pulpa der 30 Tage alten Tiere. Hier waren in etwa neunmal mehr CGRP- als SP-positive Nervenfasern anzutreffen. Im

Laufe der weiteren Entwicklung schienen sich die Zahlen anzunähern, so dass nach 155 Tagen nur noch zirka doppelt so viele CGRP- wie SP-positive Nervenfasern vorzufinden waren (s.Abb.34).

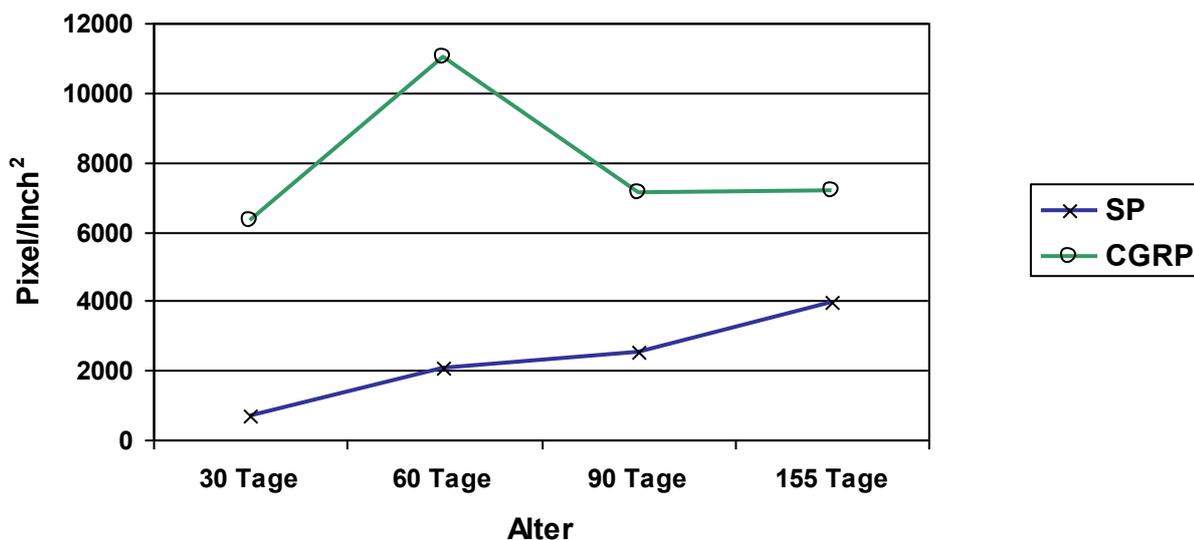


Abb.34: Vorkommen der Neuropeptide CGRP und SP im distalen Pulpenhorn unter physiologischen Bedingungen

Des Weiteren berichteten Heyeraas et al. 1993, dass in allen untersuchten Zähnen immunreaktive Nervenfasern im Bereich der koronalen Pulpa unterhalb der Odontoblastenzellschicht ein dichtes Netzwerk bilden. Die Nervenfasern reichten dabei nicht weiter als 100µm in die umliegenden Dentintubuli, wobei es sich zumeist um CGRP-immunreaktive Nervenfasern handelte. SP-immunreaktive Nervenfasern waren innerhalb der Pulpa 3-4-mal seltener anzutreffen und dann zumeist im Bereich von Gefäßwänden lokalisiert. Der Hauptteil der sowohl CGRP- als auch SP-immunreaktiven Nervenfasern konnte dabei im zentralen Anteil der Pulpa in der Nähe von Blutgefäßen nachgewiesen werden, was ihr Mitwirken an der Regulation der Blutzirkulation unterstreicht (Heyeraas, Kvinnsland et al. 1993).

Innerhalb des distalen Pulpenhorns der ersten Unterkiefermolaren der Kontrolltiere dieser Studie zeigte sich ein dichtes Verteilungsmuster CGRP-immunreaktiver Nervenfasern. Lokalisiert werden konnten die Nervenfasern vor allem im Bereich der Subodontoblastenzellschicht. Von dort aus scheinen sie mit einzelnen Fasern die Odontoblastenzellschicht Richtung Dentin zu durchqueren.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen bis zum 60. Lebensjahr eine Zunahme der CGRP-immunreaktiven Nervenfasern. Nach diesem Zeitpunkt nimmt die Dichte der immunreaktiven Fasern bis zum 90. Lebensjahr wieder ab und stabilisiert sich bis zum 155. Lebensjahr. Dieser Verlauf lässt auf einen von der Zahnentwicklung abhängigen Prozess schließen. So zeigt sich, dass es während der Zahnreife vom 30. bis zum 60. Lebensjahr zu einer Zunahme CGRP-immunreaktiver Fasern kommt, wobei die Dichte am 60. Tag mit dem Abschluss des Wurzelwachstums und dem Schluss des Foramen apicale ihren Höhepunkt erreicht. Diese Annahme deckt sich mit den Ergebnissen von Byers et al. (1982). Sie konnten zeigen, dass die Reaktion auf elektrische Stimulation zu diesem Zeitpunkt am größten ist, was sich durch das größte Vorkommen an Nervenfasern erklären lassen könnte. Mit zunehmendem Alter kommt es zu einer Abnahme der Sensibilität, was im Zusammenhang mit einer immer weiter fortschreitenden Sekundärdentinbildung, sowie der Abnahme der Zahl sensorischer Nervenfasern stehen könnte (Byers, Neuhaus et al. 1982).

SP-immunreaktive Fasern konnten, wie auch die CGRP-positiven Nervenfasern, innerhalb der Kontrollgruppe im distalen Pulpenhorn des ersten Unterkiefermolaren nachgewiesen werden. Größtenteils zeigten sich die Fasern subodontoblastisch lokalisiert, wobei nur einzelne Nervenfasern durch die Odontoblastenzellschicht zu ziehen scheinen.

Betrachtet man das Vorkommen SP-positiver Nervenfasern im Verlauf der Zahnentwicklung, so zeigt sich beginnend vom 30. Lebenstag eine stetige Zunahme dieses Nervenfasertypen im Bereich des distalen Pulpenhornes. Ein signifikanter Unterschied zeigt sich dabei im Vorkommen zwischen dem 30. und 155. Lebenstag. Zwischen dem 60. und 90. Lebenstag scheint die Zunahme der SP-positiven Nervenfasern etwas zu stagnieren. Diese Phase korreliert zeitlich mit dem von Byers et al. (1982) beschriebenen Abschluss des Wurzelwachstums und dem Schluss des Foramen apicale. Anders jedoch als Byers et al. formulierten, weisen die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass auch nach Abschluss des Wurzelwachstums eine weitere Zunahme der Zahl SP-positiver Nervenfasern erfolgt.

### **5.3 Vergleich des Vorkommens und Verteilungsmusters CGRP- und SP-immunreaktiver Nervenfasern unter physiologischen Bedingungen**

Vergleicht man die Zahl an CGRP- und SP-immunreaktiven Nervenfasern innerhalb der Pulpa, so fällt auf, dass zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung mehr CGRP-immunreaktive als SP-immunreaktive Nervenfasern zu finden sind. Diese Ergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen vorangegangener Studien. So zeigten Swift und Byers im Bereich der zervikalen und radikulären Anteile der Pulpa zahlreiche immunreaktive Fasern auf CGRP, jedoch nicht auf SP (Swift and Byers 1992). Die Ergebnisse von Heyeraas et al. (1993) erwiesen ein deutlich größeres Vorkommen an CGRP-immunreaktiven als an SP-immunreaktiven Nervenfasern im Bereich der koronalen Pulpa. Dies lässt denn Schluss zu, dass in der Pulpa insgesamt vermehrt CGRP-immunreaktive Fasern im Vergleich zu SP-immunreaktiven Fasern anzutreffen sind (Gazelius, Edwall et al. 1987). Wenngleich

einige dentale Axone eine Immunreaktivität auf CGRP und SP zeigen (Wakisaka 1990), deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass viele Nervenfasern, die innerhalb der dentalen Pulpa von Ratten lokalisiert sind, nur CGRP beinhalten.

