

Aus der Poliklinik für Parodontologie und Zahnerhaltung  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Die Expression der Stammzellmarker CD90 und CD34 in Zellen  
der gesunden und entzündeten humanen dentalen Pulpa**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Zahnmedizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Judith Franziska Schultheis  
aus Mainz

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand (komm.): Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1.Gutachter:

2.Gutachter:

Tag der Promotion: 26. März 2025

*„Für meine Familie, für die Liebe, die Förderung und die Lehre. Und für meine Freunde, für die Unterstützung und Abwechslung.*

*Ihr gabt mir die Flügel, um zu fliegen. Ich danke Euch!“*

# Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis.....	6
2	Abbildungsverzeichnis.....	9
3	Tabellenverzeichnis.....	11
4	Einleitung/Ziel der Dissertation.....	12
5	Literaturdiskussion.....	13
5.1	Zellen der Dentin-Pulpa-Einheit.....	13
5.1.1	<b>Odontoblasten und die Bildung der verschiedenen Dentinarten</b> .....	14
5.1.2	<b>Fibroblasten</b> .....	15
5.1.3	<b>Blutgefäße: Vasodilatation und –konstriktion, Gefäßpermeabilität, Perizyten</b> .....	16
5.1.4	<b>Nervenfasern: Innervation, Neurotransmission, Schmerz und neurovaskuläre Regulation</b> .....	16
5.1.5	<b>Immunzellen und Entzündungsformen der Dentin-Pulpa-Einheit bei kariösen Läsionen</b> .....	18
5.2	Einteilung kariöser Läsionen am Dentin.....	19
5.2.1	<b>Schmelzkaries</b> .....	19
5.2.2	<b>Initiale Dentinkaries</b> .....	19
5.2.3	<b>Dentinkaries</b> .....	20
5.2.4	<b>Tiefe Dentinkaries</b> .....	20
5.2.5	<b>Infektion der nekrotischen dentalen Pulpa</b> .....	21
5.3	Pulpale Stammzellen.....	21
5.3.1	<b>Pulpale ektomesenchymale Stammzellen</b> .....	22
5.3.2	<b>Pulpale Perizyten</b> .....	22
5.3.3	<b>Mesenchymale Stammzellen im Endoneurium</b> .....	23
5.4	Stammzellmarker CD90 und CD34.....	23
5.4.1	<b>CD90</b> .....	23
5.4.2	<b>CD34</b> .....	24
5.5	Fragestellung und Ziel der Studie.....	25
6	Material und Methoden.....	27
6.1	Ethische Betrachtung der Studie, Patientenkollektiv.....	27
6.2	Verwendete Materialien, Reagenzien, Antikörper und angesetzte Lösungen.....	27
6.2.1	<b>Angesetzte Lösungen</b> .....	27
6.3	Methoden.....	29
6.3.1	<b>Ansetzen der Lösungen zur Vorbereitung der gesammelten Zähne</b> .....	29
6.3.2	<b>Sammlung der Zähne</b> .....	29
6.3.3	<b>Herstellung der Schnitte</b> .....	30
6.3.4	<b>Hämatoxylin-Eosin-Färbung</b> .....	31
6.3.5	<b>Spezifität der Antikörper</b> .....	32
6.3.6	<b>Methoden der Immunhistochemie</b> .....	32
6.3.7	<b>Quantifizierung der Resultate und Statistik</b> .....	35
7	Ergebnisse.....	39

7.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung und histopathologische Diagnose .....	39
7.1.1	<b>Histopathologische Diagnose der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit .....</b>	<b>39</b>
7.1.2	<b>Histopathologische Diagnose der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit .....</b>	<b>41</b>
8	Ergebnisse der ABC-Methode.....	43
8.1	Expressionsmuster und Lokalisation in Zellen der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit ...	43
8.2	Expressionsmuster und Lokalisation in Zellen der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit	47
8.3	Densitometrische Auswertung der CD90- und CD34-positiven Zellen.....	53
8.4	Statistische Analyse.....	53
8.4.1	<b>Statistische Analyse der Intensität der Blutgefäßfärbungen .....</b>	<b>53</b>
8.4.2	<b>Statistische Analyse der Intensität der Perizytenfärbungen.....</b>	<b>54</b>
9	Diskussion .....	56
9.1	Interpretation der Ergebnisse der ABC-Methode .....	56
9.1.1	<b>CD90 und CD34 in Zellen der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit.....</b>	<b>56</b>
9.1.2	<b>CD90 und CD34 in Zellen der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit.....</b>	<b>58</b>
9.1.3	<b>Schlussfolgerungen der Ergebnisse und klinische Relevanz .....</b>	<b>61</b>
9.2	Limitationen der Studie .....	61
10	Zusammenfassung.....	62
11	Literaturverzeichnis .....	63
12	Anhang .....	70
13	Danksagung.....	77
14	Tabellarischer Lebenslauf .....	78

# 1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
%ig	Prozentig
°C	Grad Celsius
ABC-Methode	Engl. Avidin Biotin Complex Method/Avidin-Biotin-Complex-Methode
ANOVA	Engl. Analysis of Variance/Varianzanalyse
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BSA	Bovine Serum Albumin
CD34	Cluster of Differentiation 34
DAB	Diaminobenzidin
DC	Dendritic Cells/ Dendritische Zellen
df	Anzahl der Freiheitsgrade
DK	Dentinkaries
do	Degenerierte Odontoblasten
DMP	Dentinmatrixprotein
DSP	Dentin-Sialoprotein
DPP	Dentin-Phosphoprotein
EZMP	Extrazelluläre Matrixproteine
F	F-Statistik (Verhältnis der Varianzen)
g	Gramm
GDF-15	Growth Differentiation Factor 15
g/l	Gramm pro Liter
h	Stunden
H&E-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure/Chlorwasserstoffsäure
iDK	Initiale Dentinkaries
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
iTreg	Regulatorische T-Helferzelle
KFO	Kieferorthopädie

L	Liter
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
ml	Milliliter
ml/l	Milliliter pro Liter
N	Normal
n	Größe der Stichprobe
M	Molar
MHC	Majorhistocompatibilitycomplex
NaOH	Natriumhydroxid
NGF	Nerve Growth Factor
NGS	Normal Goat Serum
NK	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
o	Odontoblasten
OD	Odontoblasendegeneration
p	Wahrscheinlichkeit, dass die Nullhypothese stimmt
pAK	Primärer Antikörper
PAMPS	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphatpuffer-Natriumchlorid
dp	Dentale Pulpa
pd/pD	Primäres Dentin
PFA	Paraformaldehyd
pH	Lat. pondus hydrogenii/Potential des Wasserstoffs
PRRs	Pattern-Recognition Receptors
rER	Raues Endoplasmatisches Retikulum
rpTD	Reparatives Tertiärdentin
RT	Raumtemperatur
rTD	Reaktives Tertiärdentin
RT-PCR Analyse	Real-Time Polymerase Chain Reaction
S100 $\beta$	Calcium-Binding Protein Beta
sAK	Sekundärer Antikörper
sd/sD	Sekundäres Dentin
t	Teststatistik

TB	Trispuffer
TBS	Trispuffer-NaCL
tD	Tertiäres Dentin
tDK	Tiefe Dentinkaries
Th	T-Helferzelle
Thy1/CD90	Thy-1-Membran-Glykoprotein/Cluster of Differentiation 90
TGF-Beta	Transforming Growth Factor-Beta
Tol-DCs	Tolerogene DC
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cell (glatte Muskelzelle von Gefäßen)
zaz	Zellarme Zone
zrz	Zellreiche Zone
µl	Mikroliter

## 2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Dentin-Pulpa-Einheit.....	13
Abbildung 2: Histologischer Aufbau der Dentin-Pulpa-Grenze.....	14
Abbildung 3: Bindegewebshüllen eines peripheren Nerven.....	17
Abbildung 4: Schema: Histologie der Dentinkaries.....	20
Abbildung 5: Lokalisation der Perizyten.....	22
Abbildung 6: Schematische Darstellung der ABC-Methode.....	33
Abbildung 7: Schaubild zur densitometrischen Analyse der Blutgefäßfärbung.....	36
Abbildung 8: Schaubild zur densitometrischen Analyse der Perizytenfärbung.....	37
Abbildung 9: Histologie der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit mit Hämatoxilin-Eosin- Färbung.....	40
Abbildung 10: Histopathologie der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit mit Hämatoxilin-Eosin-Färbung.....	42
Abbildung 11: Histopathologie der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit mit Hämatoxilin-Eosin-Färbung.....	42
Abbildung 12: Histologie der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit.....	43
Abbildung 13: Histologie der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit. Immunhistochemische Färbung mit CD90.....	44
Abbildung 14: Histologie der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit. Immunhistochemische Färbung mit CD34.....	45
Abbildung 15: Histologie der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit. Immunhistochemische Färbung mit CD90 (A) und CD34 (B).....	46
Abbildung 16: Histologie der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit. Immunhistochemische Färbung mit CD90 (A) und CD34 (B).....	46
Abbildung 17: Histologie der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit. Kontrollschnitt.....	47
Abbildung 18: Histologie der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit bei iDK.....	47
Abbildung 19: Histologie der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit bei iDK.....	48
Abbildung 20: Histologie der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit bei iDK. Immunhistochemische Färbung mit CD90.....	49
Abbildung 21: Histologie der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit bei iDK. Immunhistochemische Färbung mit CD90.....	50
Abbildung 22: Histologie der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit bei iDK. Immunhistochemische Färbung mit CD34.....	51
Abbildung 23: Histologie der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit bei iDK. Immunhistochemische Färbung mit CD34.....	51
Abbildung 24: Histologie der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit bei iDK. Immunhistochemische Färbung mit CD90 (A) und CD34 (B).....	52

Abbildung 25: Histologie der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit bei iDK. Immunhistochemische Färbung mit CD90 (A) und CD34 (B).....	52
Abbildung 26: Histologie der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit bei iDK. Kontrollschnitt.....	53
Abbildung 27: Blutgefäßfärbung: Statistische Analyse der Färbungsintensitäten für die Proteine CD34 und CD90 im gesunden und entzündeten (kariösen) Zahn.....	54
Abbildung 28: Perizytenfärbung: Statistische Analyse der Färbungsintensitäten für die Proteine CD34 und CD90 im gesunden und entzündeten (kariösen) Zahn.....	55
Abbildung 29: Klinischer Dokumentationsbogen vor der Zahnextraktion.....	73

### 3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Angewandte Konzentrationen bei der Inkubation mit den primären und sekundären Antikörpern.....	33
Tabelle 2:	Einteilung der Odontoblastendegeneration, modifiziert nach Chlopek (2018).....	40, 41
Tabelle 3:	Verwendete Puffer und Lösungen.....	70, 71
Tabelle 4:	Verwendete gebrauchsfertige Lösungen.....	71
Tabelle 5:	Verwendete Chemikalien.....	72
Tabelle 6:	Verwendete Antikörper bei der ABC-Methode.....	72
Tabelle 7:	Verwendeter sekundärer Antikörper bei der ABC-Methode.....	73
Tabelle 8:	Grauwerte des Hintergrundes und die Färbungsintensität der Blutgefäße.....	74
Tabelle 9:	Mittelwerte.....	74
Tabelle 10:	Subtraktion der Färbungsintensitäten der Blutgefäße von den Grauwerten des Hintergrundes.....	75
Tabelle 11:	Grauwerte des Hintergrundes und die Färbungsintensität der Perizyten.....	75
Tabelle 12:	Mittelwerte.....	76
Tabelle 13:	Subtraktion der Färbungsintensitäten der Perizyten von den Grauwerten des Hintergrundes.....	76

## 4 Einleitung/Ziel der Dissertation

Ein gesunder Zahn ist nach außen durch seinen harten Schutzwall, den Schmelz, gegen Noxen, chemische Substanzen sowie physikalische Einwirkungen geschützt. Nach innen schließt sich das Dentin, auch das „Zahnbein“ genannt, an und umhüllt die für den Zahn lebenswichtige Pulpa mit ihren Blutgefäßen, Nerven und unterschiedlichen Zellarten. Das Dentin und die Pulpa sollten gemeinsam als funktionelle Einheit angesehen werden, da sie im Hinblick auf die Zahnentwicklung, die Zahnerhaltung und Reparatur aufeinander angewiesen sind (Bjørndal et al., 2019). Über kleine Kanälchen im Dentin, können Pulpa und Dentin miteinander kommunizieren (Bjørndal et al., 2019). Odontoblasten, die Dentin bildenden Zellen, reichen mit ihren Fortsätzen in die Kanälchen (Bjørndal et al., 2019). Die Zellkörper der Odontoblasten befinden sich hauptsächlich am Randsaum der Grenze des Dentins zur Pulpa und können über verschiedene Moleküle Informationen aneinander weiterleiten.

Die Dentin-Pulpa-Einheit besteht aus vielen unterschiedlichen Zellarten, welche in einem komplexen Kommunikationsaustausch zueinanderstehen. Jede Zelle besetzt eine spezifische Nische im Hinblick auf ihre Aufgabe, Funktion, Informationsverarbeitung und -weiterleitung. Gerät dieses sensible physiologische Spiel, aufgrund von destruktiven, kariösen Vorgängen am Schmelz und im Dentin aus dem Gleichgewicht, kann dies zum Untergang der Pulpa und somit zum Verlust der Innervation und Ernährung der Zellen des Zahnes führen.

Therapeutisch kann der Zahnarzt heutzutage bei kleinen Defekten über Füllungstherapien und Überkronungen eingreifen. Bei größeren Defekten, mit Beteiligung der Pulpa (irreversible Pulpitis), ist jedoch der Weg der Exstirpation, der Entfernung der Pulpa, und die Wurzelkanalfüllung eine standardisierte Therapieoption.

Die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien, die den Erhalt der Pulpa auch bei tiefer Dentinkaries durch medikamentös induzierte und verstärkte Selbstheilungsvorgänge anstreben, spielt in der Forschung eine immer größere Rolle. Ein Ansatzpunkt ist hier die pharmakologisch verstärkte Bildung reparativen Tertiärdentins (rpTD), welches als Folge von Dentin-destruktionen, die die Pulpa erreichen, von Odontoblasten-ähnlichen Zellen gebildet werden kann. Es wird der innersten Dentinschicht pulpawärts angelagert und dient als verbreiterte Schutzbarriere, bevor die Zerstörung (z.B. ausgelöst durch Karies) zu einer Nekrose der Pulpa führen würde. Des Weiteren spielt die Angiogenese und der vereinfachte Austausch von Entzündungsmediatoren durch die Förderung der Durchblutung eine wichtige Rolle bei der Noxenabwehr. Könnte man zukünftig therapeutisch eine verstärkte Bildung Odontoblasten-ähnlicher Zellen beispielsweise durch Neuentwicklung von Füllungsmaterialien oder die Verbesserung der Durchblutung und Unterstützung der Immunantwort pharmakologisch herbeiführen, bestünde die Chance den Zahn auch bei tiefer Dentinkaries vital zu erhalten.

Dentale pulpale Stammzellen, die sich zu Odontoblasten-ähnlichen Zellen differenzieren können, exprimieren die Stammzellmarker CD90 und CD34. Mit Hilfe dieser Marker können pulpale Stammzellen isoliert und in vitro charakterisiert werden. Bisher ist noch nicht bekannt, wie die Stammzellmarker CD90 und CD34 in vivo bei einem kariösen Zahn exprimiert werden. In der vorliegenden Studie werden daher Schnitte von gesunden und kariösen adulten humanen Molaren verwendet, um die Effekte einer Pulpaentzündung auf die Expressionsmuster von CD90 und CD34 in Zellen der dentalen Pulpa zu untersuchen.

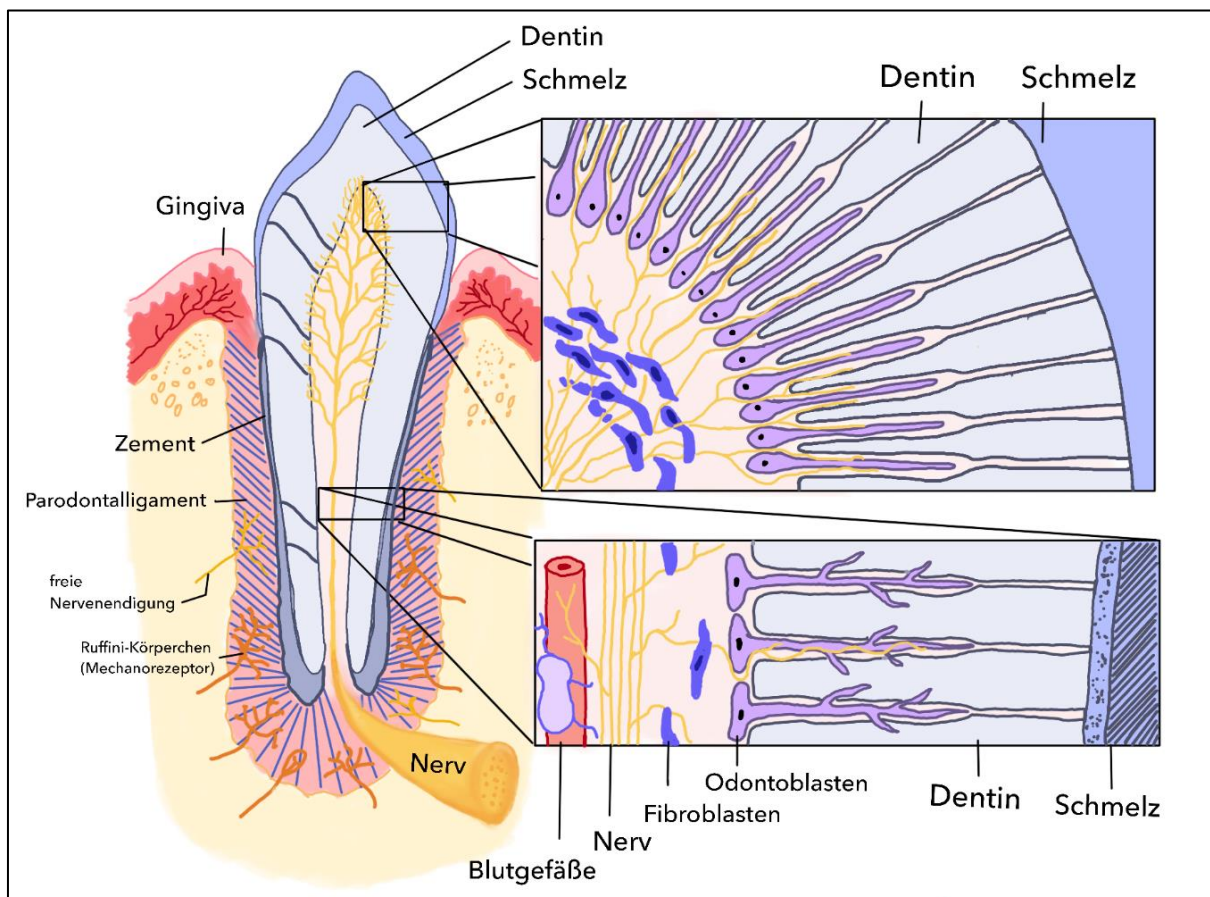
Der Vergleich der Expression der mesenchymalen Stammzellmarker CD90 und CD34 unter gesunden und entzündlichen Bedingungen kann Hinweise über das Verhalten von CD90- und CD34-positiven Zellen liefern. Die gewonnenen Erkenntnisse dienen als Grundlage für die weitere Forschung. Aufbauend können pharmakologische Therapien entwickelt werden, die durch eine Beeinflussung von mesenchymalen Stammzellen bei kariösen Läsionen, eine bessere Noxenabwehr des Zahnes ermöglichen.

## 5 Literaturdiskussion

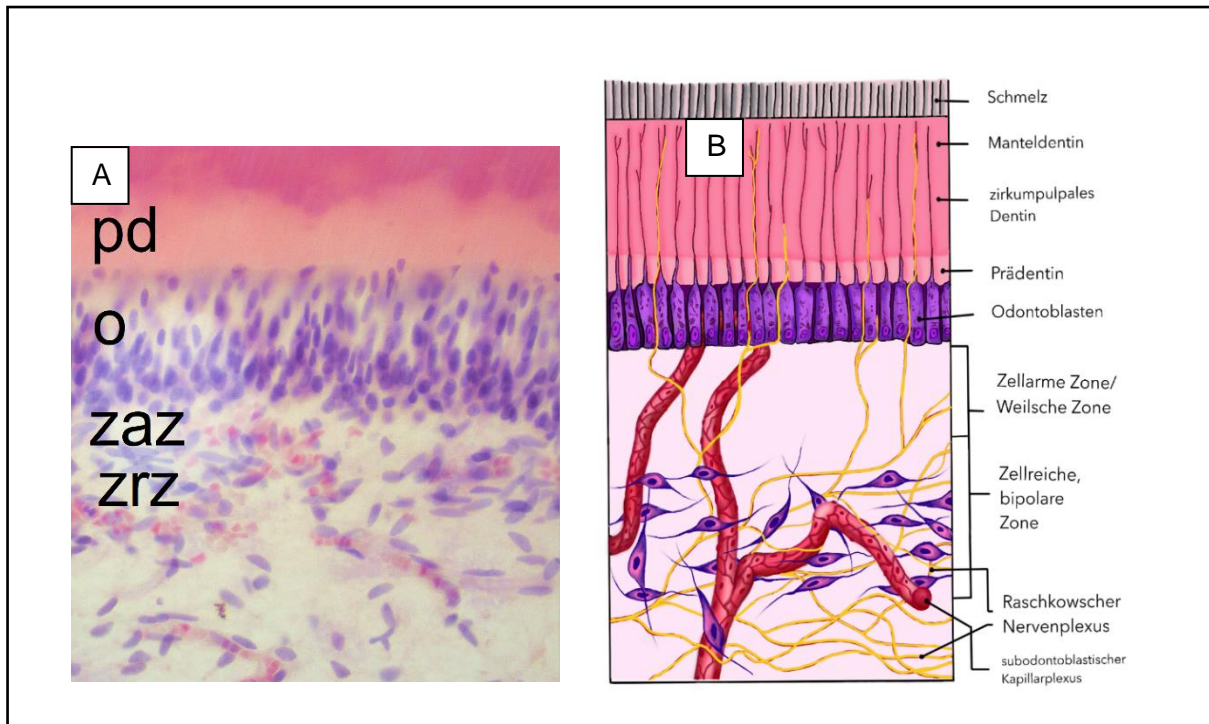
Die Interaktionen der unterschiedlichen Zellen der Dentin-Pulpa-Einheit sind sehr komplex und im Hinblick auf die Abwehr von Noxen laufen viele verschiedenen Stoffwechselvorgänge zusammen ab, um eine erfolgreiche Abwehr zu ermöglichen. Im Folgenden wird genauer auf die Einteilung der Zellen in der dentalen Pulpa sowie deren Reaktionen auf einen kariösen Reiz eingegangen.

