

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Endodontologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Kommissarische Direktorin: Prof. Dr. med. dent. Michelle Alicia Ommerborn

**Zeitlicher Verlauf der Immunlokalisation von S100 in
neonatal Capsaicin-desensitivierten Ratten.**

Dissertation

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

vorgelegt von
Helga Sarah Maria Neering

2019

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Zweitgutachterin/Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Jürgen Becker

I. ZUSAMMENFASSUNG

Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass Capsaicin eine selektive Desensitivierung der nozizeptiven Fasern, speziell der Fasern vom C- und A δ -Typ, hervorruft. Es nimmt weiterhin Einfluss auf die Entwicklung der Dentinbildung, sowie die Dentinqualität und Vaskularisierung der dentalen Pulpa. Im Tierstudienmodell mit der Projektnummer G86/2003 dienten Wistar Ratten als Versuchstiere. Die systemische Desensitivierung mit Capsaicin wurde als Studienmodell gewählt. Grundlage aller Untersuchungen ist die Frage gewesen, welchen Einfluss die neonatal verabreichte Gabe von Capsaicin über die Zeit von 30, 60, 90 und 155 Tagen auf die Entwicklung der Schwannschen Zellen und das Innervationsmuster in der Rattenpulpa hat. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss auf die S100-Proteinexpression untersucht, welche ein Marker für die Schwannsche Zelle ist. Zusätzlich sollte geklärt werden, ob der Alterungsprozess Einfluss auf die Expression von S100 in der Rattenpulpa nimmt.

48 Tiere wurden in 2 Gruppen unterteilt. Der experimentellen Gruppe wurde Capsaicin (50mg/kg) subkutan postnatal an Tag 3 injiziert, die Kontrolltiere erhielten die Trägersubstanz ohne Capsaicin. Alle Tiere wurden anästhesiert, bevor sie durch kardiale Punktion, Intravitalperfusion und Fixation an 30, 60, 90 und 155 Tagen geopfert wurden. Die Unterkiefer wurden umgehend herauspräpariert und mit dem Kryostat auf 50 μ m Sagittal-Schnitte geschnitten. Das Pulpenkavum wurde lichtmikroskopisch in hundertfacher Vergrößerung auf die Expression des Proteins S100 untersucht und digital fotografiert. Für die Immunhistochemie wurde die Avidin-Biotin-Methode angewendet. Die Bildanalyse erfolgte mit der Point Counting Methode, die statistische Auswertung mittels des Student T-Test, One-Way ANOVA und Post-Hoc-Bonferroni-Test.

Die Anzahl S100-positiver Zellen nahm in der Kontrollgruppe über den Beobachtungszeitraum signifikant zu (155 und 90 Tage vs. 30 und 60 Tage, $p < 0.001$). Es konnte kein signifikanter Unterschied von S100-positiv markierten Schwann-Zellen in der Gruppe der Kontrolltiere an Tag 30, 60 und 155 ($0,23 \pm 0,02$; $0,23 \pm 0,02$; $0,44 \pm 0,04$) verglichen mit der Gruppe der Capsaicin behandelten Tiere ($0,20 \pm 0,03$; $0,20 \pm 0,01$; $0,43 \pm 0,02$) beobachtet werden. Hingegen zeigte die Gruppe der 90 Tage Kontrolltiere einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) an S100-positiven Schwannschen Zellen ($0,44 \pm 0,01$) im Vergleich zur Gruppe der 90 Tage Capsaicin-behandelten Tiere ($0,32 \pm 0,02$). Die Expression von S100 in der dentalen Rattenpulpa wird im zeitlichen Verlauf deutlich hochreguliert. Zum Zeitpunkt 90 Tage ist eine signifikante Reduktion der S100 positiven Fasern im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten, die sich im Verlauf bis 155 Tagen wieder aufhebt. Schlussfolgernd kann man sagen, dass Capsaicin die Expression von S100 im zeitlichen Verlauf beeinflusst und somit die Übertragung der Nozizeption und die Regeneration in den sensorischen Axonen des Dentin-Pulpa-Komplexes der Ratte zumindest vorübergehend beeinflusst werden kann.

II. ABSTRACT

It has previously been shown that application of Capsaicin leads to desensitization of nociceptive nerve fibers, especially those of C and A δ subtypes. Furthermore, Capsaicin has an impact on the quality and the speed of development of dentin as well as vascularization of dental pulp. In the present experimental study, Wistar rats were chosen as an animal model. Capsaicin was administered systemically on postnatal day 3 and analyzed on day 30, 60, 90 and 155. The development of the Schwann cells as well as innervation patterns in the developing rat pulpa were analyzed using immunohistochemistry for S100, an established marker for Schwann cells.

48 animals were split into an experimental and a control group. Capsaicin (50mg/kg) was administered subcutaneously to 24 animals in the experimental group on postnatal day 3, while 24 animals in the control group received medium control only. Animals were sacrificed on days 30, 60, 90 and 155 by intracardial punctation, intravital perfusion and fixation. The mandible bones were immediately removed and cut in 50 μ m sagittal sections. Immunohistochemistry was performed on slides displaying the first molar using the Avidin-Biotin method and an antibody against S100. S100 positive cell counts were assessed using the point counting method. Statistical analyses were performed using Student's t-test, one-way ANOVA and post-hoc Bonferroni test.

The number of S100-positive Schwann cells increased significantly over time in the control group (155 and 90d vs. 30 und 60d, $p < 0.001$). There was no significant difference between the number of S100-positive Schwann cells between the experimental group and the control group on days 30, 60 and 155. On day 90, however, there was a significant decrease in the number of S100-positive Schwann cells in the experimental group versus the control group ($p < 0.05$).

There is a significant increase in S100 expression in the rat dental pulp over the course of development. But on day 90 there is a significant decrease in S100-positive Schwann cells compared to the control group; however, this difference is lost until day 155. Taken together, Capsaicin has an impact on the expression of S100, which might at least temporarily impair the transmission of nociception as well as axonal regeneration in the developing dentin pulpa complex of the rat.

III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ANOVA	<i>analysis of variance</i>
Barx	<i>BarH like homologue in vertebrates</i>
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
Caps	Capsaicin
Cbfa1	<i>Core binding factor A1</i>
CID	compound identifier number
Dlx	<i>Distaless homologue in vertebrates</i>
E	Embryonal(entwicklungs)tag
Edar	<i>Ectodysplasin A Receptor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Epo	Erythropoietin
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
GAP43	<i>growth-associated protein 43</i>
GDGF	<i>glial derived growth factor</i>
Gli	<i>glioma-associated oncogene</i>
HIV	humanes Immundefizienzvirus
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
ir	immunreaktiv
kD	Kilodalton
LANR	<i>low affinity neutrophil receptor</i>
Lef	<i>Lymphoid enhancer-binding factor 1</i>
Lhx	<i>lim homeobox</i>
MSC	myelinisierende Schwann-Zelle
Msx	<i>Msh-like genes in vertebrates</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NMSC	nichtmyelinisierende Schwann-Zelle
p21	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>
p53	Tumorsuppressor, 53 Kilodalton
P0	Myelinprotein 0
Pax	<i>paired box gene</i>

PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
Pitx	<i>pituitary gland transcription factor</i>
PSC	perisynaptische/terminale Schwann-Zelle
Shh	<i>Sonic hedgehog</i>
T	Tage
TNF	Tumornekrosefaktor
Trk	Tyrosinkinase
TX	Triton-X
TRPV1	<i>transient receptor potential vanilloid type 1 ion channel</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Wnt	<i>Wingless homologue in vertebrates</i>

IV. INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. ZUSAMMENFASSUNG	I
II. ABSTRACT	II
III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Die Entwicklung der Pulpainnervation bei der dentalen Morphogenese	1
1.2 Rolle der Schwann-Zelle bei der dentalen Nozizeption	4
1.3 Das S100-Protein	7
1.4 Modell der Capsaicin-Desensitivierung	9
1.5 Ziel der Arbeit	11
2 MATERIAL UND METHODEN	12
2.1 Studiendesign.....	12
2.1.1 Capsaicin-Applikation	12
2.1.2 Intravitalperfusion und Fixierung.....	13
2.1.3 Gewebepräparation, Entkalkung und Einbettung	13
2.1.4 Gewebevorbereitung	13
2.1.5 Avidin-Biotin Peroxidase-Komplex-Methode.....	14
2.1.6 Lichtmikroskopie	15
2.1.7 Nervenfaserverquantifizierung-Point Counting Methode	15
2.2 Datenverarbeitung und statistische Analyse.....	16
2.2.1 SPSS	16
2.2.2 Student T-Test.....	17

2.2.3	One-Way ANOVA Test.....	17
2.2.4	PostHoc Bonferroni-Test	17
3	ERGEBNISSE.....	18
3.1	Statistische Analyse: Vergleich der S100-ir positiven Schwann-Zellanzahl zwischen den Altersgruppen der Kontrolltiere	18
3.1.1	Altersgruppe 30-Tage (30T) Kontrolltiere	18
3.1.2	Altersgruppe 60-Tage (60T) Kontrolltiere	18
3.1.3	Altersgruppe 90-Tage (90T) Kontrolltiere	18
3.1.4	Altersgruppe 155-Tage (155T) Kontrolltiere	18
3.2	Vergleich der S100-ir positiven Schwann-Zellanzahl zwischen den Altersgruppen der Capsaicin-behandelten (Caps) Tiere	19
3.2.1	Altersgruppe 30-Tage (30T) Caps-Tiere	19
3.2.2	Altersgruppe 60-Tage (60T) Caps-Tiere.....	19
3.2.3	Altersgruppe 90-Tage (90T) Caps-Tiere.....	20
3.2.4	Altersgruppe 155-Tage (155T) Caps-Tiere.....	20
3.3	Vergleich der S100-ir positiven Schwann-Zellanzahl zwischen Kontroll- und Capsaicin-behandelten (Caps) Tieren.....	21
3.3.1	Altersgruppe 30-Tage (30T) Kontroll- und 30T-Caps-Tiere	21
3.3.2	Altersgruppe 60-Tage (60T) Kontroll- und 60T-Caps-Tiere	21
3.3.3	Altersgruppe 90-Tage (90T) Kontroll- und 90T-Caps-Tiere	22
3.3.4	Altersgruppe 155-Tage (155T) Kontroll- und 155T-Caps-Tiere	23
4	DISKUSSION	25
4.1	Die regionale Verteilung der Schwann-Zelle während der postnatalen Entwicklung der dentalen Pulpa der Kontrolltiere.....	25
4.2	S100-ir positive Fasern im zeitlichen Verlauf in der sich entwickelnden dentalen Pulpa	26
4.3	Spezifische und unspezifische Effekte von Capsaicin auf die Axon-Schwann- Zell-Einheit.....	27
4.4	Schlussfolgerung.....	30

5 LITERATURVERZEICHNIS 32

1 EINLEITUNG

1.1 Die Entwicklung der Pulpainnervation bei der dentalen Morphogenese

Die Entwicklung des Zahns und seiner Umgebungsstrukturen ist ein auf molekularer Ebene streng regulierter Prozess, welcher der Morphogenese anderer Organe (Leber, Niere) in seiner Komplexität ähnelt (Ten Cate *et al.*, 2003). Um den Embryonaltag 11 bildet sich bei Nagern eine Verdickung des Oberflächenepithels des ersten Kiemenbogens. Dies wird durch die Transkriptionsfaktoren *Lim-Homeobox* (Lhx) 6 und 7 induziert, welche von dem aus der Neuralleiste stammenden Ektomesenchym sezerniert werden; die Expression von Lhx-6 und Lhx-7 wird wiederum durch *fibroblast growth factor 8* (FGF-8) angeregt (Ten Cate *et al.*, 2003). Experimentelle Daten zeigen, dass die Sekretion der Transkriptionsfaktoren durch den räumlichen Kontakt mit dem ersten, nicht aber mit dem zweiten Kiemenbogen hervorgerufen wird; so wird bereits zu diesem frühen Entwicklungszeitpunkt die oral-aborale Achse festgelegt (Grigoriou *et al.*, 1998). Die Entstehung des Zahnkeims aus dem verdickten Oberflächenepithel wird durch den Transkriptionsfaktor *paired box gene 9* (Pax-9) induziert, welcher seinerseits unter der Kontrolle von FGF-8 steht und dessen Expression durch *bone morphogenetic protein 2* und 4 (BMP-2 und -4) gehemmt wird. Übereinstimmend damit sind die Expressionsareale von FGF-8 einerseits und BMP-2 und -4 andererseits räumlich streng voneinander getrennt (Tucker und Sharpe, 1999). Insgesamt sind bis zu 90 Gene und deren Proteinprodukte bekannt, deren Funktionen teils überlappen sowie teils antagonistisch wirken, und die eine wichtige Rolle bei der Zahnentwicklung spielen (Ten Cate *et al.*, 2003) (Abbildung 1). Insbesondere für die frühe Zahnentwicklung sind der Botenstoff *sonic hedgehog* (Shh) und sein Effektor *glioma-associated oncogene* (Gli) wichtig, deren jeweiliger experimenteller Knockout zu nahezu vollständigem Verlust der Zahnentwicklung führt (Sarkar *et al.*, 2000). Umgekehrt kann die Zugabe zu Shh zu kultivierten oralen Epithelien die Ausbildung von Zahnknospen fördern (Hardcastle *et al.*, 1998). Zumindest scheint Shh die Proliferation des Zahnknospenepithels zu fördern. Mutationen in Genen wie *pituitary gland transcription factor 2* (Pitx-2), SHH oder Pax-9 können zur Zahnagenesie führen, wie sie bei einigen Syndromen zu beobachten ist (Rakhshan, 2013). Einzelne

nicht angelegte Zähne kommen in 2 bis 10% der Bevölkerung vor (Ten Cate *et al.*, 2003).