Vergleicht man das Verteilungsmuster der CGRP- und SP-immunreaktiven Fasern im Verlauf der Entwicklung, fällt zudem auf, dass sich die CGRP-positiven Nervenfasern im Laufe des Alterungsprozesses immer weiter in die Richtung der Odontoblastenzellschicht orientieren. Die histologischen Ergebnisse zeigen deutlich, dass sich das subodontoblastisch gelegene Nervenfasergeflecht verdichtet und von diesem ausgehend die CGRP-positiven Fasern durch die Odontoblastenzellschicht bis in das Dentin ziehen. Die Zahl des Vorkommens an CGRP-positiven Nervenfasern scheint dabei von der Zahnentwicklung abhängig zu sein. So zeigt sich die höchste Dichte an CGRP-positiven Nervenfasern nach sechzig Lebenstagen, was mit dem Abschluss des Wurzelwachstums korreliert. Nach diesem Zeitpunkt nimmt die Zahl der CGRP-positiven Nervenfasern wieder ab, was die Vermutung äußern lässt, dass den CGRP-positiven Nervenfasern während der Zahnentwicklung eine modulierende Rolle zukommt. Im Vergleich zu dieser Entwicklung scheint die Entwicklung der SP-positiven Nervenfasern gegenläufig zu sein. Beginnend vom 30. Lebenstag an scheinen sich die Nervenfasern ausgehend von der Subodontoblastenzellschicht kontinuierlich mit zunehmendem Alter zentralwärts zurückzuziehen. Bedeutend seltener konnten in der histologischen Auswertung SP-positiv Nervenfasern innerhalb der Odontoblastenzellschicht lokalisiert werden. Auch scheint der Abschluss der Zahnentwicklung in der siebten Lebenswoche keinen bedeutenden Einfluss auf das Vorkommen SP-positiver Nervenfasern zu haben. Während der Verschluss des Foramen apicale bei den CGRP-positiven

Nervenfasern zu einer Reduktion dieser führt, scheint die Zahl Substance P enthaltender Nervenfasern weiterhin zuzunehmen.

Insgesamt kann daraus geschlossen werden, dass CGRP- und SP-immunreaktive Nervenfasern eine unterschiedliche Entwicklungszeit und im selben Lebensalter eine andere Lokalisation innerhalb der dentalen Pulpa einnehmen. Es ist unwahrscheinlich, dass die Neuropeptide von denselben Nervenfasern, jedoch an unterschiedlichen Stellen freigesetzt werden. Geht man von der ersten Annahme aus, kann vermutet werden, dass den CGRP- und SP-enthaltenden Nervenfasern sowohl während als auch nach Abschluss der Zahnentwicklung unterschiedliche Aufgaben zukommen.

Um diese Annahme bestätigen zu können, sind weiterführende Studien erforderlich, in denen man anhand der immunhistochemischen Methode einer Doppelfärbung die genaue Lokalisation von CGRP und SP ermitteln kann, um auszuschließen, dass es sich um die selben Nervenfasern handelt.

#### **5.4 Auswirkungen einer neonatalen systemischen Desensibilisierung auf CGRP- und SP-immunreaktive Nervenfasern in der dentalen Pulpa**

Bei Capsaicin handelt es sich um ein Neurotoxin aus Pflanzen der Gattung Capsicum. Als topisch angewandte Creme hat es bereits weite Verbreitung gefunden. So wird es bei einer Vielzahl chronischer Leiden, wie der postherpetischen Neuralgie, der diabetischen Neuropathie, Osteoarthritis und rheumatoiden Arthritis, sowie zusätzlich bei Pruritus, Psoriasis oder Clusterkopfschmerzen eingesetzt (Reynolds 1999). Capsaicin agiert dabei als ein Aktivator unmyelinisierter und dünn myelinisierter nozizeptiver Nervenfasern mit kleinem Durchmesser (Konietzny, Perl et

al. 1981; Kenins 1982; Szolcsanyi, Anton et al. 1988; Baumann, Simone et al. 1991; LaMotte, Shain et al. 1991).

In der Literatur ist bereits mehrfach belegt worden, dass eine neonatale, systemische Applikation von Capsaicin in Ratten zu einer systemischen Desensibilisierung sensorischer Nervenfasern führt (Buck and Burks 1986). Während das Ausmaß dieser Desensibilisierung auf die Haut schon gut untersucht ist, ist bisher noch nicht ausreichend erforscht, wie sich die systemische Desensibilisierung auf die Entwicklung des Nervenfasersystems innerhalb der dentalen Pulpa auswirkt.

Vor der Durchführung dieser Studie wurde die These aufgestellt, dass die systemische Verabreichung von Capsaicin zu einer Reduktion der CGRP- und SP-immunreaktiven Nervenfasern innerhalb der dentalen Pulpa führt. In verschiedenen Voruntersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass die systemische Desensibilisierung mittels Capsaicin zu einer signifikanten Reduktion von CGRP-immunreaktiven Nervenfasern innerhalb der Pulpa von 150 Tage alten Ratten führt (Krage, Lambrichts et al. 2002a) und ein Zusammenhang zwischen einer durch systemische Capsaicinapplikation herbeigeführten Desensibilisierung und einer veränderten Dentinstruktur besteht (Krage, Lambrichts et al. 2002b; Krage, Stiefel et al. 2005). Die aus dieser Studie gewonnenen Ergebnisse stimmen mit dieser These überein und bestätigen unter anderem die Ergebnisse der von Jacobsen et al. (1996) durchgeführten Untersuchungen. Gegenstand der Untersuchung war die Auswirkung einer reduzierten sensorischen Innervation durch zum einen eine systemische Capsaicinapplikation und zum anderen durch die Axotomie des Nervus alveolaris inferior auf die Dentinformation bei Rattenmolaren. Sie konnten eine bleibende Reduktion CGRP- und SP-immunreaktiver Nervenfasern innerhalb der Pulpa der capsaicinbehandelten Tiere, sowie eine fast vollständige Elimination dieser Fasern

durch eine Axotomie belegen. Ferner zeigten sie eine signifikante Reduktion der Dentinformation sowohl innerhalb der Capsaicin- als auch der Axotomiegruppe, was darauf schließen lässt, dass die sensorischen Neuropeptide CGRP und SP eine Rolle bei der Dentinformation spielen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass eine systemische Capsaicinapplikation insgesamt zu einer Reduktion der Zahl an Nervenfasern führt, jedoch zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung eine vollständige Eliminierung der Nervenfasern erzielt werden konnte. Dies bestätigt die Ergebnisse von Lawson et al. (1980). Er konnte zeigen, dass eine systemische Capsaicinapplikation zu einer Reduktion von A-delta (30%) und C-Fasern (90-95%) im Bereich der Hinterwurzel (L4-T13), jedoch nicht zu einem vollständigen Verlust der Fasern führt.

Betrachtet man das Verteilungsmuster der immunreaktiven Fasern innerhalb des distalen Pulpenhorns der capsaicinbehandelten Tiere, fällt auf, dass die Nervenfasern über den gesamten Beobachtungszeitraum zwar weiterhin in allen Bereichen anzutreffen sind, ihr Verteilungsmuster jedoch insgesamt in einer geringeren Dichte in Erscheinung tritt. So scheint sich die Zahl der CGRP-immunreaktiven Fasern vor allem im Bereich der Subodontoblastenzellschicht zu reduzieren. Während in der Pulpa der Kontrolltiere ein dichtes Netzwerk an subodontoblastisch gelegenen Nervenfasern beschrieben werden konnte, zeigt sich dieses Netzwerk innerhalb der capsaicinbehandelten Tiere weniger ausgeprägt und insgesamt deutlich lichter. Des Weiteren scheinen weniger immunreaktive Nervenfasern aus dem subodontoblastisch gelegenen Nervenfasergeflecht die Odontoblastenzellschicht zu durchziehen.