### 5.1 Zellen der Dentin-Pulpa-Einheit

Das Dentin bildet mit der dentalen Pulpa zusammen eine Einheit, die als Dentin-Pulpa-Einheit bezeichnet wird. In dieser Einheit befinden sich unterschiedliche Typen von Zellen, die Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen eingehen können. In der dentalen Pulpa kommen Odontoblasten vor, die mit ihren Fortsätzen in den Dentintubuli in die Nähe der Schmelz-Dentin-Grenze ziehen (Abb. 1). Außerdem befinden sich hier pulmale Fibroblasten, Histozyten, Gewebsmakrophagen, Dendritische Zellen, Nervenfasern mit Schwann-Zellen, Blutgefäße mit Perizyten (um präkapillare Arteriolen, Kapillaren, Venolen und postkapillaren Venolen), Endothelzellen sowie glatte Muskelzellen (um Arterien, präkapillaren Arteriolen, Venen und postkapillaren Venolen). Die in der Pulpa befindlichen Stammzellen (Gliazellen, Perizyten, pulmale ektomesenchymale Stammzellen) bilden das Zellreservoir für viele unterschiedliche Gewebstrukturen.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Dentin-Pulpa-Einheit. Die Odontoblasten bilden längliche Fortsätze, die weit in die Dentintubuli hineinragen. Begleitet werden diese Fortsätze von dünnen Nervenfasern, die sich bis zu 0,2 mm mit in die Tubuli erstrecken (Byers and Närhi, 1999, Byers, 1984). 40 % der Dentintubuli befinden sich im koronalen Drittel der Pulpa. Nach apikal nimmt ihre Anzahl und somit auch die Innervation des Dentins ab (Byers and Närhi, 1999). Modifizierte Darstellung in Anlehnung an Byers and Närhi (1999).



**Abbildung 2:** Histologischer Aufbau der Dentin-Pulpa-Grenze. Die gesunde dentale Pulpa wird nach peripher zunächst von einer dünnen Schicht weniger stark mineralisierten Prädentins (**pd**) umgeben. Es folgt nach peripher das Sekundärdentin, welches im Laufe des Lebens pulpawärts an Dicke zunimmt. Odontoblasten (**o**), die mit ihren Fortsätzen in pulpanahe Teilabschnitte der Dentinkanälchen reichen, lagern sich pulpawärts als Odontoblastensaum (**o**) dem Prädentin an.

Unterhalb der Odontoblastenschicht befindet sich eine zellarme Zone (**zaz**), die Weil'sche-Zone, an die eine zellreiche Zone (**zrz**), die bipolare Zone (mit Fibroblasten), grenzt. In unmittelbarer Nähe der bipolaren Zone befindet sich der Raschkowsche Nervenplexus sowie der subodontoblastische Kapillarplexus.

**(A)** Histologie der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Entkalkter Schnitt, 40x Vergrößerung.

**(B)** Modifizierte Darstellung in Anlehnung an Endodontologie Diagnostik und Therapie (Guldner PHA, 1987).

### 5.1.1 Odontoblasten und die Bildung der verschiedenen Dentinarten

Die wichtigste Aufgabe von terminal differenzierten Odontoblasten ist die Bildung von Dentinmatrix. Sie werden während der embryonalen Entwicklungszeit gebildet und verbleiben lebenslang in der Odontoblastenschicht. Ausdifferenzierte Odontoblasten sezernieren extrazelluläre Matrixproteine, Kollagene (hauptsächlich Kollagen Typ I, 90%) und nicht-Kollagene Dentinmatrixproteine (DMP1, DSP und DPP, 10%) (Goldberg et al., 2011). DMP1, DSP und DPP regulieren in der Dentinmatrix die Ordnung der Kollagenfibrillen. Durch die Bindung an  $Ca^{2+}$ -Ionen biomineralisieren sie die Fibrillen in Form von Hydroxylapatitkristallen (Goldberg et al., 2011). Das Dentin, das während der Embryonalentwicklung von terminal differenzierten Odontoblasten gebildet wird, wird als tubuläres „Primärdentin“ (pD) bezeichnet (Goldberg et al., 2011, Bleicher, 2014).

Nach dem Abschluss der Wurzelbildung und während des gesamten Lebens eines Menschen nennt man das gebildete und ebenfalls tubuläre Dentin „Sekundärdentin“ (sD) (Goldberg et al., 2011, Bleicher, 2014). Es wird dem Primärdentin von innen, pulpawärts angelagert. Nachdem Durchbruch, kommt der Zahn mit seinem Antagonisten in Kontakt. Durch die mechanische Belastung und der zunehmenden Bildung von sD, nimmt der Durchmesser des apikalen Forams ab und erreicht seine physiologische Größe.

Die dritte gebildete Dentinart nennt sich „Tertiärdentin“ (tD) (Smith et al., 1995, Neves and Sharpe, 2018). Es wird als Reaktion auf Beschädigungen des Zahnes, beispielsweise durch Karies, von den Odontoblasten innen, pulpawärts dem Sekundärdentin angelagert (Smith et al., 1995, Neves and Sharpe, 2018). Das tD ist weiterhin zu unterteilen in das „reaktive Tertiärdentin“ (rTD) und in das „reparative Tertiärdentin“ (rpTD) (Neves and Sharpe, 2018, Smith et al., 1995). Ebenso wie Primärdentin und Sekundärdentin, wird das reaktive Tertiärdentin von terminal differenzierten Odontoblasten als Reaktion auf initiale Dentin- und Dentinkaries gebildet (Smith et al., 1995, Neves and Sharpe, 2018).

Nach dem apoptotischen Untergang oder der Degradation von Odontoblasten, in Folge einer tiefen Dentinkaries, die bereits die Pulpa erreicht hat, erfolgt die Reparatur durch Odontoblasten-ähnliche Zellen, die sich infolgedessen aus pulpalen Stammzellen differenzieren können (Smith et al., 2012b, Zaugg et al., 2020). Odontoblasten-ähnliche Zellen bilden atubuläres rpTD zum Schutz der Pulpa. Reguliert wird die Bildung von rpTD durch verschiedene Moleküle, wie beispielsweise von Wachstumsfaktoren (Cassidy et al., 1997, Grando Mattuella et al., 2007, Smith, 2003, Bjørndal et al., 2019). Für die genaue Klärung der Bildungsmechanismen des rpTD ist das Erlangen weiterer Kenntnisse zu den biologischen Eigenschaften der Stammzellen in der dentalen Pulpa von essenzieller Bedeutung, um die Vitalität der dentalen Pulpa bei einer Behandlung von tiefer Dentinkaries gewährleisten zu können.

Odontoblasten stammen von Zellen der Neuralleiste ab, sind post-mitotisch und besitzen die Fähigkeit eine Bakterieninvasion bei kariösen Läsionen frühzeitig zu detektieren, um anschließend in der Pulpa eine Entzündungs- sowie Immunantwort zu initiieren (Bleicher, 2014). Durch die Sezernierung von Chemokinen können Odontoblasten dendritische Zellen rekrutieren, die ihrerseits weitere Funktionen bei der Abwehr übernehmen können (Bleicher, 2014).

### **5.1.2 Fibroblasten**

Eine fundamentale Zellart in der dentalen Pulpa, sind die Fibroblasten. Ihre Hauptaufgabe ist die Synthese der extrazellulären Matrix (Quispe-Salcedo and Ohshima, 2021).

Fibroblasten übernehmen in der dentalen Pulpa jedoch ebenfalls wichtige Funktionen als Initiatoren der Regeneration (Chmilewsky et al., 2014).

Das Komplementsystem, bestehend aus verschiedenen Komplexen von Plasmaproteinen, dient der Opsonierung von Noxen und gehört zum angeborenen Immunsystem. Es wurde bereits nachgewiesen, dass aufgrund von gram-positiven Kariesbakterien die Aktivierung des Komplexes (C5b-9) des Komplementsystems erfolgt, um die Regeneration der Dentin-Pulpa Einheit anzustreben (Chmilewsky et al., 2014). Mittels RT-PCR-Analyse (real time polymerase chain reaction) wurde außerdem herausgefunden, dass Fibroblasten die Möglichkeit besitzen alle Proteine zu synthetisieren, die für die Bildung des Komplementsystems notwendig sind (Chmilewsky et al., 2014). Durch die Aktivierung der von Fibroblasten gebildeten Komplement-Proteine und die darauffolgende Ausschüttung des Faktors C5a konnte nachgewiesen werden, dass es in der Pulpa zu einer verstärkten Rekrutierung von pulpalen Vorläuferzellen kommt (Chmilewsky et al., 2014).

Des Weiteren wurde in einer anderen Studie von Chmilewsky entdeckt, dass es durch Stimulation mit Lipoteichonsäure (einem Hauptbestandteil der Zellwand Gram-positiver Bakterien, um diese im Versuch zu imitieren) von Fibroblasten, zu einer Ausschüttung der Nervenwachstumsfaktoren (=nerve growth Factors (NGF)) kommt, die als Mediatoren für das Wachstum von Neuriten in Richtung der Verletzung dienen (Chmilewsky et al., 2016).

### **5.1.3 Blutgefäße: Vasodilatation und –konstriktion, Gefäßpermeabilität, Perizyten**

Die dentale Pulpa ist von einem komplexen Blutgefäßnetz durchzogen. Die Hauptaufgabe dessen liegt in der Versorgung des umliegenden Gewebes mit Sauerstoff, der Versorgung mit Nährstoffen und es unterstützt durch den Transport von Mediatoren, die Immunantwort.

Endothelzellen bilden die innerste Wand der Kapillaren, sie werden zusammen mit den Perizyten von einer gemeinsamen Basallamina umgeben. Die Perizyten sitzen außen an der Gefäßwand, besitzen lange Ausläufer mit kontraktile Eigenschaften und können dadurch die Gefäßweite regulieren (Abb. 5). Außerdem unterstützen sie die Erneuerung des Endothels und synthetisieren selbst Substanzen, die die Gefäßweite steuern können.

Die Kapillaren sind permeabel. Durch Diffusion, Filtration und transzellulären Transport durch die Endothelzellen hindurch können Mediatoren bei Entzündungen in die Blutbahn gelangen sowie die Gefäßweite und somit die Sauerstoffzufuhr und Immunantwort regulieren.

Mitunter finden sich in einigen größeren Gefäßen auch eine dünne Schicht glatter Muskelzellen (VSMCs), welche ebenfalls durch ihre kontraktile Eigenschaften die Gefäßweite regulieren können (Armulik et al., 2011, Herbert and Stainier, 2011). Sie umgeben die Endothelzellen von Arterien, Arteriolen, Venolen und Venen und steuern außer der Gefäßweite auch die Permeabilität der Gefäße (Haefliger et al., 1994, Hall et al., 2014).

Bei Entzündungen wird das Gewebe hyperämisch. Die Blutgefäße weiten sich, und Immunzellen sowie mit Sauerstoff beladene Erythrozyten können besser in die betroffene Region gelangen und die Heilung unterstützen (Korkmaz et al., 2011). Unter Sauerstoffmangel in bereits geschädigtem Gewebe können sich durch Angiogenese neue Blutgefäße bilden (Almushayt et al., 2006).

### **5.1.4 Nervenfasern: Innervation, Neurotransmission, Schmerz und neurovaskuläre Regulation**

Nervenfasern können in der Peripherie myelinisiert wie auch unmyelinisiert vorliegen. In beiden Fällen sind ihre Axone von Schwann-Zellen umhüllt. Im peripheren Nervensystem werden bei marklosen, nicht myelinisierten Nervenfasern mehrere Axone von einer Schwann-Zelle umhüllt, wohingegen bei der Myelinisierung jeweils eine Schwann-Zelle ein Axon mit der Ausbildung von Markscheiden umhüllt. Diese Isolation dient der schnelleren Weiterleitung von Aktionspotentialen (Abb. 3).

Schwann-Zellen gehören zu den Makrogliazellen und stammen wie auch die Odontoblasten von der Neuralleiste ab. Schwann-Zellen produzieren das Myelin zur elektrischen Isolation der peripheren Nerven. Sie besitzen außerdem reparative Funktionen bei der Nervregeneration.

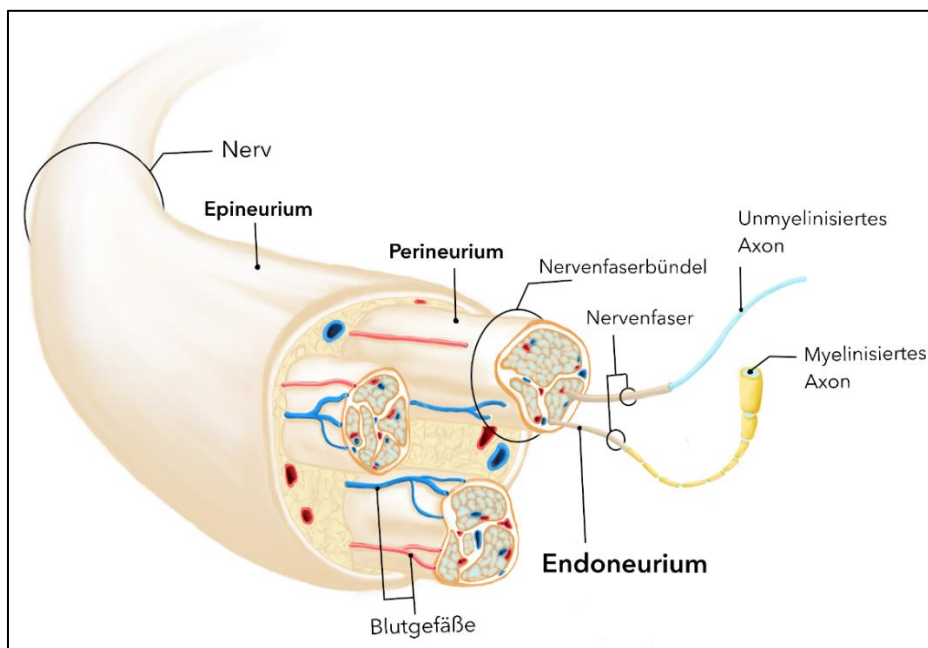
Die Dentin-Pulpa-Einheit ist reichlich von peripheren Nervenfasern innerviert (Byers, 1984, Byers and Närhi, 1999). Über das Foramen apikale dentis treten dicke Nervenfaserbündel in die Wurzelpulpa ein und verzweigen sich innerhalb der koronalen Pulpa zu dünnen Nervenfaserbündeln (Abb. 1) (Byers, 1984, Byers and Närhi, 1999). Nach ihrer Verästelung mit zahlreichen Nervenfasern unterhalb der Odontoblastenschicht bilden sie den Subodontoblastenplexus (Byers, 1984, Byers and Närhi, 1999).

Die unmyelinisierten C-Fasern stellen eine Gruppe der sensiblen Nervenfasern dar (Byers, 1984, Byers and Närhi, 1999). Sie verteilen sich zunächst in der zellreichen Zone, anschließend gelangen sie durch die zellarme Zone in die Odontoblastenschicht und enden dann an der Prädentin-Dentin-Grenze (Byers, 1984, Byers and Närhi, 1999, Chung et al., 2013, Solé-Magdalena et al., 2018) (Abb. 2). Pulpale polymodale C-Fasern reagieren hauptsächlich auf intensive Stimulation durch beispielsweise schwere entzündliche Schäden an der Pulpa oder auch starke Kälte- und Hitzereize (Byers, 1984, Byers and Närhi, 1999).

Zwei weitere Gruppen sensibler Nervenfasern (dünne A-delta (dünn-myelinisiert) und dickere A-beta Fasern (dick-myelinisiert)) verteilen sich im Prädentin und in den initialen Dentinkanälchen und enden dort bis zu 0,2 mm innerhalb des Dentins (Byers, 1984, Byers and Närhi, 1999, Chung et al., 2013, Solé-Magdalena et al., 2018). Sie reagieren bereits sehr früh auf schädliche Reize und ihre Aktivierung wird mit einem spitzen, scharfen, akuten Schmerzreiz in Verbindung gebracht (Byers and Närhi, 1999).

Es wurde bereits beobachtet, dass die pulpale Heilung beeinträchtigt wird, wenn Zähne von Ratten in Versuchen genetisch denerviert und ein entzündlicher Prozess initiiert wurde (Byers and Taylor, 1993, Byers and Närhi, 1999). Das Vorhandensein des pulpalen Nervengewebes hat somit einen positiven Einfluss auf den Heilungsprozess des Zahnes.

In neuen Untersuchungen wurde bestätigt, dass periphere Nervenfasern mesenchymale Stammzellen (mit entwicklungsgeschichtlichem Ursprung aus der Neuralleiste) im Endoneurium besitzen (Carr et al., 2019). Versuche am Mausmodell zeigten, dass eine lokale Verletzung von Gewebe und peripherer Nerven einerseits zu einer Schwann-Zell Dedifferenzierung, andererseits jedoch auch zu einer Proliferation von endoneuronalen mesenchymalen Stammzellen führt (Carr et al., 2019). Diese migrieren infolgedessen in das benachbarte Gewebe, um Reparaturvorgänge zu fördern (Carr et al., 2019). Die Stammzellen können sich nach einer Verletzung zu Zellen differenzieren, die nicht der Nervlinie angehören, um Haut- und Knochengewebe zu bilden (Carr et al., 2019). Dies wurde in mehreren weiteren Experimenten mit Zellkulturen und Transplantationen festgestellt (Carr et al., 2019). Da die dentale Pulpa dicht von peripheren Nervenfasern innerviert wird, ist es möglich, dass auch Nervenfasern der dentalen Pulpa mesenchymale Stammzellen im Endoneurium besitzen können, die aufgrund von Differenzierungen und Proliferationen bei der Reparatur der Pulpa-Dentin-Einheit beteiligt sein können.



**Abbildung 3:** Bindegewebshüllen eines peripheren Nerven

**Epineurium:** Bestehend hauptsächlich aus Kollagenfasern und Gefäßen.

**Perineurium:** Umschließt mehrere Nervenfasern als Nervenfaserbündel (Faszikel) und fasst sie somit zusammen. Es besteht aus straffem Bindegewebe.

**Endoneurium:** Besteht aus einer lockeren Bindegewebsschicht und umhüllt und ernährt über Blutgefäße das Axon mit den myelinisierenden Schwann-Zellen.

Modifizierte Darstellung in Anlehnung an Abbildung von © AMBOSS GmbH (2021).

### 5.1.5 Immunzellen und Entzündungsformen der Dentin-Pulpa-Einheit bei kariösen Läsionen

Unter physiologischen Bedingungen kommen in der dentalen Pulpa Makrophagen und Dendritische Zellen (DCs) vor. Im Vergleich zu der entzündeten dentalen Pulpa ist die Anzahl von Makrophagen und DCs in der gesunden dentalen Pulpa gering (Jontell et al., 1998). Als Antwort auf eine kariöse Läsion, die in allen Fällen eine Entzündung in der dentalen Pulpa induziert, nimmt die Anzahl von Makrophagen und DCs stark zu. Des Weiteren führt eine Entzündung zu einer verstärkten Proliferation von Neutrophilen Granulozyten, Mastzellen und T- und B-Zellen (Galler et al., 2021, Korkmaz et al., 2023).

Bei der Entstehung von Karies werden gebundene Moleküle aus der Matrix des Dentins herausgelöst, die eine Entzündungsreaktion fördern und mit der Bildung von rTD sowie rpTD assoziiert sind (Tani-Ishii et al., 1995, Farges et al., 2015).

Odontoblasten sind die ersten pulpalen Zellen, die mit der Karies und ihren Stoffwechselprodukten in Berührung kommen (Farges et al., 2015). In vitro wurde gezeigt, dass sie bereits erste Schritte einleiten und Chemokine sowie Zytokine freisetzen können, um eine Immunantwort der Immunzellen zu erzeugen (Farges et al., 2015). Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) sind pathogene Strukturen, die von den Odontoblasten mit Hilfe der Pattern-Recognition Receptors (PRRs) erkannt werden können (Farges et al., 2015).

Durch den Einsatz der TLR werden proinflammatorische Stoffe wie Zytokine und Chemokine freigesetzt, um Entzündungszellen des Gewebes und des Blutes in das entzündete Gewebe zu leiten (Viola and Luster, 2008, Turner et al., 2014, Farges et al., 2015). Über Stickstoffmonoxid (NO) sowie Beta-Defensine können Odontoblasten direkt Bakterien abwehren sowie weitere Immunzellen anlocken (Shiba et al., 2003, Song et al., 2009, Lee and Baek, 2012, Lee et al., 2013, Farges et al., 2015). Zu diesen gehören die Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen (DC), Makrophagen, CD4+ T-Helferzellen, B-Zellen und die natürlichen Killerzellen (NK) (Semple and Dorin, 2012, Farges et al., 2015).

Im frühen Entzündungsstadium, noch bevor es zur Bildung von tertiärem Dentin kommt, lagern sich, als Antwort auf die ausgeschütteten Chemokine, zunächst unreife DCs an der Pulpa-Dentin-Grenze an, um mit ihren langen Ausläufern Antigene der Noxen detektieren und über Pinozytose, Phagozytose sowie Endozytose aufnehmen zu können (Farges et al., 2015, Quispe-Salcedo and Ohshima, 2021, Matsumura et al., 2017). Sie rekrutieren die T-Helferzellen, indem sie zu regionalen Lymphknoten migrieren und als unreife DC aufgenommene und verarbeitete Antigenpeptide über den Majorhistocompatibilitycomplex (MHC) der Klasse I und II den naiven CD8+ sowie den CD4+ T-Zellen präsentieren (Farges et al., 2015, Quispe-Salcedo and Ohshima, 2021). Diese CD4+ T-Zellen antworten auf die Aktivierung mit einer Proliferation weiterer Zellen ihrer Art und differenzieren sich, unter dem Einfluss von verschiedenen Interleukinen, in verschiedene T-Zell Untergruppen (Th1, Th2, Th17, regulatorische T-Zellen (iTreg)) (Farges et al., 2015).

Die DCs reifen durch diesen Vorgang zu Tolerogenic-DCs (Tol-DCs), die wiederum die iTreg Differenzierung über Interleukin 10 (IL-10) sowie den Transforming growth factor-Beta (TGF-Beta) induzieren können (Farges et al., 2015). Anschließend migrieren weitere T- und B-Lymphozyten sowie Makrophagen und neutrophile Granulozyten an den Ort der Entzündung (Hahn and Liewehr, 2007, Jontell et al., 1998, Farges et al., 2015). Ihre Anzahl steigt signifikant mit der Stärke der Entzündung (Farges et al., 2015).

Die B-Zellen können sich ihrerseits weiter zu Plasmazellen differenzieren und die Bildung von Antikörpern ermöglichen.

Leukozyten gelangen durch Blutgefäße an den Ort des Geschehens, lagern sich anschließend den Endothelzellen des Blutgefäßes an und migrieren durch Diapedese aus dem Blutgefäß in

das betroffene Gewebe (Farges et al., 2015). Neutrophile Granulozyten werden bereits in einem sehr frühen Stadium der Inflammation aktiviert. Nach ihnen gelangen Monozyten, die sich zu Makrophagen und Histozyten differenzieren können, über die Blutgefäße an den Ort des Geschehens (Farges et al., 2015).