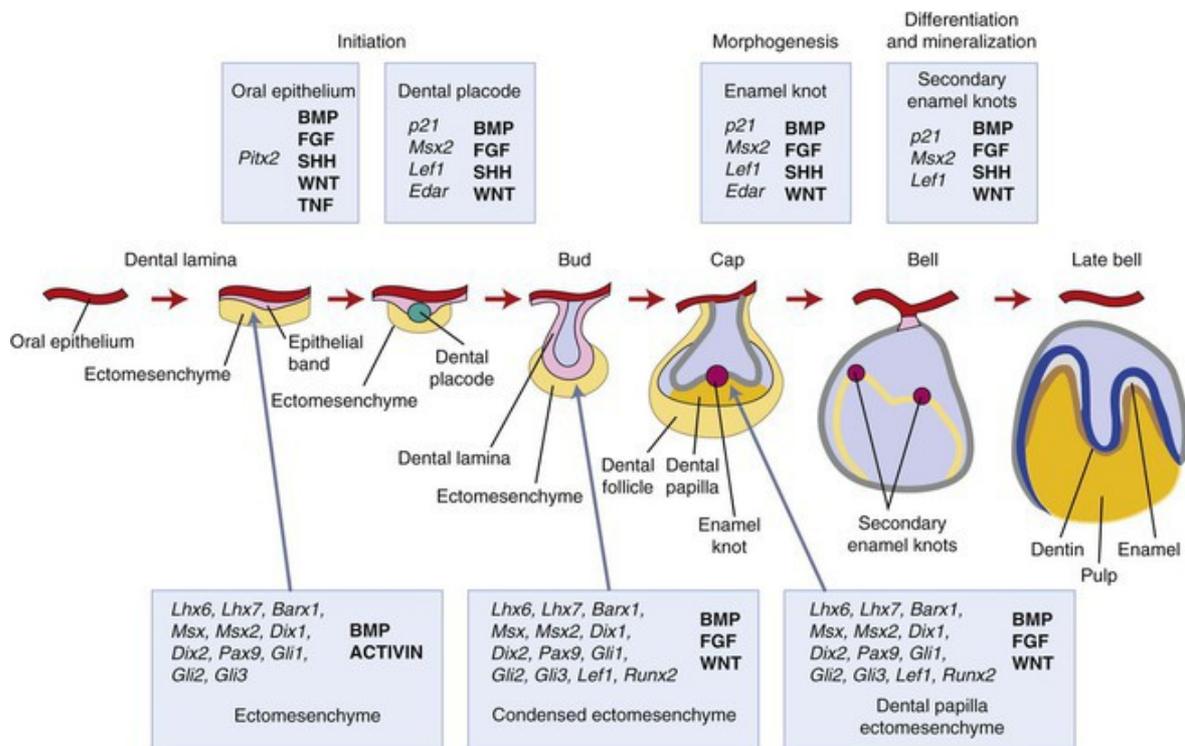


Abb. 1: Schematische Darstellung der Zahnentwicklung (hier eines Molaren) und der daran beteiligten Signalmoleküle (Transkriptionsfaktoren *kursiv*, Botenstoffe **fett**). Aus (Ten Cate *et al.*, 2003). *Barx*, *BarH like homologue in vertebrates*; *Bmp*, *Bone morphogenetic protein*; *Cbfa1*, *Core binding factor A1*; *Dlx*, *Distaless homologue in vertebrates*; *Edar*, *Ectodysplasin A Receptor*; *Fgf*, *Fibroblast growth factor*; *Gli*, *Glioma-associated oncogene homologue*; *Lef*, *Lymphoid enhancer-binding factor 1*; *Lhx*, *Lim-homeobox domain gene*; *Msx*, *Msh-like genes in vertebrates*; *p21*, *cyclin-dependent kinase inhibitor 1*; *Pax*, *Paired box homeotic gene*; *Pitx*, *pituitary gland transcription factor*; *Shh*, *Sonic hedgehog*; *TNF*, *tumor necrosis factor*; *Wnt*, *Wingless homologue in vertebrates*.

Menschen sind heterodont; dies bedeutet, dass jeder Zahn an einer spezifischen Stelle im Kiefer zu liegen kommt und eine charakteristische Form (und damit Funktion) besitzt. Diese Anordnung wird auch als *patterning* bezeichnet. Man unterscheidet incisiforme, caniniforme und molariforme Zähne (Ten Cate *et al.*, 2003). Wie genau das *patterning* bei der Gebissentstehung vermittelt wird, ist

noch unbekannt; es scheint jedoch auf einer räumlichen und zeitlichen Anordnung bzw. Abfolge der Expression von Transkriptionsfaktoren zu beruhen (Jernvall und Thesleff, 2000; Thesleff und Mikkola, 2002; Kassai *et al.*, 2005).

Die Trennung des Ektoderms in dentale und orale Anteile, wie sie für die weiteren Schritte der Zahnentwicklung notwendig wird, basiert erneut auf einem gegenläufigen Konzentrationsgradienten von Shh und Wnt, wobei Wnt-7 die Expression von Shh unterdrückt; damit ist dieser Prozess der Segmentation bei der Entwicklung von Insekten vergleichbar (Sarkar *et al.*, 2000).

Das nun folgende Entwicklungsstadium (E12,5-E13) wird als Knospung bezeichnet (Matthiessen, 1963). Unter dem Einfluss von BMP, FGF, Shh und Wnt wachsen Epithelstränge in das unterlagernde Ektomesenchym, welches sich nun kondensiert. Beim hierauf folgenden Kappenstadium ist in der Zahnanlage bereits die angedeutete Form des sich entwickelnden Zahns histologisch nachweisbar; das entstehende Schmelzorgan sitzt wie eine Kappe auf dem verdichteten Ektomesenchym der Zahnpapille (Abbildung 1). Aus dieser Zahnpapille wird das Dentin und die Zahnpulpa hervorgehen, während aus dem die Zahnanlage umgebenden Ektomesenchym der Zahnhalteapparat entsteht. Die abgefalteten epithelialen Anteile werden hingegen während des nun folgenden Glockenstadiums ihre endgültigen Differenzierungen (Ameloblasten, Odontoblasten) einnehmen (Ten Cate *et al.*, 2003).

Die Zahnpapille wird von undifferenzierten mesenchymalen Zellen gebildet, die verstreut zwischen locker angeordneten Kollagenfibrillen zu liegen kommen. Zur Entstehung der darin liegenden Gefäß- und Nervenversorgung des sich entwickelnden Zahns existieren nur wenige Arbeiten. Es konnte gezeigt werden, dass während des Kappenstadiums zahlreiche primitive Gefäße in die Zahnpapille einsprossen; diese haben noch keine Verbindung zu den Dentalarterien, sondern werden zu Beginn aus den gingivalen Gefäßplexus gespeist (Gaunt, 1959). Die maximale Gefäßdichte wird zum Zeitpunkt des Glockenstadiums erreicht, wobei die Gefäße an der Stelle der späteren Zahnwurzel die höchste Dichte aufweisen. Dies deckt sich mit dem Resultat immunhistochemischer Färbungen, welche eine kräftige Expression des Angiogenesefaktors *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und seines Rezeptors (VEGF-R) durch die Zahnanlage vom Kappen- bis zum späten Glockenstadium zeigen (Miwa *et al.*, 2008). Das Schmelzorgan ist im Gegensatz zur Zahnpapille avaskulär.

Die Innervation der Zahnpapille und der daraus entstehenden Pulpa wird durch neurotrophe Faktoren gesteuert. In-situ-Hybridisierungsexperimente zeigen, dass die mRNAs für *nerve growth factor* (NGF) und *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) in der Zahnpapille und der entstehenden Pulpa nachgewiesen werden können und die Intensität der Expression mit dem Beginn der Innervation korreliert (Nosrat *et al.*, 1998). Diese neurotrophen Faktoren regen trigeminale Nervenzellen dazu an, in die sich entwickelnde Zahnpulpa einzuwachsen; *in-vitro*-Experimente zeigten einen positiven Effekt der durch kultivierte Pulpazellen sezernierten Neurotrophine auf die Zellviabilität und das dendritische Aussprossen trigeminaler Neurone (Nosrat *et al.*, 2001). Während hieran mit großer Wahrscheinlichkeit *nerve growth factor* (NGF) und *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) beteiligt sind, scheinen die Neurotrophine 3 und 4/5 keine wesentliche Rolle zu spielen (Fried *et al.*, 2000). Trotzdem korreliert auch die Expression der Neurotrophinrezeptoren *low-affinity neurotrophin receptor* (LANR) sowie der Trk-Rezeptortyrosinkinasen A, B und C mit dem Beginn der Innervation (Luukko *et al.*, 1996). Auch das Vorhandensein von Matrixproteinen wie Laminin-8 ($\alpha 4\beta 1\gamma 1$, Lm-411) ist für das Einsprossen der Nervenfasern essentiell (Fried *et al.*, 2000; Fried *et al.*, 2007). Der zeitliche Ablauf der Innervation und der Vaskularisation der Zahnpulpa sind voneinander unabhängig, was einen wechselseitigen Einfluss unwahrscheinlich macht. Tatsächlich scheint das zu frühe Einsprossen von Nervenfasern aktiv durch die Sekretion von neurorepulsiven Faktoren verhindert zu werden, was die exakte zeitliche Steuerung der Innervation belegt. Einzelne Nervenfasern ziehen von der Zahnpulpa durch feine Kanäle in den periodontoblastischen Raum und sogar in das Dentin ein (Carda und Peydro, 2006). Nach einer Verletzung folgt das Wiedereinsprossen von Nervenfasern ebenfalls einem exakt austarierten, komplexen Wechselspiel zwischen den einwachsenden Fasern und der Pulpamatrix (Byers *et al.*, 2003).

1.2 Rolle der Schwann-Zelle bei der dentalen Nozizeption

Nervenzellen bestehen aus Dendriten, die Signale empfangen (Afferenz), einem Zelleib mit dem Zellkern und den Zellorganellen sowie Axonen, die ein Signal vom Zelleib weg hin zu einer weiteren Nervenzelle oder einem Effektororgan leiten (Efferenz). Für die Schmerzempfindung (Nozizeption) sind spezialisierte Nervenfasern verantwortlich, welche im Zahn- und Gesichtsbereich zumeist aus trigeminalen Neuronen stammen (Sessle, 1987). Dies konnte durch selektive

Degradationsversuche kleinkalibriger Nervenfasern bis zum Trigeminalganglion nach Capsaicinapplikation (s.u.) belegt werden (Bombardi *et al.*, 2006). Nozizeptive Fasern werden in myelinisierte (von Hüllzellen umgebene, schnellleitende) A δ - und unmyelinisierte (langsam leitende) C-Fasern unterteilt (Beitel und Dubner, 1976; Dubner und Bennett, 1983; Dubner, 1985).

In der Zahnpulpa sind sowohl myelinisierte als auch unmyelinisierte Nervenfasern darstellbar, deren Zahl im Laufe des Lebens variiert (Johnsen *et al.*, 1983). Die Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Bradykinin führt über die Aktivierung von intrazellulären Phosphorylierungskaskaden zu einer Verstärkung und Aufrechterhaltung des lokalen Schmerzreizes (Korkmaz *et al.*, 2008).

Die Myelinscheiden peripherer Nerven werden von Schwann-Zellen gebildet, die nach ihrem Entdecker, dem deutschen Anatomen und Naturforscher Theodor Schwann (1810-1882) benannt sind (Schwann, 1839). Myelinisierende Schwann-Zellen (MSCs) sind Hüll- und Stützzellen, welche den in ihr eingehüllten Nervenfasern einerseits Halt bieten und sie andererseits isolieren, was die Weiterleitung des elektrischen Impulses in der Nervenfaser unterstützt (Abbildung 2). Die durch die Schwann-Zellen gebildete Isolierschicht wird in Abständen von ca. 1mm immer wieder unterbrochen (Ranvier'sche Schnürringe), was eine „springende“ (saltatorische) Erregungsleitung ermöglicht (Corfas *et al.*, 2004). Zudem wurde gezeigt, dass die Schwann-Zellen durch Sekretion löslicher Mediatoren eine wesentliche Rolle bei der Entzündungsantwort nach Nervenverletzungen sowie bei autoinflammatorischen Prozessen spielen (Campana, 2007). So können Schwann-Zellen durch die Sekretion von TNF- α die lokale Entzündungsantwort heraufregulieren, was zugleich das neuropathische Schmerzempfinden verstärkt (Wagner und Myers, 1996). Unsere Arbeitsgruppe konnte in vorangehenden Arbeiten zeigen, dass eine Herabregulation der löslichen Guanylatzyklase (sGC) in entzündeten Odontoblasten wesentliche Bedeutung für die Aufrechterhaltung des inflammatorischen Geschehens hat (Korkmaz *et al.*, 2011).

Neben den MSCs werden noch drei weitere Klassen von Schwann-Zellen unterschieden: nichtmyelinisierende Schwann-Zellen (NMSCs) sind in Assoziation mit kleinen Axonen von C-Fasern nachweisbar, wobei eine Schwann-Zelle ein ganzes Bündel von Nervenfasern mit kleinen Zellausläufern unterteilt, ohne die Axone zu umhüllen (sogenanntes Remak-Bündel) (Douglas und Ritchie, 1962;

Corfas *et al.*, 2004). Perisynaptische Schwann-Zellen (auch terminale Schwann-Zellen genannt) kommen an der neuromuskulären Endplatte vor, während Satellitenzellen in Bindung an die neuronalen Zelleiber der peripheren Ganglien nachweisbar sind (Abbildung 2).

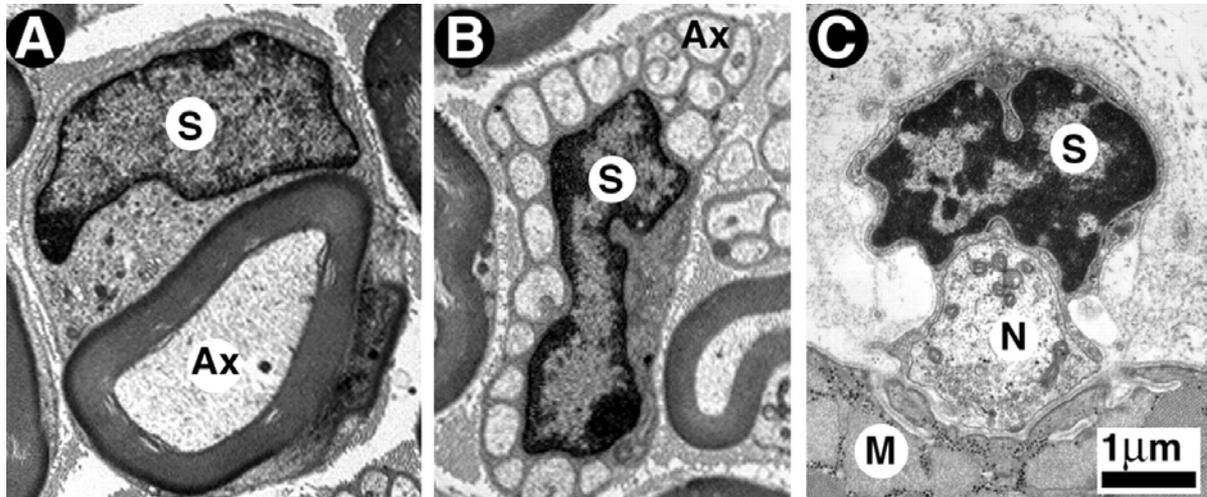


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von myelinisierenden Schwann-Zellen (MSCs, A), nichtmyelinisierenden Schwann-Zellen (NMSCs, B) und perisynaptischen/terminalen Schwann-Zellen (PSCs) im Bereich der neuromuskulären Endplatte. Ax, Axon; S, Schwann-Zelle; N, Nervenendigung; M, Muskelfaser. Aus (Corfas *et al.*, 2004).

Schwann-Zellen stammen entwicklungsgeschichtlich aus den Zellen der Neuralleiste, genau wie die Nervenfasern, die sie begleiten (Jessen und Mirsky, 1999; Corfas *et al.*, 2004). Diese multipotenten Vorläuferzellen migrieren aktiv aus der Neuralleiste in die Peripherie, wo sie sich zu Nerven- und Schwann-Zellen ausdifferenzieren. Die Differenzierung zur Schwann-Zelle wird durch Expression der Differenzierungsmarker P0 (Myelinprotein 0), GAP43 (*growth-associated protein 43*) und F-spondin angezeigt (Jessen und Mirsky, 1999). Im weiteren Verlauf exprimieren die unreifen Schwann-Zellen dann die β -Form des Proteins S100, auf das im weiteren Verlauf noch detaillierter eingegangen werden wird. Das exakte Signal, welches eine Differenzierung entlang der verschiedenen Formen von Schwann-Zellen bedingt, ist allerdings noch unbekannt; es scheint jedoch von der begleiteten Nervenfaser auszugehen (Jessen und Mirsky, 1999).