Als Konsequenz lässt sich daraus schlussfolgern, dass eine systemische Applikation von Capsaicin bedingt durch eine verminderte Innervation im Bereich der Pulpa-Dentin-Grenze zu einer verringerten Dentinsensibilität führt.

Offen bleibt die Frage, ob es sich bei den nach Capsaicinapplikation innerhalb der Pulpa verbliebenen Nervenfasern ausschließlich um A-delta Fasern oder auch C-Fasern handelt. Dazu sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

### **5.5 Auswirkung einer neonatalen systemischen Desensibilisierung auf dentale Gewebe**

Verschiedene Studien haben die Auswirkungen auf die Physiologie der dentalen Pulpa, die durch eine systemische Capsaicinapplikation auftreten, als Gegenstand ihrer Untersuchungen gewählt. So konnten Jacobsen et al. 1996, nachdem sie zeigten, dass eine wiederholte Capsaicininjektion zu einer Reduktion der CGRP- und SP-immunreaktiven Fasern innerhalb der Pulpa führt, zudem aufzeigen, dass CGRP- und SP-immunreaktive Nervenfasern sowohl Einfluss auf die physiologische wie auch reparative Dentinbildung innerhalb der koronalen Pulpa haben.

Darüber hinaus führt eine systemische Desensibilisierung zu einer Veränderung der Dentinqualität (Raab, Stiefel et al. 1996; Krage, Stiefel et al. 2005). Raab et al. berichteten nach neonataler systemischer Capsaicinapplikation über eine Reduktion der Prädentinschicht und zeigten ferner, dass die Verringerung der sensiblen Innervation zu Defekten innerhalb des Dentins führt. Eine weitere Studie von Seltmann et al. zeigte zudem, dass die Schädigung der Dentinstruktur durch neonatale systemische Capsaicinapplikation altersabhängig auftritt. So zeigte sich

innerhalb der Pulpa der Versuchstiere im Vergleich zur Kontrollgruppe am 30. Lebenstag keine Veränderung der Dentinstruktur, wohingegen ab dem 60. Lebenstag deutliche Dentindefekte, wie irreguläre Dentintubuli und Hohlräume, auftraten (Seltmann, Krage et al. 2007). Vergleicht man die Ergebnisse mit den Erkenntnissen der vorliegenden Studie, so zeigt sich, dass das Auftreten der Dentindefekte zeitlich mit dem verminderten Vorkommen der CGRP-immunreaktiven Nervenfasern korreliert. Während eine Reduktion am 30. Lebenstag keine Auswirkungen auf die Dentinstruktur zu haben scheint, zeigen sich am 60. Lebenstag durch die irreversible Desensibilisierung deutliche Dentindefekte. Daraus kann geschlossen werden, dass die Zahl der vorkommenden immunreaktiven sensorischen Nervenfasern Einfluss auf die regelrechte Dentinbildung haben, wobei der Zeitraum zwischen dem 30. und 60. Lebenstag von besonderer Bedeutung zu sein scheint. Die Studie von Krage et al. (2005) bewies eine Reduktion der Vicker's Mikrohärte innerhalb der untersuchten Dentinbereiche der mittels Capsaicin desensibilisierten 150 Tage alten Tiere. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine selektive Reduktion der nozizeptiven Innervation einen hemmenden Einfluss auf die Odontoblastenfunktion besitzt, wobei der genaue Mechanismus noch nicht eindeutig geklärt werden konnte.

Alle angeführten Untersuchungen weisen auf ein komplexes Zusammenspiel zwischen den verschiedenen Zellen der Pulpa-Dentin-Einheit und den sensorischen Nervenfasern, die den Zahn innervieren, hin. Des Weiteren zeigen sie beeindruckend, wie dieses System durch verschiedene Faktoren beeinflusst und aus dem Gleichgewicht gebracht werden kann. Das Ausmaß der Interaktionen und gegenseitigen Abhängigkeiten lässt sich bis heute nur erahnen.

## 5.6 Schlussfolgerung

Aus den vorliegenden Ergebnissen können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

1. Im koronalen Anteil der Pulpa bilden die sensorischen Nervenfasern unterhalb der Odontoblastenzellschicht einen Plexus. Dabei scheint es sich zumeist um CGRP-immunreaktive Nervenfasern zu handeln.
2. Zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung lassen sich unter physiologischen Bedingungen innerhalb der Pulpa vermehrt CGRP-immunreaktive Nervenfasern im Vergleich zu SP-immunreaktiven Fasern finden.
3. Während sich die CGRP-immunreaktiven Nervenfasern während der Zahnentwicklung zur Odontoblastenzellschicht hin orientieren zu scheinen, sieht es so aus als ob sich die SP-immunreaktiven Nervenfasern mit zunehmendem Alter zentralwärts zurückziehen.
4. Die Zahl CGRP-immunreaktiver Nervenfasern zeigt eine enge Korrelation mit der Zahnentwicklung, wohingegen die SP-immunreaktiven Fasern eine untergeordnete Funktion während der Zahnentwicklung zu haben scheinen.
5. Eine systemische, neonatale Desensibilisierung mittels Capsaicin führt zu einer Reduktion der CGRP- und SP-immunreaktiven Nervenfasern innerhalb der Pulpa.

Um die genauen physiologischen Zusammenhänge zwischen dem sensorischen Nervenfasersystem und den zellulären Bestandteilen der dentalen Pulpa aufzudecken und erklären zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen. In einer weiteren Studie soll nun die Auswirkung einer reduzierten Innervation mittels neonataler Capsaicinapplikation auf das Wurzelwachstum von Rattenmolaren untersucht werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aars, H., P. Brodin, et al. (1993). "A study of cholinergic and beta-adrenergic components in the regulation of blood flow in the tooth pulp and gingiva in man." Acta Physiol Scand **148**(4): 441-7.
- Adam, C., A. Llorens, et al. (2000). "Effects of capsaicin-induced sensory denervation on osteoclastic resorption in adult rats." Exp Physiol **85**(1): 62-6.
- Alvarez, F. J., A. M. Kavookjian, et al. (1993). "Ultrastructural morphology, synaptic relationships, and CGRP immunoreactivity of physiologically identified C-fiber terminals in the monkey spinal cord." J Comp Neurol **329**(4): 472-90.
- Amara, S. G., J. L. Arriza, et al. (1985). "Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide." Science **229**(4718): 1094-7.
- Amara, S. G., V. Jonas, et al. (1982). "Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products." Nature **298**(5871): 240-4.
- Awawdeh, L., F. T. Lundy, et al. (2002). "Quantitative analysis of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in pulp tissue from painful and healthy human teeth." Int Endod J **35**(1): 30-6.
- Bar-Shavit, Z., R. Goldman, et al. (1980). "Enhancement of phagocytosis - a newly found activity of substance P residing in its N-terminal tetrapeptide sequence." Biochem Biophys Res Commun **94**(4): 1445-51.
- Baumann, T. K., D. A. Simone, et al. (1991). "Neurogenic hyperalgesia: the search for the primary cutaneous afferent fibers that contribute to capsaicin-induced pain and hyperalgesia." J Neurophysiol **66**(1): 212-27.
- Bishop, M. A., M. Malhotra, et al. (1991). "Interodontoblastic collagen (von Korff fibers) and circumpulpal dentin formation: an ultrathin serial section study in the cat." Am J Anat **191**(1): 67-73.
- Boenisch, T., A. Farmilo, et al. (2003). Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden. Hamburg, Dako Cytomation.
- Bongenhielm, U., A. Haegerstrand, et al. (1995). "Effects of neuropeptides on growth of cultivated rat molar pulp fibroblasts." Regul Pept **60**(2-3): 91-8.
- Brain, S. D., T. J. Williams, et al. (1985). "Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator." Nature **313**(5997): 54-6.
- Breschi, L., M. Lopes, et al. (2002). "Dentin proteoglycans: an immunocytochemical FEISEM study." J Biomed Mater Res **61**(1): 40-6.