Histozyten sind die ruhende Form der gewebsständigen Makrophagen und können bei inflammatorischen Reaktionen zu diesen aktiviert werden. Makrophagen gehören wie DCs den Antigen-präsentierenden Zellen an und können ebenso Zellen der Immunantwort rekrutieren (Quispe-Salcedo and Ohshima, 2021). Makrophagen sind außerdem in der Lage, Zellbestandteile zu phagozytieren, sie chemisch abzubauen und somit für den Organismus unschädlich zu machen.

## **5.2 Einteilung kariöser Läsionen am Dentin**

Karies entsteht durch das Zusammenspiel mehrerer pathogener Einflüsse, wie beispielsweise lange Säureeinwirkung und die Vermehrung pathogener Mikroorganismen in der Plaque. Zucker dient den kariogenen Bakterien als Nährstoffquelle (Featherstone, 2000, Featherstone, 2004, Caufield and Griffen, 2000, Selwitz et al., 2007).

Eine Remineralisation der kristallinen Struktur des Schmelzes kann nur im frühen Stadium durch die Aufnahme von Fluorid, Phosphaten und Kalzium erfolgen (Selwitz et al., 2007). Die Prozesse der De- und Remineralisation halten sich im Laufe der Zeit in der Waage (Selwitz et al., 2007). Sobald jedoch das Stadium der Demineralisation und der niedrige pH-Wert über einen längeren Zeitraum anhält, begünstigt dies das Herauslösen von Kalzium- und Phosphat-Ionen aus den Schmelzkristallen und somit auch die Kariesbildung (Selwitz et al., 2007).

Der Speichel kann die entstehenden Säuren neutralisieren und eine Remineralisation bewirken (Hellwig E, 2018). Zu nennen sind der Phosphatpuffer und der Bikarbonatpuffer. Des Weiteren ist Speichel in der Lage Kalzium- und Phosphat-Ionen, die durch Demineralisationsvorgänge dem Zahn verloren gegangen sind, wieder einzulagern (Hellwig E, 2018).

### **5.2.1 Schmelzkaries**

Zu Beginn des Prozesses der Kariesbildung am Zahn steht die initiale Schmelzkaries. Hier beschränkt sich der Befall lediglich auf die äußersten Schmelzprismen am Zahn, die bereits durch Mikroorganismen eine Entkalkung erfahren haben (Selwitz et al., 2007).

Schon bevor eine Schmelzkaries eine tiefe Kavität bis zum Dentin bilden kann, können bakterielle Toxine und Enzyme durch diese Läsion des Zahnschmelzes diffundieren. Als Reaktion darauf kann sich zu diesem Zeitpunkt bereits rTD bilden (Hellwig E, 2018).

### **5.2.2 Initiale Dentinkaries (iDK)**

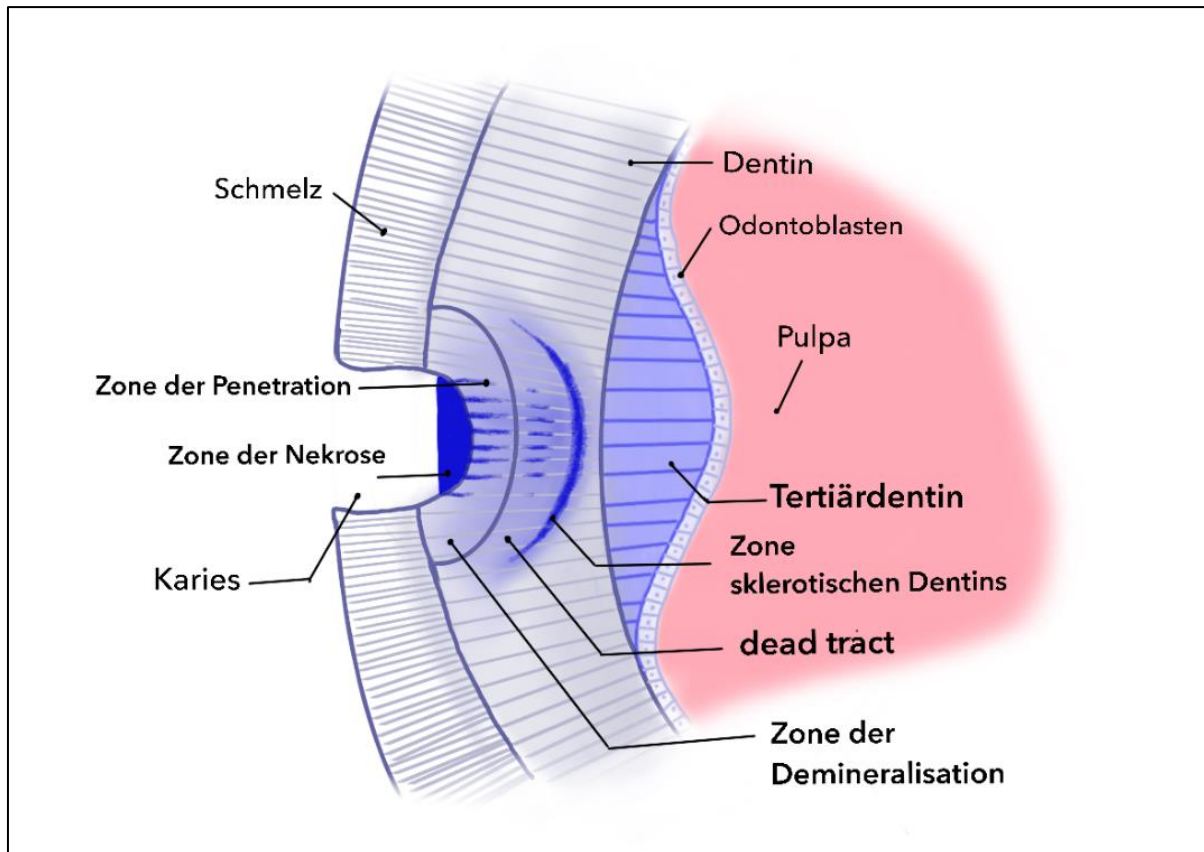
Mit dem Fortschreiten einer Karies über die Schmelz-Dentin-Grenze hinaus in das Dentin, spricht man von einer initialen Dentinkaries. Es findet nicht nur eine Entkalkung der mineralisierten Strukturen statt, sondern es wird auch organisches Material, die Kollagenfasern vom Typ I, zersetzt (Horst et al., 2016, Zhao et al., 2018). Die Dentinkaries kann man, je nach dem bereits vorliegenden Schweregrad der Karies, in verschiedene Untergruppen aufteilen.

Spätestens durch das Erreichen des Dentins wird eine Reaktion der Pulpa-Dentin-Einheit hervorgerufen (Hellwig E, 2018). Aufgrund des größeren Wasser- und Proteinanteils im Dentin und aufgrund der Dentintubuli können sich die Mikroorganismen in der, im Vergleich zum Zahnschmelz weicheren Struktur schneller ausbreiten (Hellwig E, 2018).

### 5.2.3 Dentinkaries (DK)

Das Fortschreiten der Karies ist zunächst mit einer lateral spreitenden Ausbreitung im Dentin verbunden, anschließend gewinnt der Prozess jedoch an Tiefe. In den Anfangsstadien wird die Pulpa noch nicht erreicht.

### 5.2.4 Tiefe Dentinkaries (tDK)



**Abbildung 4:** Schema: Histologie der Dentinkaries

Quelle: Modifizierte Darstellung in Anlehnung an Abbildung 6.8 S.116 von Lehmann et al. (2015).

Bei der tiefen Dentinkaries ist die Läsion bereits so weit vorangeschritten, dass sie die Pulpa erreichen kann. Histologisch lassen sich mehrere unterschiedliche Regionen erkennen (siehe Abbildung 4). Peripher findet sich zunächst die Zone der Penetration (Hellwig E, 2018). Hier sind bereits hauptsächlich grampositive Bakterien eingedrungen (Hellwig E, 2018). Pulpawärts lässt sich die Zone der Demineralisierung abgrenzen, diese Zone erscheint lichtmikroskopisch unverändert (Hellwig E, 2018). An diese Zone grenzt der „dead tract“, in dem bereits Odontoblastenfortsätze verschwunden sind (Hellwig E, 2018). Somit kann keine Kommunikation mit der Pulpa mehr stattfinden (Hellwig E, 2018). Die folgende Zone der Sklerose entsteht durch den Untergang der Dentinkanälchen und reduziert die Permeabilität des Dentins wieder, um die Pulpa weitestgehend zu schützen (Hellwig E, 2018, Bjørndal et al., 2019). Durch einen weiteren Schutzmechanismus weichen die Odontoblastenfortsätze zurück und lagern peritubuläres Dentin ein (Hellwig E, 2018, Bjørndal et al., 2019). Ist die Dentinkaries bereits sehr weit fortgeschritten, entsteht peripher zusätzlich eine Nekrosezone, in der das Dentin eine weiche, flüssige Konsistenz bekommt. Zusätzlich finden sich hier tote Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukte (Hellwig E, 2018) (Abb. 4).

Wird schließlich durch eine tiefe Karies die Pulpa erreicht, gehen auch die betroffenen Odontoblasten zugrunde. Die Reparatur erfolgt nun durch Odontoblasten-ähnliche Zellen, die sich aus pulpalen Stammzellen differenzieren können und atubuläres rpTD bilden (Smith et al., 2012a, Zaugg et al., 2020, Mitsiadis et al., 2011a).

Aufgrund der fortschreitenden Demineralisierung des Dentins, werden auch Bestandteile der Dentinmatrix herausgelöst (Dung et al., 1995, Bjørndal et al., 2019). Einige Matrixmetalloproteinasen lösen die Dentinmatrix weiter auf (Mazzoni et al., 2015, Bjørndal et al., 2019) und setzen gleichzeitig weitere Faktoren frei, welche die Tertiärdentinbildung stimulieren (Finkelman et al., 1990, Bègue-Kirn et al., 1992, Smith et al., 1994, Bjørndal et al., 2019).

Moleküle, wie Chemokine, Zytokine, Wachstumsfaktoren und neurogene Faktoren, wie der brain-derived neurotrophic factor (BDNF) und der growth/differentiation factor 15 (GDF-15) induzieren ebenfalls die Mineralisation des Tertiärdentins und nehmen an der Regeneration der Pulpa teil (Smith et al., 2012b, Smith et al., 2016, Tomson et al., 2017, Tomson et al., 2013, Duncan et al., 2017, Galler et al., 2016, Bjørndal et al., 2019).

Gefäßneubildung, Neurogenese sowie die Rekrutierung von Stammzellen sind weitere Aufgaben dieser Faktoren (Roberts-Clark and Smith, 2000, Fayazi et al., 2017, Marquardt et al., 2015, Bjørndal et al., 2019).

### **5.2.5 Infektion der nekrotischen dentalen Pulpa**

Im unbehandelten Zustand, entzündet sich nach einiger Zeit das Gewebe der Pulpa so stark, dass es zur Entstehung einer irreversiblen Pulpitis kommt (Farges et al., 2015). Wird das Gewebe nekrotisch, kann infolgedessen zusätzlich eine Infektion entstehen. Die Pulpa verliert ihre physiologischen Funktionen. Die Abwehrmöglichkeiten gegen eine weitere Kontamination reduzieren sich zunehmend (Farges et al., 2015). Therapeutisch kann man in diesem Fall mit einer Pulpektomie, (die Entfernung der gesamten Zahnpulpa, im Rahmen einer Wurzelkanalbehandlung) den Zahn versuchen zu erhalten (Bjørndal et al., 2019).

## **5.3 Pulpale Stammzellen**

Pulpale dentale Stammzellen bilden die Grundlage für die Bildung unterschiedlicher Zellarten. Unter anderem dienen sie der Noxenabwehr. Es wird angenommen, dass es zu einer gesteigerten Proliferation von Stammzellen im entzündeten Gewebe kommt.

Der Begriff der mesenchymalen Stammzellen beschreibt Zellarten, die, wenn sie von ihrem Bindegewebe isoliert wurden, Stammzeleigenschaften (z.B. die Möglichkeit zur Selbstreplikation und Differenzierung in verschiedene Zellarten) aufweisen (Yianni and Sharpe, 2019). Zu den funktionellen Merkmalen mesenchymaler Stammzellen *in vitro* gehören ihre Multipotenz und Fähigkeit zur Differenzierung in mesodermale Zell-Linien, einschließlich Chondrozyten, Adipozyten und Osteoblasten, nachdem sie *in vitro* mit bestimmten Faktoren stimuliert wurden (Beltrami et al., 2007, Covas et al., 2008, Huang et al., 2009, Yianni and Sharpe, 2019). In Studien wurde herausgefunden, dass sich in der postnatalen dentalen Pulpa ebenfalls mesenchymale Stammzellen befinden, die eine wichtige Rolle bei der Regeneration von Geweben besitzen und zudem hoch proliferativ und teilungsfähig sind (Gronthos et al., 2000, Gronthos et al., 2002).

Die Freisetzung von speziellen Proteinen (z.B. Dentinmatrixprotein DMP1) aus dem Dentin, kann ausreichen, um die Differenzierung von pulpalen mesenchymalen Stammzellen zu Odontoblasten einzuleiten (Almushayt et al., 2006). Besonders bei Verletzungen des Dentins spielt diese Funktion eine tragende Rolle bei der Reparatur.

Nicht nur extrazelluläre Matrixproteine (EZMP) des Dentins, sondern auch EZMPs der Pulpa induzieren die Rekrutierung von pulpalen Stammzellen über einen rho-Weg (Smith et al.,

2012b). Diese Rekrutierung durch EZMPs des Dentins und der Pulpa wird verstärkt durch die Einwirkung von Säuren sowie enzymatische Abbauprozesse, wie sie bei einer Karies vorliegen (Smith et al., 2012b).

### 5.3.1 Pulpale ektomesenchymale Stammzellen

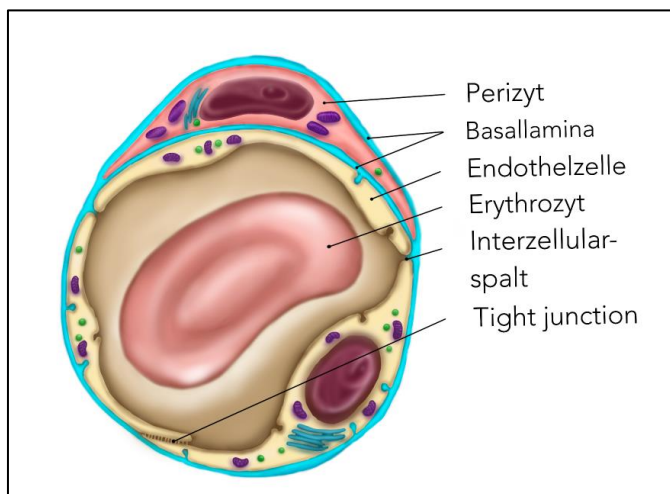
Zellen, die an der Bildung des Zahnes beteiligt sind, stammen hauptsächlich von zwei unterschiedlichen embryonalen Ressourcen ab: dem ektodermalen Epithel und dem Ektomesenchym der Neuralleiste (Koussoulakou et al., 2009, Kaukua et al., 2014).

Odontoblasten und Gliazellen stammen von einer gemeinsamen Zelllinie aus der Neuralleiste ab (Kaukua et al., 2014). Dies wurde an Schneidezähnen im Mausmodell nachgewiesen (Kaukua et al., 2014). Ektomesenchymale Stammzellen gehen aus Gliazellen hervor und können anschließend Zellen der Pulpa sowie Odontoblasten bilden (Kaukua et al., 2014). Zusätzlich exprimieren Odontoblasten die Stammzellmarker Nestin, sowie den Schwann-Zellmarker S-100 $\beta$  (Terling et al., 1995, Nakatomi et al., 2018, Lombardi et al., 1992, Kaukua et al., 2014, Korkmaz et al., 2021). Diese Erkenntnis unterstreicht außerdem die Idee der gemeinsamen Herkunft von Odontoblasten und Gliazellen (Schwann-Zellen) (Kaukua et al., 2014).

In Versuchen mit ektomesenchymalen Stammzellmarkern zu den unterschiedlichen Bildungsmechanismen von Dentikeln, die ebenfalls vermehrt als Reaktion auf äußere Reize gebildet werden, fand man heraus, dass bei den gebildeten, unechten atubulären Dentikeln eine nahe räumliche Beziehung zu Blutgefäßen und Nervenfasern besteht (Korkmaz et al., 2021).

### 5.3.2 Pulpale Perizyten

Eine weitere Art der pulpalen Stammzellen sind die Perizyten. Perizyten sind nicht stark differenziert, kontraktile und lagern sich an den Kapillarwänden und postkapillären Venolen an, welche von Endothelzellen gestützt werden (Abb. 5.). Sie dienen als Mediatoren für Leukozyten bei der Immunabwehr, helfen dabei, toxische Nebenprodukte abzubauen und induzieren die Bildung neuer Blutgefäße (Birbrair, 2018).



**Abbildung 5:** Lokalisation der Perizyten

Quelle: Modifizierte Darstellung in Anlehnung an Continuous Capillary (McGraw-Hill Companies, 2021).

Es wurde bereits in Studien mit Cre-Recombinase Mäusen, zur Bestimmung der genetischen Abstammungslinie von Perizyten beschrieben, dass sie in der Lage sind sich bei Verletzungen

von ihrem Herkunftsort, der Wand des Blutgefäßes, zu lösen, um sich zu Progenitoren der mesenchymalen Stammzellen zu differenzieren (Yianni and Sharpe, 2019). Anschließend wandern sie zu dem Ort der Verletzung und differenzieren sich weiter in die gewebsspezifische Zellart, wie beispielsweise Myoblasten (Dellavalle et al., 2007, Yianni and Sharpe, 2019), Osteoblasten (Supakul et al., 2019, Yianni and Sharpe, 2019) und Odontoblasten (Feng et al., 2011, Yianni and Sharpe, 2019).

In weiteren Untersuchungen an Mäusen wurde ebenfalls bestätigt, dass Perizyten sich nach einer kariösen Läsion zu Odontoblasten-ähnlichen Zellen differenzieren (Feng et al., 2011, Traktuev et al., 2008, Wang et al., 2019). Im Zuge dessen wurde jedoch auch festgestellt, dass nicht alle Odontoblasten-ähnlichen Zellen von Perizyten abstammen (Feng et al., 2011). Es gibt eine weitere Population von pulpalen mesenchymalen Stammzellen, die ebenfalls zu der verletzten Stelle migrieren und sich zu Odontoblasten differenzieren können (Feng et al., 2011).

### **5.3.3 Mesenchymale Stammzellen im Endoneurium**

Einige Stammzellen der Neuralleiste verbleiben während der Entwicklung im Endoneurium der peripheren Nerven (Joseph et al., 2004, Carr et al., 2019). Dort können sie sich selbst replizieren und dienen als Reserve für die Bildung von myelinisierenden und nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen sowie endoneuronalen Fibroblasten in peripheren Nervenfasern (Joseph et al., 2004, Richard et al., 2014). Es besteht somit die Annahme, dass mesenchymale Stammzellen auch im Endoneurium der Nervenfasern in der Dentin-Pulpa-Einheit vorkommen können.

Es wurde ebenfalls beschrieben, dass sich bei Verletzungen der Nervenfasern, diese mesenchymalen endoneuronalen Stammzellen zu mesenchymalen Vorläuferzellen differenzieren können, die bei der Regeneration der Dermis und von Knochen beteiligt sind (Johnston et al., 2013, Johnston et al., 2016, Carr et al., 2019, Korkmaz et al., 2021). In gesundem Nervengewebe wurden diese Proliferationen und Differenzierungen nicht beobachtet (Korkmaz et al., 2021, Carr et al., 2019, Adameyko and Ernfors, 2019).

Ein endgültiger Beweis für das Vorkommen von mesenchymalen Stammzellen im Endoneurium von pulpalen Nervenfasern liegt bis jetzt noch nicht vor. Auch ist nicht geklärt, ob es mögliche Reaktionen der pulpalen mesenchymalen endoneuronalen Stammzellen auf ein entzündliches Geschehen der dentalen Pulpa gibt, wie sie bereits bei anderen Verletzungen peripherer Nerven und der darauffolgenden Regeneration durch periphere mesenchymale endoneuronale Stammzellen nachgewiesen wurden (Cattin and Lloyd, 2016, Carr et al., 2019).

## **5.4 Stammzellmarker CD90 und CD34**

Die Verwendung der Stammzellmarker Thy1/CD90 und CD34 zur Darstellung von mesenchymalen Stammzellen wurde bereits in den folgend aufgeführten Studien gezeigt.

### **5.4.1 CD90**

CD90 ist ein Glykosylphosphatidylinositol gekoppeltes Protein und wurde bereits in Endothelzellen und Perizyten nachgewiesen (Inoue et al., 2016, Pérez et al., 2022, Park et al., 2016). Es spielt eine Rolle bei der Zellmigration und Adhäsion und es ist eine Hochregulation von CD90 in Endothelzellen bei einer Zytokin-induzierten Inflammation mit Angiogenese beschrieben (Pérez et al., 2022, Brenet et al., 2020, Schubert et al., 2013, Schubert et al., 2011).

In Thy1-Knockout-Mäusen wurde eine Heilungsverzögerung von Hautwunden nachgewiesen, sodass anzunehmen ist, dass Thy/CD90 eine wichtige Rolle bei der Wundheilung durch den Einfluss auf die Durchblutung des betroffenen Areals hat (Pérez et al., 2022).

Der Antikörper „rabbit monoclonal anti Thy1/CD90 wurde ebenfalls als Marker für mesenchymale Stammzellen im Epineurium, Perineurium und Endoneurium charakterisiert (Yumkham et al., 2024, Carr et al., 2019, Richard et al., 2014, Joseph et al., 2004).

Außerdem wurde beschrieben, dass CD90 in Odontoblasten sowie in der Subodontoblastenschicht nachweisbar ist und möglicherweise bei der Odontoblastendifferenzierung eine Rolle spielt (Svandova et al., 2023). CD90 positive Zellen können in der Lage sein, zu Zellen der Hartgewebsbildung zu differenzieren und die Zelladhäsion sowie Zytoskelettbildung beeinflussen (Svandova et al., 2023, Hosoya et al., 2012, Leyton et al., 2019).

In einer Studie zur Expression von CD90 wurde im Tiermodell (Ratte) die Veränderung der Immunreaktivität für CD90, in unterschiedlichen Zeitabständen nach einer Kavitätenpräparation im Zahn, untersucht (Sano et al., 2019). Es wurde herausgefunden, dass CD90 positive Zellen in der Subodontoblastenschicht zu einer Heilung der Odontoblasten- und Subodontoblastenschicht beitragen können (Sano et al., 2019).