Schwann-Zellen spielen bei der Nozizeption zwei entscheidende Rollen: myelinisierte A δ -Fasern sind in der Lage, einen Schmerzreiz über die saltatorische Erregungsleitung rasch nach zentral weiterzuvermitteln („stechender“ Schmerz), während die Erregungsleitung in den nichtmyelinisierten C-Fasern eher langsam erfolgt („dumpfer“ Schmerz). Zudem sind Schwann-Zellen stoffwechselaktiv; eine Verletzung führt zu einem intensiven und reziproken Axon-Glia-Signalaustausch, welcher über Botenstoffe wie *nerve growth factor*- β (NGF- β), *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), *insulin like growth factor* (IGF-1), Erythropoietin (Epo), Pleiotrophin und *glial derived growth factor* (GDGF) vermittelt wird (Campana, 2007). Wird ein Nerv durchtrennt, dient die Basalmembran der sich rasch retrahierenden Schwann-Zelle als Leitstruktur für das Neuwachstum der Nervenfasern im Rahmen der posttraumatischen Reinnervation (Jessen und Mirsky, 2005). Allerdings sind nur ältere Schwann-Zellen in der Lage, den Verlust des begleiteten Axons durch die Freisetzung autokrin wirkender Wachstumsfaktoren (*Insulin-Like Growth Factor*, Neurotrophin-3, *Platelet-Derived Growth Factor-BB*) zu kompensieren (Meier *et al.*, 1999).

1.3 Das S100-Protein

Die S100-Proteinfamilie ist die größte Unterfamilie der kalziumbindenden Proteine, welche ein sogenanntes EF-Hand-Motiv aufweisen, das sich aus einer helix-loop-helix-Sekundärstruktur mit den beiden α -Helices E und F bildet (Donato, 2001; Marenholz *et al.*, 2004). S100-Proteine sind kleine, saure Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 10 und 12 Kilodalton (kD), welche charakteristischerweise zwei EF-Domänen aufweisen: eine N-terminale, S100-spezifische sowie eine klassische kalziumbindende EF-Domäne (Abbildung 3) (Marenholz *et al.*, 2004). S100-Proteine sind hoch gewebespezifisch exprimiert und in der Lage, Dimere und Oligomere zu bilden. Fast alle S100-Isoformen (Suffix -A) werden beim Menschen auf dem langen Arm von Chromosom 1 kodiert (1q21). Ausnahmen bilden das S100A11-Pseudogen (7q22-q31) sowie S100B (21q22), S100P (4p16), S100Z (5q14) und Calbindin-3 (Xp22), welches lediglich als Monomer anzutreffen ist, da die für die Dimerisierung notwendigen hydrophoben Residuen bei Calbindin-3 fehlen (Marenholz *et al.*, 2004). Nach Kalziumbindung kommt es zu einer Konformationsänderung der S100-Proteine, wodurch eine hydrophobe Bindungstasche freigelegt wird, die die Protein-Protein-Interaktion mit Zielproteinen wie p53, CapZ oder der Ndr-Kinase ermöglicht

(Abbildung 3) (Rust *et al.*, 2000; Inman *et al.*, 2002; Bhattacharya *et al.*, 2003). Hierdurch können durch S100 und seine Interaktionspartner zahlreiche intrazelluläre Signalkaskaden (Proteinphosphorylierungen, Enzymaktivität, Kalziumhomöostase, Umbau des Zytoskeletts und Aktivität von Transkriptionsfaktoren) beeinflusst werden (Ji *et al.*, 2014).

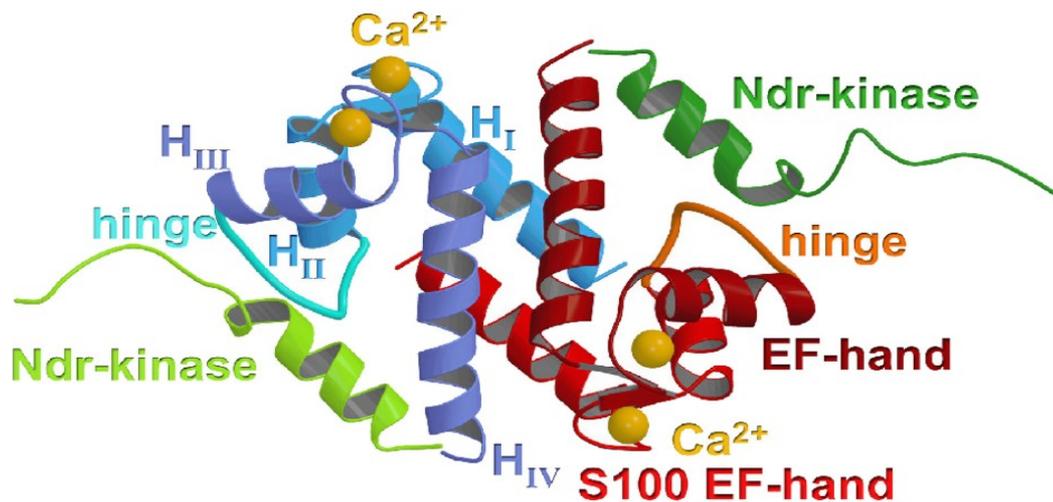


Abb. 3: Struktur der S100-Proteine und Bindungsmöglichkeiten an mögliche Interaktionspartner. S100 setzt sich aus zwei kalziumbindenden EF-Domänen (rot und blau) zusammen, welche jeweils durch eine Scharnierregion (*hinge*) verbunden sind. Kalziumbindung an die EF-Motive eröffnet eine hydrophobe Bindungsregion, an welche Proteininteraktionspartner (hier als Beispiel die Ndr-Kinase) andocken können. Aus (Marenholz *et al.*, 2004).

Bereits 1990 wiesen Mata *et al.* mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen S100 in Myelinscheiden peripherer Nerven nach, wobei die Immunreaktivität mit der Dicke der Myelinscheide korrelierte (Mata *et al.*, 1990). Trotzdem war S100 ultrastrukturell auch in NMSCs nachweisbar, da das Protein nicht im Myelin selbst, sondern im Zytoplasma und dem Zellkern der Schwann-Zellen nachweisbar war. Dies belegt, dass S100 einen guten Marker für Schwann-Zellen darstellt, während die Nervenfasern selbst keine Reaktivität mit dem Antikörper gegen S100 zeigen (Mata *et al.*, 1990). Der Antikörper gegen S100 ist daher in der diagnostischen Histopathologie von großem Nutzen für den Nachweis von Nervenscheidentumoren (Schwannomen) (Kaddu und Kokol, 2016).

Ichikawa et al. zeigten im Jahre 1998, dass sensible trigeminale Nervenendigungen in der Zahnpulpa mittels S100-Immunhistochemie darstellbar sind (Ichikawa et al., 1998). Die Autoren legten zudem mittels Immunelektronenmikroskopie dar, dass alle myelinisierten Nervenfasern und etwa die Hälfte der unmyelinisierten Nervenfasern Reaktivität mit dem Antikörper gegen S100 aufwiesen. Interessanterweise konnte zudem gezeigt werden, dass aus kariösen Zähnen vermehrt S100 isoliert werden kann; dies ist allerdings auf eine vermehrte bakteriell induzierte Expression der S100-Isoformen S100A8 und S100A8/S100A9 durch infiltrierende neutrophile Granulozyten zurückzuführen (McLachlan et al., 2004).

1.4 Modell der Capsaicin-Desensitivierung

Primäre sensorische Nervenfaserendigungen verfügen über den *transient receptor potential vanilloid type 1 ion channel* (TRPV1), einen Ionenkanal mit Rezeptorfunktion, der durch Hitze (>42°C), Protonen und Vanilloide wie Capsaicin (8-Methyl-N-Vanillyl-6-Nonenamid, Inhaltsstoff roter Chillischoten; Abbildung 4) aktiviert wird, weshalb er auch als Capsaicin-Rezeptor bezeichnet wird (Nagy et al., 2014). Die genannten Stimuli führen über eine kurzfristige Aktivierung des Kanals zu einem akuten Schmerzreiz.

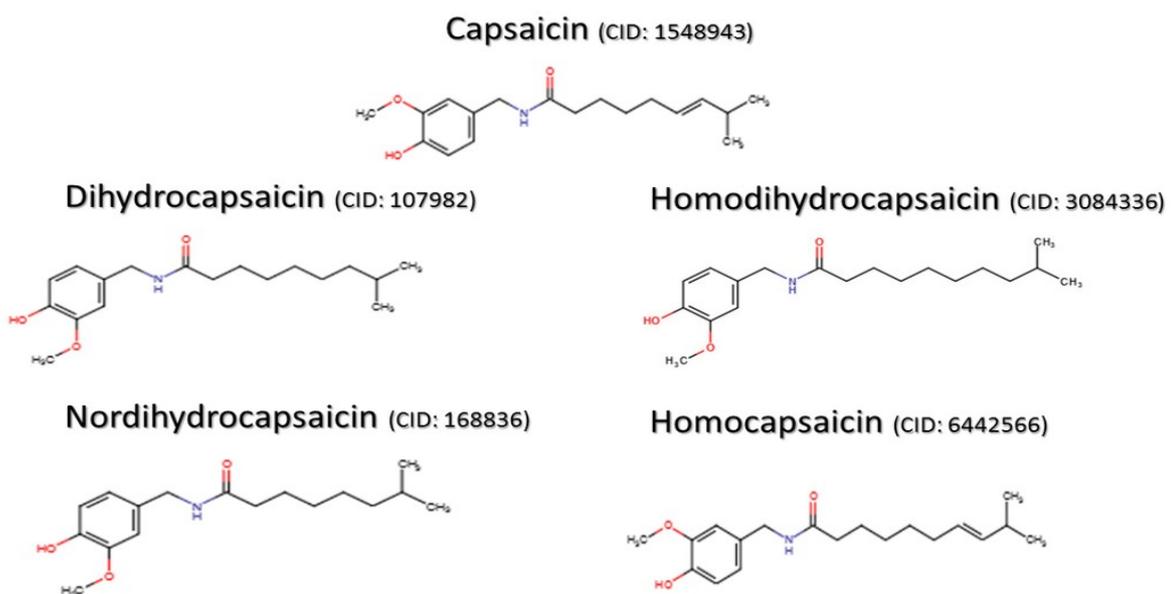


Abb. 4: Strukturformel von Capsaicin sowie der Capsaicinoide. CID, compound identifier number. Aus (Fattori et al., 2016).

Allerdings konnte bereits in den 1990er Jahren an der Haut gezeigt werden, dass eine konstante Applikation von Capsaicin zu einer Degeneration von intrakutanen Nervenfasern führt, die auch im weiteren Verlauf nur bis zu 25% reversibel ist (Reilly *et al.*, 1997; Simone *et al.*, 1998). Diese Resultate bestätigten frühe Studien, nach denen systemische Administration von Capsaicin zur Degeneration subepidermaler Nervenplexus führte, was ebenfalls auf eine systemische neurotoxische Wirkung anhaltender Capsaicinexposition hindeutet (Holzer *et al.*, 1979; Chung *et al.*, 1990). Lawson konnte 1986 im Rattenmodell zeigen, dass eine neonatale Gabe von 50-100mg/kg Capsaicin zu einer ausgeprägten Reduktion unmyelinisierter (89%) und myelinisierter (36%) Nervenfasern führte (Lawson, 1986). Das histologische Muster des Nervenuntergangs ist hierbei vergleichbar mit jenem der diabetischen Neuropathie oder der HIV-Neuropathie (McCarthy *et al.*, 1995; Kennedy *et al.*, 1996). An der Zahnpulpa konnte gezeigt werden, dass die lokale (intradentale) Applikation von Capsaicin selektiv kleinkalibrige Nervenfasern in der Zahnpulpa zur Degeneration veranlasst; diese Degeneration kann bis in die trigeminalen Ganglienzellen nachverfolgt werden, was die trigeminale Herkunft der Fasern belegt (Bombardi *et al.*, 2006). Die lokale neurodegenerative Wirkung von Capsaicin auf kleinkalibrige Nervenfasern wurde auch in vorangegangenen Arbeiten bereits beschrieben (Jancso *et al.*, 1985; Jancso und Lawson, 1990).

Der exakte Mechanismus, wie systemisch appliziertes Capsaicin zum Untergang sensorischer Nerven führt, ist hingegen noch unverstanden. Es ist belegt, dass Capsaicin die Apoptose von Nervenzellen durch Aktivierung des Caspase-Pathways fördert; die Aktivierung des TRPV1-Rezeptors führt zudem zu erhöhter mitochondrialer Permeabilität (Fattori *et al.*, 2016). Eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration löst daraufhin den Einstrom von Natriumionen mit passivem Wassereinstrom aus, was zur Zellschwellung und Membranschädigung der sensorischen Nervenzellen mit schließlichem Zelluntergang führt. Ob auch Schwann-Zellen, insbesondere jene der Zahnpulpa, den TRPV1-Rezeptor besitzen, ist bislang nicht bekannt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die systemische Gabe von Capsaicin zu einer signifikanten Reduktion myelinisierter wie auch unmyelinisierter Nervenfasern führt, welche für das Schmerzempfinden verantwortlich sind.

1.5 Ziel der Arbeit

Die Schmerzempfindung in der dentalen Pulpa wird von myelinisierten A δ - und nichtmyelinisierten C-Fasern vermittelt, welche im Laufe der Embryonalentwicklung in die Pulpa einwachsen. Beide Fasern sind von Schwann-Zellen umgeben, für die das Protein S100 einen hochselektiven Marker darstellt. Es konnte in vorangehenden Arbeiten gezeigt werden, dass die systemische neonatale Applikation von Capsaicin (8-Methyl-N-Vanillyl-6-Nonenamid) eine selektive Desensitivierung der nozizeptiven Fasern hervorruft (Lawson, 1986; Jancso und Lawson, 1990).

In der vorliegenden Arbeit soll nun am Rattenmodell untersucht werden, inwiefern die neonatale Applikation von Capsaicin eine Änderung in Anzahl und Dichte der S100-positiven Schwann-Zellen als Marker für die nozizeptive Pulpainnervation hervorruft. Hierzu wurden histologische Schnitte der Zahnanlage zu den postnatalen Tagen 30, 60, 90 und 155 angefertigt und immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen S100 gefärbt. Zusätzlich soll untersucht werden, ob der Alterungsprozess Einfluss auf die Dichte und Anzahl S100-positiver Schwann-Zellen in der Rattenpulpa hat.

Die Arbeit soll so zu einem besseren Verständnis der Neurophysiologie des Schmerzempfindens der Zahnpulpa beitragen und eine mögliche langfristige antinozizeptive Wirkung von Capsaicin untersuchen, welche insbesondere bei langanhaltenden trigeminalen Schmerzzuständen hilfreich sein könnte.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studiendesign

Die Tierversuche fanden mit Genehmigung der Bezirksregierung Düsseldorf (Projektnummer G86/2003) in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf statt. Als Versuchstiere dienten Wistar-Ratten. Alle Tiere wurden anästhesiert, bevor sie durch kardiale Punktion, Intravitalperfusion und Fixation geopfert wurden. Außerdem wurden weitere Gewebe zur Analyse durch andere Arbeitsgruppen fixiert und gefroren.

Eine schematische Übersicht über den Studienablauf zeigt Abbildung 5.

2.1.1 Capsaicin-Applikation

Insgesamt wurden 48 Wistar-Ratten zur Gewebeanalyse in zwei Gruppen unterteilt: eine experimentelle Gruppe, die mit Capsaicin behandelt wurde und eine Kontrolltiergruppe, denen nur die Trägerlösung ohne Capsaicin verabreicht wurde.

Die Capsaicin Lösung wurde wie folgt hergestellt: 50mg Capsaicin 95% (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) wurden in 0,5ml Ethanol 96% gelöst und 0,5ml Tween R 80 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) hinzugefügt. Die Lösung wurde mit 4ml physiologischer Natriumchloridlösung aufgefüllt und steril filtriert. Die Kontrollgruppe erhielt die gleiche Lösung, wobei auf die Gabe von Capsaicin verzichtet wurde. Die Applikationsmenge betrug 50mg Capsaicin pro Kilogramm Körpergewicht (Lawson, 1986).