- Bronckers, A. L., S. Gay, et al. (1987). "Immunolocalization of Gla proteins (osteocalcin) in rat tooth germs: comparison between indirect immunofluorescence, peroxidase-antiperoxidase, avidin-biotin-peroxidase complex, and avidin-biotin-gold complex with silver enhancement." J Histochem Cytochem **35**(8): 825-30.
- Bronckers, A. L., D. M. Lyaruu, et al. (1989). "Immunohistochemistry of extracellular matrix proteins during various stages of dentinogenesis." Connect Tissue Res **22**(1-4): 65-70.
- Buck, S. H. and T. F. Burks (1986). "The neuropharmacology of capsaicin: review of some recent observations." Pharmacol Rev **38**(3): 179-226.
- Butler, W. T., R. N. D'Souza, et al. (1992). "Recent investigations on dentin specific proteins." Proc Finn Dent Soc **88 Suppl 1**: 369-76.
- Byers, M. (1990). "Segregation of NGF receptor in sensory receptors, nerves and local cells of teeth and periodontium demonstrated by EM immunocytochemistry." J Neurocytol **19**: 765-777.
- Byers, M. (1992). "Effects of inflammation on dental sensory nerves and vice versa." Proc Finn Dent Soc **88**(I): 499-506.
- Byers, M., M. Närhi, et al. (1988). "Acute and chronic reactions of dental sensory nerve fibres to cavities and desiccation in rat molars." Anat Rec **221**: 872-883.
- Byers, M., P. Taylor, et al. (1990). "Effects of injury and inflammation on pulpal and periapical nerves." J Endod **16**: 78-84.
- Byers, M. R. (1984). "Dental sensory receptors." Int Rev Neurobiol **25**: 39-94.
- Byers, M. R. (1990). "Segregation of NGF receptor in sensory receptors, nerves and local cells of teeth and periodontium demonstrated by EM immunocytochemistry." J Neurocytol **19**(5): 765-75.
- Byers, M. R. (1992). "Effects of inflammation on dental sensory nerves and vice versa." Proc Finn Dent Soc **88 Suppl 1**: 499-506.
- Byers, M. R. (1994). "Dynamic plasticity of dental sensory nerve structure and cytochemistry." Arch Oral Biol **39 Suppl**: 13S-21S.
- Byers, M. R. (1996). Neuropeptide immunoreactivity in dental sensory nerves: variations related to primary odontoblast function and survival. dentin/Pulp Complex. M. Shimono and K. Takahashi. Tokyo, Quintessence Publishing Co.
- Byers, M. R. (2002). Nerve supply of the pulpodentin complex and response to injury. Seltzer and Bender's dental pulp. K. M. Hargreaves and H. E. Goodis. Chicago, Quintessence: 151.
- Byers, M. R. and M. V. Narhi (1999). "Dental injury models: experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions." Crit Rev Oral Biol Med **10**(1): 4-39.

- Byers, M. R., M. V. Narhi, et al. (1987). "Sensory innervation of pulp and dentin in adult dog teeth as demonstrated by autoradiography." Anat Rec **218**(2): 207-15.
- Byers, M. R., S. J. Neuhaus, et al. (1982). "Dental sensory receptor structure in human teeth." Pain **13**(3): 221-35.
- Byers, M. R., H. Suzuki, et al. (2003). "Dental neuroplasticity, neuro-pulpal interactions, and nerve regeneration." Microsc Res Tech **60**(5): 503-15.
- Byers, M. R. and P. E. Taylor (1993). "Effect of sensory denervation on the response of rat molar pulp to exposure injury." J Dent Res **72**(3): 613-8.
- Byers, M. R., E. F. Wheeler, et al. (1992). "Altered expression of NGF and P75 NGF-receptor by fibroblasts of injured teeth precedes sensory nerve sprouting." Growth Factors **6**(1): 41-52.
- Calland, J. W., S. E. Harris, et al. (1997). "Human pulp cells respond to calcitonin gene-related peptide in vitro." J Endod **23**(8): 485-9.
- Calvo, C. F., G. Chavanel, et al. (1992). "Substance P enhances IL-2 expression in activated human T cells." J Immunol **148**(11): 3498-504.
- Carpenter, S. E. and B. Lynn (1981). "Vascular and sensory responses of human skin to mild injury after topical treatment with capsaicin." Br J Pharmacol **73**(3): 755-8.
- Caterina, M. J., M. A. Schumacher, et al. (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." Nature **389**(6653): 816-24.
- Caviedes-Bucheli, J., N. Arenas, et al. (2005). "Calcitonin gene-related peptide receptor expression in healthy and inflamed human pulp tissue." Int Endod J **38**(10): 712-7.
- Caviedes-Bucheli, J., M. M. Azuero-Holguin, et al. (2005). "The effect of capsaicin on substance P expression in pulp tissue inflammation." Int Endod J **38**(1): 30-3.
- Caviedes-Bucheli, J., C. Camargo-Beltran, et al. (2004). "Expression of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in irreversible acute pulpitis." J Endod **30**(4): 201-4.
- Caviedes-Bucheli, J., J. Correa-Ortíz, et al. (2005). "The effect of cavity preparation on substance P expression in human dental pulp." J Endod **31**: 857-9.
- Caviedes-Bucheli, J., J. E. Gutierrez-Guerra, et al. (2007). "Substance P receptor expression in healthy and inflamed human pulp tissue." Int Endod J **40**(2): 106-11.
- Caviedes-Bucheli, J., N. Lombana, et al. (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.

- Caviedes-Bucheli, J., H. R. Munoz, et al. (2008). "Neuropeptides in dental pulp: the silent protagonists." J Endod **34**(7): 773-88.
- Chang, M. M., S. E. Leeman, et al. (1971). "Amino-acid sequence of substance P." Nat New Biol **232**(29): 86-7.
- Chen, J., C. A. McCulloch, et al. (1993). "Bone sialoprotein in developing porcine dental tissues: cellular expression and comparison of tissue localization with osteopontin and osteonectin." Arch Oral Biol **38**(3): 241-9.
- Coil, J., E. Tam, et al. (2004). "Proinflammatory cytokine profiles in pulp fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide and methyl mercaptan." J Endod **30**: 88-91.
- Corpron, R. E., J. K. Avery, et al. (1973). "Ultrastructure of capillaries in the odontoblastic layer." J Dent Res **52**(2): 393.
- Coure, E. (1986). "Ultrastructural changes during the life cycle of human odontoblasts." Arch Oral Biol **31**: 643.
- Culp, W. J., J. Ochoa, et al. (1989). "Heat and mechanical hyperalgesia induced by capsaicin. Cross modality threshold modulation in human C nociceptors." Brain **112 ( Pt 5)**: 1317-31.
- de Hoon, J. N., P. Pickkers, et al. (2003). "Calcitonin gene-related peptide: exploring its vasodilating mechanism of action in humans." Clin Pharmacol Ther **73**(4): 312-21.
- Deal, C. L., T. J. Schnitzer, et al. (1991). "Treatment of arthritis with topical capsaicin: a double-blind trial." Clin Ther **13**(3): 383-95.
- Dong, W. K., E. H. Chudler, et al. (1985). "Physiological properties of intradental mechanoreceptors." Brain Res **334**(2): 389-95.
- Dubner, R. (1991). "Topical capsaicin therapy for neuropathic pain." Pain **47**(3): 247-8.
- Edvinsson, L., H. Mulder, et al. (1998). "Calcitonin gene-related peptide and nitric oxide in the trigeminal ganglion: cerebral vasodilatation from trigeminal nerve stimulation involves mainly calcitonin gene-related peptide." J Auton Nerv Syst **70**(1-2): 15-22.
- Edwall, B., B. Gazelius, et al. (1985). "Neuropeptide Y and sympathetic control of blood flow in oral mucosa and dental pulp in the cat." Acta Physiol Scand **125**: 255-264.
- Edwall, L. and M. Kindlova (1971). "The effect of sympathetic nerve stimulation on the rate of disappearance of tracers from various oral tissues." Acta Odontol Scand **29**(4): 387-400.
- Fallgren, B., E. Ekblad, et al. (1989). "Co-existence of neuropeptides and differential inhibition of vasodilator responses by neuropeptide Y in guinea pig uterine arteries." Neurosci Lett **100**(1-3): 71-6.