#### **5.4.2 CD34**

Der Antikörper „rabbit monoclonal anti CD34 diente in der Vergangenheit ebenfalls als Marker für endoneuronale, mesenchymale Stammzellen (Sidney et al., 2014, Richard et al., 2014, Carr et al., 2019). Des Weiteren wurde in einem Review von Sidney et. al., 2014: „Concise Review: Evidence for CD34 as a Common Marker for Diverse Progenitors“; erläutert, dass CD34 als transmembranes Phosphoglykoprotein insbesondere in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen vorkommt. Außerdem wurden in der Literatur auch Vorkommen in multipotenten mesenchymalen Stromazellen (auch in Osteozyten) und in Endothelzellen beschrieben, die unter anderem an der Angiogenese beteiligt sind (Sidney et al., 2014, Fina et al., 1990, Hristov and Weber, 2008).

CD34 positive Endothelzellen beeinflussen ebenfalls die Migration und Adhäsion von Zellen (Sidney et al., 2014). Angiogene Stimuli können eine Subpopulation von CD34 positiven Endothelzellen dazu anregen Gefäße neu zu bilden (Sidney et al., 2014, Siemerink et al., 2012). Es ist bekannt, dass es eine Untergruppe von nicht zirkulierenden adulten Endothelzellen gibt, die ebenfalls CD34 positiv sind und die insbesondere in kleinen Blutgefäßen nachweisbar sind, wohingegen größere Venen und Arterien sich vorwiegend CD34 negativ darstellen (Fina et al., 1990). CD34 positive Endothelzellen sind länglicher und besitzen weniger tight junctions als die typisch kopfsteinpflasterartigen Endothelzellen (Sidney et al., 2014, Fina et al., 1990, Siemerink et al., 2012).

Des Weiteren ist bekannt, dass CD34 ein Marker für Perizyten ist. Eine Lokalisation wurde bereits in der Tunica Adventitia von Blutgefäßen beschrieben (Lin and Lue, 2013, Wang et al., 2019, Traktuev et al., 2008).

## 5.5 Fragestellung und Ziel der Studie

Durch Zell-Zell- und Zell-Matrix Interaktionen können unterschiedliche Zelltypen in der dentalen Pulpa an der Regeneration des Dentins teilhaben. Terminal differenzierte Odontoblasten sind in der Lage reaktives Tertiärdentin zu bilden (Smith et al., 1994, Neves et al., 2017). Im Gegensatz dazu können sich die pulpalen Stammzellen zu Odontoblasten-ähnlichen Zellen differenzieren, um reparatives Tertiärdentin zu bilden (Smith et al., 2012b, Zaugg et al., 2020). Die Vitalität der dentalen Pulpa ist für die Bildung von reparativem Tertiärdentin Voraussetzung. Die Funktionen von pulpalen Stammzellen bei der Bildung des reparativen Tertiärdentins zu verstehen, bildet ein Fundament, auf das aufgebaut werden kann, um mögliche Therapien zu entwickeln.

Ferner ist der Einfluss der gesteigerten Blutversorgung durch Hyperämie, Vasodilatation, Angiogenese und die gesteigerte Diapedese von Entzündungszellen an den Ort der Inflammation als wichtige Faktoren bei der Reaktion des Zahnes auf die Noxe zu sehen.

In bereits vorliegenden Studien wurde die Expression von CD90 in gesunden und entzündeten dentalen Pulpen untersucht und nachgewiesen (Wu et al., 2022). Es fehlt jedoch ein Vergleich des Stammzellmarkers CD34 in Zellen der gesunden und entzündeten dentalen Pulpa. In Blutgefäßen der gesunden und entzündeten dentalen Pulpa wurde CD34 bereits untersucht (Digka et al., 2006, Güven et al., 2007). In diesen Studien wurde jedoch die Expression von CD34 im gesunden und entzündeten Pulpagewebe nicht quantifiziert. Es fehlt die Feststellung, ob eine Entzündung zu einer veränderten Expression von CD34 in Endothelzellen und Perizyten führen kann.

Des Weiteren wurde in diesen Studien nicht näher auf die Expressionen von CD90 und CD34 in pulpalen Stammzellen eingegangen, obwohl CD90 und CD34 als mesenchymale Stammzellmarker betrachtet werden. In der vorliegenden Studie soll daher die Frage geklärt werden, wie die Stammzellmarker CD90 und CD34 in unterschiedlichen Zellen der gesunden und entzündeten dentalen Pulpa exprimiert werden und ob es bei einer Entzündung der Pulpa zu einer Steigerung der Expression kommt. Um die Expressionen von CD90 und CD34 auf der gleichen Proteinebene unter gleichen Bedingungen zu vergleichen und zu charakterisieren, haben wir immunhistochemische Untersuchungen mittels Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex-Methode mit den spezifischen Antikörpern gegen CD90 und CD34 an aufeinander folgenden Schnitten durchgeführt.

In den geplanten Experimenten sollen daher die Antworten auf die folgenden Fragestellungen untersucht werden:

- 1. *Wie sind die Expressionsmuster der Stammzellmarker Thy1/CD90 und CD34 in Zellen der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit?***
  - 1.1 *In welchen Zellen der Dentin-Pulpa-Einheit sind die mesenchymalen Stammzellmarker Thy1/CD90 und CD34 zu finden?***
  - 1.2 *Ist eine Expression von Thy1/CD90 und CD34 in Nervenfaserbündeln, in Blutgefäßen sowie in Perizyten der gesunden dentalen Pulpa nachweisbar?***

**2. Wie sind die Expressionsmuster der Stammzellmarker Thy1/CD90 und CD34 in Zellen der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit bei einer kariösen Läsion?**

- 2.1** *Induziert Karies eine Veränderung der Expression der Stammzellmarker Thy1/CD90 und CD34 in Zellen der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit? Ist eine Expressionsänderung in neuronalen Strukturen erkennbar?*
- 2.2** *Induziert Karies in der dentalen Pulpa eine statistisch signifikante Veränderung der Expression der Stammzellmarker Thy1/CD90 und CD34 in Perizyten und in Zellen, die mit vaskulären Strukturen assoziiert sind?*

Der Erhalt einer vitalen, dentalen Pulpa ist für die Prognose eines Zahnes essenziell. Die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien, vor allem bei tiefer Dentinkaries, spielt somit eine wichtige Rolle, um die dentale Pulpa nachhaltig gesund erhalten zu können.

Durch die gewonnenen Ergebnisse der Untersuchungen an menschlichen Molaren über das ex vivo Verhalten dieser Stammzellen, sollen neue Anhaltspunkte für weitere In-vitro-Forschung geliefert werden.

Somit können in Zukunft mögliche neue Therapiestrategien bei tiefer Dentinkaries entwickelt werden. Pharmakologisch könnten speziell angepasste, dentale Unterfüllungsmaterialien, die in der menschlichen dentalen Pulpa Proliferation, Migration und Differenzierung von Stammzellen zu Odontoblasten-ähnlichen Zellen induzieren, bei der Behandlung der Dentinkaries ihre therapeutische Anwendung finden.

## 6 Material und Methoden

Im Folgenden werden die durchgeführten Experimente sowie die verwendeten Chemikalien, angesetzten Lösungen, die Erhebung der Daten und die statistische Analyse genauer erläutert.

### 6.1 Ethische Betrachtung der Studie, Patientenkollektiv

In der vorliegenden Studie wurden humane Zähne, die als anfallendes Überschussmaterial nach der Zahnextraktion entsorgt werden sollten, als Probenmaterial verwendet. Vorbereitend wurden zu Beginn der Arbeiten, die Patienten über die Nutzung der Patientendaten und der Biomaterialien (Gewebe und Körperflüssigkeiten) für medizinische Forschungszwecke aufgeklärt.

Zur Erhebung der Daten wurden insgesamt 460 Molaren von 163 Patienten im Alter von 13-89 Jahren gesammelt und klinisch diagnostiziert. Von den 163 Patienten waren 81 Frauen und 82 Männer. Die Zähne wurden aufgrund von kieferorthopädischen und anderen Gründen (Parodontitis, Karies) extrahiert. Die Zähne stellten Überschussmaterial der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten des Universitätsklinikums Mainz dar.

Histologisch diagnostiziert wurden 67 von 460 Molaren. Für die Untersuchungen wurden 12 Molaren (6 gesunde und 6 kariöse Molaren) der insgesamt 67 Molaren ausgewählt.

### 6.2 Verwendete Materialien, Reagenzien, Antikörper und angesetzte Lösungen

Im Folgenden sind die angesetzten Lösungen, Puffer und Reagenzien aufgeführt, die verwendet wurden. Im Anhang befindet sich zusätzlich eine detaillierte, tabellarische Aufführung aller Chemikalien und Materialien mit den genauen Mengenangaben sowie einem Herstellerverzeichnis (siehe Tabellen 3-7 im Anhang). Die durchgeführten Versuche und Reagenzien wurden in Anlehnung an das bereits beschriebene Vorgehen in den Arbeiten von Kufahl (2017), Chlopek (2018) und Kuithan (2021), durchgeführt und angesetzt. Entsprechend der Fragestellung wurden Änderungen vorgenommen, um die hier verwendeten Antikörper zu untersuchen.

#### 6.2.1 Angesetzte Lösungen

##### 6.2.1.1 Phosphatpuffer (PB) - 0,2 M PB, Stammlösung, pH 7,2-7,4

Zunächst wurde eine Stammlösung 0,2 molarer PB (pH-Wert 7,2-7,4) hergestellt. Zu diesem Zweck wurden 28,8 g/l Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat und 5,2 g/l Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat abgewogen und in 900 ml destilliertem Wasser gelöst (Kufahl, 2017). Mit NaOH (1 %ig) und HCl (1 %ig) folgte anschließend die Einstellung des pH-Wertes auf 7,4. Die Lösung wurde daraufhin mit einem Liter destilliertem Wasser bis zu einem Liter aufgefüllt.

##### 6.2.1.2 Phosphatpuffer (PB) - 0,1 M PB, Gebrauchslösung, pH 7,4

Zur Herstellung der Gebrauchslösung 0,1 molarer PB wurde die Stammlösung im Verhältnis 1:1 ebenfalls mit destilliertem Wasser aufgefüllt (Kufahl, 2017). Der pH-Wert wurde auf einen Wert von 7.4 eingestellt.

##### 6.2.1.3 Phosphatpuffer-Natriumchlorid (PBS) - 0,2 M PBS, Stammlösung, pH 7,2-7,4

Die Phosphatpuffer-Natriumchlorid (PBS) Stammlösung wurde nach dem Abwiegen von ebenfalls 28,8 g/l Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat und 5,2 g/l Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat sowie dem Abmessen von 17,53 g/l Natriumchlorid hergestellt (Kufahl, 2017).

#### 6.2.1.4 *Phosphatpuffer-Natriumchlorid (PBS) - 0,1 M PBS Gebrauchslösung/Waschlösung, pH 7,4*

Zur Herstellung der Gebrauchslösung/Waschlösung wurde die Stammlösung PBS im Verhältnis 1:1 mit Aqua dest. verdünnt, bis ein pH-Wert von 7,4 erreicht wurde (Kuithan, 2021). Die Zusammensetzung bestand aus 14,4 g/l Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 2,6 g/l Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat sowie 8,76 g/l Natriumchlorid (Kuithan, 2021). Mit Aqua dest. wurde, wie bereits beschrieben, der pH-Wert von 7,4 sowie das Volumen von 1000 ml erzielt.

#### 6.2.1.5 *Trispuffer (TB) - 0,5 M TB, Stammlösung, pH 7,6*

Zu Beginn wurden 60,57 g Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) in 750 ml destilliertem Wasser gelöst, um einen Liter 0,5 molarer TB-Stammlösung herzustellen. Der pH-Wert wurde durch Titration mit etwa 150 ml HCl auf einen Wert von 7,6 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung bis zu einem Liter mit destilliertem Wasser aufgefüllt und eine erneute pH-Wertkontrolle von 7,6 durchgeführt.

#### 6.2.1.6 *Tris-HCl Puffer/Gebrauchslösung*

Zur Herstellung des 0,05 molaren Tris-HCl Puffers wurden 100 ml/l TB-Stammlösung mit 800 ml/l destilliertem Wasser verdünnt (Kufahl, 2017). Der pH-Wert wurde somit auf 7,6 eingestellt (Kufahl, 2017). Anschließend wurde weiter mit Aqua dest. aufgefüllt, bis 1000 ml erreicht wurden. Eine erneute pH-Kontrolle erfolgte (Kufahl, 2017).

#### 6.2.1.7 *Trispuffer-NaCl (TBS) - 0,05 M TBS, Gebrauchslösung, pH 7,6*

Die Gebrauchslösung TBS wurde durch Lösen von 8,76 g Natriumchlorid in 800 ml destilliertem Wasser angesetzt (Kufahl, 2017). Zusätzlich wurden 100 ml 0,5 molarer TB dazugegeben, um den pH-Wert von 7,6 zu erzielen (Kufahl, 2017). Mit Aqua dest. wurde das Gemisch bis auf 1000 ml aufgefüllt und anschließend der pH-Wert von 7,6 erneut kontrolliert.

#### 6.2.1.8 *Fixierlösung (Zamboni-Lösung) (4 % Paraformaldehyd + 0,2 % Pikrinsäure + 0,1 M PBS, pH 7,4)*

Durch Mischung von 998 ml 0,1 molarem Phosphatpuffer (pH 4,7) mit 2 ml/l gesättigter Pikrinsäure (filtriert) und 40 g/l Paraformaldehyd wurde ein Liter Fixativlösung hergestellt.

#### 6.2.1.9 *Entkalkungslösung*

Die Entkalkungslösung wurde durch Mischen von 150,885 ml 4 N Ameisensäure mit 849,115 ml 0,1 molarem Phosphatpuffer oder destilliertem Wasser hergestellt (Kufahl, 2017).

#### 6.2.1.10 *Kryoprotektionslösung*

Die Kryoprotektionslösung wurde hergestellt aus 30 %iger Saccharoselösung. Hierfür wurden 30 g Saccharosepulver in 70 ml 0,1 M PBS gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

#### 6.2.1.11 *Tissue Tek® [Sakura Finetek, Tokio, Japan]*

Die Substanz besteht aus wasserlöslichen Glykolen und Harzen und wurde zum Einbetten für das Schneiden mit dem Kryostaten verwendet (Kufahl, 2017).

#### 6.2.1.12 *Triton® X-100 - 0,25 %*

Diese Lösung wurde eins bis drei Tage vor der Immunhistochemischen Inkubation angesetzt und bei 4 °C gelagert. Für 100 ml 0,25 %ige Triton® X-100 Lösung wurden 99,750 µl 0,05 M TBS sowie 100 %ige Triton® X-100 Lösung (davon 250 µl) miteinander gemischt.

#### 6.2.1.13 *Blockierungspuffer (2 % BSA + 5 % NGS in 0,05 M TBS)*

Kurz vor Beginn der immunhistochemischen Inkubation werden 950 µl 0,05 M TBS mit 20 mg bovine serum albumine (BSA) sowie 50 µl normal goat serum (NGS) angesetzt und somit 1 ml des Blockierungspuffers hergestellt.

#### 6.2.1.14 *Antikörper Verdünnungspuffer*

Dieser wurde mittels 970 µl 0,05 M TBS sowie 30 µl NGS hergestellt.

#### 6.2.1.15 ABC-Komplex (avidin biotin complex)

Die ABC-Komplex-Lösung wurde lichtgeschützt und etwa eine Stunde vor dem Start der immunhistochemischen Färbung vorbereitet. Zusammengesetzt wurde die Lösung aus 0,05 M TBS (6 ml), einem Tropfen Lösung A; (ca. 50 µl) und einem Tropfen Lösung B (ca. 50 µl).

#### 6.2.1.16 Nickelsulfatlösung

Die lichtempfindliche Lösung, jeweils 50 µl, wurde in destilliertem Wasser angesetzt (13 mg/100 ml) und in Aliquots (in kleinen Portionen von jeweils 50 µl) bei -20 °C gelagert und lichtgeschützt aufbewahrt.

#### 6.2.1.17 DAB-Lösung (Diaminobinzidin-Lösung)

Die Angaben beziehen sich auf 50 ml DAB-Lösung: Es wurden zunächst in 50 ml 0,05 M Tris-HCl eine DAB-Tablette (10 mg) eingerührt und anschließend gefiltert. Hinzugegeben wurden anschließend 50 µl Nickelsulfatlösung (13 mg/100 ml) sowie 6,5 µl 30%ig H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nach einer Wartezeit von zwei Minuten wurde die Lösung anschließend verwendet. Die DAB-Lösung ist lichtempfindlich, weshalb die Lösung unter Lichtausschluss aufbewahrt wurde.

### 6.3 Methoden

Nachfolgend werden auf die Durchführung der einzelnen Versuche sowie die Erhebung der Daten und die statistische Auswertung eingegangen.

#### 6.3.1 Ansetzen der Lösungen zur Vorbereitung der gesammelten Zähne

Zu Beginn wurden die 0,1 M PB Gebrauchslösung und die 0,1 M PBS Gebrauchslösung angesetzt und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Des Weiteren fand die Herstellung der Entkalkungslösung (4 N Ameisensäure in 0,1 M PB) unter dem Abzug statt, welche ebenfalls im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt wurde.

Es wurde ein Liter Fixationslösung (Zamboni-Lösung) (4 % Paraformaldehyd (PFA) + 0,1 M PBS + 0,2 % Pikrinsäure) angesetzt und in jeweils ein Falcon-Röhrchen (50 ml) gegeben. Die Röhrchen wurden mit dem Extraktionsdatum beschriftet und bekamen je eine fortlaufende Patientenummer zur Anonymisierung der Proben.

#### 6.3.2 Sammlung der Zähne

Die Falcon-Röhrchen wurden vor der Sammlung der Zähne, bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Die Zähne wurden nach der Extraktion direkt für 48 h - 72 h bei 4 °C in der Fixativlösung, die 0,2 % Pikrinsäure und 4 % Paraformaldehyd in 0,1 M PBS enthält, immersionsfixiert.

Etwa drei Tage später folgte die Entkalkung der Zähne in 4 N Ameisensäure in 0,1 M PB, bei ebenfalls 4 °C. Dafür wurde die Fixationslösung aus dem Röhrchen entsorgt und das Gefäß mit dem Zahn erneut mit der Entkalkungslösung befüllt. Dreimal wöchentlich erfolgte der Wechsel der Lösung für insgesamt drei Wochen. Das Datum des ersten Entkalkungstages wurde auf das Röhrchen geschrieben. Mit Strichmarkierungen wurde dahinter dokumentiert, wie oft die Lösung über die Zeit gewechselt wurde.

Die Zähne wurden daraufhin in 0,1 M PBS, mit dem pH-Wert von 7,4, für 24 Stunden bei 4 °C gewaschen. Täglich wurde die Lösung gewechselt. Erneut erfolgte die Dokumentation des Datums auf dem Röhrchen, wann die PBS-Lösung das erste Mal eingebracht wurde. Weitere Waschvorgänge wurden durch Punktmarkierungen hinter dem Datum symbolisiert.

Danach wurden die Proben für fünf Tage in die Kryoprotektionslösung mit 30 %iger Saccharoselösung in 0,1 M PBS bei einem pH-Wert von 7,4 für 24 h bei 4 °C gegeben. Nach erfolgter

Protektion konnten die Zähne eingebettet werden. Das Datum des Zeitpunktes der Saccaroprotektion wurde auf dem zugehörigen Falcon-Röhrchen dokumentiert.

Die Einbettung erfolgte in aus Aluminiumfolie gefalteten Quadern, welche nach oben hin offen waren. Sie wurden mit der Patientenummer, der Zahnnummer, des Einbettdatums und der klinischen Diagnose (Karies, gesund, Gangrän etc.) beschriftet. Die Aluminiumkästchen wurden mit Tissue-Tek<sup>®</sup> gefüllt und jeweils ein Zahn darin eingebettet. Auf eine mesio-distale Ausrichtung der Zähne in den Aluminiumkästen wurde geachtet, um eine einheitliche Schnittebene erreichen zu können. Die offene Seite der Quader konnte anschließend mit einem Deckel aus Aluminiumfolie wieder verschlossen werden, bevor, mittels flüssigen Stickstoffs bei -196 °C, die eingebetteten Proben für mindestens eine Minute schockgefroren wurden. Es erfolgte die Lagerung der Zähne bei -80 °C im Tiefkühlschrank für mindestens sieben Tage vor dem Schneiden.

### **6.3.3 Herstellung der Schnitte**

Für jeden Zahn mussten zunächst ca. 7 x 24-er Wellplatten nummeriert werden. Mit einem wasserfesten Stift wurden alle Einsenkungen der Wellplatte laufend ab der ersten Wellplatte durchnummeriert. Die erste Wellplatte endete mit der Zahl 24, die Zweite endete auf 48, die Dritte auf 72 und so weiter. Zusätzlich bekam jede Wellplatte der Reihe nach eine eigene Nummer (1, 2, 3, 4, usw.). Zusätzlich wurde die Patientenummer von außen auf die zugehörigen Wellplatten geschrieben. Die Wellplattennummer und die Patientenummer standen jeweils auf Deckel und Boden der Wellplatten. Mittels einer Pasteurpipette erfolgte die Auffüllung der Wellplatten mit 0,1 M PBS. Anschließend wurden die Wellplatten im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Einen Tag vor dem Schneiden wurde kontrolliert, dass der Kryostat bereits aktiviert und heruntergekühlt war, damit eine Temperatur von -20 °C beim Schneidevorgang gewährleistet werden konnte. Zudem mussten die Schneidemesser mit genügend zeitlichem Vorlauf in den Kryostaten zum Abkühlen gelegt werden.

Vor dem Prozess des Schneidens wurden die gefrorenen Proben mit den Zähnen für etwa zwei Stunden im Kryostaten bei -20 °C aufbewahrt, bis sie anschließend bei -20 °C geschnitten wurden. Die Aluminiumfolie wurde manuell entfernt. Die Zahnblöcke wurden mittels Tissue-Tek<sup>®</sup> auf der Objektplatte in der Kryostatenkammer fixiert. Es folgte die Übertragung der Informationen der aufgeklebten Beschriftungen des Tissue-Tek<sup>®</sup>-Blocks in ein Protokollheft. Des Weiteren wurde im Protokollheft dokumentiert, welche Wellplatten einer Patientenummer zugehörig sind.

Die Objektplatte wurde anschließend in den Objektkopf eingespannt und sicher befestigt. Hier durfte es zu keinen Lockerungen kommen, um eine gleichmäßige Schnittdicke von 30 µm erzielen zu können. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Klinge zunächst beginnend an einer Kante des Blocks, diesen in diagonaler Richtung schneidet, um einen gleichmäßigen Schnitt zu erzielen.

Vor dem Schneideprozess wurden die mit 0,1 M PBS gefüllten 24-er Wellplatten bis zum Erreichen der Solltemperatur in die Kryostatenkammer gestellt.