Den jeweils 24 Wistar-Ratten der experimentellen Gruppe wurde am 3. postnatalen Tag eine Dosis von 50mg/kg Körpergewicht Capsaicin in einer Trägersubstanz subkutan in die Nackenfalte injiziert. Die Gruppe der Kontrolltiere, ebenfalls 24, erhielt die gleiche Menge Trägersubstanz ohne Capsaicin am 3. postnatalen Tag subkutan appliziert.

Durch die Capsaicingabe entwickelten die Tiere der experimentellen Gruppe Asthmaanfälle, weswegen bei den ersten Anzeichen ein Hub Asthmaspray mit dem Wirkstoff Fenoterolhydrobromid (Berotec R N 100µg Dosier-Aerosol, Boehringer Ingelheim, Deutschland) verabreicht wurde. Unter Sauerstoffgabe erfolgte eine Brustmassage, um die Atmung zu unterstützen. Die Tiere der Kontrollgruppe, die die reine Trägerlösung ohne Capsaicin erhielten, entwickelten

keinen Asthmaanfall. Es wurde ihnen aber ebenfalls das Asthmaspray verabreicht. Nach Beendigung des Asthmaanfalls und im weiteren Verlauf erfolgte die Kontrolle des Gesundheitszustandes der Jungtiere.

2.1.2 Intravitalperfusion und Fixierung

Jeweils sechs Tiere der Kontroll- und Capsaicin-Gruppe wurden nach 30, 60, 90 und 155 Lebenstagen geopfert. Vor der Intravitalperfusion wurden die Tiere mit 100mg Ketaminhydrochlorid (Ketavet R 100mg/ml, Pharmacia&Upjohn Erlangen, Deutschland) und 5g Xylazinhydrochlorid 2% (Rompun R 2%, Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) pro Kilogramm Körpergewicht intraperitoneal anästhesiert. Die erste Fixierung des Gewebes erfolgte nach Zamboni (Stefanini *et al.*, 1967). Die Lösung bestehend aus 4% Paraformaldehyd und 0,2% Pikrinsäure in 0,1M pH 7,4 Phosphatpuffer diffundierte mittels des hydrostatischen Druckes über die Gefäße in das umliegende Gewebe. Der erreichte Fixierungsgrad zeigte sich an der Gelbfärbung der Schleimhäute.

2.1.3 Gewebepräparation, Entkalkung und Einbettung

Danach wurden die Kiefer präpariert und in 4% neutral gepufferter Paraformaldehydlösung für 24 Stunden nachfixiert. Die Fixierung wurde in Phosphatpuffer für 24 Stunden ausgewaschen. Die Entkalkung der Kiefer erfolgte in 25% Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) für 2-4 Wochen, je nach Alter der Tiere. In der ersten Woche wurde die EDTA-Lösung täglich gewechselt, später nach 3-4 Tagen. Die Auswaschung der Fixierung und die Entkalkung sind wichtige Schritte in der Vorbereitungsphase. Reste der Fixierung können zu unspezifischen Reaktionen am Gewebe in der Phase der Immunhistochemie führen, während in der Entkalkungsphase zugunsten der besseren Bearbeitung der Zahnhartsubstanz Schäden an der Pulpa auftreten können. Nach der Entkalkungsphase folgte eine weitere Auswaschung für 24 Stunden in Phosphatpuffer. Bevor die Kiefer bei -80°C in 30% Sucrose gelöst und in Phosphatpuffer eingefroren und gelagert wurden, folgte eine 24-stündige Einlagerung in Sucrose 10% gelöst in Phosphatpuffer (Bergmann, 2009).

2.1.4 Gewebevorbereitung

Die Unterkieferhälften von jeweils 6 Tieren aus jeder Gruppe wurden am Kryostat Leica CM 3050 (Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland) bei -18°C auf $50\mu\text{m}$

Sagittalschnitte geschnitten und anschließend in Phosphatpuffer schwimmend bis zur immunhistochemischen Färbung aufbewahrt.

2.1.5 Avidin-Biotin Peroxidase-Komplex-Methode

Die Gewebeschnitte wurden für je fünf Minuten in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) zweimal gewaschen und für 30 Minuten in 0,3% Hydrogen-Peroxid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in einer PBS und 0,5% TritonX 100R (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) Lösung inkubiert (Hsu *et al.*, 1981). Es folgten sechs weitere Waschgänge mit PBS-TritonX (PBS-TX). Unspezifische Bindungsstellen wurden blockiert mit 5% Normalserum der Ziege (Vector Laboratories, Burlingame, USA) für 60 Minuten. Der polyklonale Primärantikörper Kaninchen S100, 1:800 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurde in eine Lösung aus 1% Rinderserum Albumin (Calbiochem, LaJolla, USA) und 5% Normalserum von der Ziege eingebracht. Die Schnitte wurden bei 4°C für 72 Stunden in dieser Lösung auf dem Schüttler kontinuierlich bei niedriger Frequenz inkubiert. Es folgten sechs Waschgänge mit PBS-TX. Der Sekundärantikörper Ziege Anti Kaninchen, 1:500 (Vector Laboratories, Burlingame, USA) wurde in die Blockierungslösung gegeben und die Schnitte für 90 Minuten in diese eingelegt. Es schlossen sich sechs Waschgänge mit PBS-TX an. Auf das Gewebe wirkte dann für vier Stunden der Avidin Biotin Peroxidase-Komplex (ABC Standardkit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) ein. Anschließend wurde das Gewebe durch drei Pufferbäder mit PBS und drei Pufferbäder mit Tris-Puffer (TBS) geführt. Eine Lösung bestehend aus in Tris-Puffer gelöstem nickelverstärktem 3,3'-Diaminobenzidin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und Hydrogen-Peroxid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurde für die Chromogenreaktion hergestellt. Dort verblieben die Schnitte für die Reaktion 1 Minute lang. Die Chromogenreaktion wurde unterbrochen, indem drei Waschgänge in Tris-Puffer folgten und drei weitere in PBS. Danach wurden die Schnitte in Phosphatpuffer gesammelt und auf mit Chrom-Alaun-Gelatine beschichteten Objektträgern aufgezogen und getrocknet. Die Gegenfärbung, bestehend aus 1% Azur II und 1% Methylenblau zu gleichen Teilen gelöst in 1% Borax 1:250 verdünnt in destilliertem Wasser, wirkte für eine Minute ein. In einer aufsteigenden Isopropanolreihe wurden die Schnitte dehydriert, zweimal für je fünf Minuten in Xylol geklärt und mit DePeX (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) und Deckgläsern

eingedeckt. Negativkontrollen wurden durchgeführt und zeigten keine Immunfärbung über die gesamte Länge der Versuchsreihen an.

2.1.6 Lichtmikroskopie

Mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Laborlux D, Leitz, Deutschland) wurden geeignete Gewebe-Sagittalschnitte ausgewählt, bevor diese digital mit einer am Mikroskop installierten Kamera (Leica DM 2500) fotografiert wurden. Die Kriterien entsprechen denen wie bereits in den Dissertationen von Frau Dr. Bergmann und Frau Dr. Hahner festgelegt (Bergmann, 2009; Hahner, 2012). Das mesiale Pulpenhorn und das Pulpenkavum auf Höhe der Schmelz-Zement-Grenze wurden in 10-facher Vergrößerung digital fotografiert. Aus diesen Aufnahmen wurde jeweils ein beliebiges Gesichtsfeld ausgewählt.

2.1.7 Nervenfaserverquantifizierung-Point Counting Methode

Die Quantifizierung der S 100-ir erfolgte mit der Point Counting Methode in der von Korkmaz et al. 2009 beschriebenen Variante (Weibel *et al.*, 1966; Ingersoll *et al.*, 1984; Korkmaz *et al.*, 2009). Da die Färbungen der einzelnen Aufnahmen unterschiedliche Qualitäten aufwiesen, wurden jeweils die besten sechs Aufnahmen einer jeden Gruppe ausgewählt und statistisch analysiert. Die Auswahl erfolgte visuell jedoch ohne Berücksichtigung der Anzahl der optisch erkennbaren S100 ir positiven-Zellen.

Für die Auswertung nach der Point Counting Methode wurde eine transparente Millimeterfolie auf den Computermonitor gelegt. Die Millimeterfolie wurde in 20x20 mm große Raster unterteilt, so dass ein beliebiges Gesichtsfeld der Aufnahmen eingerahmt wurde. Es wurden alle S100 ir positiven Zellen gezählt, die die Eckpunkte eines 20x20 mm Rasters auf der Millimeterfolie schnitten. Der Durchschnitt für jeden Molaren wurde ermittelt, indem die Zahl der Eckpunkte, die durch eine S100 ir positive Schwann-Zelle geschnitten wurden, durch die Gesamtzahl der Eckpunkte des Pulpenrahmens geteilt wurde.

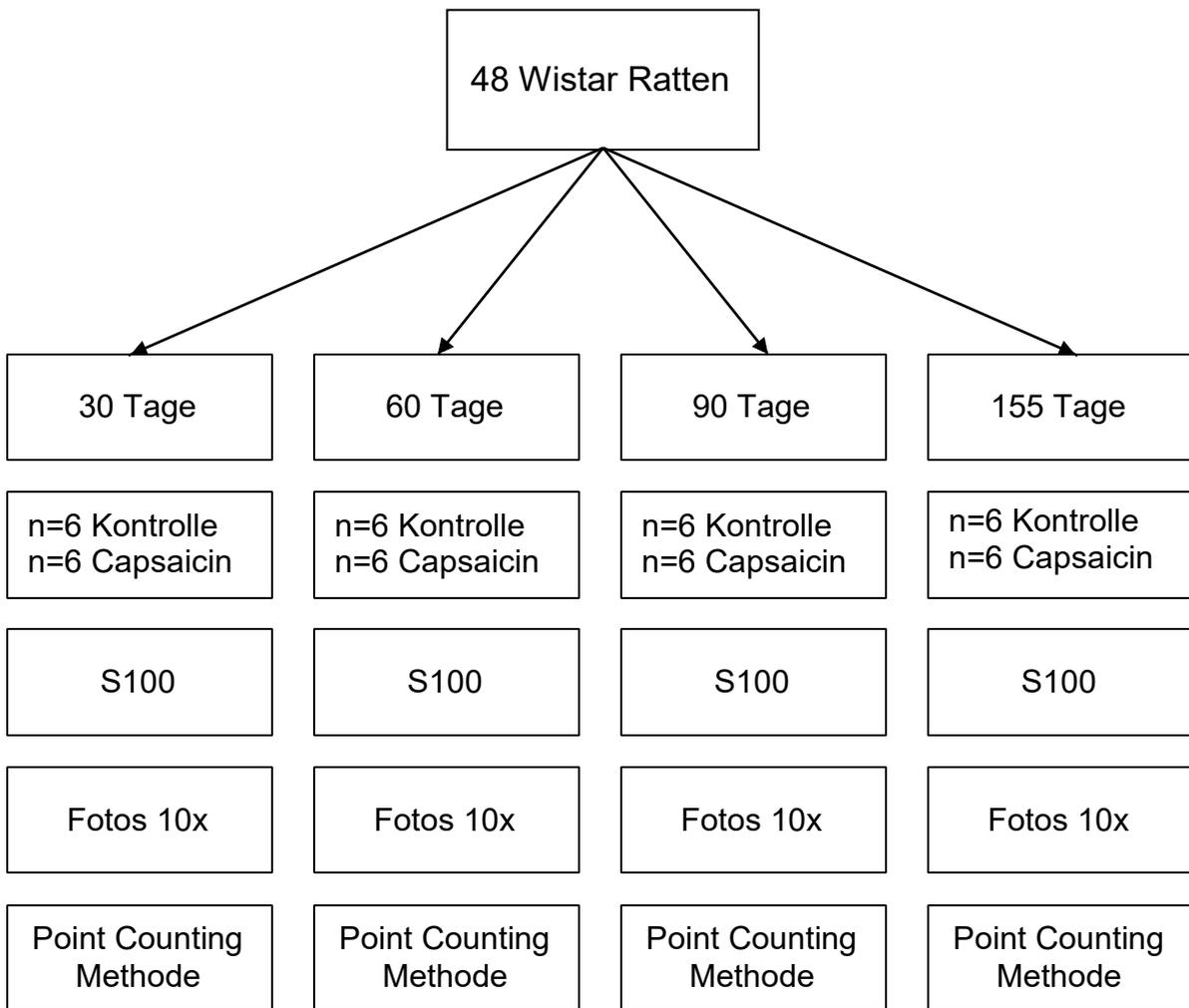


Abb. 5: Grafische Darstellung des Studiendesigns

2.2 Datenverarbeitung und statistische Analyse

2.2.1 SPSS

Mit Hilfe des Programms IBM SPSS Statistics (Version 12.0, Chicago, Illinois, U.S.A.) für Windows wurde die statistische Auswertung unter fachlicher Anleitung durch Prof. Dr. Wilhelm Bloch, Deutsche Sporthochschule Köln, durchgeführt. Dabei wurden der Student T-Test, der One-Way ANOVA (univariate Varianzanalysen) und der PostHoc Bonferroni-Test angewendet (Huck *et al.*, 1974). Die Signifikanzgrenze wurde einheitlich bei $p < 0.05$ festgelegt. Die Untersuchungsergebnisse wurden in tabellarischer Form mit Office EXCEL (Microsoft, Seattle, U.S.A.) zusammengefasst. Die graphische Darstellung erfolgte mit Boxplot-Diagrammen.