- Fazekas, A., K. Vindisch, et al. (1990). "Experimentally-induced neurogenic inflammation in the rat oral mucosa." J Periodontal Res **25**(5): 276-82.
- Fearnhead, R. W. (1961). "The neurohistology of human dentine." Proc R Soc Med **54**: 877-84.
- Fink, B. R., S. J. Kish, et al. (1975). "Rapid axonal transport in trigeminal nerve of rat." Brain Res **90**(1): 85-95.
- Fitzgerald, M. (1983). "Capsaicin and sensory neurones--a review." Pain **15**(2): 109-30.
- Fleetwood-Walker, S. (1995). "Nonopioid mediators and modulators of nociceptive processing in the spinal dorsal horn as targets for novel analgesics." Pain Rev **2**: 153-173.
- Flores, C. M., A. S. Leong, et al. (2001). "Capsaicin-evoked CGRP release from rat buccal mucosa: development of a model system for studying trigeminal mechanisms of neurogenic inflammation." Eur J Neurosci **14**(7): 1113-20.
- Fried, K. (1992). "Changes in pulpal nerves with aging." Proc Finn Dent Soc **88 Suppl 1**: 517-28.
- Fried, K., H. Aldskogius, et al. (1988). "Proportion of unmyelinated axons in rat molar and incisor tooth pulps following neonatal capsaicin treatment and/or sympathectomy." Brain Res **463**(1): 118-23.
- Fried, K., C. Nosrat, et al. (2000). "Molecular signaling and pulpal nerve development." Crit Rev Oral Biol Med **11**(3): 318-32.
- Fristad, I., K. J. Heyeraas, et al. (1994). "Nerve fibres and cells immunoreactive to neurochemical markers in developing rat molars and supporting tissues." Arch Oral Biol **39**(8): 633-46.
- Fristad, I., V. Vandevska-Radunovic, et al. (2003). "NK1, NK2, NK3 and CGRP1 receptors identified in rat oral soft tissues, and in bone and dental hard tissue cells." Cell Tissue Res **311**(3): 383-91.
- Games, R., P. Holzer, et al. (1980). "Decrease of substance P in primary afferent neurons and impairment of neurogenic plasma extravasation by capsaicin." British Journal of Pharmacology **86**: 207- 213.
- Gazelius, B., B. Edwall, et al. (1987). "Vasodilatory effects and coexistence of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P in sensory nerves of cat dental pulp." Acta Physiol Scand **130**(1): 33-40.
- Gibson, S. J., J. M. Polak, et al. (1984). "Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species." J Neurosci **4**(12): 3101-11.
- Goodis, H. E., W. R. Bowles, et al. (2000). "Prostaglandin E2 enhances bradykinin-evoked iCGRP release in bovine dental pulp." J Dent Res **79**(8): 1604-7.

- Gorter de Vries, I., E. Quartier, et al. (1987). "Immunocytochemical localization of osteocalcin in developing rat teeth." J Dent Res **66**(3): 784-90.
- Green, B. G. and L. J. Flammer (1988). "Capsaicin as a cutaneous stimulus: sensitivity and sensory qualities on hairy skin." Chem Senses **13**: 367-384.
- Grutzner, E. H., M. G. Garry, et al. (1992). "Effect of injury on pulpal levels of immunoreactive substance P and immunoreactive calcitonin gene-related peptide." J Endod **18**(11): 553-7.
- Gunji, T. (1982). "Morphological research on the sensitivity of dentin." Arch Histol Jpn **45**(1): 45-67.
- Hahn, C. L., W. A. Falkler, Jr., et al. (1989). "A study of T and B cells in pulpal pathosis." J Endod **15**(1): 20-6.
- Hargreaves, K. M., D. L. Jackson, et al. (2003). "Adrenergic regulation of capsaicin-sensitive neurons in dental pulp." J Endod **29**(6): 397-9.
- Hargreaves, K. M., J. Q. Swift, et al. (1994). "Pharmacology of peripheral neuropeptide and inflammatory mediator release." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **78**(4): 503-10.
- Hellwig, E., J. Klimek, et al. (2007). Einführung in die Zahnerhaltung, Urban & Fischer bei Elsevier.
- Heyeraas, K. and I. Kvinnsland (1992). "Tissue pressure and blood flow in pulpal inflammation." Proc Finn Dent Soc **88 (Suppl. 1)** 393- 401.
- Heyeraas, K. J. and E. Berggreen (1999). "Interstitial fluid pressure in normal and inflamed pulp." Crit Rev Oral Biol Med **10**(3): 328-36.
- Heyeraas, K. J., S. Kim, et al. (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): 329-43.
- Heyeraas, K. J. and I. Kvinnsland (1992). "Tissue pressure and blood flow in pulpal inflammation." Proc Finn Dent Soc **88 Suppl 1**: 393-401.
- Heyeraas, K. J., I. Kvinnsland, et al. (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): 207-21.
- Holje, L., C. Hildebrand, et al. (1983). "Proportion of unmyelinated axons in the rat inferior alveolar nerve and mandibular molar pulps after neonatal administration of capsaicin." Brain Res **266**(1): 133-6.
- Holzer, P. (1991). "Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons." Pharmacol Rev **43**(2): 143-201.

- Hosoi, J., G. F. Murphy, et al. (1993). "Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide." Nature **363**(6425): 159-63.
- Hoyle, C. (1995). Neuropeptides, essential data. John Wiley & Sons Chichester.
- Ikeda, H., Y. Tokita, et al. (1997). "Capsaicin-sensitive A delta fibers in cat tooth pulp." J Dent Res **76**(7): 1341-9.
- Izumi, T., I. Kobayashi, et al. (1995). "Immunohistochemical study on the immunocompetent cells of the pulp in human non-carious and carious teeth." Arch Oral Biol **40**(7): 609-14.
- Jacobsen, E. and K. Heyeraas (1996). "Effects 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." Archs oral Biol. **41**: 1121-1131.
- Jacobsen, E. B. and K. J. Heyeraas (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): 1121-31.
- Jancso, G. and E. Kiraly (1980). "Distribution of chemosensitive primary sensory afferents in the central nervous system of the rat." J Comp Neurol **190**(4): 781-92.
- Jancso, G., E. Kiraly, et al. (1977). "Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones." Nature **270**(5639): 741-3.
- Jean, A., B. Kerebel, et al. (1986). "Scanning electron microscope study of the pre-dentin-pulpal border zone in human dentin." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **61**(4): 392-8.
- Jontell, M., M. N. Gunraj, et al. (1987). "Immunocompetent cells in the normal dental pulp." J Dent Res **66**(6): 1149-53.
- Kenins, P. (1982). "Responses of single nerve fibres to capsaicin applied to the skin." Neurosci Lett **29**(1): 83-8.
- Kerezoudis, N. P., L. Olgart, et al. (1994). "Involvement of substance P but not nitric oxide or calcitonin gene-related peptide in neurogenic plasma extravasation in rat incisor pulp and lip." Arch Oral Biol **39**(9): 769-74.
- Killough, S., F. Lundy, et al. (2009). "Substance P Expression by Human Dental Pulp Fibroblasts: A Potential Role in Neurogenic inflammation." J Endod **35**: 73-77.
- Kim, S. (1990). "Neurovascular interaction in the dental pulp in health and inflammation." J Endodod **16**: 48- 53.
- Kim, S. (1990). "Neurovascular interactions in the dental pulp in health and inflammation." J Endod **16**(2): 48-53.