Geschnitten wurde zunächst manuell per Handdrehung, bis die Zahnpulpa erkannt werden konnte. Sobald dies der Fall war, wurden die Schnitte gesammelt. Nach jedem Schnitt wurde dieser mit einem Pinsel, in die 24-er Wellplatten (gefüllt mit 0,1 M PBS, pH 7,4) überführt. Die Wellplatten dienten als Aufbewahrungsort für jeden einzelnen Schnitt, bei dem die Pulpa sichtbar war. Die Proben wurden bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

War das Ende der Pulpa eines Zahnes erreicht, wurde auch das Schneiden dieses Zahnes beendet. In Abhängigkeit von der Zahngröße, wurden durchschnittlich ca. 5-10 Wellplatten für einen Zahn benötigt.

Der jeweils erste Schnitt einer 24-er Wellplatte wurde zur histologischen Diagnose und zur Begutachtung der Kariesstadien einer H&E-Färbung unterzogen. Die Zähne wurden anhand dessen allgemein in die Kategorien gesund und kariös eingeordnet sowie in separaten Objektträgerkästen aufbewahrt. Darüber hinaus fand eine weitere Selektion geeigneter Schnitte statt, die später für die immunhistochemische Färbung genommen werden konnten. Die restlichen Schnitte wurden weiterhin in der 0,1 M PBS-Lösung bei 4 °C gelagert.

#### **6.3.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung)**

Die gesammelten Zähne wurden bereits nach der Extraktion klinisch begutachtet und eine Diagnose über das Kariesstadium getroffen. Für die späteren Färbungen, mussten jedoch die Zähne zusätzlich histopathologisch nach dem Schneiden, genau begutachtet werden, um eine exakte Kategorisierung in die Stadien (gesund, kariös) vornehmen zu können.

Für die genaue histologische Diagnose der Tiefe der kariösen Läsionen an den genommenen Proben und für den Vergleich der verschiedenen Proben und späteren Färbungen, wurden die Schnitte zunächst mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt. Pro Zahn wurde der erste Schnitt jeder 24-er Wellplatte mit der H&E-Färbung behandelt.

Zu Beginn wurden die Kryoschnitte der Zähne mithilfe eines Pinsels in Küvetten, mit destilliertem Wasser, gegeben und abschließend auf einen Objektträger aufgezogen (Kuithan, 2021). Dieser wurde anschließend bei Raumtemperatur (RT) über Nacht getrocknet und senkrecht in einem Objektträgerhalter gelagert (Kuithan, 2021). Pro Zahn wurden somit mehrere Schnitte aufeinanderfolgender Pulpabereiche auf einen Objektträger gezogen. Die Schnittanzahl entsprach der Wellplattenanzahl pro Zahn.

Für die H&E-Färbung wurden die Schnitte zunächst mit destilliertem Wasser für fünf Minuten bei RT gewaschen. Anschließend wurden sie bei RT mit der Hämatoxylin-Lösung nach Mayer für zehn Minuten behandelt. Diese Lösung färbt alle sauren und somit basophilen Strukturen (z.B.: DNA, Zellkerne, Ribosomen, rER (raues Endoplasmatisches Retikulum)) blau an.

Nach der Färbung erfolgte eine Waschung für zehn Minuten in lauwarmem Leitungswasser, um die Färbung durch den dadurch gesteigerten pH-Wert zu verstärken. Hierfür wurden zwei Küvetten mit Leitungswasser gefüllt. Zunächst wurden die Objektträger für fünf Minuten in der ersten Küvette platziert. Ein Wechsel in die andere Küvette erfolgte danach für weitere fünf Minuten. Anschließend erfolgte die Inkubation der Schnitte mit der Eosin-Lösung unter dem Abzug für zehn Minuten bei RT. Der Farbstoff Eosin ist sauer und färbt somit Strukturen an, die basisch oder acidophil sind (z.B. Proteine im Zytoplasma, Mitochondrien, kollagene Strukturen).

Daraufhin wurden die Schnitte erneut mit Aqua dest. für fünf Sekunden bei RT gewaschen. Es folgte die Entwässerung mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Ethanollösungen, von 50 % (für zehn Sekunden), zu 70 % (für 15 Sekunden), zu 80 % (für eine Minute), zu 90 % (für fünf Minuten), zu 100 % (für fünf Minuten). Die Entwässerung mit absolutem, 100 %igem Ethanol geschah zweimal je fünf Minuten.

Um die Schnitte nachher mit Entellan™ einzudecken, müssen die Schnitte unter dem Abzug mit Xylol, das in Entellan™ löslich ist, behandelt werden. Dafür wurden die Schnitte in 100 %igem Xylol-I und Xylol-II, für jeweils drei Minuten eingelegt. Hierdurch wurde gewährleistet, dass eine homogene Eindeckung mit Entellan™ möglich ist.

Im letzten Schritt der Präparatherstellung wurden die Schnitte unter dem Abzug mit Entellan™ und einem Deckglas eingedeckt. Auf eine sorgfältige Eindeckung ohne Luftblasen wurde besonderen Wert gelegt, um später eine genaue Datenerhebung durchführen zu können.

Unter Lichtausschluss erfolgte die Aufbewahrung und Trocknung der Schnitte. Nach drei Tagen wurden die Objektträger in einen Objektträgerkasten eingeordnet.

Die H&E-Schnitte konnten anschließend unter dem Lichtmikroskop histopathologisch untersucht werden. Die gestellten Diagnosen wurden blind und zusätzlich von zwei weiteren Personen (J.s. und Y. K.) gestellt, ohne Kenntnis der bereits vorliegenden klinischen Diagnose, um eine mögliche Beeinflussung durch vorangegangene Ergebnisse ausschließen zu können. Zum Abschluss wurden die Ergebnisse schriftlich protokolliert.

Im Anschluss darauf erfolgte die Auswahl der Schnitte für die IHC-Inkubationen in Bezug zum Ziel der Studie. Die ausgewählten Schnitte für die IHC-Färbung wurden mit 0,1 M PBS-Lösung in den 12-er Wellplatten bei +4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Die immunhistochemische Färbung musste anschließend in den darauffolgenden sieben Tagen geschehen. War dies nicht möglich, wurde die Lösung (0,1 M PBS) einmal wöchentlich gewechselt.

### **6.3.5 Spezifität der Antikörper**

Die Spezifität der Antikörper wurde bereits in anderen Studien mittels Westernblot-Methode und in KO-Mäusen untersucht und nachgewiesen:

Der Antikörper Thy1/CD90 wurde als Marker für mesenchymale Stammzellen im Epineurium, Perineurium und Endoneurium charakterisiert (Richard et al., 2014, Carr et al., 2019, Joseph et al., 2004). CD90 wurde des Weiteren in Endothelzellen und in Perizyten nachgewiesen (Inoue et al., 2016, Pérez et al., 2022, Park et al., 2016).

Der Antikörper CD34 diente ebenfalls als Marker für endoneuronale, mesenchymale Stammzellen (Sidney et al., 2014, Richard et al., 2014, Carr et al., 2019). Es wurde in einem Review von Sidney et. al., 2014: „Concise Review: Evidence for CD34 as a Common Marker for Diverse Progenitors“; erläutert, dass CD34 als transmembranes Phosphoglykoprotein insbesondere in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen vorkommt. Außerdem wurden in der Literatur Lokalisationen in multipotenten mesenchymalen Stromazellen (auch in Osteozyten) und in Endothelzellen beschrieben, die unter anderem an der Angiogenese beteiligt sind (Sidney et al., 2014, Fina et al., 1990, Hristov and Weber, 2008). Des Weiteren diente CD34 bereits als Marker für Perizyten und wurde in der Tunica Adventitia von Blutgefäßen beschrieben (Lin and Lue, 2013, Wang et al., 2019, Traktuev et al., 2008).

In dieser Studie wurden die Antikörper der folgenden Firmen verwendet: „Rabbit monoclonal Anti Thy1/CD90 (D3V8A) (#13801; Cell Signaling Technology)“ und „Rabbit monoclonal Anti CD34 (EPR2999) (ab110643; abcam)“.

### **6.3.6 Methoden der Immunhistochemie (IHC)**

Bei den immunhistochemischen Inkubationen war darauf zu achten, dass die Farbstoffe lichtgeschützt aufbewahrt wurden, um eine mögliche Abschwächung oder gar Auslöschung der Färbungen zu verhindern. Es wurde zudem auf eine konstante RT von 20 °C bis 23 °C geachtet, da es sonst zu ungewollten Bindungen der Antikörper an anderen Stellen im Gewebeschnitt, zusätzlich zu den jeweiligen Epitopen, hätte kommen können.

Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe mit allen zu testenden Antikörpern an aufeinander folgenden Schnitten eines Molaren durchgeführt, um die richtige Antikörperkonzentration zu bestimmen. Es wurden Probeschnitte einer Wellplatte eines später IHC zu färbenden, gesunden Zahnes verwendet.

Drei 12-er Wellplatten wurden hierfür benutzt. Jeweils die erste und dritte horizontale Reihe wurden mit PBS und den aufeinanderfolgenden Schnitten eines Zahnes einer 24-er Probe-Wellplatte gefüllt. In jeder Reihe wurde ein Antikörper in den folgenden Konzentrationen getestet: 1:500/1:500, 1:800/1:500, 1:1000/1:500, 1:2000/1:500. Die beste Verdünnung jedes Antikörpers wurde für alle weiteren Untersuchungen genommen. Eine letzte Reihe der dritten 12-er Wellplatte diente als Kontrolle.

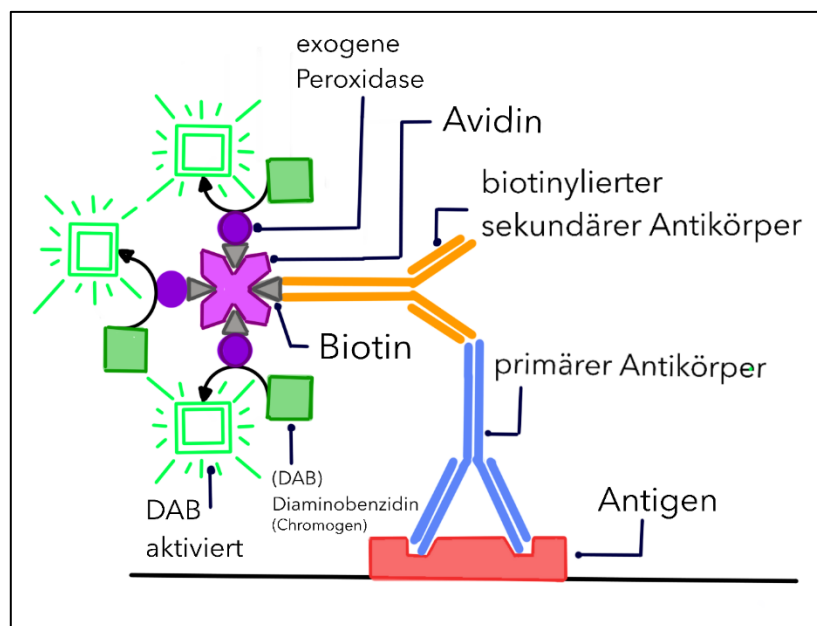
Es wurden die folgenden Konzentrationen der Antikörper verwendet:

**Tabelle 1:** Angewandte Konzentrationen bei der Inkubation mit den primären und sekundären Antikörpern

Primärer Antikörper	Verdünnung primärer Antikörper	Verdünnung sekundärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
Rabbit monoclonal Anti Thy1/CD90	1:500	1:500	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)
Rabbit monoclonal Anti CD34	1:800	1:500	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)

### 6.3.6.1 Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex Methode (ABC-Methode)

Um die untersuchten Epitope (Antigene) nachzuweisen, wurden diese zunächst mittels der ABC-Methode immunhistochemisch dargestellt. Hierbei wurden die Schnitte zuerst mit den primären Antikörpern gegen CD90 und mit CD34 inkubiert. Danach inkubierte man die Proben mit dem biotinylierten sekundären Antikörper gegen Goat Anti-Rabbit IgG (Kufahl, 2017). Dann folgte die Inkubation der Schnitte mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex. Um die Antigen-Antikörperbindung darzustellen, wurden die Schnitte mit Diaminobenzidin (DAB)-Lösung behandelt. Die chromogene Färbung von Peroxidase im ABC-Komplex durch DAB zeigte die untersuchten Epitope (Abb. 6).



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der ABC-Methode: Avidin, Biotin und die exogene Peroxidase bilden einen Komplex. Mit der ABC-Methode bindet der primäre Antikörper zunächst an das untersuchte Epitop. Infolgedessen bindet der sekundäre Antikörper (dieser ist biotinyliert) an den primären Antikörper. Da Avidin eine starke Affinität an Biotin hat, bindet der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex über Avidin an die biotinylierte Stelle des sekundären Antikörpers. Zuletzt wird die Peroxidase im ABC-Komplex, durch eine chromogene Reaktion des DAB-Substrates, sichtbar gemacht.

Zunächst erfolgte die Untersuchung mit histologisch als gesund diagnostizierten Zähnen. Jedem Antikörper wurde eine 12-er Wellplatte, die mit dem Antikörper beschriftet wurde, zugeteilt. Die 12-er Wellplatten wurden mit den zu untersuchenden Zahnschnitten, die aus einer vorher histologisch ausgesuchten 24-er Wellplatte stammten, sowie mit PBS-Lösung befüllt. Jeder Schnitt einer Wellplatte sollte infolgedessen mit jeweils einem anderen Antikörper behandelt werden. Am Ende konnten somit an aufeinander folgenden Schnitten, mikroskopisch

die Färbungen unterschiedlicher Strukturen diagnostiziert werden. Schnittnummer und Zahnnummer wurden auf den Wellplatten für jede Probe dokumentiert. Eine 12-er Wellplatte diente als Kontrolle.

Der gleiche Ablauf wurde für die Untersuchung der kariösen Zähne durchgeführt

Zu Beginn der ABC-Methode wurden die beschrifteten 12-er Wellplatten, mit den ausgewählten Zahnschnitten in 0,1 M PBS-Lösung, an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit unterschiedlichen Lösungen freischwimmend inkubiert. Die Inkubationen fanden jeweils bei RT auf einem Schüttler statt und für jeden Schnitt wurde jeweils 1 ml Lösung pipettiert.

Am **ersten Tag** erfolgte zunächst zweimal ein fünfminütiger Waschvorgang mit 0,05 M TBS mit einem pH-Wert von 7,6. Anschließend wurde zum Waschen 0,3 %iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 0,05 M TBS in die Wellplatten gegeben. Die Reaktion lief 20 Minuten lang im Dunkeln ab, damit die endogene Peroxidase gehemmt und blockiert werden konnte. Somit wurde verhindert, dass es später nicht zu falsch positiven Färbungen durch eine mögliche Bindung der DAB-Substanz an die endogene Peroxidase des gesamten Gewebes im Schnitt kam.

Es folgten zwei weitere Waschvorgänge für jeweils fünf Minuten mit 0,05 M TBS bei einem pH-Wert von 7,6 und eine anschließende 30-minütige Behandlung mit 0,25 % Triton™ X-100 und 0,05 M TBS. Triton™ X-100 diente als Tensid, um Oberflächenspannungen, die durch die Verwendung von den hier verwendeten wässrigen Lösungen entstanden sind, herabzusetzen. Damit wurde den Antikörpern ein leichter Zugang zu Ihren Epitopen ermöglicht. Triton™ X-100 permeabilisiert die Schnitte, um die Epitope vor allem in der Extrazellulärmatrix der Zellmembran und im Zellkern für den Antikörper freizulegen.

Ein weiterer zweimaliger Waschvorgang folgte für jeweils fünf Minuten mit 0,05 M TBS mit einem pH-Wert von 7,6 und eine weitere Behandlung mit den Blockierungspuffern: 2 % bovine serum albumin (BSA) sowie 5 % normal goat serum (NGS) in 0,05 M TBS für 30 Minuten, um unspezifische Bindungen von Immunglobulinen zu vermeiden. Der sekundäre Antikörper sollte sich ausschließlich an den primären Antikörper binden. Durch die Behandlung der Schnitte mit der Serumart des Tieres, in der der sekundäre Antikörper hergestellt wurde, wird die Blockade möglicher anderer Bindungsstellen im Gewebe für den sekundären Antikörper gewährleistet.

In den letzten fünf bis zehn Minuten des letzten Schrittes wurden die primären Antikörper mit 0,05 M TBS pH 7,6 verdünnt (Verdünnungen: CD34 (1:800), Thy/CD90 (1:500)). Nach der Behandlung der Schnitte mit dem Blockierungspuffer wurden die Schnitte nicht gewaschen, stattdessen erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper. Um die Hintergrundfärbung zu reduzieren, wurden pro Schnitt ca. zwei Tropfen (5 % NGS + 2 % BSA) hinzugefügt. Für fünfzehn Minuten wurden die Schnitte so bei RT behandelt und im Anschluss im Kühlraum bei 4 °C auf einem Schüttler über Nacht inkubiert.

Zu Beginn des **zweiten Tages** wurden zunächst die Schnitte ebenfalls zweimal für 15 Minuten in 0,05 M TBS mit einem pH-Wert von 7,6 gewaschen (Kuithan, 2021). In den letzten 15 Minuten des Waschvorganges fand die Verdünnung des sekundären Antikörpers in 0,05 M TBS statt (Verdünnung: Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Biotinylated (Vector laboratories) (1:500)) (Kufahl, 2017). Die Inkubation der Schnitte mit dem sekundären Antikörper geschah für eine Stunde ebenfalls auf dem Schüttler bei RT.

Nach einer halben Stunde wurde begonnen den ABC-Komplex in 0,05 M TBS-Lösung in Rollrandgläschen mit einer Verdünnung von 1:160 anzusetzen. Das Gemisch wurde unter Lichtausschluss auf den Schüttler gestellt.

Es folgte eine weitere Wäsche (zweimal für 15 Minuten) mit 0,05 M TBS mit einem pH-Wert von 7,6. Die anschließende, einstündige Inkubation der Schnitte mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (verdünnt in 0,05 M TBS) geschah im Dunkeln. Zwei weitere Wäschen mit 0,05 M TBS (pH-Wert: 7,6) unter Lichtausschluss folgten (Kuithan, 2021). Die Wäschen dauerten jeweils 15 Minuten.

In den letzten 15 Minuten wurde die DAB-Lösung unter Lichtausschluss hergestellt. Für 50 ml wurden somit 50 ml 0,05 M Tris-HCl Lösung mit einer DAB-Tablette versetzt. Diese wurde eingerührt. Im Anschluss erfolgte die Filtration der Lösung. Zugegeben wurden schließlich 50 µl Nickelsulfatlösung (13 mg/100 ml) sowie 6,5 µl 30 %igen Wasserstoffperoxids. Nach einer zweiminütigen Wartezeit wurde die Lösung sofort verwendet.

Die Inkubation der Zahnschnitte mit der hergestellten DAB-Lösung geschah für bis zu 20 Minuten auf dem Schüttler bei RT. Es wurde für jeden Antikörper seine individuelle Entwicklungszeit anhand der gewünschten Färbungsintensität bestimmt. Die Entwicklungszeit für die Behandlung mit der DAB-Lösung musste für jeden einzelnen Antikörper in allen nachfolgenden immunhistochemischen Inkubationen immer gleich gehalten werden. Dies ermöglichte gleiche Bedingungen für eine optimale Vergleichbarkeit der Färbungsintensitäten von unterschiedlichen Antikörpern miteinander.

Ein weiterer Waschvorgang mit Aqua dest. folgte zweimal für 15 Minuten. Es wurde hier explizit darauf geachtet, dass keine Wäsche mit 0,05 M TBS erfolgte, da dies zu einer Abschwächung der Nickelsulfatwirkung hätte führen können.

Vor der Eindeckung wurde eine Küvette mit destilliertem Wasser gefüllt, in die ein Schnitt, mit der Hilfe eines Pinsels, aus den 12-er Wellplatten entnommen und in eine Küvette übertragen wurde. Einer der beschriebenen Objektträger konnte nun in das destillierte Wasser gehalten werden. Mit dem Pinsel wurde im Anschluss vorsichtig der Zahnschnitt auf den Objektträger aufgezogen. Zum Schluss wurde der Objektträger bei RT für eine Stunde bei warmer Heizungsluft getrocknet und in einer Objektträger-Halterungsvorrichtung aufbewahrt. Alle weiteren Schnitte für die IHC-Inkubationen wurden ebenfalls so behandelt.

Unter dem Abzug folgte dann die Dehydrierung mit Ethanol für jeweils drei Minuten in den aufsteigenden Konzentrationen 70 %, 80 %, 90 % und 100 %. Die Entwässerung mit absolutem, 100 %igem Ethanol geschah zweimal.

Die anschließende dreiminütige Klärung der Schnitte auf den Objektträgern erfolgte mit Xylol-I und Xylol-II (Kufahl, 2017). Zum Schluss wurden die Schnitte mit Entellan™ eingedeckt (Kufahl, 2017).

Ein weiteres Mal wurde darauf geachtet, keine Luftbläschen beim Eindecken entstehen zu lassen, um die Schnitte später optimal beurteilen zu können.

Die Präparate wurden lichtgeschützt bei RT aufbewahrt. Nach drei Tagen konnten sie mikroskopiert werden.

Die Begutachtung der Präparate unter dem Mikroskop erfolgte blind von zwei erfahrenen Wissenschaftlern (Y.K., J.S.).

Bei allen IHC-Inkubationen wurde pro-Zahnreihe auch ein Schnitt für die immunhistochemische Kontrolle verwendet (Kuithan, 2021). Um die Spezifität der sekundären Antikörper und der immunhistochemischen Reagenzien (BSA, NGS, 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zu testen, wurden nur die primären Antikörper in den IHC-Kontroll-Inkubationen ausgelassen (Kuithan, 2021). Die Kontrollschnitte wurden dann bei allen weiteren Inkubationsschritten der IHC gleich behandelt.

### **6.3.7 Quantifizierung der Resultate und Statistik**

Zur Analyse der Expressionsmuster der einzelnen Stammzellmarker wurden die Färbungsintensitäten von Blutgefäßen und Perizyten mittels Densitometrie bestimmt und anschließend statistisch ausgewertet.