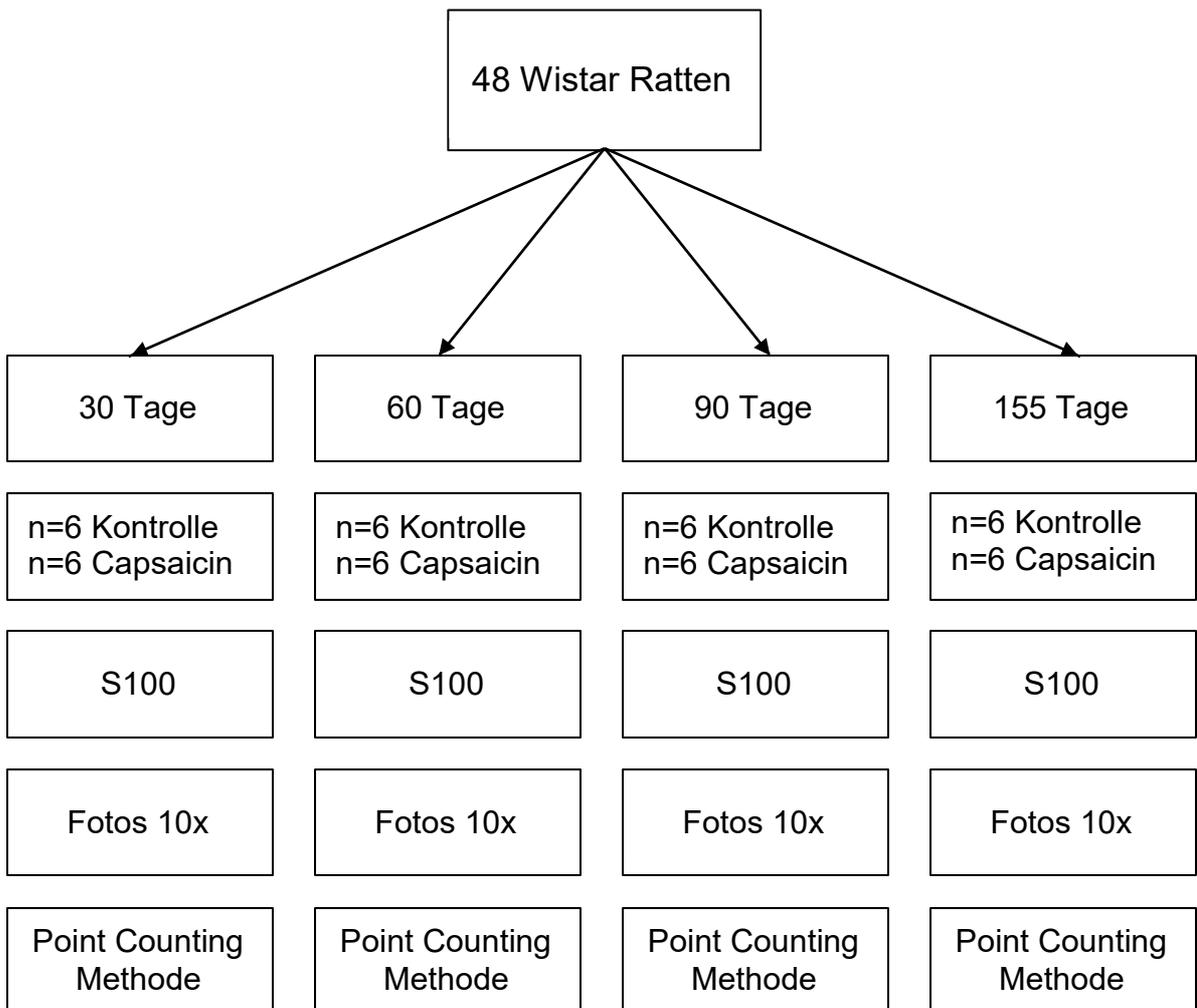


Abb. 5: Grafische Darstellung des Studiendesigns

2.2 Datenverarbeitung und statistische Analyse

2.2.1 SPSS

Mit Hilfe des Programms IBM SPSS Statistics (Version 12.0, Chicago, Illinois, U.S.A.) für Windows wurde die statistische Auswertung unter fachlicher Anleitung durch Prof. Dr. Wilhelm Bloch, Deutsche Sporthochschule Köln, durchgeführt. Dabei wurden der Student T-Test, der One-Way ANOVA (univariate Varianzanalysen) und der PostHoc Bonferroni-Test angewendet (Huck *et al.*, 1974). Die Signifikanzgrenze wurde einheitlich bei $p < 0.05$ festgelegt. Die Untersuchungsergebnisse wurden in tabellarischer Form mit Office EXCEL (Microsoft, Seattle, U.S.A.) zusammengefasst. Die graphische Darstellung erfolgte mit Boxplot-Diagrammen.

2.2.2 Student T-Test

Mit Hilfe des Student T-Tests sind die Mittelwerte und Standardabweichung für die Anzahl S-100 ir positive Schwann Zelle, die die Eckpunkte eines 20x20mm-Rasters gekreuzt haben, der Versuchs- und Kontrollgruppe miteinander verglichen worden. Der Vergleich erfolgte je Altersgruppe.

2.2.3 One-Way ANOVA Test

Anhand des One-Way ANOVA Test wurde getestet, ob mehr als zwei Altersgruppen sich in ihren Mittelwerten statistisch unterscheiden. Der initiale Test unterscheidet aber nicht, zwischen welchen Gruppen dieser statistisch signifikante Unterschied besteht; dazu wurde der PostHoc Bonferroni-Test angewendet.

2.2.4 PostHoc Bonferroni-Test

Paarweise wurden die Gruppenmittelwerte verglichen, um einen Mittelwertvergleich mehrerer unabhängiger Stichproben zu erhalten. Die unterschiedlichen Altersklassen der Versuchs- und Kontrollgruppe wurden so miteinander verglichen, und es konnten statistisch signifikante Veränderungen in der Anzahl der S100 immunreaktiv positiven- Zellen zwischen den verschiedenen Altersklassen dargestellt werden.

3 ERGEBNISSE

3.1 Statistische Analyse: Vergleich der S100-ir positiven Schwann-Zellanzahl zwischen den Altersgruppen der Kontrolltiere

3.1.1 Altersgruppe 30-Tage (30T) Kontrolltiere

Im Vergleich der S100-ir positiven Schwann-Zelle der 30T-Kontrolltiere (n=6, Mittelwert $0,2335 \pm 0,02154$) zu den 60T-Kontrolltieren (n=6, Mittelwert $0,2277 \pm 0,02268$) konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der Student-t-Test offenbarte hierbei einen Signifikanzwert von $p=1,0$. Die 30T-Kontrolltiere zeigten aber einen signifikanten Unterschied zu den 90T- (n=6, $0,4392 \pm 0,01884$, $p < 0,001$) und 155T-Kontrolltieren ($0,4370 \pm 0,04397$, $p < 0,001$) (Abbildung 6).

3.1.2 Altersgruppe 60-Tage (60T) Kontrolltiere

Der Vergleich der S100-ir positiven Schwann-Zelle der 60T-Kontrolltiere (n=6, Mittelwert $0,2277 \pm 0,02268$) zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den 30T-Kontrolltieren (n=6, Mittelwert $0,2335 \pm 0,02154$). Einen signifikanten Unterschied ergab der Vergleich der 60T-Kontrolltiere zu den 90T- (n=6, $0,4392 \pm 0,01884$, Signifikanzwert von $< 0,001$) und 155T-Kontrolltieren ($0,4370 \pm 0,04397$, Signifikanzwert von $< 0,001$) (Abbildung 6).

3.1.3 Altersgruppe 90-Tage (90T) Kontrolltiere

Die Gruppe der 90T-Kontrolltiere (n=6) zeigte einen signifikanten Unterschied zu den 30T- ($0,2335 \pm 0,02154$) und 60T-Kontrolltieren ($0,2277 \pm 0,02268$), aber nicht zur Gruppe der 155-Kontrolltiere ($0,4370 \pm 0,04397$) (Abbildung 6).

3.1.4 Altersgruppe 155-Tage (155T) Kontrolltiere

Der Vergleich der S100-ir positiven Schwann-Zelle zwischen den Gruppen der 155-Kontrolltiere (n=6) zu den Gruppen 30T- ($0,2335 \pm 0,02154$), 60T-Kontrolltiere ($0,2277 \pm 0,02268$) war signifikant. Die Kontrolltiere 155T zeigten aber keinen signifikanten Unterschied zur Gruppe der 90T-Kontrolltiere ($0,4392 \pm 0,01884$) (Abbildung 6).

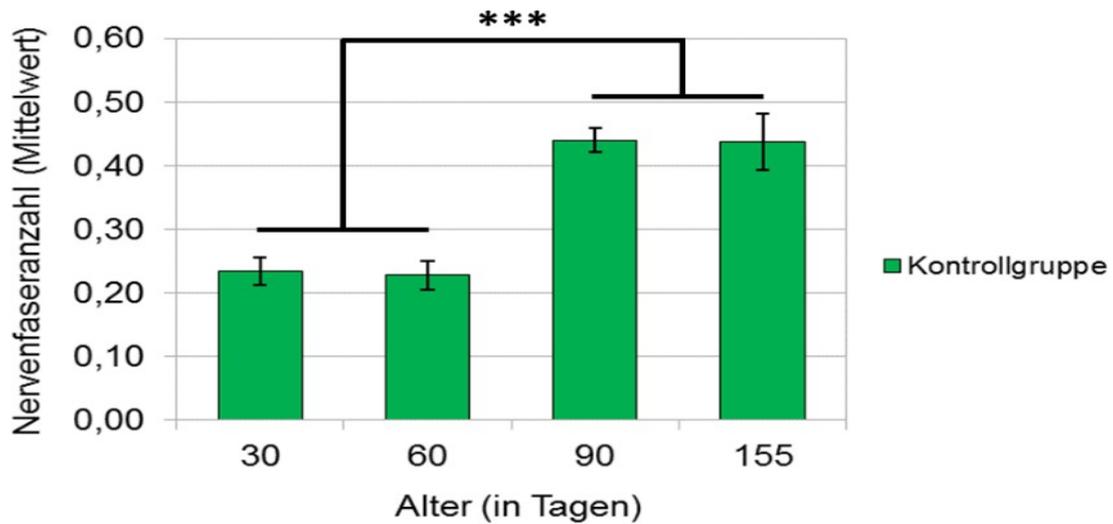


Abb. 6: Statistische Auswertung der mittleren S100-ir positiven Schwann-Zellanzahl in der Kontrollgruppe. *, $p < 0,001$**

3.2 Vergleich der S100-ir positiven Schwann-Zellanzahl zwischen den Altersgruppen der Capsaicin-behandelten (Caps) Tiere

3.2.1 Altersgruppe 30-Tage (30T) Caps-Tiere

Im Vergleich der 30T-Caps- zu 60T-Caps- und 90T-Caps-Tiere wurde bei ($n=6$) kein signifikanter Unterschied (30T: $0,1953 \pm 0,03769$) (60T: $0,2037 \pm 0,01607$) (90T: $0,3118 \pm 0,02002$) detektiert. 30T-Caps-Tiere zeigten aber einen signifikanten Unterschied zur Gruppe der 155T-Caps-Tiere ($0,4342 \pm 0,02182$) (Abbildung 7).

3.2.2 Altersgruppe 60-Tage (60T) Caps-Tiere

Die S100-ir positive Schwann-Zellanzahl der 60T-Caps-Tiere ($n=6$) zeigte einen signifikanten Unterschied zur Gruppe der 155T-Caps-Tiere ($0,4342 \pm 0,02182$), während bei Vergleichen der 60T-Caps-Tiere mit der Gruppe der 30T-Caps-Tiere ($0,1953 \pm 0,03769$) und 90T-Caps-Tiere ($0,3118 \pm 0,02002$) keine signifikanten Unterschiede gefunden wurde (Abbildung 7).

3.2.3 Altersgruppe 90-Tage (90T) Caps-Tiere

Der Vergleich der Gruppe der 90T-Caps-Tiere (n=6) zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den 30T-Caps- ($0,1953 \pm 0,03769$) und 60T-Caps-Tieren ($0,2037 \pm 0,01607$). Ein tendenziell erhöhter, aber nicht signifikanter, Unterschied zur Gruppe der 155T-Caps-Tiere ($0,4342 \pm 0,02182$) war zu finden (Abbildung 7).

3.2.4 Altersgruppe 155-Tage (155T) Caps-Tiere

In Bezug auf die S100-ir positive Schwann-Zellanzahl wurde bei der Gruppe der 155-Caps-Tiere (n=6) ein signifikanter Unterschied zur Gruppe der 30T-Caps-Tiere ($0,1953 \pm 0,03769$) und 60T-Caps-Tiere ($0,2037 \pm 0,01607$) detektiert. Die Gruppe der 155T-Caps-Tiere zeigte aber keinen signifikanten Unterschied zur Gruppe der 90T-Kontrolltiere ($0,3118 \pm 0,02002$) (Abbildung 7).

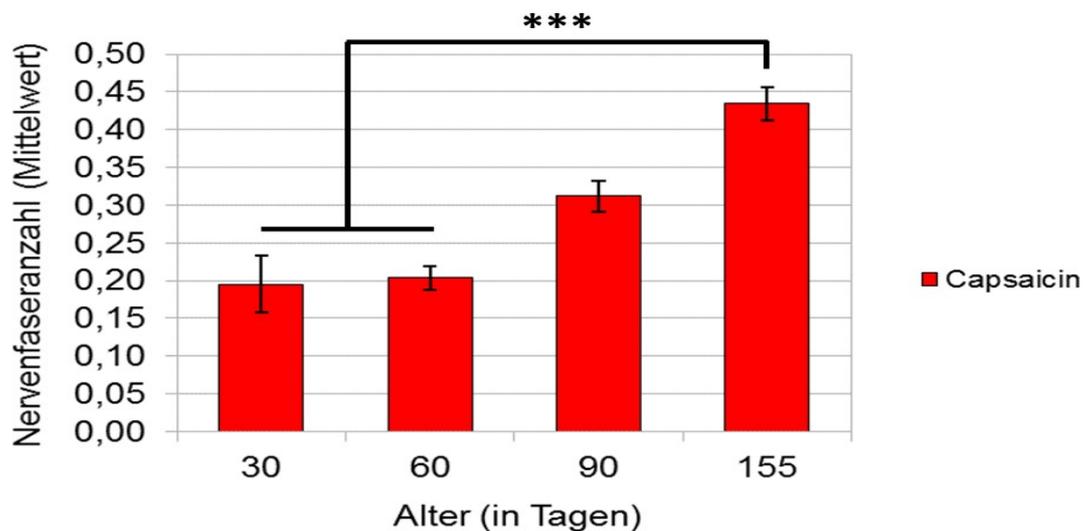


Abb. 7: Statistische Auswertung der mittleren S100-ir positiven Schwann Zellanzahl in der Capsaicingruppe. *, $p < 0,001$**

3.3 Vergleich der S100-ir positiven Schwann-Zellanzahl zwischen Kontroll- und Capsaicin-behandelten (Caps) Tieren

3.3.1 Altersgruppe 30-Tage (30T) Kontroll- und 30T-Caps-Tiere

Beim Vergleichen der S100-ir positiven Schwann-Zellanzahl zeigten 30T-Kontrolltiere (n=6) ($0,2335 \pm 0,05276$) keine signifikanten Unterschiede zur 30T-Caps-Tiere (n=6) ($0,1953 \pm 0,09231$) (Abbildungen 8 und 12).

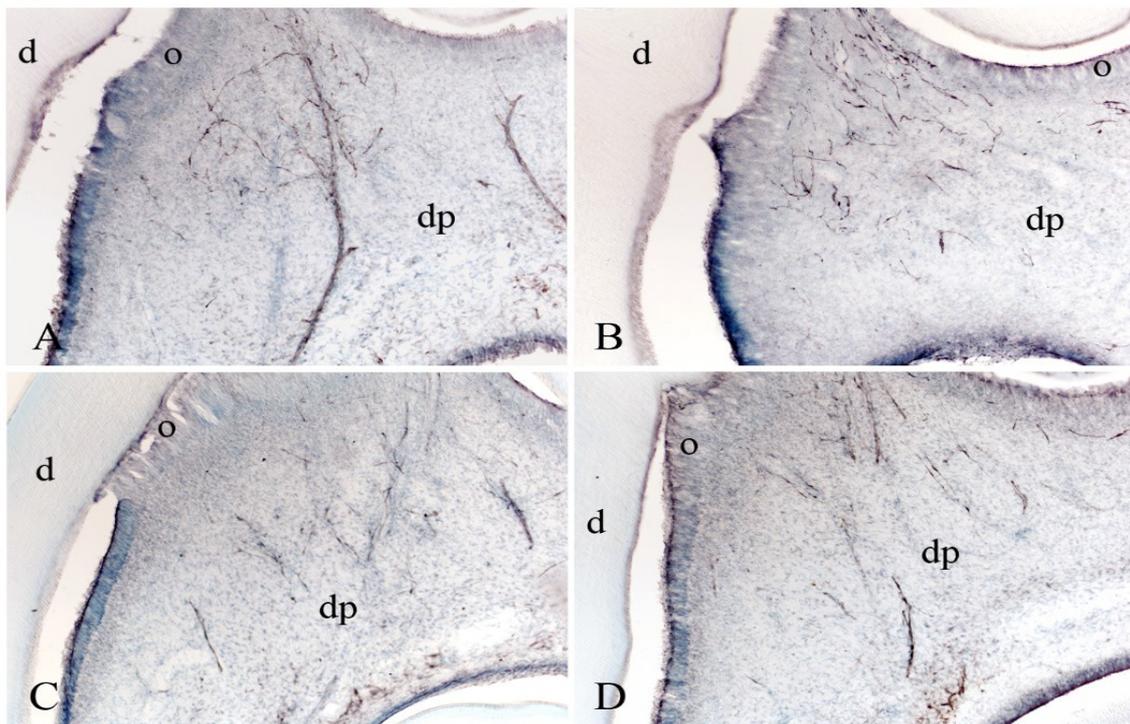


Abb. 8: Repräsentative Mikrofotografien der immunhistochemischen Färbungen mit dem Antikörper gegen S100 bei Tieren der Altersgruppe 30 Tage. A, B: Tiere der Kontrollgruppe; C, D: Tiere der Capsaicin-Gruppe. d, dentin; o, Odontoblastenschicht; dp, Zahnpapille/Pulpa.