- Kimball, E. S., F. J. Persico, et al. (1988). "Substance P, neurokinin A, and neurokinin B induce generation of IL-1-like activity in P388D1 cells. Possible relevance to arthritic disease." J Immunol **141**(10): 3564-9.
- Kishi, Y. and K. Takahashi (1990). Changes of vascular architecture of dental pulp with growth. London, Chapman and Hall.
- Konietzny, F., E. R. Perl, et al. (1981). "Sensory experiences in man evoked by intraneural electrical stimulation of intact cutaneous afferent fibers." Exp Brain Res **42**(2): 219-22.
- Krage, T., I. Lambrichts, et al. (2001). Capsaicin-treated animals vs. the NOS-3 knockout mouse: an immunohistological comparison. Proceedings of the International Conference on Dentin/Pulp Complex, Tokyo, Quintessence Publishing.
- Krage, T., I. Lambrichts, et al. (2002a). Capsaicin-Treated Animals vs. the NOS-3 Knockout Mouse: An Immunohistological Comparison. Proceedings of the International Conference on Dentin/Pulp Complex 2001. T. Ishikawa, K. Takahashi, T. Maeda et al. Tokyo, Quintessence Publishing: 119-122.
- Krage, T., I. Lambrichts, et al. (2002b). Capsaicin-treated Animals vs. the NOS-3 Knockout Mouse: A SEM and TEM Comparison. Proceedings of the International Conference on Dentin/Pulp Complex 2001. T. Ishikawa, K. Takahashi, T. Maeda et al. Tokyo, Quintessence Publishing: 187-189.
- Krage, T. L., A. Stiefel, et al. (2005). "Microhardness changes in dentine after neonatal capsaicin application." Int Endod J **38**(8): 570-4.
- Kramer, I. (1968). The distribution of blood vessels in the human dental pulp. University of Alabama Press. B. o. t. D. P. Organ. Birmingham: pp361.
- Kvinnsland, I., K. Heyeraas, et al. (1991). "Regeneration of calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerves in replanted rat molars and their supporting tissues." Archs oral Biol. **36**: 815-826.
- Kvinnsland, I. and K. J. Heyeraas (1992). "Effect of traumatic occlusion on CGRP and SP immunoreactive nerve fibre morphology in rat molar pulp and periodontium." Histochemistry **97**(2): 111-20.
- LaMotte, R. H., C. N. Shain, et al. (1991). "Neurogenic hyperalgesia: psychophysical studies of underlying mechanisms." J Neurophysiol **66**(1): 190-211.
- Lawson, S. N. (1987). "The morphological consequences of neonatal treatment with capsaicin on primary afferent neurones in adult rats." Acta Physiol Hung **69**(3-4): 315-21.
- Lawson, S. N. and S. Nickels (1980). "The use of morphometric techniques to analyse the effect of neonatal capsaicin treatment of rat dorsal root ganglia and dorsal roots." J. Physiol., Lond. **303**: 12P.

- Lembeck, F. and P. Holzer (1979). "Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **310**(2): 175-83.
- Lesot, H., M. Osman, et al. (1981). "Immunofluorescent localization of collagens, fibronectin, and laminin during terminal differentiation of odontoblasts." Dev Biol **82**(2): 371-81.
- Lotz, M., J. H. Vaughan, et al. (1988). "Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes." Science **241**(4870): 1218-21.
- Lundy, F., P. Lamey, et al. (1999). "Calcitonin gene-related peptide in gingival cervicular fluid in periodontal health and disease." J Clin Periodontol **26**: 212-6.
- Lundy, F. T. and G. J. Linden (2004). "Neuropeptides and Neurogenic Mechanisms in Oral and Periodontal Inflammation." Crit Rev Oral Biol Med **15**(2): 82-98.
- Lynn, B. (1990). "Capsaicin: actions on nociceptive C-fibres and therapeutic potential." Pain **41**(1): 61-9.
- Maeda, T., T. Iwanaga, et al. (1986). "Immunohistochemical demonstration of nerves in the predentin and dentin in human third molars with the use of an antiserum against neurofilament protein (NFP)." Cell Tissue Res **243**: 13-23.
- Marfurt, C. F. and D. F. Turner (1983). "Sensory nerve endings in the rat oro-facial region labeled by the anterograde and transganglionic transport of horseradish peroxidase: a new method for tracing peripheral nerve fibers." Brain Res **261**(1): 1-12.
- McCarthy, G. M. and D. J. McCarty (1992). "Effect of topical capsaicin in the therapy of painful osteoarthritis of the hands." J Rheumatol **19**(4): 604-7.
- McGillis, J. P., M. L. Organist, et al. (1987). "Substance P and immunoregulation." Fed Proc **46**(1): 196-9.
- McMahon, S. B., G. Lewin, et al. (1991). "The consequences of long-term topical capsaicin application in the rat." Pain **44**(3): 301-10.
- Mjor, I. A. and I. Nordahl (1996). "The density and branching of dentinal tubules in human teeth." Arch Oral Biol **41**(5): 401-12.
- Mulderry, P. K., M. A. Ghatei, et al. (1988). "Differential expression of alpha-CGRP and beta-CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat." Neuroscience **25**(1): 195-205.
- Nagy, J. I., S. P. Hunt, et al. (1981). "Biochemical and anatomical observations on the degeneration of peptide-containing primary afferent neurons after neonatal capsaicin." Neuroscience **6**(10): 1923-34.
- Nanci, A. (2008). Dentin-pulp complex. Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function. A. Nanci. St. Louis, Mosby: 191-238.

- Narhi, M. V. (1985). "The characteristics of intradental sensory units and their responses to stimulation." J Dent Res **64 Spec No**: 564-71.
- Nawa, H., H. Kotani, et al. (1984). "Tissue-specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing." Nature **312**(5996): 729-34.
- Nilsson, J., A. M. von Euler, et al. (1985). "Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K." Nature **315**(6014): 61-3.
- Nong, Y. H., R. G. Titus, et al. (1989). "Peptides encoded by the calcitonin gene inhibit macrophage function." J Immunol **143**(1): 45-9.
- Okiji, T. (2002). Pulp as a connective tissue. Seltzer and Bender's dental pulp. K. M. Hargreaves and H. E. Goodis. Chicago, Quintessence: 95-122.
- Okiji, T., M. Jontell, et al. (1997). "Structural and functional association between substance P- and calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerves and accessory cells in the rat dental pulp." J Dent Res **76**(12): 1818-24.
- Olgart, L., L. Edwall, et al. (1991). "Involvement of afferent nerves in pulpal blood-flow reactions in response to clinical and experimental procedures in the cat." Arch Oral Biol **36**(8): 575-81.
- Olgart, L., B. Gazelius, et al. (1977). "Release of substance P-like immunoreactivity from the dental pulp." Acta Physiol Scand **101**(4): 510-2.
- Pan, M., J. P. Naftel, et al. (2000). "Effects of deprivation of neonatal nerve growth factor on the expression of neurotrophin receptors and brain-derived neurotrophic factor by dental pulp afferents of the adult rat." Arch Oral Biol **45**(5): 387-99.
- Park, S. H., G. Y. Hsiao, et al. (2004). "Role of substance P and calcitonin gene-related peptide in the regulation of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 expression in human dental pulp." Int Endod J **37**(3): 185-92.
- Pashley, D. H. (1996). "Dynamics of the pulpo-dentin complex." Crit Rev Oral Biol Med **7**(2): 104-33.
- Pashley, D. H. and F. R. Liewehr (2006). Structure and Functions of the Dentin-Pulp Complex. Pathways of the Pulp. S. Cohen and K. M. Hargreaves. St. Louis, Mosby: 460-513.
- Patel, T., S. H. Park, et al. (2003). "Substance P induces interleukin-8 secretion from human dental pulp cells." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **96**(4): 478-85.
- Payan, D. G., D. R. Brewster, et al. (1983). "Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P." J Immunol **131**(4): 1613-5.
- Pohto, P. and R. Antila (1972). "Innervation of blood vessels in the dental pulp." Int Dent J **22**(2): 228-39.