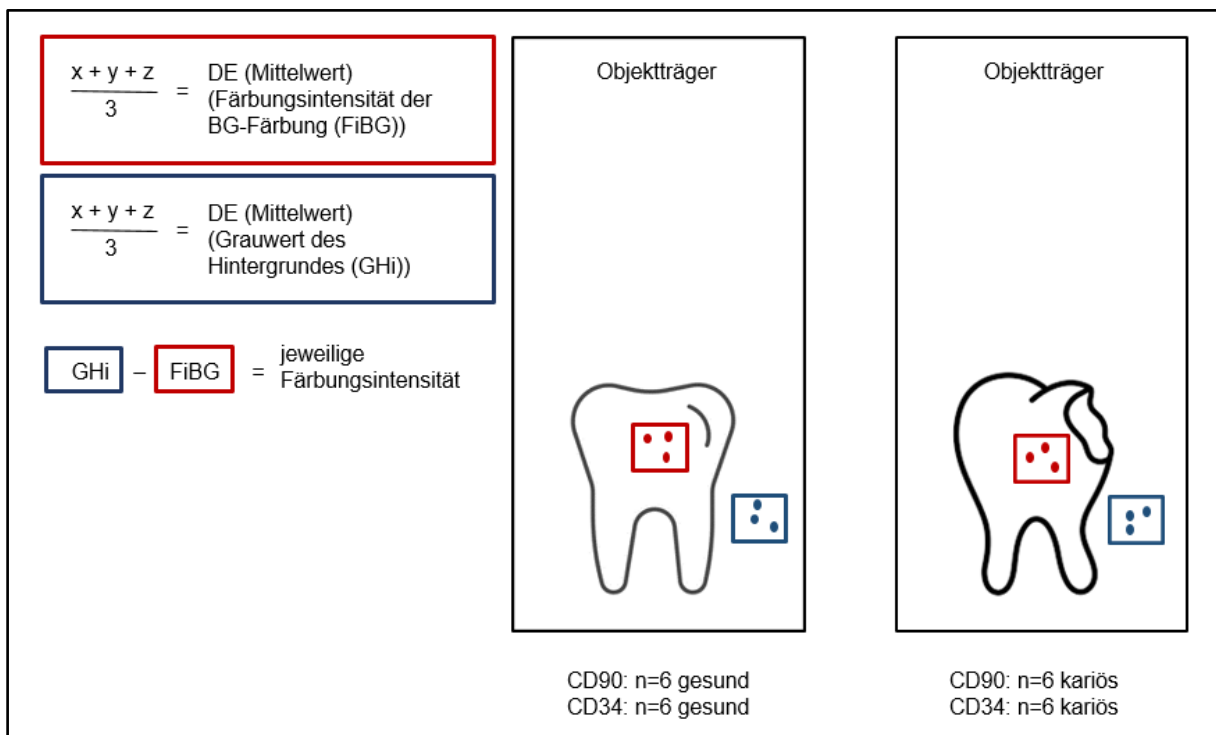
### 6.3.7.1 Messung der immunhistochemischen Färbungsintensitäten (= Densitometrie)

Für die Messung der immunhistochemischen Färbungsintensitäten wurden zunächst Bilder der Präparate, die mit der ABC-Komplexmethode angefärbt wurden, angefertigt. Es wurde hierbei eine Kamera (Leica DFC 295) verwendet, die an einem Lichtmikroskop der Marke Leica (IDENT-Nr. 116217) angeschlossen wurde. Die Vergrößerung der untersuchten subzellulären Regionen, wurde mit einem 40x-Objektiv und dem Programm LAS V3.6 aufgenommen. Um die Färbungsintensitäten zu messen, wurde die ImageJ Software (V1.54k) verwendet.

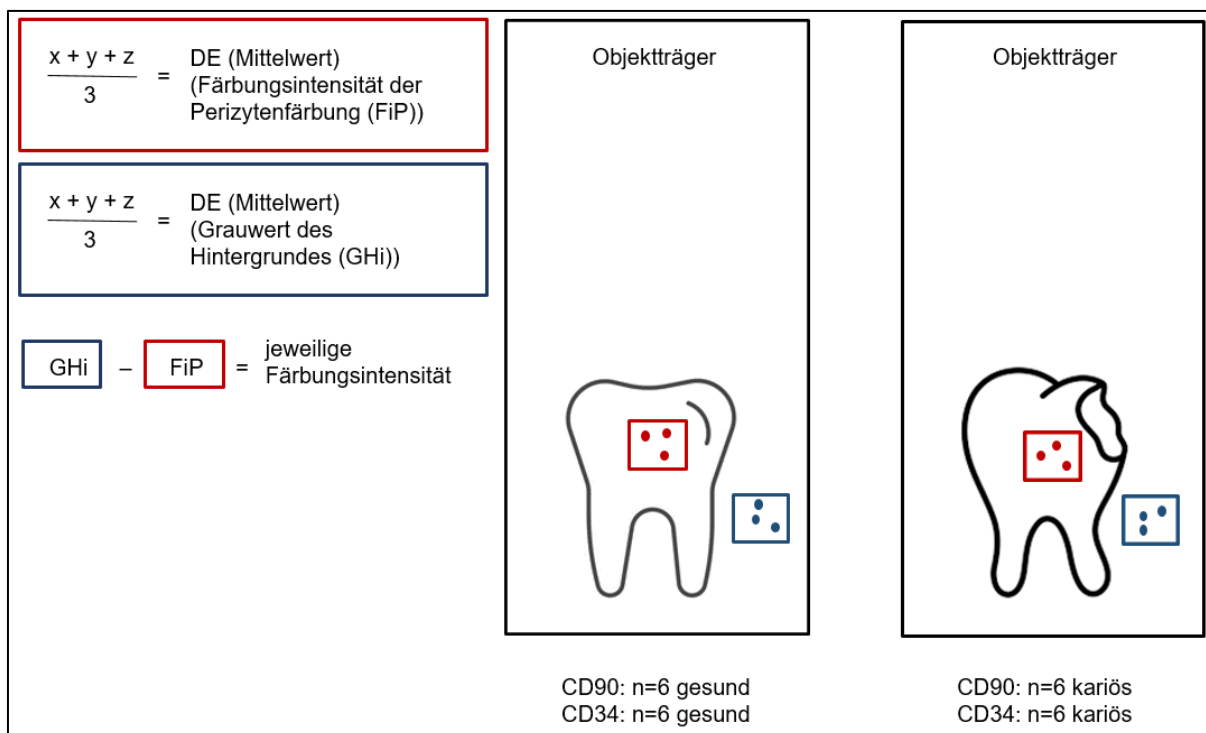
Die Analyse der immunhistochemischen Färbungsintensitäten wurde unabhängig voneinander an Blutgefäßen und Perizyten durchgeführt, um eine Differenzierung der Densitometrischen Befunde sowie eine jeweils separate statistische Auswertung vornehmen zu können.

Die Auswertung der Färbungsintensitäten wurde wie folgt durchgeführt: Zunächst wurden Präparate von gesunden und entzündeten Molaren bestimmt. Es wurde pro Schnitt jeweils ein Bild mit 40-facher Vergrößerung außerhalb des Zahnschnittes (am Objektträgererrand) erstellt und ein Bild in der zu interessierenden Region (mit Darstellung der Blutgefäße bzw. mit Darstellung der Perizyten). In jedem Bild wurden jeweils drei unterschiedliche Flächen bestimmt, um mit dem Programm ImageJ die gemittelte Färbungsintensität des jeweiligen Bildausschnittes zu bestimmen. In dem Bild mit der Darstellung von Blutgefäßen bzw. der Perizyten wurde darauf geachtet, Bereiche zu messen, in denen Blutgefäße bzw. Perizyten abgebildet wurden.

Von den drei Werten des jeweiligen Bildes wurde der Mittelwert (die densitometrische Einheit (DE) des Bildes) bestimmt. Der Mittelwert des Bildes außerhalb des Zahnschnittes stellte den Grauwert des Hintergrundes (GHi) dar. Der Mittelwert des Bildes mit der zu interessierenden Region, stellte die Färbungsintensität der Blutgefäßfärbung (FiBG) bzw. die Färbungsintensität der Perizytenfärbung (FiP) dar. Es wurde im Anschluss der Mittelwert der Blutgefäßmessung/ Perizytenmessung von dem Mittelwert der Hintergrundfärbung abgezogen, um die jeweilige Färbungsintensität, abzüglich der Hintergrundfärbung, pro Schnitt und Färbung bestimmen zu können (Abb. 7, Abb. 8).



**Abbildung 7:** Schaubild zur densitometrischen Analyse der Blutgefäßfärbung. Bestimmung der densitometrischen Werte von drei Stichproben eines Bildausschnittes ( $x+y+z$ ). **(DE):** Densitometrische Einheit. **(Roter Kasten):** Färbungsintensität der Blutgefäßfärbung (**FiBG**) als Mittelwert aus  $x, y, z$ . **(Blauer Kasten):** Grauwert des Hintergrundes (**GHi**) als Mittelwert aus  $x, y, z$ . Von dem Minuenden (**GHi**) wird zur Bestimmung der Differenz (**jeweilige Färbungsintensität**) der Substrahend (**FiBG**) abgezogen.



**Abbildung 8:** Schaubild zur densitometrischen Analyse der Perizytenfärbung. Bestimmung der densitometrischen Werte von drei Stichproben eines Bildausschnittes ( $x+y+z$ ). **(DE):** Densitometrische Einheit. **(Roter Kasten):** Färbungsintensität der Perizytenfärbung (**FiP**) als Mittelwert aus  $x, y, z$ . **(Blauer Kasten):** Grauwert des Hintergrundes (**GHi**) als Mittelwert aus  $x, y, z$ . Von dem Minuenden (**GHi**) wird zur Bestimmung der Differenz (**jeweilige Färbungsintensität**) der Subtrahend (**FiP**) abgezogen.

Somit wurden die Färbungsintensitäten von CD34 und CD90 von sechs gesunden und sechs entzündeten Molaren unterschiedlicher Patienten ermittelt. Es folgte die statistische Auswertung der erhobenen Daten, um zu ermitteln, ob es zu einer Intensitätssteigerung der Färbungen bei einer Entzündung des Zahnes kommt.

### 6.3.7.2 Statistische Analyse

Eine statistische Analyse der Densitometrie wurde durchgeführt, um Unterschiede in der Expression von CD34 und CD90 bei gesunden und kariösen Zähnen zu untersuchen. Die Normalverteilung wurde mithilfe von Q-Q-Plots visuell überprüft. Es wurden unabhängige t-Tests durchgeführt, um die Mittelwerte von CD34 und CD90 zwischen beiden Gruppen zu vergleichen. Die t-Tests waren einseitig und testeten die Hypothese, dass gesunde Zahnproben niedrigere Mittelwerte der CD34 und CD90 Expression aufwiesen als kariöse Zähne. Um zu testen, ob die Unterschiede zwischen den Gruppen signifikant waren, wurde ein Signifikanzwert von  $p \leq 0,05$  berücksichtigt. Alle Analysen wurden mit RStudio (RStudio PBC, Boston, USA, 2024.4.2.764) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p \leq 0,050$  festgelegt.

Um die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen in Bezug auf die Stammzellmarker zu untersuchen, wurde eine zweifach gemischte Varianzanalyse (ANOVA) mit der Gruppe (gesunde vs. kariöse Patienten) und dem Proteintyp (CD34 und CD90) als Faktoren durchgeführt. Um wiederholte Messungen innerhalb der Teilnehmer zu berücksichtigen, wurde ein Fehlerterm für die ID zwischen den Proteinmessungen einbezogen. Es wurden paarweise Post-hoc-Vergleiche unter Verwendung geschätzter marginaler Mittelwerte (emmeans) mit Bonferroni-Anpassung durchgeführt, um Unterschiede zwischen beiden Gruppen für jeden Proteintyp einzeln zu untersuchen.

Die statistische Analyse wurde im Bezug zu den Färbungsintensitäten der Blutgefäße und im Bezug zu den Färbungsintensitäten der Perizyten jeweils getrennt durchgeführt.

## **7 Ergebnisse**

Es ist bekannt, dass in der Zahnheilkunde Unterschiede zwischen der gestellten klinischen Diagnose und den histopathologischen Befunden eines gesunden oder entzündeten Zahnes bestehen können. Eine sichere Diagnose kann nur histopathologisch gestellt werden. Basierend auf dieser Tatsache wurden alle Zahnproben dieser Studie klinisch und zusätzlich histopathologisch charakterisiert. Hierfür wurden die Zähne mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

### **7.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung und histopathologische Diagnose**

Alle angefertigten Schnitte eines Zahnes wurden in durchschnittlich sechs 24-er Wellplatten gesammelt. Der erste Schnitt jeder 24-er Wellplatte wurde mittels HE-Färbung untersucht. Somit wurden pro Zahn etwa sechs bis zehn Schnitte mit gleichem Schnittabstand histopathologisch charakterisiert. Die histopathologische Auswertung der Schnitte wurde von zwei Wissenschaftler/innen (Y.K, J.S.) durchgeführt. Nach der Bestimmung der histopathologischen Diagnose erfolgte die Auswahl der Wellplatten mit geeigneten Schnitten für die IHC-Färbungen.

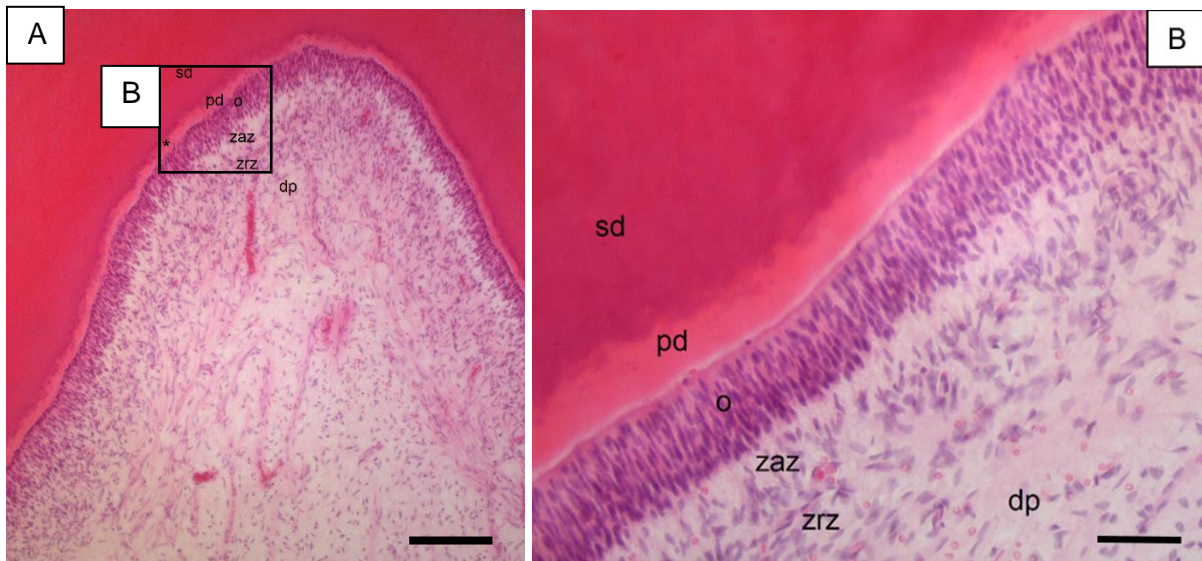
#### **7.1.1 Histopathologische Diagnose der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit**

Die gesunde Dentin-Pulpa-Einheit stellte sich im histologischen Bild wie folgt dar: Durch die durchgeführte Entkalkung fehlt der Zahnschmelz. Das Dentin umgibt die Pulpa von peripher. Man kann eine Einteilung des Dentins in die unterschiedlichen Dentinarten vornehmen: Das Primärdentin zeigt eine starke Eosin-Färbung. Unterhalb des Primärdentins ist die Sekundärdentinschicht mit einer hellen Eosin-Färbung zu erkennen.

Die Pulpa grenzt direkt mit einem Saum aus sich basophil darstellenden Odontoblasten an das Prädentin. Ausgehend von den Odontoblasten kann man histologisch ein dünnes Streifenmuster innerhalb des Dentins erkennen, welches aufgrund der Odontoblastenfortsätze und Dentinkanälchen hervorgerufen wird und sich bis zur Schmelz-Dentingrenze erstreckt.

Unterhalb der Odontoblastenschicht befindet sich eine zellarme Zone (Weil'sche-Zone), an die die zellreiche Zone (bipolare Zone) grenzt. In unmittelbarer Nähe der bipolaren Zone befindet sich der Raschkowsche Nervenplexus sowie der subodontoblastische Kapillarplexus (Abb. 9).

Die Färbung der Pulpa ist homogen.



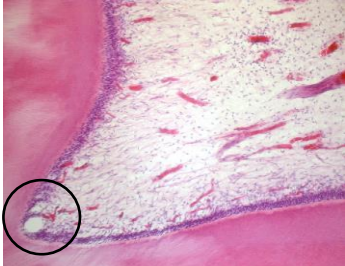
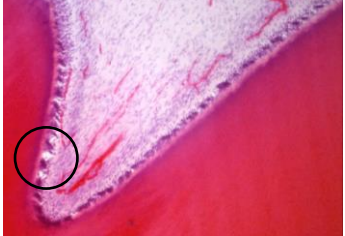
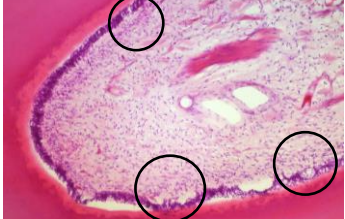
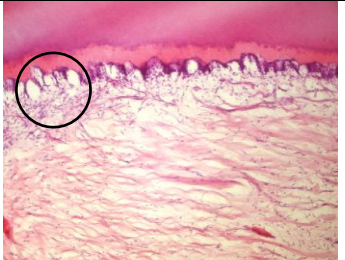
**Abbildung 9:** Histologie der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Entkalkter Schnitt.

- (A)** Gesunder Zahn im Längsschnitt, 10x Vergrößerung, Messbalken= 100 µm. Das Dentin umgibt die Pulpa von peripher. An das Sekundärdentin (**sd**), welches sich im Laufe des Lebens bildet, ist das hypomineralisierte Primärdentin (**pd**) nach zentral hin angelagert. Es umgibt die dentale Pulpa (**dp**) zirkulär und steht mit ihr über den Odontoblastensaum (**o**) in Kontakt.
- (B)** 20x vergrößerter Ausschnitt der Dentin-Pulpa-Grenze (\*), Messbalken= 50 µm. Unterhalb des Odontoblastensaumes schließen sich die zellarme (Weil'sche-) Zone (**zaz**) und die zellreiche Zone (**zrz**) an.

In vielen Schnitten wich die klinisch gestellte Diagnose eines gesunden Zahnes von der histopathologisch festgestellten Diagnose ab. So wurden beispielsweise unter den ersten 27 H&E gefärbten Zähnen (die klinisch als gesund diagnostiziert wurden) lediglich sechs als histologisch gesund befundet. Die anderen Zähne wiesen Kriterien der Odontoblastendegeneration (OD) auf. Zur genaueren Definition der Odontoblastendegeneration wurde die Einteilung von Chlopek „Subzelluläre Expression und Phosphorylierung der ERK1/2 in gesunden und degenerierten humanen Odontoblasten mit der Berücksichtigung einer neuen Klassifizierung der Odontoblastendegeneration“ modifiziert und erweitert (Chlopek, 2018):

**Tabelle 2:** Einteilung der Odontoblastendegeneration, modifiziert nach Chlopek (2018)

Grad	Charakteristika	Beispiel
gesund	Strukturelle Ordnung der einzelnen Zellschichten (Dentin, Prädentin ( <b>pd</b> ), Odontoblastenschicht ( <b>o</b> ), zellarme Zone ( <b>zaz</b> ), zellreiche Zone ( <b>zrz</b> ) und dentale Pulpa).	

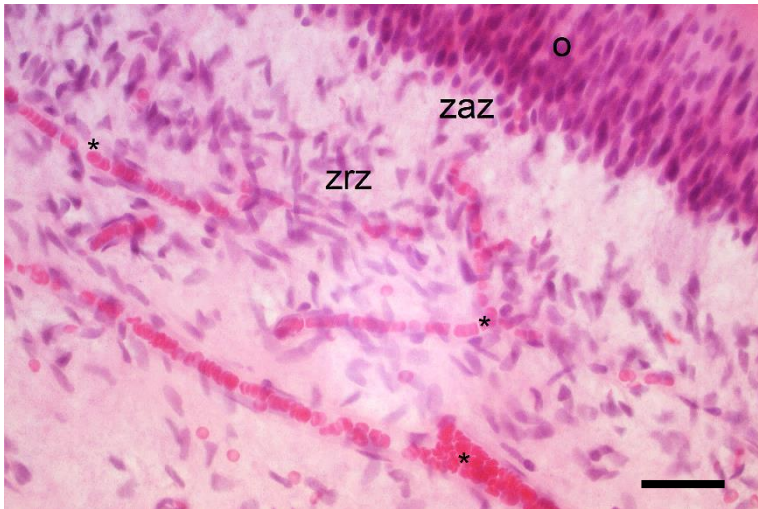
OD I	Einzelne Vakuolen in der Odontoblastenschicht – an einer Wand, ggf. Hyperämie.	
OD II a	Einzelne Vakuolen in der Odontoblastenschicht – an zwei Wänden.	
OD II b	Vermehrtes Auftreten größerer Vakuolen – an drei Wänden.	
OD III a	Viele, große Vakuolen – an mehr als drei Wänden	
OD III b	Große Vakuolen an allen Wänden, die zelluläre Ordnung ist nicht mehr erkennbar (keine zellreiche-/zellarme Zone).	
Nekrose	Die Zellen der Pulpa sind untergegangen, teils finden sich große zelleere Bereiche, Zelldetritus ist zu erkennen	

## 7.1.2 Histopathologische Diagnose der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit

Die entzündete Dentin-Pulpa-Einheit stellte sich entsprechend der verschiedenen Dentinkariesstadien (initiale Dentinkaries, Dentinkaries, tiefe Dentinkaries) unterschiedlich histopathologisch dar.

### 7.1.2.1 Die Entzündung der dentalen Pulpa bei einer initialen Dentinkaries

Histologisch lässt sich eine Hyperämie erkennen, die sich im Vergleich zum gesunden Präparat darstellt. Die Vasodilatation dient der Permeabilitätserhöhung zwischen den Endothelzellen der Kapillaren. Es kommt infolgedessen zu einer Plasmaexsudation. Neutrophile Granulozyten sowie Entzündungsmediatoren können in das umliegende Gewebe gelangen und eine Immunantwort hervorrufen (Abb. 10).

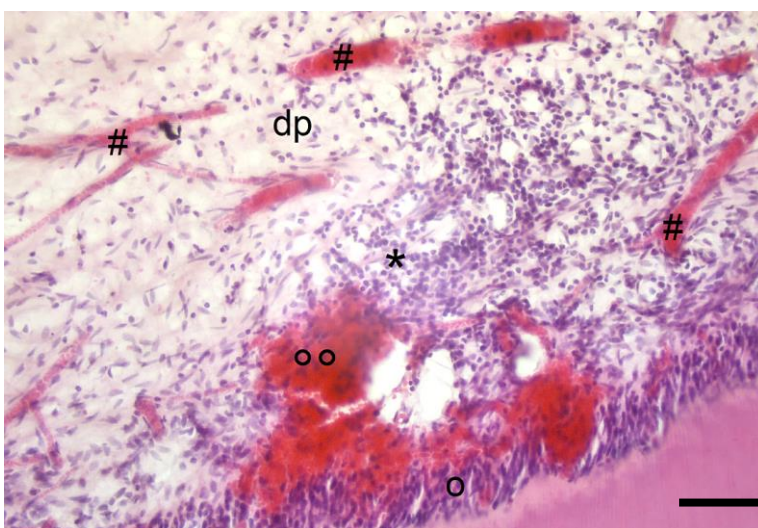


**Abbildung 10:** Histopathologie der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Entkalkter Schnitt, 40x Vergrößerung, Messbalken= 25 µm. Odontoblasten (o), zellarme Zone (zaz), zellreiche Zone (zrz), hyperämische Blutgefäße (\*).