3.3.2 Altersgruppe 60-Tage (60T) Kontroll- und 60T-Caps-Tiere

Im Vergleich der S100-ir positiven Schwann-Zellanzahl war bei den 60T-Kontrolltieren (n=6) ($0,2277 \pm 0,05556$) kein signifikanter Unterschied zur Gruppe der 60T-Caps-Tiere ($0,2037 \pm 0,03937$) zu finden (Abbildungen 9 und 12).

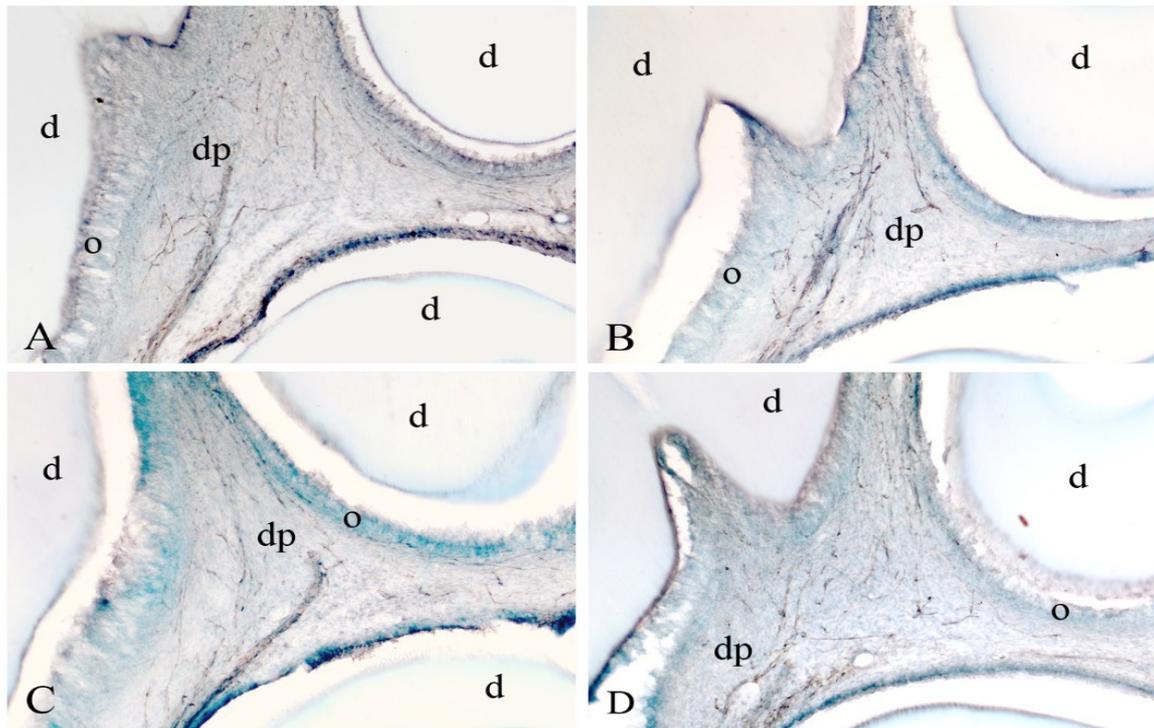


Abb. 9: Repräsentative Mikrofotografien der immunhistochemischen Färbungen mit dem Antikörper gegen S100 bei Tieren der Altersgruppe 60 Tage. A, B: Tiere der Kontrollgruppe; C, D: Tiere der Capsaicin-Gruppe. d, dentin; o, Odontoblastenschicht; dp, Zahnpapille/Pulpa.

3.3.3 Altersgruppe 90-Tage (90T) Kontroll- und 90T-Caps-Tiere

Die Gruppe der 90T-Kontrolltiere (n=6) ($0,4392 \pm 0,04614$) zeigte einen signifikanten Unterschied zur Gruppe der 90T-Caps-Tiere (n=6) ($0,3118 \pm 0,04903$) (Abbildungen 10 und 12).

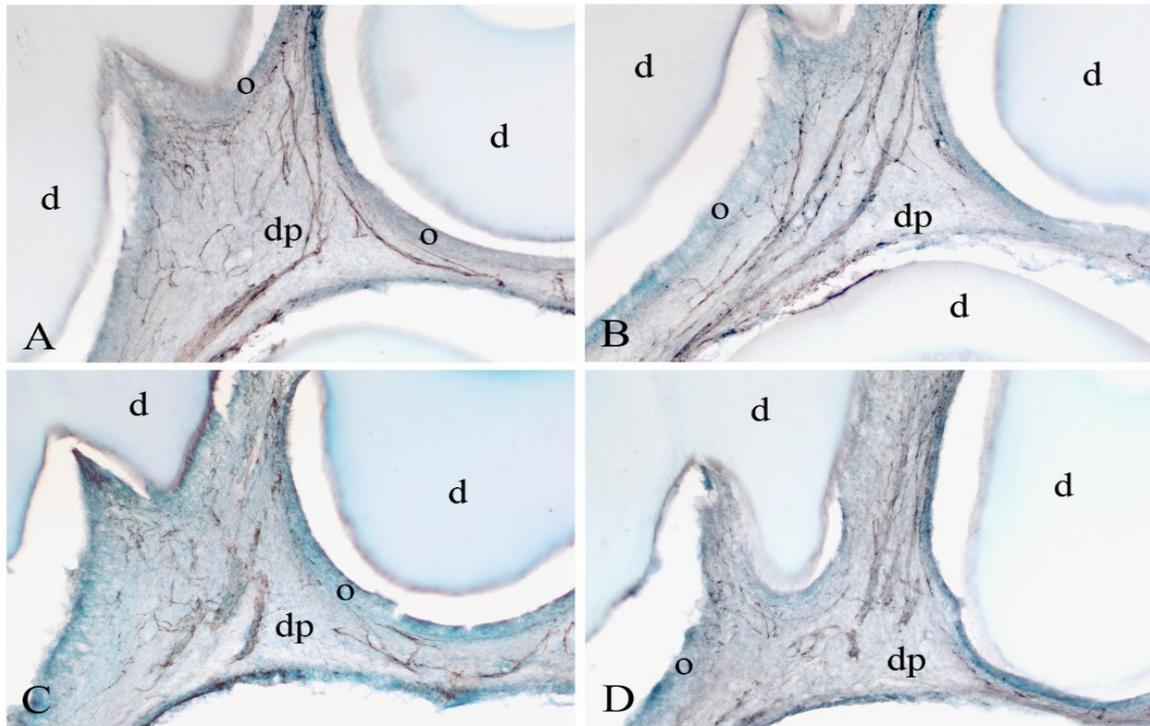


Abb. 10: Repräsentative Mikrofotografien der immunhistochemischen Färbungen mit dem Antikörper gegen S100 bei Tieren der Altersgruppe 90 Tage. A, B: Tiere der Kontrollgruppe; C, D: Tiere der Capsaicin-Gruppe. d, dentin; o, Odontoblastenschicht; dp, Zahnpapille/Pulpa.

3.3.4 Altersgruppe 155-Tage (155T) Kontroll- und 155T-Caps-Tiere

Bei der Gruppe der 155-Kontrolltiere (n=6) ($0,4370 \pm 0,10769$) wurde kein signifikanter Unterschied zur Gruppe der 155T-Caps-Tiere (n=6) ($0,4342 \pm 0,05344$) gefunden, wenn die S100-ir positive Schwann-Zellanzahl zwischen beiden Gruppen verglichen wurde (Abbildungen 11 und 12).

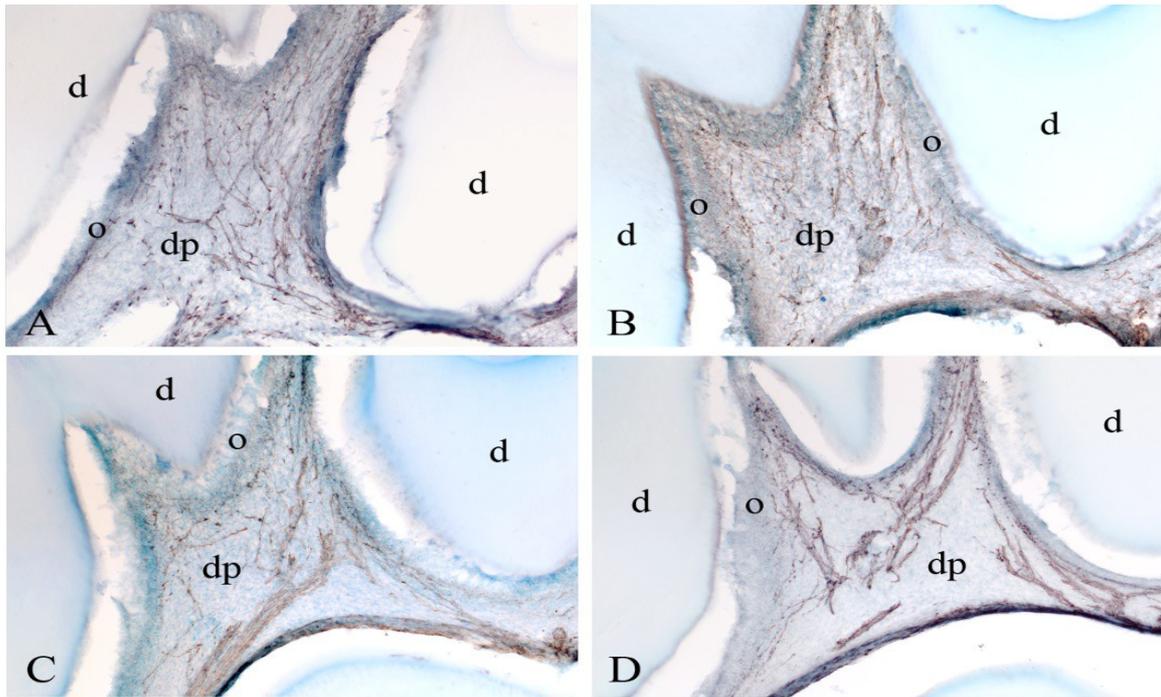


Abb. 11: Repräsentative Mikrofotografien der immunhistochemischen Färbungen mit dem Antikörper gegen S100 bei Tieren der Altersgruppe 155 Tage. A, B: Tiere der Kontrollgruppe; C, D: Tiere der Capsaicin-Gruppe. d, dentin; o, Odontoblastenschicht; dp, Zahnpapille/Pulpa.

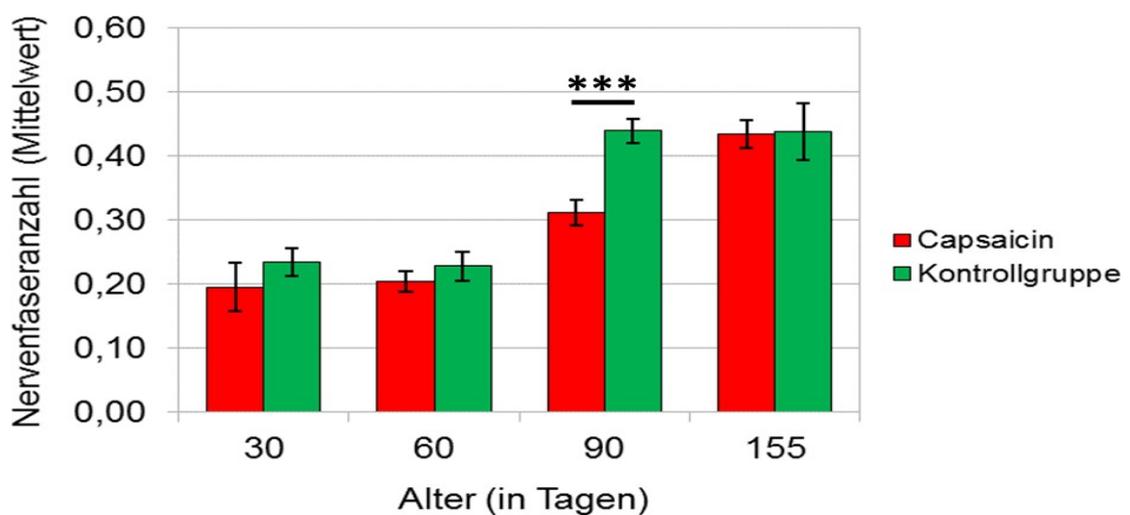


Abb. 12: Statistische Auswertung der mittleren S100-ir positiven Schwann-Zellanzahl in der Capsaicin- und der Kontrollgruppe. *, $p < 0,001$**

4 DISKUSSION

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen auf das Protein S100, eines Markers für Schwann-Zellen, am Rattenmodell zwei Fragestellungen nachzugehen.

Zum einen sollte anhand der immunhistochemischen Färbungen die Anzahl S100-positiver Nervenfasern im zeitlichen Verlauf (zu vier definierten Zeitpunkten) untersucht werden. Damit sollte der zeitliche Verlauf der postnatalen Entwicklung der Schwannschen Zellen in der sich entwickelnden Pulpa dargestellt werden; ein Rückschluss auf den Myelinisierungsgrad gezogen werden, da Schwann Zellen in Begleitung aller Axone (sensorisch, sympathisch und parasymphatisch, myelinisiert, unmyelinisiert) in der dentalen Pulpa vorkommen.

Zum anderen wurde eine Interventionsgruppe einbezogen, der am 3. postnatalen Tag 50mg/kg Körpergewicht Capsaicin in einer sterilen Trägersubstanz subkutan injiziert worden war. Es ist bekannt, dass die systemische Applikation von Capsaicin zu einer numerischen bzw. funktionellen Reduktion sensibler Nervenfasern durch die Depletion der sensiblen Neuropeptide CGRP und Substanz P führen kann. Hier sollte untersucht werden, ob Capsaicin auch einen mittelbaren, oder unmittelbaren Effekt auf die postnatale Entwicklung der Schwann-Zelle in der dentalen Pulpa während der postnatalen Entwicklungszeit haben kann, da die Effekte von Capsaicin auf die Schwann-Zelle völlig unbekannt sind.