- Raab, W. H.-M. (1997). "Temperature related changes in pulpal microcirculation." Proc Finn Dent Soc **88**(1): 469-479.
- Raab, W. H. (1989). "[Laser Doppler Flowmetry: microcirculatory studies in the dental pulp]." Dtsch Zahnarztl Z **44**(3): 198-200.
- Raab, W. H. (1992). "Temperature related changes in pulpal microcirculation." Proc Finn Dent Soc **88 Suppl 1**: 469-79.
- Raab, W. H., A. Stiefel, et al. (1996). Changes in the formation of dental hard tissues after desensitization with capsaicin. Proceedings of the International Conference on Dentin/Pulp Complex. M. Shimono, T. Maeda, H. Suda and K. Takahashi. Tokyo, Japan, Quintessence Publishing Co.: 90-92.
- Reichert, T., S. Storkel, et al. (1992). "The role of osteonectin in human tooth development: an immunohistological study." Calcif Tissue Int **50**(5): 468-72.
- Retief, D. H. and C. J. Dreyer (1969). "Sectioning of the inferior dental nerve in rats." J Dent Res **48**(5): 969.
- Rodd, H. D. and F. M. Boissonade (2001). "Innervation of human tooth pulp in relation to caries and dentition type." J Dent Res **80**(1): 389-93.
- Rodd, H. D. and F. M. Boissonade (2003). "Immunocytochemical investigation of neurovascular relationships in human tooth pulp." J Anat **202**(2): 195-203.
- Rosell, S., L. Olgart, et al. (1981). "Inhibition of antidromic and substance P-induced vasodilatation by a substance P antagonist." Acta Physiol Scand **111**(3): 381-2.
- Ruff, M. R., S. M. Wahl, et al. (1985). "Substance P receptor-mediated chemotaxis of human monocytes." Peptides **6 Suppl 2**: 107-11.
- Salomon, J. P., D. Septier, et al. (1991). "Ultrastructure of inter-odontoblastic fibres in the rat molar." Arch Oral Biol **36**(3): 171-6.
- Seltmann, M., T. L. Krage, et al. (2007). "Changes observed over time in dentin development after neonatal desensitisation." European Cells and Materials **14**(2): 128.
- Shibata, H., M. Mio, et al. (1985). "Analysis of the mechanism of histamine release induced by substance P." Biochim Biophys Acta **846**(1): 1-7.
- Silverman, J. D. and L. Kruger (1987). "An interpretation of dental innervation based upon the pattern of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-immunoreactive thin sensory axons." Somatosens Res **5**(2): 157-75.
- Simard-Savoie, S., H. Lemay, et al. (1979). "The effect of epinephrine on pulpal microcirculation." J Dent Res **58**(11): 2074-9.

- Simone, D. A. and J. Ochoa (1991). "Early and late effects of prolonged topical capsaicin on cutaneous sensibility and neurogenic vasodilatation in humans." Pain **47**(3): 285-94.
- Steenbergh, P. H., J. W. Hoppener, et al. (1985). "A second human calcitonin/CGRP gene." FEBS Lett **183**(2): 403-7.
- Swift, M. L. and M. R. Byers (1992). "Effect of ageing on responses of nerve fibres to pulpal inflammation in rat molars analysed by quantitative immunocytochemistry." Arch Oral Biol **37**(11): 901-12.
- Szallasi, A. and P. M. Blumberg (1999). "Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms." Pharmacol Rev **51**(2): 159-212.
- Szolcsanyi, J. (1977). "A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibres and receptor endings in mediation of pain." J Physiol (Paris) **73**(3): 251-9.
- Szolcsanyi, J., F. Anton, et al. (1988). "Selective excitation by capsaicin of mechano-heat sensitive nociceptors in rat skin." Brain Res **446**(2): 262-8.
- Takagi, M., H. Hishikawa, et al. (1990). "Immunohistochemical localization of glycosaminoglycans and proteoglycans in predentin and dentin of rat incisors." J Histochem Cytochem **38**(3): 319-24.
- Takahashi, K., A. Tanaka, et al. (1992). "The primary structure and gene organization of human substance P and neuromedin K receptors." Eur J Biochem **204**(3): 1025-33.
- Takamori, K. (2000). "A histopathological and immunohistochemical study of dental pulp and pulpal nerve fibers in rats after the cavity preparation using Er:YAG laser." J Endod **26**(2): 95-9.
- Tokuda, M., R. Miyamoto, et al. (2004). "Substance P enhances expression of lipopolysaccharide-induced inflammatory factors in dental pulp cells." J Endod **30**(11): 770-3.
- Torneck, C. (1998). Dentin-Pulp complex. Oral Histology: Development, Structure, and Function. A. Ten Cate. St Louis, Mosby: 150.
- Trantor, I. R., H. H. Messer, et al. (1995). "The effects of neuropeptides (calcitonin gene-related peptide and substance P) on cultured human pulp cells." J Dent Res **74**(4): 1066-71.
- Uddman, R., J. Kato, et al. (1999). "Expression of calcitonin gene-related peptide-1 receptor mRNA in human tooth pulp and trigeminal ganglion." Arch Oral Biol **44**(1): 1-6.
- Umeda, Y., M. Takamiya, et al. (1988). "Inhibition of mitogen-stimulated T lymphocyte proliferation by calcitonin gene-related peptide." Biochem Biophys Res Commun **154**(1): 227-35.