#### 7.1.2.2 Entzündung der dentalen Pulpa bei einer Dentinkaries

Es kommt infolge der Dentinkaries zu einer akuten Entzündung sowie einer neurogenen Entzündung. Die Vasodilatation führt zu einer Permeabilitätssteigerung der Gefäße mit Plasmaexsudation. Der Gewebsdruck steigt, dadurch nimmt jedoch die Blutzufuhr in die Pulpa ab. Es kommt zur Infiltratbildung im Koronal- und Wurzelbereich, man spricht auch von einer Pulpitis acuta serosa partialis oder radicularis (im Wurzelbereich).

Neutrophile Granulozyten und Makrophagen können migrieren und sich in der Entzündungsregion ansammeln. Dendritische Zellen erkennen pathogene Strukturen und sind in der Lage, Peptide auf ihrer Oberfläche mittels des MHC-Komplexes zu präsentieren. Nach dem Kontakt mit dem Pathogen, wandern sie in den nächstgelegenen Lymphknoten und induzieren über T-Zellen eine Immunantwort, die infolgedessen zum Ort des Geschehens wandern, um die bakterielle Infektion abzuwehren und zu eliminieren (Abb. 11).



**Abbildung 11:** Histopathologie der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Entkalkter Schnitt, 20x Vergrößerung, Messbalken= 50 µm. Odontoblasten (o), hyperämische Blutgefäße (#), Erythrozyten (°), Entzündungszellinfiltrat (\*), dentale Pulpa (dp).

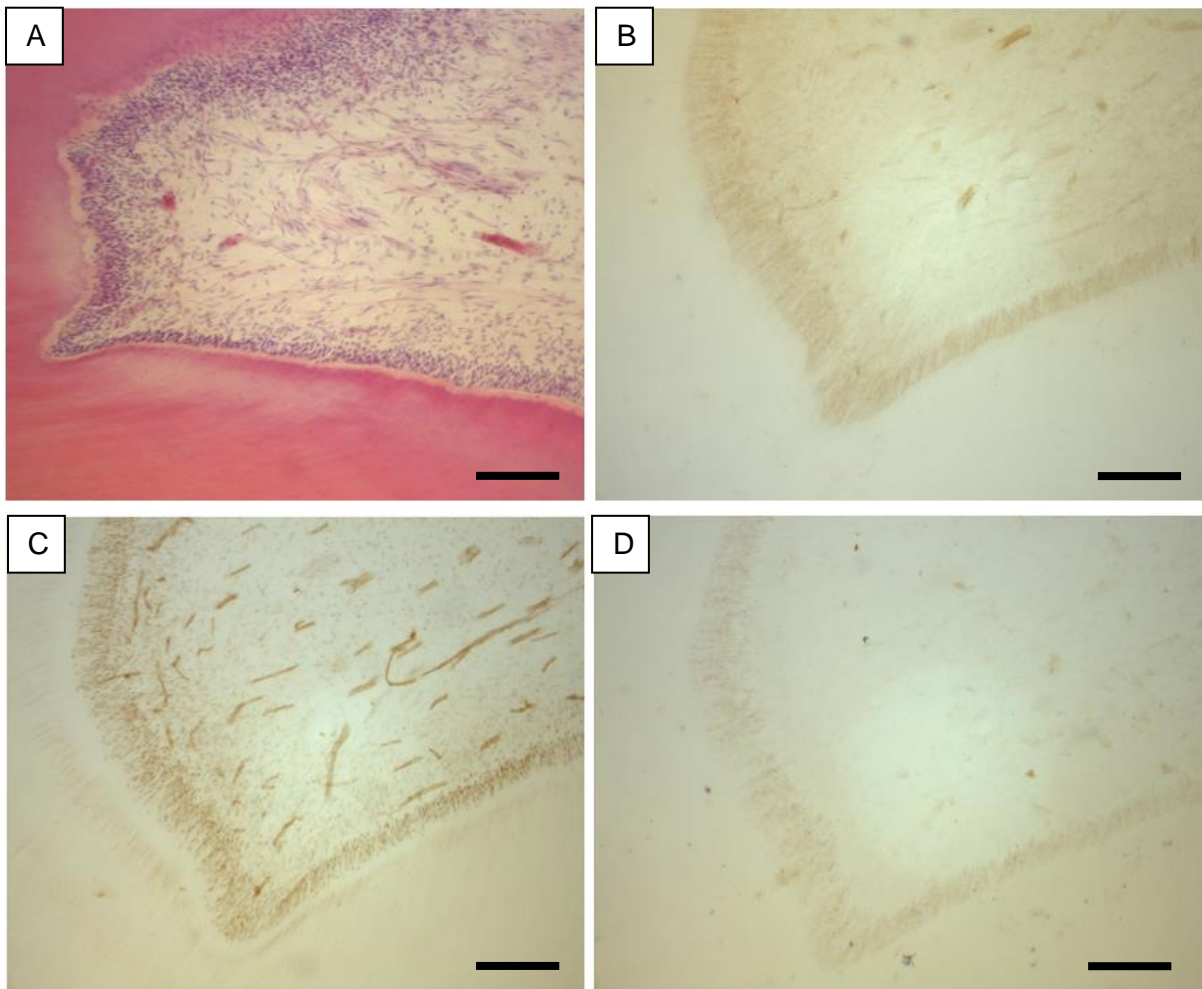
### 7.1.2.3 Entzündung der dentalen Pulpa bei einer tiefen Dentinkaries

Zusätzlich zu den oben genannten Punkten der akuten Entzündung ist die tiefe Dentinkaries mit einer chronischen Entzündung assoziiert. Es liegt somit eine akute und eine chronische Entzündungsregion vor. Zusätzlich zu den oben aufgezählten Zelltypen kommen nun auch vermehrt Mastzellen und Plasmazellen im Gewebe vor. Es kann zur purulenten Infiltratbildung im Koronal- und/oder Wurzelbereich kommen. Dann wird von einer Pulpitis acuta purulenta partialis oder pulpitis acuta purulenta radicularis gesprochen.

## 8 Ergebnisse der ABC-Methode

Durch die ABC-Methode sollten die Lokalisation der Stammzellmarker CD90 und CD43 näher bestimmt und deren Expression im gesunden und entzündeten Gewebe anschließend densitometrisch sowie statistisch untersucht werden.

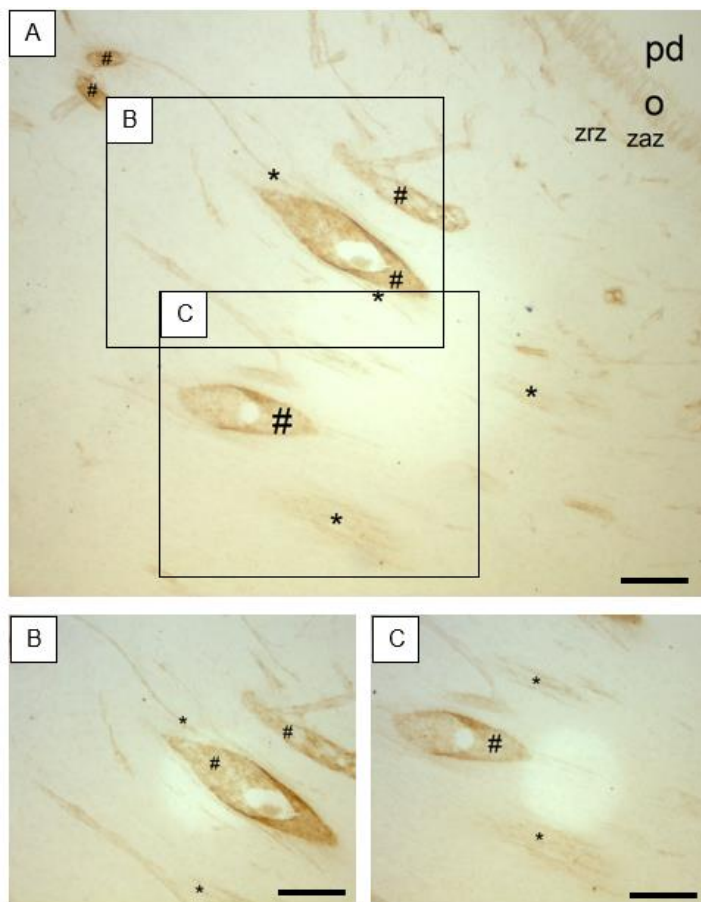
### 8.1 Expressionsmuster und Lokalisation von Thy1/CD90 und CD34 in Zellen der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit



**Abbildung 12:** Histologie der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit. (A) HE-Färbung. (B) Immunhistochemische Färbung mit CD90. (C) Immunhistochemische Färbung mit CD34. (D) Kontrollschnitt. Entkalkter Schnitt. 10x Vergrößerung, Messbalken= 100 µm. Aufeinanderfolgende Schnitte.

Thy1/CD90 wird als mesenchymaler Stammzellmarker betrachtet. Aufgrund dessen wurde in der vorliegenden Studie die Expression von Thy1/CD90 in Stammzellen (einschließlich endoneuronaler Stammzellen), die auch in Nervenfaserbündeln der Dentin-Pulpa-Einheit vorkommen, untersucht. Des Weiteren ist bekannt, dass CD90 in Endothelzellen exprimiert ist und bei der Angiogenese eine Rolle spielt (Pérez et al., 2022, Brenet et al., 2020, Schubert et al., 2013, Schubert et al., 2011). Auch eine mögliche Beteiligung bei der Hartgewebsbildung wird diskutiert (Svandova et al., 2023, Hosoya et al., 2012, Leyton et al., 2019).

Bei den Untersuchungen wurde insbesondere eine Färbung in Blutgefäßen und Perizyten nachgewiesen (Abb.16). In einer Subpopulation von Zellen innerhalb der Nervenfaserbündel war ebenfalls CD90 nachzuweisen (Abb. 15). Die Odontoblasten wiesen ebenso eine leichte Färbung auf (Abb. 12). In Blutgefäßen und Nervenfaserbündeln wurde Thy1/CD90 ebenfalls deutlich exprimiert (Abb. 13, Abb. 15).



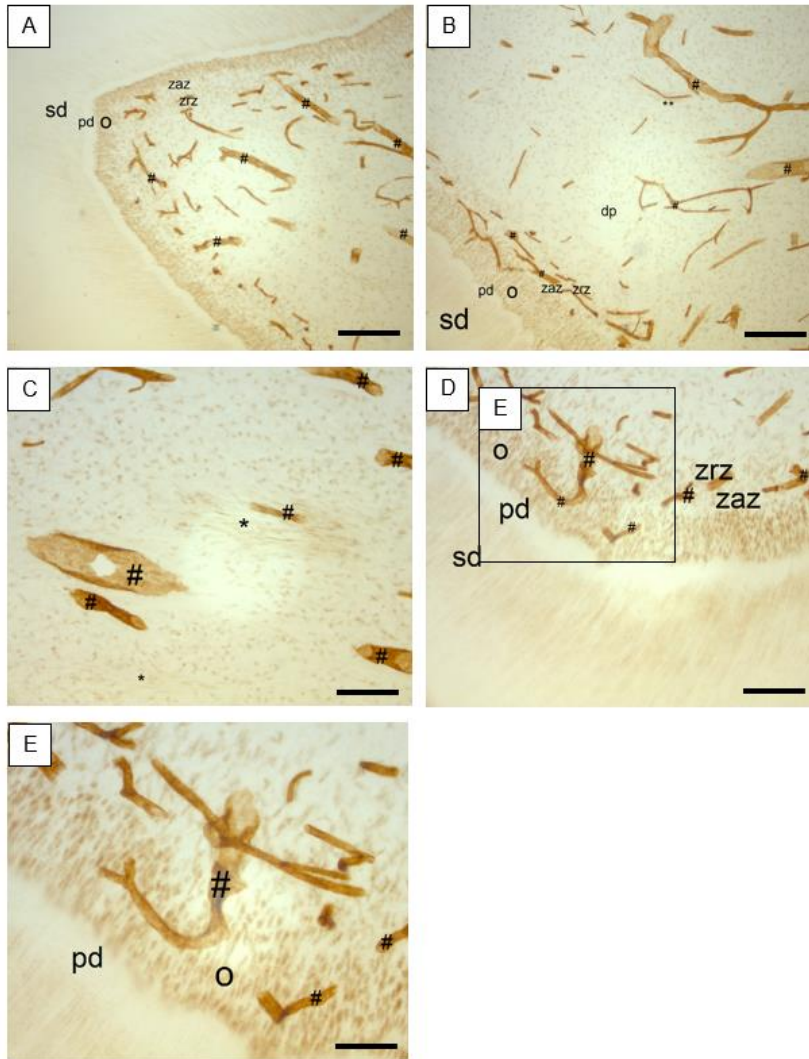
**Abbildung 13:** Histologie der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit. Immunhistochemische Färbung mit CD90. Entkalkter Schnitt. Prädentin (**pd**), Odontoblasten (**o**), zellarme Zone (**zaz**), zellreiche Zone (**zrz**), Nervenfasern und Nervenfaserbündel (**\***), Blutgefäße (**#**).

**(A)** Übersichtsaufnahme in 20x Vergrößerung, Messbalken= 50 µm: In der dentalen Pulpa sind einige Nervenfasern und Nervenfaserbündel (**\***) erkennbar, die in Richtung der koronalen Pulpa ziehen. Es ist der subodontoblastische Plexus in der zellreichen Zone (**zrz**) erkennbar.

**(B und C)** Vergrößerung jeweils eines zentralen Ausschnittes in 40x Vergrößerung, Messbalken= 25 µm: Deutlich ist eine Färbung der Blutgefäße (**#**) erkennbar. Die Nervenfasern und Nervenfaserbündel (**\***) begleiten diese teilweise.

Die Expression von CD34 wurde in Blutgefäßen, die oft in Begleitung von dicken und dünnen Nervenfaserbündeln vorkamen, mit unterschiedlichen Färbungsintensitäten detektiert. Einige

Blutgefäße wiesen eine deutlich schwächere Färbung auf als andere. Es konnte bei einer 40-fachen Vergrößerung eine Färbung von Perizyten erkannt werden (Abb.16). Auch in zellulären Strukturen, in denen Nervenfasern und Blutgefäße in enger räumlicher Beziehung standen, wurde eine Immunreaktivität für CD34 identifiziert. Teilweise wurden auch Nervenfasern und Nervenfaserbündel angefärbt. In den abgebildeten Nervenfaserbündeln war sowohl für CD90 als auch für CD34 eine Subpopulation stärker gefärbter Zellen erkennbar (Abb. 14, Abb. 15).

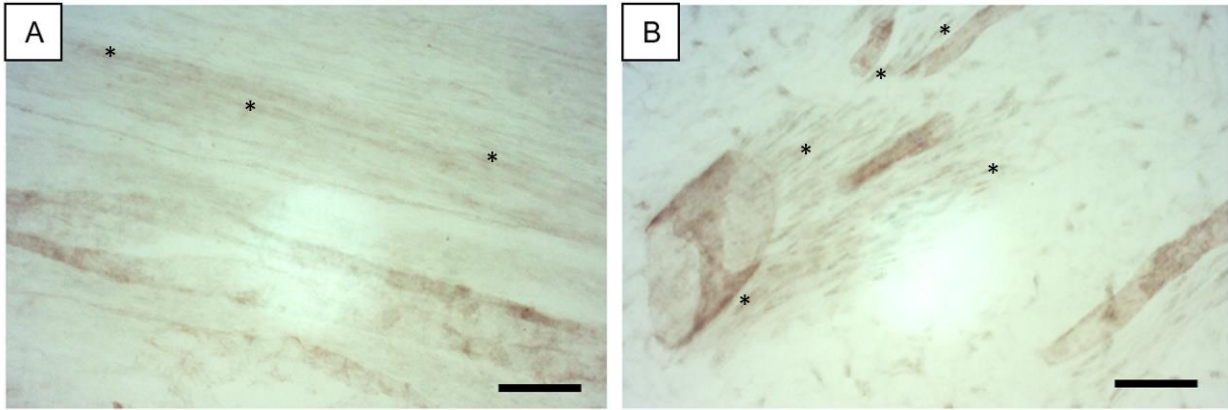


**Abbildung 14:** Histologie der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit. Immunhistochemische Färbung mit CD34. Entkalkter Schnitt. Sekundärdentin (**sd**), Prädentin (**pd**), Odontoblasten (**o**), zellarme Zone (**zaz**), zellreiche Zone (**zrz**), dentale Pulpa (**dp**), Nervenfasern und Nervenfaserbündel (**\***), Blutgefäße (**#**).

**(A und B)** Übersichtsaufnahme mit 10x Vergrößerung, Messbalken= 100 µm: In der dentalen Pulpa sind die Blutgefäße (**#**) deutlich angefärbt. Sie verzweigen sich in Richtung der Odontoblastenschicht.

**(C)** 40x Vergrößerung eines zentralen Ausschnittes in der dentalen Pulpa, Messbalken= 25 µm: Deutlich ist eine Färbung der Blutgefäße (**#**) erkennbar. Die Nervenfaserbündel (**\***) begleiten diese teilweise.

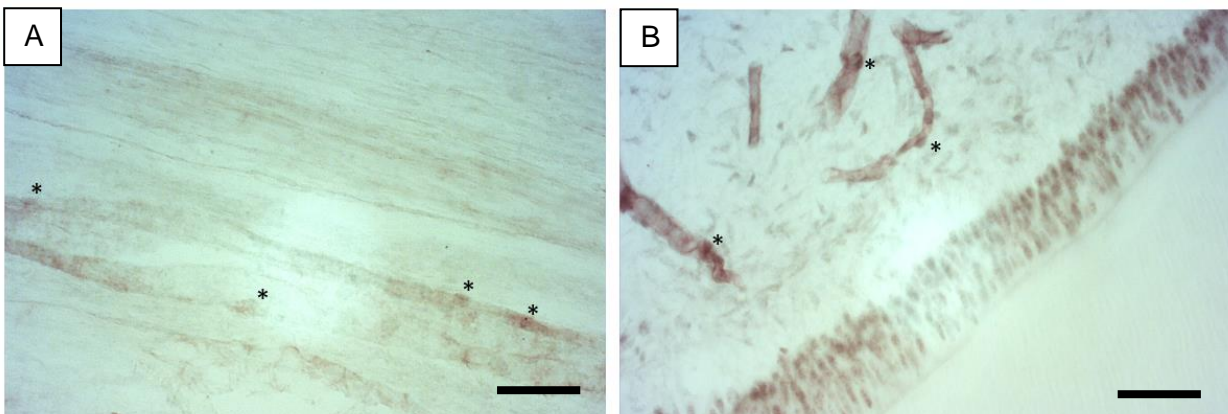
**(D und E)** (D) 20x Vergrößerung, Messbalken= 50 µm, (E) 40x Vergrößerung eines Ausschnittes der Dentin-Pulpa-Grenze, Messbalken= 25 µm: Die Blutgefäße (**#**) ziehen in Richtung der Odontoblastenschicht und bilden einen Kapillarplexus auf Höhe der zellreichen Zone.



**Abbildung 15:** Histologie der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit. Immunhistochemische Färbung mit CD90 (A) und CD34 (B) am selben Zahn. Entkalkter Schnitt. 40x Vergrößerung, Messbalken= 25 µm.

**(A) CD90:** Deutlich ist der Verlauf eines Nervenfaserbündels in der oberen Bildhälfte zu erkennen. Ein Blutgefäß ist ebenfalls angeschnitten. Eine Subpopulation von Zellen innerhalb des Nervenfaserbündels erscheint intensiver gefärbt (\*).

**(B) CD34:** Ein breites Blutgefäß und eine Kapillare werden von einem Nervenfaserbündel begleitet. Eine Subpopulation von Zellen innerhalb des Nervenfaserbündels ist deutlich intensitätsstärker (\*).

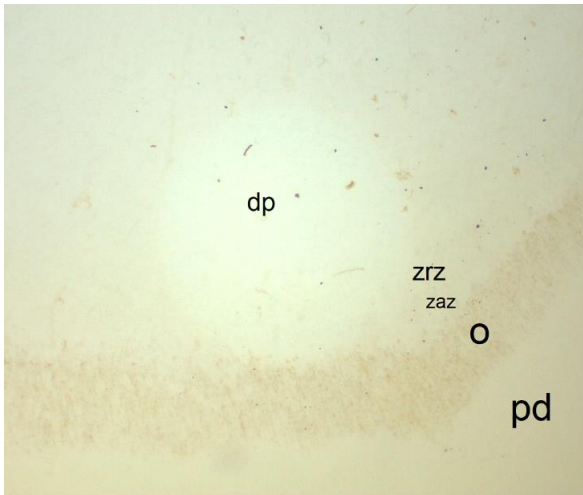


**Abbildung 16:** Histologie der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit. Immunhistochemische Färbung mit CD90 (A) und CD34 (B). Entkalkter Schnitt. 40x Vergrößerung, Messbalken= 25 µm.

**(A) CD 90:** Darstellung von Kapillaren mit Perizyten (\*).

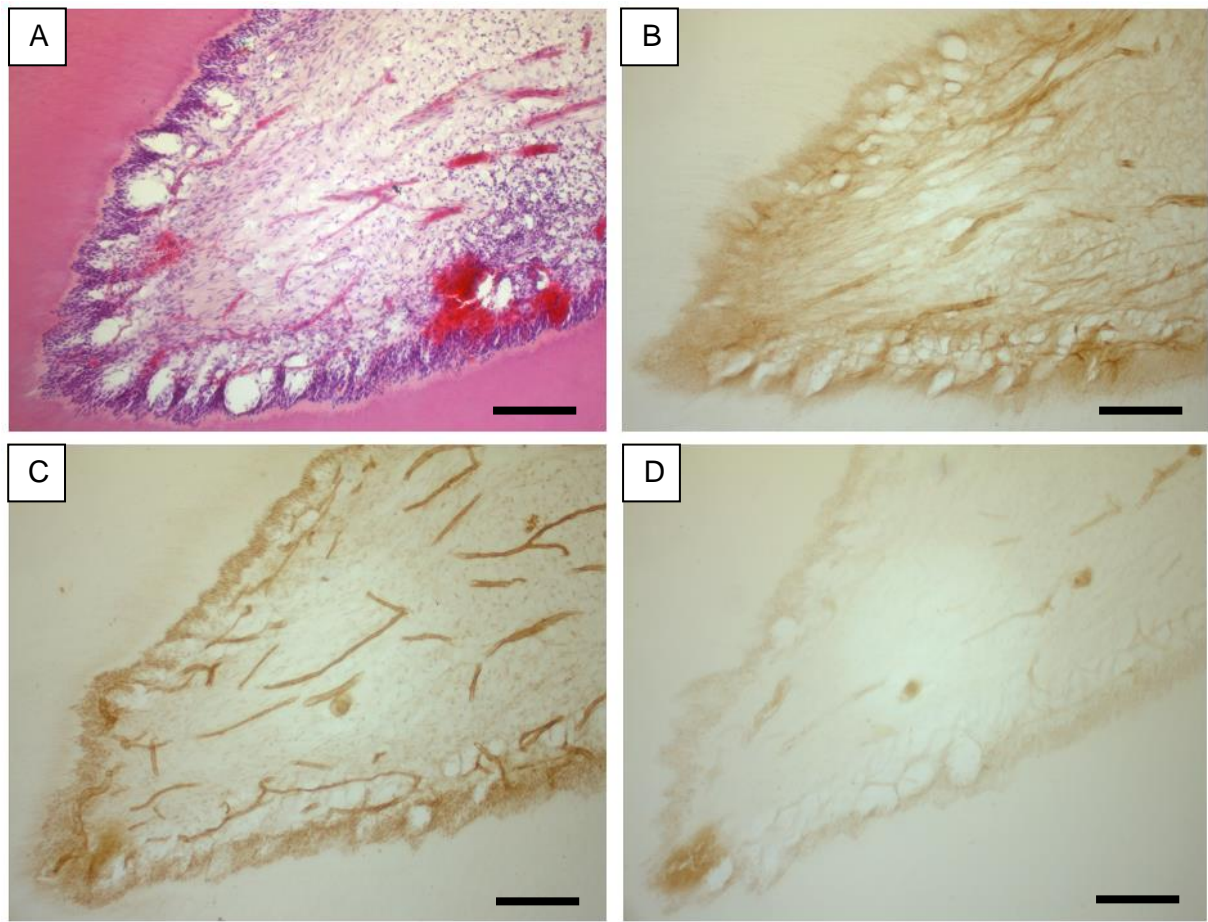
**(B) CD34:** Darstellung von Kapillaren mit Perizyten (\*).