4.1 Die regionale Verteilung der Schwann-Zelle während der postnatalen Entwicklung der dentalen Pulpa der Kontrolltiere

Die Nervenfasern der dentalen Pulpa treten über das Foramen apikale in die Wurzelpulpa ein und verteilen sich weiter in der zentralen Pulpa (Byers, 1984). Die dünnen Nervenfaserbündel verzweigen sich in der zentralen Pulpa und bilden unterhalb der Odontoblastenschicht ein Subodontoblastenplexus (Byers, 1984). Von diesem Plexus aus reichen die myelinisierten A-delta und A-beta Fasern in die Odontoblastenschicht, das Prädentin und bis zu 0.2 mm innerhalb der Dentintubuli (Byers, 1984; Byers and Närhi, 1999). Die nicht myelinisierten C Fasern reichen bis zum Prädentin während die autonomen Nervenfasern sich in

der zentralen Pulpa und im Subodontoblastenplexus verteilen (Byers, 1984; Byers and Närhi, 1999). In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass an postnatal 30 Tagen in der dentalen Pulpa die Schwann-Zellen sich noch nicht in einer vergleichbaren Ordnung wie das Nervenfaserverteilungsmuster darstellen. Ab 60 Tage fangen die Schwann-Zellen an, sich in einer Struktur, die mit der zentralen Verteilung der Nervenfasern und der Bildung des subodontoblasten Plexus vergleichbar ist, darzustellen. Die Befunde der vorliegenden Studie zeigen, dass die Schwann-Zellen sich ab postnatal 60 Tagen in einer Ordnung in der zentralen Pulpa verteilen und dann unterhalb der Odontoblastenschicht einen Plexus bilden. Diese Struktur lässt sich am 90. Tag und vor allem am Tag 155 noch intensiver und deutlicher darstellen. Die Befunde der vorliegenden Studie können auf die Annahme hindeuten, dass Axone oder Schwann-Zellen bei der Bildung dieser Verteilungsordnung eine führende Rolle übernehmen.

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass S100-ir positive Schwann-Zellen in den wesentlichen Abschnitten der Pulpa, jedoch nicht im Prädentin und Dentin nachgewiesen werden können. Diese Befunde zeigen, dass die Schwann-Zellen sowohl während der postnatalen Entwicklung als auch in der adulten Phase nicht im Bereich des Prädentins oder Dentins vorkommen. Dies könnte beispielsweise mit dem Stoffwechselbedarf der Schwann-Zelle in der Pulpa erklärt werden, da die Axone ihre Zellkörper in den Ganglien haben, während die Schwann-Zellen mit ihren Zellkörpern in der Pulpa um die Axonen verteilt sind.

4.2 S100-ir positive Fasern im zeitlichen Verlauf in der sich entwickelnden dentalen Pulpa

Um die Anzahl an nozizeptiven Fasern in der sich entwickelnden Zahnpulpa der Ratte zu bestimmen, wurden immunhistochemische Färbungen gegen den Schwann-Zell-Marker S100 zu definierten Zeitpunkten (30, 60, 90 und 155 Tage) angefertigt.

Zum Zeitpunkt 30 Tage ergab sich ein Mittelwert von 0,2335 Nervenfasern pro Eckpunkt, während sich für 60 Tage alte Tiere ein Mittelwert von 0,2277 Nervenfasern pro Eckpunkt ergab. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p > 0.05$).

Der Nachweis von S100-ir positiven Nervenfaserverendigungen in der Zahnpulpa im Rattenmodell deckt sich mit den Ergebnissen von Ichikawa et al. (Ichikawa *et al.*, 1998). Allerdings weisen die Daten von Ichikawa auch darauf hin, dass ein Teil der

Nervenfaserendigungen in der Zahnpulpa unmyelinisiert ist, was zu einer systematisch zu niedrigen Zahl an Nervenfasern durch die von uns gewählte Untersuchungsmethode führen würde. Neuere Ergebnisse von Henry et al. bestätigen allerdings, dass der Großteil der afferenten Fasern in der Zahnpulpa myelinisiert vorliegt (Henry *et al.*, 2012). Zudem handelt es sich hierbei um einen systematischen Fehler, der sich in allen Untergruppen der untersuchten Kohorte (Zeitpunkte und Kontroll- bzw. Interventionsgruppe) reproduzierbar wiederfindet und somit die Aussagekraft der gefundenen Unterschiede nicht wesentlich schmälert. Schließlich zeigen sich auch in Bindung an einen Teil der unmyelinisierten Nervenfasern Schwann-Zellen (NMSCs) (Corfas *et al.*, 2004; Campana, 2007), weshalb diese Nervenzellpopulation zumindest teilweise in der Auswertung mit berücksichtigt werden konnte.

Im Verlauf zu den Zeitpunkten 90 und 155 Tagen zeigte sich dann eine signifikante Zunahme der Nervenfaserdichte (0,4392 und 0,4370; $p < 0.05$) im Vergleich zu den Zeitpunkten 30 und 60 Tage.

Es existieren nur vereinzelte Studien zur Dichte der Nervenfasern in der sich entwickelnden Zahnpulpa; insgesamt scheinen die Nervenfasern zwar im zeitlichen Verlauf an Anzahl und Verzweigungen zuzunehmen (Luthman *et al.*, 1992; Luukko *et al.*, 1996), doch die exakte Dichte der Nervenfasern zu gegebenen Zeitpunkten ist unklar. Dies kann jedoch auch mit der Tatsache zusammenhängen, dass in den wenigen vorliegenden Arbeiten unterschiedliche Quantifizierungen verwendet wurden und insbesondere in älteren Arbeiten ausschließlich morphologische (v.a. elektronenmikroskopische) Techniken zum Einsatz kamen, während in der hier vorliegenden Arbeit ein immunhistochemisches Nachweisverfahren gewählt wurde. Insgesamt bestätigen die hier präsentierten Daten aber somit eine signifikante Zunahme von myelinisierten und unmyelinisierten nozizeptiven Fasern in der sich entwickelnden Zahnpulpa der Ratte im zeitlichen Verlauf, da S100 in allen Schwann-Zellen, die sensible, parasympathische und sympathische Axone umgeben, vorkommt.

4.3 Spezifische und unspezifische Effekte von Capsaicin auf die Axon-Schwann-Zell-Einheit

Um der Frage nachzugehen, inwieweit eine Capsaicin-Desensibilisierung zu einer Abnahme der S100-ir positiven Fasern führt, wurde den Ratten der Läsionsgruppe am 3. postnatalen Tag 50mg/kg Körpergewicht Capsaicin in einer sterilen

Trägersubstanz subkutan injiziert. Die Unterkiefer wurden zu denselben Zeitpunkten wie bei der oben näher beschriebenen Kontrollgruppe präpariert und die Nervenfasern mit dem Antikörper gegen S100 dargestellt.

Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der S100-ir positiven Fasern in der Pulpa der Capsaicin-behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 90 Tage; die Zeitpunkte 30, 60 und 155 Tage zeigten hingegen keinen signifikanten Unterschied. Somit scheint es durch die Gabe von Capsaicin entweder zu einer temporären Reduzierung oder Schädigung von Schwann-Zellen zu kommen. Bisher wurde der Effekt von Capsaicin nur auf Axonen untersucht. Daher ist dieser Befund der vorliegenden Arbeit von grundsätzlicher Bedeutung. Es wurde beschrieben, dass Capsaicin eine systemische neurotoxische Wirkung auf die Nervenfasern haben kann (Holzer *et al.*, 1979; Chung *et al.*, 1990). Es ist möglich, dass neben den Axonen auch die Schwann-Zellen durch die Effekte von Capsaicin betroffen werden können.

Aufgrund der Beobachtungen in der Kontrollgruppe ist es allerdings wahrscheinlicher, dass die hier nachgewiesene, physiologische Zunahme der Schwann-Zellen durch die Capsaicin-Gabe verzögert wird. Es kann angenommen werden, dass die Schwann-Zellen und Axone entweder gleichzeitig, oder einzelselektiv betroffen werden. Sollte die Schädigung (Desensibilisierung) nur selektiv in Axonen vorkommen, könnte das verzögerte postnatale Wachstum von Schwann-Zellen durch die gestörte Interaktionen zwischen Axon und Schwann-Zelle erklärt werden. Da Schwann-Zellen für die Regeneration der Axone von großer Bedeutung sind, ist dieser Befund von klinischer Relevanz.

Es ist bekannt, dass Axone die Entwicklung von Schwann-Zellen während der Entwicklung des peripheren Nervensystems (PNS) regulieren (Jessen und Mirsky, 2002, 2005). Auch bestimmen sie nachfolgenden Phänotyp der Schwann-Zelle (Taveggia *et al.*, 2005). Die mitogenen und trophischen axonalen Signale führen zur Bildung von Schwann-Zellen, die entweder nicht-myelinisierte oder myelinisierte peripheren Axone umhüllen (Nave und Salzer, 2006). Es wurde beschrieben, dass die Differenzierung von Gliazellen überwiegend postnatal reguliert wird (Nave, 2010). Daher treten klinisch relevante Störungen bei demyelinisierenden Erkrankungen in der Adoleszenz und im Erwachsenenalter auf (Nave, 2010). Diese Ergebnisse zeigten, dass Reize, die die Interaktionen zwischen Schwann-Zellen und Axon beeinflussen, die postnatale Entwicklung von

myelinisierten und nicht-myelinisierten Schwann-Zellen beeinflussen können. Da Capsaicin auf die Axone eine starke Desensibilisierung durch die erhöhte Ausschüttung der Neuropeptide (CGRP, Substanz P) auslösen kann, ist zu erwarten, dass die Interaktionen zwischen Axon und Schwann-Zelle während der postnatalen Entwicklung gestört ist. Während in der Kontrollgruppe eine physiologische Interaktion zwischen Axon und Schwann-Zelle zu einer kontinuierlichen Entwicklung der Schwann-Zelle führt, ist es erklärbar, dass durch eine gestörte Interaktion zwischen Axon und Schwann-Zelle es zu einer verzögerten Entwicklung der Schwann-Zelle in der Rattenpulpa kommen kann.

TRPV1 ist ein nicht-selektiver Kationenkanal Rezeptor, der in primär sensorischen Axonen exprimiert wird. Capsaicin kann seine Wirkung über die Aktivierung von TRPV1 in einem Axon (oder Neuron) entfalten. Bisher wurde eine Lokalisation von TRPV1 in der Schwann-Zelle nicht dargestellt. Daher sind neue Studien nötig, zu klären, ob TRPV1 in Schwann-Zellen exprimiert wird. Sollte TRPV1 in Schwann-Zellen nicht vorkommen, ist es mit großer Wahrscheinlichkeit möglich, dass die verzögerte postnatale Entwicklung der Schwann-Zelle durch die gestörte Interaktion zwischen Axon und Schwann-Zelle über die erhöhte Aktivität von TRPV1 in Axonen reguliert werden kann.

Da ab Tag 90 sich die Quantität der Nervenfasern und der Schwann-Zelle annähern, zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass die einmalige systemische Verabreichung von Capsaicin am 3. Tag der postnatalen Entwicklung bis zum 90. Tag Zeit-abhängig einen reversiblen Effekt auf die Entwicklung der Schwann-Zelle hat. Ab dem 90. Tag bis zu Tag 155 zeigen sich die Schwann-Zellen wieder in physiologischer Häufigkeit. Dies zeigt, dass die systemische Capsaicin-Gabe am 3. postnatalen Tag reversibel wirkt. Diese Befunde deuten auf einen Zeit- und Dosis-abhängigen Effekt von Capsaicin auf die postnatale Entwicklung der Schwann-Zelle in der Rattenpulpa hin.

Wenn Schwann-Zellen selektiv von Capsaicin betroffen werden, sollte die Frage geklärt werden, ob Capsaicin seine Wirkung auf die Schwann-Zelle über seinen Rezeptor TRPV1 entfalten kann. Da bislang nicht bekannt ist, ob Schwann-Zellen den TRPV1-Rezeptor besitzen, könnte die Differenzierungsverzögerung auch sekundär durch Degeneration oder Rückzug der begleiteten Axonen (durch die gestörte Interaktionen zwischen Axonen und Schwann Zelle) induziert werden. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Zahl der Nervenfasern zu

keinem Zeitpunkt signifikant unter die Zahl der in der Kontrollgruppe beobachteten Fasern sinkt. Zudem ist, wie bereits eingangs beschrieben, ein Capsaicin-bedingter Nervenfasernuntergang nur bis zu 25% reversibel (Reilly *et al.*, 1997; Simone *et al.*, 1998). Schließlich ist darauf hinzuweisen, dass sich auch möglicherweise lediglich das Verhältnis von myelinisierten zu unmyelinisierten Nervenfasern ändern könnte, da Lawson bereits 1986 ein unterschiedliches Ansprechen dieser neuronalen Populationen auf die systemische Capsaicin-gabe beschrieb (Reduktion unmyelinisierter Fasern um 89% und myelinisierter Fasern um 36%) (Lawson, 1986). Daher sollte auch geklärt werden, ob die verzögerte Entwicklung der Schwann-Zelle myeliniserten oder nicht-myeliniserten oder beiden Fasern zugeordnet werden kann. Um hingegen direkte Effekte von Capsaicin auf die Schwann-Zelle nachzuweisen, wäre es erforderlich, die Expression des TRPV1-Rezeptors auf den Schwann-Zellen beispielsweise mittels Immunhistochemie nachzuweisen.

Eine Verzögerung des Nervenfasernwachstums durch Capsaicin könnte durch eine Modulation des neuronalen Ansprechens auf NGF erklärt werden, die bereits experimentell nachgewiesen wurde (Winter *et al.*, 1988; Aguayo und White, 1992; Shu und Mendell, 1999). Denkbar ist eine Verringerung der auto- oder parakrinen Sekretion oder eine Modulation der Empfindlichkeit, beispielsweise über Expressionsänderungen des NGF-Rezeptors (NGFR). Hierfür scheint auch das Vorhandensein eines entzündlichen Milieus in der Umgebung der Nervenfasern entscheidend zu sein (Nicholas *et al.*, 1999). Alternativ wäre auch ein Signalweg über BDNF vorstellbar, wie er (unabhängig von NGF) für die Capsaicin-Sensitivität vasovagaler Ganglienzellen gezeigt werden konnte (Winter, 1998).

4.4 Schlussfolgerung

Wir konnten in der vorliegenden Dissertationsschrift zeigen, dass es während der Pulpaentwicklung des Rattenzahns zu einer signifikanten Zunahme der S100-ir positiven Schwann Zellen kommt. Die Verteilung der S100-ir positiven Fasern ist mit der klassischen Verteilung der Axone in der Dentin-Pulpa-Einheit vergleichbar. Im Vergleich zu den Axonen werden im Prädentin und Dentin keine S100-ir positiven Fasern detektiert. In der vorliegenden Studie wurde weiterhin dargestellt, dass die systemische Capsaicin-gabe am 3. postnatalen Tag die Zahl der S100-ir

positiven Fasern temporär (30 und 60 Tage) verringert, sich dieser Effekt im Langzeitverlauf aber wieder aufhebt.