- van Amerongen, J. P., I. G. Lemmens, et al. (1984). "Immunofluorescent localization and extractability of fibronectin in human dental pulp." Arch Oral Biol **29**(2): 93-9.
- van Rossum, D., U. K. Hanisch, et al. (1997). "Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors." Neurosci Biobehav Rev **21**(5): 649-78.
- Wakisaka, S. (1990). "Neuropeptides in the dental pulp: distribution, origins, and correlation." J Endod **16**(2): 67-9.
- Wakisaka, S., H. Ischikawa, et al. (1984). "Substance P-like immunoreactivity in the pulp-dentine zone of human molar teeth demonstrated by indirect immunofluorescence." Arch Oral Biol **29**: 73-5.
- Walpole, C. S., R. Wigglesworth, et al. (1993). "Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 3. The hydrophobic side-chain "C-region"." J Med Chem **36**(16): 2381-9.
- Welch, J. M., S. A. Simon, et al. (2000). "The activation mechanism of rat vanilloid receptor 1 by capsaicin involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13889-94.
- White, J. L. and M. E. Durieux (2005). "Clinical pharmacology of local anesthetics." Anesthesiol Clin North America **23**(1): 73-84.
- Wigglesworth, D. J., G. A. Longmore, et al. (1986). "Early dentinogenesis in mice: von Korff fibres and their possible significance. A preliminary study by light and electron microscopy." Acta Anat (Basel) **127**(2): 151-60.
- Wimalawansa, S. J. (1992). "Isolation, purification, and biochemical characterization of calcitonin gene-related peptide receptors." Ann N Y Acad Sci **657**: 70-87.
- Yang, L., F. Huang, et al. (2003). "Induction of interleukin-8 gene expression by black-pigmented Bacteroides in human pulp fibroblasts and osteoblasts." Int Endod J **36**: 774-779.
- Yoshida, N., K. Yoshida, et al. (1994). "A confocal laser scanning microscopic study of the immunofluorescent localization of fibronectin in the odontoblast layer of human teeth." Arch Oral Biol **39**(5): 395-400.
- Yoshida, N., K. Yoshida, et al. (1996). "Immunolocalization of the small proteoglycan decorin in human teeth." Arch Oral Biol **41**(4): 351-7.
- Yoshida, N., K. Yoshida, et al. (1995). "Immunoelectron-microscopic study of the localization of fibronectin in the odontoblast layer of human teeth." Arch Oral Biol **40**(2): 83-9.
- Yoshida, S. and H. Ohshima (1996). "Distribution and organization of peripheral capillaries in dental pulp and their relationship to odontoblasts." Anat Rec **245**(2): 313-26.

- Yu, C., N. Boyd, et al. (2002). "Agonist-induced vasoactive responses in isolated perfused porcine dental pulp arterioles." Arch Oral Biol **47**: 99.
- Yu, C., N. Boyd, et al. (2002). "An in vivo and in vitro comparison of the effects of vasoactive mediators on pulpal blood vessels in rat incisors." Arch Oral Biol **47**: 723.
- Yu, C. Y., N. M. Boyd, et al. (2002). "An in vivo and in vitro comparison of the effects of vasoactive mediators on pulpal blood vessels in rat incisors." Arch Oral Biol **47**(10): 723-32.
- Zhang, J. Q., K. Nagata, et al. (1998). "Scanning electron microscopy and immunohistochemical observations of the vascular nerve plexuses in the dental pulp of rat incisor." Anat Rec **251**(2): 214-20.

## 7 Curriculum vitae

### PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Susanne Hahner  
Geburtsdatum: 18.05.1982  
Geburtsort: Neuss  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### SCHULAUSBILDUNG

1992 - 2001 Albert-Einstein-Gymnasium, Kaarst  
Juni 2001 Allgemeine Hochschulreife

### BERFUSAUSBILDUNG

2001-2007 Studium der Zahnmedizin, Heinrich-Heine-Universität,  
Düsseldorf  
November 2007 Staatsexamen und Approbation

### BERUFSERFAHRUNG

Seit Januar 2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Poliklinik für  
Zahnerhaltung, Parodontologie und Endodontologie der  
Westdeutschen Kieferklinik, Düsseldorf

## 8 Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. W.H.-M. Raab, dem Ärztlichen Direktor des Universitätsklinikums Düsseldorf, für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas an der Poliklinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Endodontologie der Westdeutschen Kieferklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Mein außerordentlicher Dank gilt Dr. Tracy de Peralta für die Betreuung während der Durchführung, sowie während der Fertigstellung der Promotionsarbeit auch über weite Entfernungen hinaus, da sie zwischenzeitlich als Associate Director of Clinical Dentistry an die Peninsula Dental School der Universität von Plymouth, UK berufen wurde.

Ein spezieller Dank gilt meiner Mutter und gleichzeitig damaliger MTA der Westdeutschen Kieferklinik Düsseldorf, Frau Judit Lauterbach, sowie Dr. Nora Bergmann. Ich hatte das Glück, gemeinsam mit beiden zahlreiche Stunden im Labor verbringen zu dürfen.

Bei PD Dr. Michelle A. Ommerborn und Dr. Kurt Schneider bedanke ich mich für die aufmunternden Worte, unermüdlige Motivation, die konsequenten Ratschläge und unfassbar schnellen Korrekturen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden ganz besonders bedanken, die mich während der ganzen Zeit unterstützt, zeitweise aufgebaut und immer mit Rat und Tat beiseite gestanden haben.

Abstract

## **Neuronale Veränderungen im Pulpa-Dentin-Komplex nach neonataler Desensibilisierung durch systemische Capsaicinapplikation**

Susanne Hahner

Die Pulpa-Dentin-Einheit stellt ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen Geweben und Zellen dar, deren genaues Zusammenspiel bis heute noch nicht vollständig geklärt werden konnte. In diesem Zusammenhang nehmen die aus dem Ganglion trigeminale stammenden sensorischen Nervenfasern (C- und A-delta Fasern) sowohl unter physiologischen wie auch pathologischen Bedingungen durch die Freisetzung verschiedener Neuropeptide wie Calcitonin gene-related peptide (CGRP) oder Substance P (SP) eine entscheidende Rolle ein.

Ziel der vorliegenden Studie war es daher am Modell der Wistar-Ratte über einen Beobachtungszeitraum von 30-155 Lebenstagen zu untersuchen, wie sich die neonatale, systemische Applikation einer Capsaicinlösung auf das quantitative Vorkommen von CGRP- und SP-immunreaktiven (IR) Nervenfasern innerhalb der dentalen Pulpa auswirkt. Als Kontrollgruppe dienten dabei Wistar-Ratten, die neonatal eine Lösung ohne enthaltenes Capsaicin appliziert bekamen. Nach jeweils 30, 60, 90 oder 155 Lebenstagen wurden die Tiere mittels Intravitalperfusion geopfert. Die entsprechenden Kieferabschnitte wurden zur immunhistochemischen Auswertung aufbereitet und die primären Antikörper gegen CGRP und SP zur Lokalisation nozizeptiver Fasern in der dentalen Pulpa eingesetzt. Das distale Pulpenhorn des linken, ersten Unterkiefermolaren wurde lichtmikroskopisch analysiert und die Pixel der IR Nervenfasern pro Inch<sup>2</sup> gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS. Der Student-T Test wurde dabei zur Analyse von Unterschieden zwischen den Kontroll- und den mit Capsaicin behandelten Tieren innerhalb einer Altersgruppe eingesetzt, wohingegen der Bonferroni Post-Hoc Test die Unterschiede zwischen den verschiedenen Altersgruppen sowohl der Kontroll- als auch der Capsaicin-Gruppe aufzeigen sollte. Die Ergebnisse zeigten einen signifikanten Unterschied für das Vorkommen von CGRP- als auch SP-IR Nervenfasern zwischen den Kontroll- und den capsaicinbehandelten Tieren in allen untersuchten Altersgruppen. Des Weiteren zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Vorkommen von CGRP zwischen den 60 und 90 Tage alten Tieren der Capsaicin-Gruppe, wohingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Alterskategorien der Kontrollgruppe gezeigt werden konnten. Die Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse für SP zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll- und Capsaicin-Gruppe aller untersuchten Alterskategorien. Innerhalb der Capsaicin-Gruppe konnte ein signifikanter Unterschied sowohl zwischen 30 und 155 Tagen, 60 und 155 Tagen, als auch zwischen 90 und 155 Tagen festgestellt werden. Innerhalb der Kontrollgruppe zeigte sich nur ein signifikanter Unterschied im Vorkommen SP-IR Nervenfasern zwischen 30 und 155 Tagen. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass eine neonatale, systemische Capsaicinapplikation zu einer signifikanten Reduktion nozizeptiver Nervenfasern innerhalb der dentalen Pulpa führt. Diese scheint ein vom Alter abhängiger Prozess zu sein.

Unterschrift des Referenten Univ.-Prof. Dr. W. H.-M. Raab