Am wahrscheinlichsten erscheint demnach ein Modell, bei dem die systemische Capsaicin-Gabe die physiologische Vermehrung von Nervenzellen während der postnatalen Entwicklung der Pulpa im Zeitraum bis zu 90 Tagen hemmt, diese Verzögerung aber nachfolgend bis zum 155. Tag kompensiert wird. Die exakten molekularen Grundlagen dieser Wachstumsverzögerung sind unklar, allerdings wäre eine Hemmung der Ausschüttung von und/oder Empfindlichkeit für neurotrophe Wachstumsfaktoren denkbar. Die Befunde der vorliegenden Studie deuten daher auf einen Zeit- und Dosis-abhängigen Effekt von Capsaicin auf die postnatale Entwicklung der Schwann-Zelle in der dentalen Rattenpulpa hin. Es ist möglich, dass die verzögerte postnatale Entwicklung durch Interaktionen zwischen Axon (über TRPV1-Rezeptor in Axonen) und Schwann-Zelle induziert wird. Da die Schwann-Zellen für die Regeneration der Axone von grundsätzlicher Bedeutung sind, sind die Befunde der vorliegenden Studie von wichtiger klinischer Bedeutung, um die Regeneration der Axone unter Läsionsbedingungen pharmakologisch beeinflussen zu können.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- Aguayo, L. G. und White, G. (1992). **Effects of nerve growth factor on TTX-and capsaicin-sensitivity in adult rat sensory neurons.** Brain research 570, 61-67.
- Beitel, R. und Dubner, R. (1976). **Response of unmyelinated (C) polymodal nociceptors to thermal stimuli applied to monkey's face.** Journal of Neurophysiology 39, 1160-1175.
- Bergmann, N. (2009) **Immunolokalisation von Neuropeptid Y in der dentalen Pulpa unterschiedlicher Altersklassen nach neonataler, systemischer Capsaicin-Applikation.** Dissertation, Universität Düsseldorf.
- Bhattacharya, S., Large, E., Heizmann, C. W., Hemmings, B. A. und Chazin, W. J. (2003). **Structure of the Ca²⁺/S100B/NDR kinase peptide complex: insights into S100 target specificity and activation of the kinase.** Biochemistry 42, 14416-14426.
- Bombardi, C., Chiocchetti, R., Brunetti, O., Grandis, A., Lucchi, M. und Bortolami, R. (2006). **Central distribution of nociceptive intradental afferent nerve fibers in the rat.** Tissue and Cell 38, 251-255.
- Byers, M. R., Suzuki, H. und Maeda, T. (2003). **Dental neuroplasticity, neuro-pulpal interactions, and nerve regeneration.** Microscopy research and technique 60, 503-515.
- Campana, W. M. (2007). **Schwann cells: activated peripheral glia and their role in neuropathic pain.** Brain, behavior, and immunity 21, 522-527.
- Carda, C. und Peydro, A. (2006). **Ultrastructural patterns of human dentinal tubules, odontoblasts processes and nerve fibres.** Tissue and Cell 38, 141-150.
- Chung, K., Klein, C. und Coggeshall, R. (1990). **The receptive part of the primary afferent axon is most vulnerable to systemic capsaicin in adult rats.** Brain research 511, 222-226.
- Corfas, G., Velardez, M. O., Ko, C.-P., Ratner, N. und Peles, E. (2004). **Mechanisms and roles of axon-Schwann cell interactions.** Journal of Neuroscience 24, 9250-9260.
- Donato, R. (2001). **S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles.** The international journal of biochemistry & cell biology 33, 637-668.
- Douglas, W. und Ritchie, J. (1962). **Mammalian nonmyelinated nerve fibers.** Physiological reviews 42, 297-334.

- Dubner, R. (1985). **Specialization in nociceptive pathways: sensory discrimination, sensory modulation, and neural connectivity.** *Advances in pain research and therapy* 9, 111-137.
- Dubner, R. und Bennett, G. J. (1983). **Spinal and trigeminal mechanisms of nociception.** *Annual review of neuroscience* 6, 381-418.
- Fattori, V., Hohmann, M. S., Rossaneis, A. C., Pinho-Ribeiro, F. A. und Verri, W. A. (2016). **Capsaicin: current understanding of its mechanisms and therapy of pain and other pre-clinical and clinical uses.** *Molecules* 21, 844.
- Fried, K., Lillesaar, C., Sime, W., Kaukua, N. und Patarroyo, M. (2007). **Target finding of pain nerve fibers: neural growth mechanisms in the tooth pulp.** *Physiology & behavior* 92, 40-45.
- Fried, K., Nosrat, C., Lillesaar, C. und Hildebrand, C. (2000). **Molecular signaling and pulpal nerve development.** *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 11, 318-332.
- Gaunt, W. (1959). **The vascular supply to the dental lamina during early development.** *Cells Tissues Organs* 37, 232-252.
- Grigoriou, M., Tucker, A. S., Sharpe, P. T. und Pachnis, V. (1998). **Expression and regulation of Lhx6 and Lhx7, a novel subfamily of LIM homeodomain encoding genes, suggests a role in mammalian head development.** *Development* 125, 2063-2074.
- Hahner, S. (2012) **Neuronale Veränderungen im Pulpa-Dentin-Komplex nach neonataler Desensibilisierung durch systemische Capsaicinapplikation.**
- Hardcastle, Z., Mo, R., Hui, C. und Sharpe, P. T. (1998). **The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants.** *DEVELOPMENT-CAMBRIDGE-* 125, 2803-2811.
- Henry, M. A., Luo, S. und Levinson, S. R. (2012). **Unmyelinated nerve fibers in the human dental pulp express markers for myelinated fibers and show sodium channel accumulations.** *BMC Neurosci* 13, 29, doi: 10.1186/1471-2202-13-29.
- Holzer, P., Jurna, I., Gamse, R. und Lembeck, F. (1979). **Nociceptive threshold after neonatal capsaicin treatment.** *European journal of pharmacology* 58, 511-514.
- Hsu, S.-M., Raine, L. und Fanger, H. (1981). **Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.** *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 29, 577-580.

- Huck, S. W., Cormier, W. H. und Bounds, W. G. (1974). **Reading statistics and research**, Harper & Row New York.
- Ichikawa, H., He, Y. F. und Sugimoto, T. (1998). **S100 protein-immunoreactive trigeminal neurons innervating the rat molar tooth pulp**. Somatosens Mot Res 15, 128-133.
- Ingersoll, R. V., Bullard, T. F., Ford, R. L., Grimm, J. P., Pickle, J. D. und Sares, S. W. (1984). **The effect of grain size on detrital modes: a test of the Gazzi-Dickinson point-counting method**. Journal of Sedimentary Research 54, 103-116.
- Inman, K. G., Yang, R., Rustandi, R. R., Miller, K. E., Baldisseri, D. M. und Weber, D. J. (2002). **Solution NMR structure of S100B bound to the high-affinity target peptide TRTK-12**. Journal of molecular biology 324, 1003-1014.
- Jancso, G., Király, E., Joo, F., Such, G. und Nagy, A. (1985). **Selective degeneration by capsaicin of a subpopulation of primary sensory neurons in the adult rat**. Neuroscience letters 59, 209-214.
- Jancso, G. und Lawson, S. (1990). **Transganglionic degeneration of capsaicin-sensitive C-fiber primary afferent terminals**. Neuroscience 39, 501-511.
- Jernvall, J. und Thesleff, I. (2000). **Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis**. Mechanisms of development 92, 19-29.
- Jessen, K. R. und Mirsky, R. (1999). **Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development**. Trends in neurosciences 22, 402-410.
- Jessen, K. R. und Mirsky, R. (2005). **The origin and development of glial cells in peripheral nerves**. Nature Reviews Neuroscience 6, 671-682.
- Ji, Y.-F., Huang, H., Jiang, F., Ni, R.-Z. und Xiao, M.-B. (2014). **S100 family signaling network and related proteins in pancreatic cancer (Review)**. International journal of molecular medicine 33, 769-776.
- Johnsen, D., Harshbarger, J. und Rymer, H. (1983). **Quantitative assessment of neural development in human premolars**. The anatomical record 205, 421-429.
- Kaddu, S. und Kokol, R. (2016). **Nerventumoren der Haut**. In: Histopathologie der Haut, Springer, S. 797-813.
- Kassai, Y., Munne, P., Hotta, Y., Penttilä, E., Kavanagh, K., Ohbayashi, N., Takada, S., Thesleff, I., Jernvall, J. und Itoh, N. (2005). **Regulation of mammalian tooth cusp patterning by ectodin**. Science 309, 2067-2070.

- Kennedy, W. R., Wendelschafer-Crabb, G. und Johnson, T. (1996). **Quantitation of epidermal nerves in diabetic neuropathy**. *Neurology* 47, 1042-1048.
- Korkmaz, Y., Bloch, W., Klinz, F.-J., Kübler, A. C., Schneider, K., Zimmer, S., Addicks, K. und Raab, W. H.-M. (2009). **The constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 in periodontal ligament nerve fibers**. *Journal of periodontology* 80, 850-859.
- Korkmaz, Y., Bloch, W., Schneider, K., Zimmer, S., Addicks, K. und Raab, W.-M. (2008). **Time-dependent activation of ERK1/2 in nerve terminals of the dentin-pulp complex following bradykinin treatment**. *Journal of dental research* 87, 1149-1154.
- Korkmaz, Y., Lang, H., Beikler, T., Cho, B., Behrends, S., Bloch, W., Addicks, K. und Raab, W.-M. (2011). **Irreversible inflammation is associated with decreased levels of the α 1-, β 1-, and α 2-subunits of sGC in human odontoblasts**. *Journal of dental research* 90, 517-522.
- Lawson, S. (1986). **The morphological consequences of neonatal treatment with capsaicin on primary afferent neurones in adult rats**. *Acta physiologica Hungarica* 69, 315-321.
- Luthman, J., Luthman, D. und Hökfelt, T. (1992). **Occurrence and distribution of different neurochemical markers in the human dental pulp**. *Archives of oral biology* 37, 193-208.
- Luukko, K., Moshnyakov, M., Sainio, K., Saarma, M., Sariola, H. und Thesleff, I. (1996). **Expression of neurotrophin receptors during rat tooth development is developmentally regulated, independent of innervation, and suggests functions in the regulation of morphogenesis and innervation**. *Developmental dynamics* 206, 87-99.
- Marenholz, I., Heizmann, C. W. und Fritz, G. (2004). **S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature)**. *Biochemical and biophysical research communications* 322, 1111-1122.
- Mata, M., Alessi, D. und Fink, D. J. (1990). **S100 is preferentially distributed in myelin-forming Schwann cells**. *Journal of neurocytology* 19, 432-442.
- Matthiessen, M. (1963). **Histochemical studies of the prenatal development of human deciduous teeth**. *Cells Tissues Organs* 55, 201-223.
- McCarthy, B., Hsieh, S.-T., Stocks, A., Hauer, P., Macko, C., Cornblath, D., Griffin, J. und McArthur, J. (1995). **Cutaneous innervation in sensory neuropathies evaluation by skin biopsy**. *Neurology* 45, 1848-1855.
- McLachlan, J. L., Sloan, A. J., Smith, A. J., Landini, G. und Cooper, P. R. (2004). **S100 and cytokine expression in caries**. *Infect Immun* 72, 4102-4108, doi: 10.1128/iai.72.7.4102-4108.2004.

- Meier, C., Parmantier, E., Brennan, A., Mirsky, R. und Jessen, K. R. (1999). **Developing Schwann cells acquire the ability to survive without axons by establishing an autocrine circuit involving insulin-like growth factor, neurotrophin-3, and platelet-derived growth factor-BB.** *Journal of Neuroscience* 19, 3847-3859.
- Miwa, Y., Fujita, T., Sunohara, M. und Sato, I. (2008). **Immunocytochemical localization of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 of the human deciduous molar tooth germ development in the human fetus.** *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger* 190, 246-251.
- Nagy, I., Friston, D., Valente, J. S., Perez, J. V. T. und Andreou, A. P. (2014). **Pharmacology of the capsaicin receptor, transient receptor potential vanilloid type-1 ion channel.** In: *Capsaicin as a Therapeutic Molecule*, Springer, S. 39-76.
- Nicholas, R., Winter, J., Wren, P., Bergmann, R. und Woolf, C. (1999). **Peripheral inflammation increases the capsaicin sensitivity of dorsal root ganglion neurons in a nerve growth factor-dependent manner.** *Neuroscience* 91, 1425-1433.
- Nosrat, C. A., Fried, K., Ebendal, T. und Olson, L. (1998). **NGF, BDNF, NT3, NT4 and GDNF in tooth development.** *European journal of oral sciences* 106, 94-99.
- Nosrat, I. V., Widenfalk, J., Olson, L. und Nosrat, C. A. (2001). **Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury.** *Developmental biology* 238, 120-132.
- Rakhshan, V. (2013). **Meta-analysis and systematic review of factors biasing the observed prevalence of congenitally missing teeth in permanent dentition excluding third molars.** *Progress in orthodontics* 14, 33.
- Reilly, D., Ferdinando, D., Johnston, C., Shaw, C., Buchanan, K. und Green, M. (1997). **The epidermal nerve fibre network: characterization of nerve fibres in human skin by confocal microscopy and assessment of racial variations.** *British Journal of Dermatology* 137, 163-170.
- Rust, R. R., Baldisseri, D. M. und Weber, D. J. (2000). **Structure of the negative regulatory domain of p53 bound to S100B ($\beta\beta$).** *Nature Structural & Molecular Biology* 7, 570-574.
- Sarkar, L., Cobourne, M., Naylor, S., Smalley, M., Dale, T. und Sharpe, P. T. (2000). **Wnt/Shh interactions regulate ectodermal boundary formation during mammalian tooth development.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 4520-4524.
- Schwann, T. (1839). **Mikroskopische Untersuchungen.** Reimer, Berlin, S, 220-257.

- Sessle, B. (1987). **Invited review: the neurobiology of facial and dental pain: present knowledge, future directions.** *Journal of Dental Research* 66, 962-981.
- Shu, X. und Mendell, L. M. (1999). **Nerve growth factor acutely sensitizes the response of adult rat sensory neurons to capsaicin.** *Neuroscience letters* 274, 159-162.
- Simone, D. A., Nolano, M., Johnson, T., Wendelschafer-Crabb, G. und Kennedy, W. R. (1998). **Intradermal injection of capsaicin in humans produces degeneration and subsequent reinnervation of epidermal nerve fibers: correlation with sensory function.** *Journal of Neuroscience* 18, 8947-8959.
- Stefanini, M., De Martino, C. und Zamboni, L. (1967). **Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy.** *Nature* 216, 173-174.
- Ten Cate, A., Sharpe, P., Roy, S. und Nanci, A. (2003). **Development of the tooth and its supporting tissues.** *Ten Cate's oral histology: development, structure, and function.* 6th ed. St. Louis: Mosby, 105-109.
- Thesleff, I. und Mikkola, M. (2002). **The role of growth factors in tooth development.** *International review of cytology* 217, 93-135.
- Tucker, A. und Sharpe, P. (1999). **Molecular genetics of tooth morphogenesis and patterning: the right shape in the right place.** *Journal of Dental Research* 78, 826-834.
- Wagner, R. und Myers, R. R. (1996). **Endoneurial injection of TNF-[alpha] produces neuropathic pain behaviors.** *Neuroreport* 7, 2897-2902.
- Weibel, E. R., Kistler, G. S. und Scherle, W. F. (1966). **Practical stereological methods for morphometric cytology.** *The Journal of cell biology* 30, 23.
- Winter, J. (1998). **Brain derived neurotrophic factor, but not nerve growth factor, regulates capsaicin sensitivity of rat vagal ganglion neurones.** *Neuroscience letters* 241, 21-24.
- Winter, J., Forbes, C. A., Sternberg, J. und Lindsay, R. M. (1988). **Nerve growth factor (NGF) regulates adult rat cultured dorsal root ganglion neuron responses to the excitotoxin capsaicin.** *Neuron* 1, 973-981.

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab, Direktor der Abteilung für Zahnerhaltung, Parodontologie und Endodontologie, danke ich für die Überlassung des Themas. Er stand mir mit seiner Expertise stets zur Seite.

Herrn Dr. Yüksel Korkmaz bin ich dankbar für seine wertvollen Ratschläge und seine Betreuung über die gesamte Dauer der Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere Jan und meinen Eltern, und meinen Freunden, die mich während meiner Promotion unterstützt und motiviert haben. Ich danke Ihnen für Ihre liebevolle Begleitung und Ihr fortwährendes Interesse an meiner Arbeit.

Ihre Zeit und Ihr Rat sind mit in diese Dissertation eingeflossen.

Ihnen allen widme ich diese Arbeit.