In den Kontrollschnitten wurde lediglich eine schwache Hintergrundfärbung detektiert (Abb. 17).

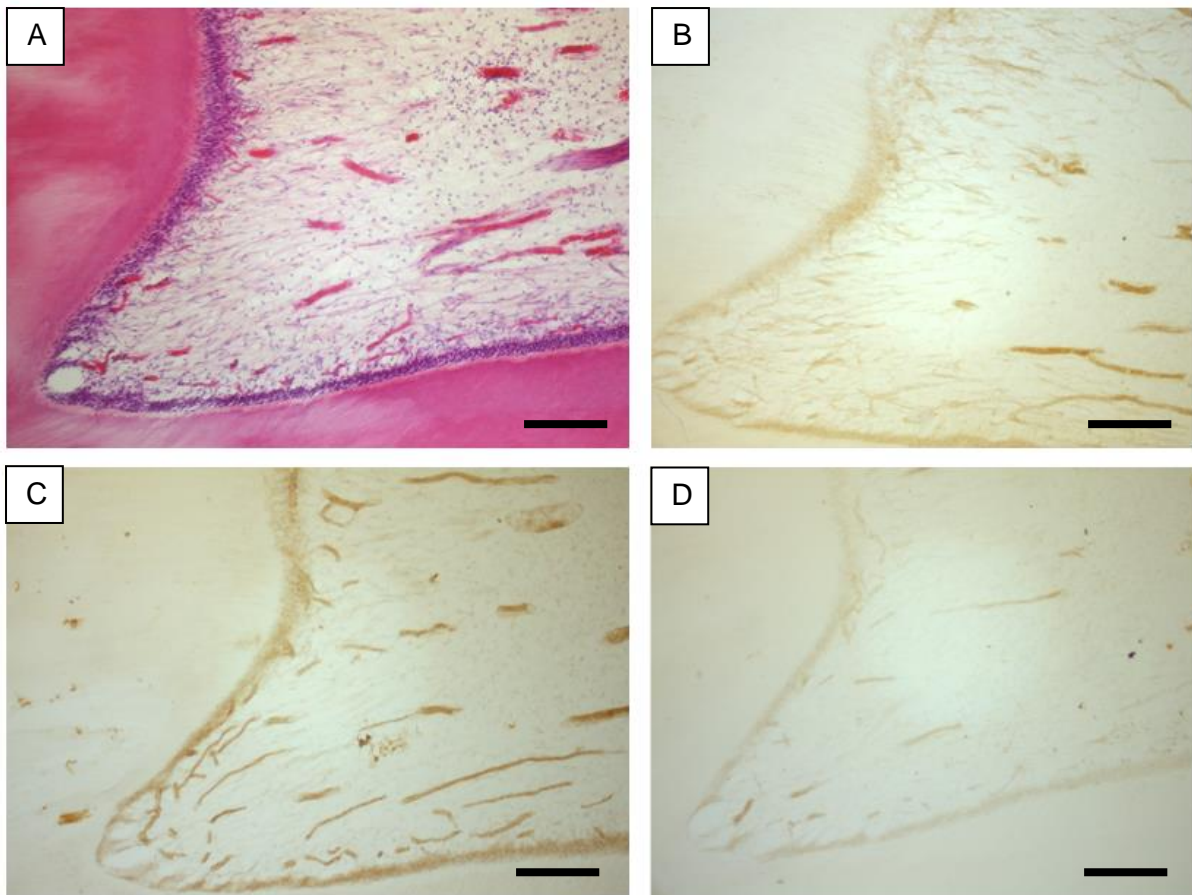


**Abbildung 17:** Histologie der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit. Kontrollschnitt. Entkalkter Schnitt, 10x Vergrößerung, Messbalken= 100 µm. Prädentin (**pd**), Odontoblasten (**o**), zellarme Zone (**zaz**), zellreiche Zone (**zrz**), dentale Pulpa (**dp**). Dargestellt ist eine leichte Hintergrundfärbung der Odontoblastenschicht.

## 8.2 Expressionsmuster und Lokalisation von Thy1/CD90 und CD34 in Zellen der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit

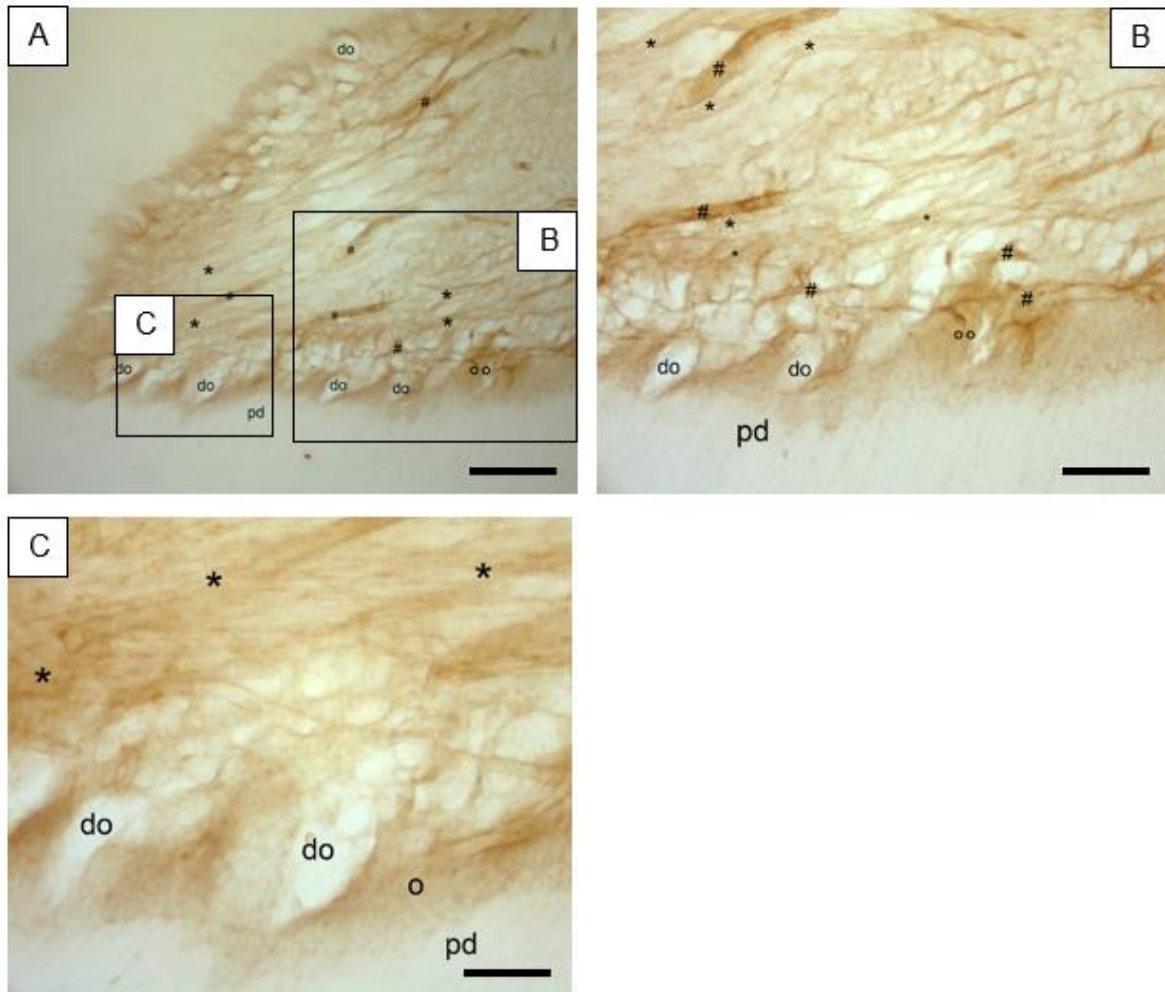


**Abbildung 18:** Histologie der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit bei iDK. (A) HE-Färbung. (B) Immunhistochemische Färbung mit CD90. (C) Immunhistochemische Färbung mit CD34. (D) Kontrollschnitt. Entkalkter Schnitt. 10x Vergrößerung, Messbalken= 100 µm. Aufeinanderfolgende Schnitte.



**Abbildung 19:** Histologie der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit bei iDK. (A) HE-Färbung. (B) Immunhistochemische Färbung mit CD90. (C) Immunhistochemische Färbung mit CD34. (D) Kontrollschnitt. Entkalkter Schnitt. 10x Vergrößerung, Messbalken= 100 µm. Aufeinanderfolgende Schnitte.

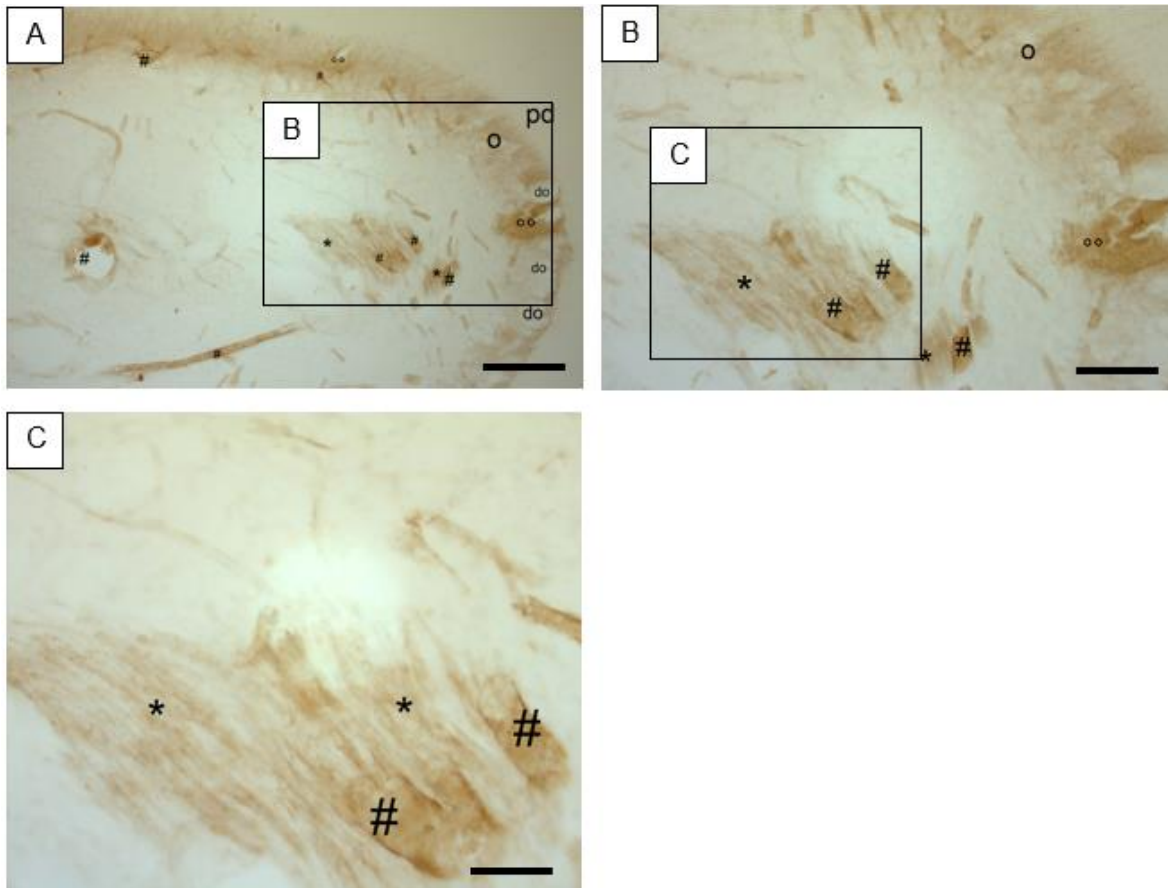
Blutgefäße und Nervenfasern der entzündeten dentalen Pulpa zeigten insgesamt eine Zunahme der Expression für CD90, verglichen mit den Färbungsintensitäten der gesunden Pulpa (Abb. 24). Perizyten wurden ebenfalls stärker angefärbt (Abb. 25). Insbesondere unterhalb der Läsionsstelle ist eine Intensitätszunahme in der Nähe der teilweise degenerierten Odontoblastenschicht erkennbar. Des Weiteren ist eine Zunahme der Nervenfaser- und Blutgefäßanzahl direkt unterhalb der Läsionsstelle auffällig. Die Odontoblastenschicht und die Subodontoblastenschicht erscheinen stark gefärbt (Abb. 20, 21).



**Abbildung 20:** Histologie der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit bei iDK. Immunhistochemische Färbung mit CD90. Entkalkter Schnitt. Prädentin (pd), Odontoblasten (o), degenerierte Odontoblasten (do), Nervenfasern und Nervenfaserbündel (\*), Blutgefäße (#), Erythrozyten (\*°).

**(A)** Übersichtsaufnahme in 10x Vergrößerung, Messbalken= 100 µm: In der Odontoblastenschicht (o) befinden sich vereinzelt große, degenerierte, ballionierte Odontoblasten (do). Eine Einblutung in dieser Schicht bis in die dentale Pulpa sind erkennbar (\*°). Es sind Nervenfasern (\*) und Blutgefäße (#) angefärbt. Die Nervenfasernzahl (\*) erscheint im Vergleich zum gesunden Zahn gestiegen zu sein. Die Nervenfasern (\*) ziehen aus der Pulpa in Richtung der Odontoblastenschicht (o). Die Odontoblastenschicht (o) und die Subodontoblastenschicht sind stark gefärbt.

**(B und C)** Die Vergrößerung ((B): 20x, Messbalken= 50 µm. (C): 40x, Messbalken= 25 µm) zeigt die Anfärbung von Blutgefäßen (#) und Nervenfasern (\*) sowie die ballionierten Odontoblasten (do). Die Blutgefäße (#) befinden sich oft in Begleitung von Nervenfasern (\*).



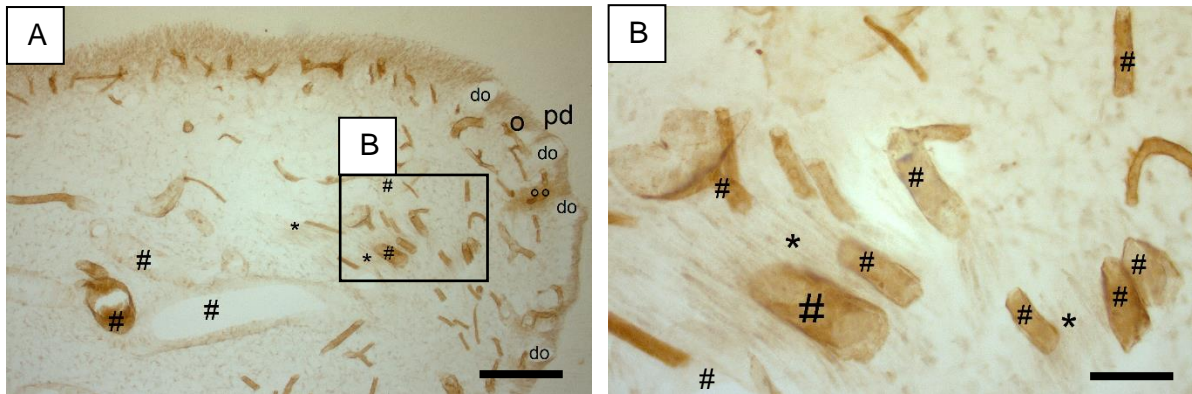
**Abbildung 21:** Histologie der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit bei iDK. Immunhistochemische Färbung mit CD90. Entkalkter Schnitt. Prädentin (**pd**), Odontoblasten (**o**), degenerierte Odontoblasten (**do**), Nervenfasern und Nervenfaserbündel (\*), Blutgefäße (#), Erythrozyten (°°).

**(A)** Übersichtsaufnahme in 10x Vergrößerung, Messbalken= 100 µm: In der Odontoblastenschicht (**o**) befinden sich vereinzelt große, degenerierte, ballonierete Odontoblasten (**do**). Einblutungen in dieser Schicht bis in die dentale Pulpa sind erkennbar (°°).

**(B und C)** Die Vergrößerung ((B): 20x, Messbalken= 50 µm. (C): 40x, Messbalken= 25 µm) zeigt die Anfärbung von Blutgefäßen (#) und Nervenfasern (\*), die oft einen gemeinsamen Weg beschreiben.

Insbesondere CD34 wies eine Intensitätszunahme der Färbung in Blutgefäßen und Perizyten auf (Abb. 25). Teilweise waren Intensitätsunterschiede von Blutgefäßen erkennbar. Einige waren einheitlich stark gefärbt, wohingegen andere (meist größere Blutgefäße) einheitlich schwach gefärbt waren. Mit den Blutgefäßen angeschnittene Nervenfasern wurden ebenfalls dargestellt (Abb. 24). Die Blutgefäße hatten eine starke Assoziation zur teilweise degenerierten Odontoblastenschicht. Im Vergleich zum gesunden Zahn war eine Zunahme der Blutgefäßanzahl histologisch zu erkennen (Abb. 22, 23).

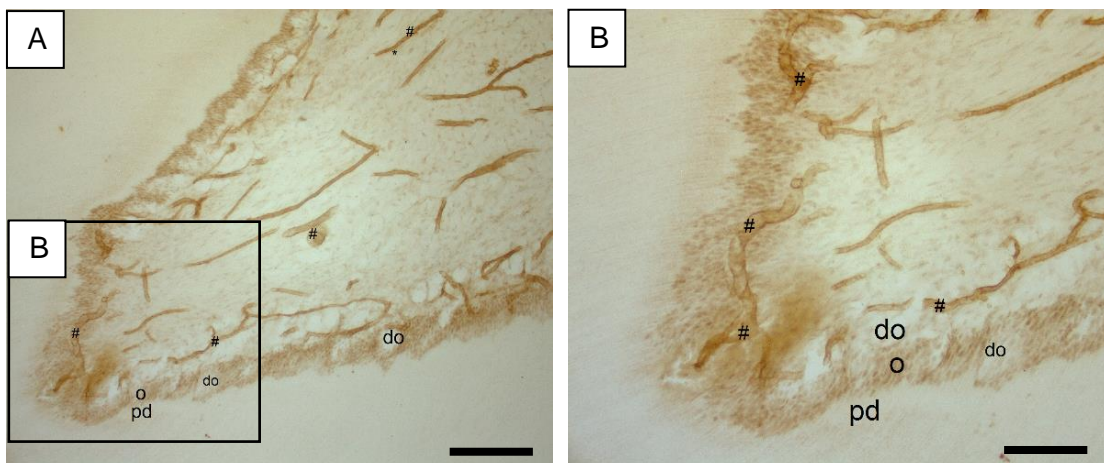
Innerhalb der Nervenfaserbündel ist eine Subpopulation intensiver gefärbter Zellen erkennbar. Diese stellen sich sowohl bei der Färbung mit CD90 als auch bei der Färbung mit CD34 dar (Abb. 21, 22, 24).



**Abbildung 22:** Histologie der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit bei iDK. Immunhistochemische Färbung mit CD34. Entkalkter Schnitt. Prädentin (**pd**), Odontoblasten (**o**), degenerierte Odontoblasten (**do**), Nervenfasern und Nervenfaserbündel (\*), Blutgefäße (**#**), Erythrozyten (°°).

**(A)** Übersichtsaufnahme in 10x Vergrößerung, Messbalken= 100 µm: In der Odontoblastenschicht (**o**) befinden sich vereinzelt große, degenerierte, ballionierte Odontoblasten (**do**). Einblutungen in dieser Schicht bis in die dentale Pulpa sind erkennbar (°°). Es sind Intensitätsunterschiede der Blutgefäße (**#**) untereinander erkennbar. Einige sind nur blass gefärbt, wohin gegen andere stark gefärbt sind.

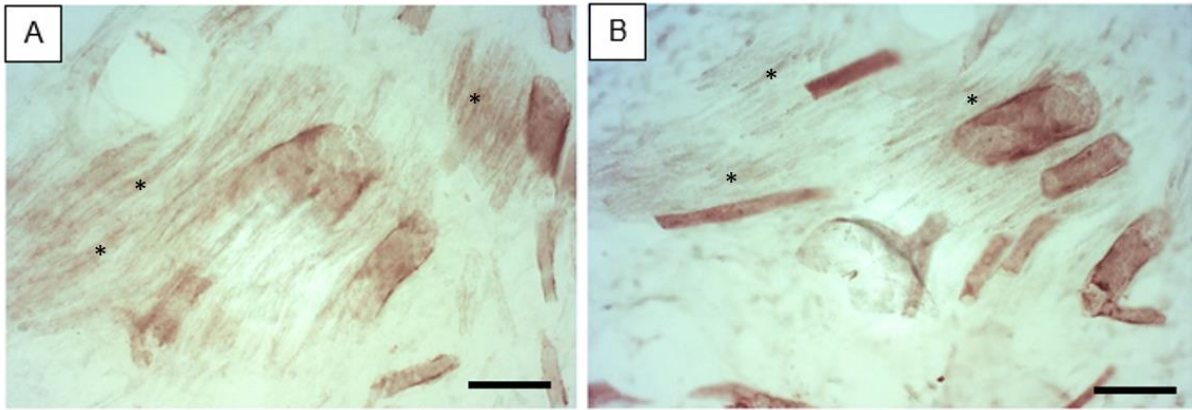
**(B)** Die 40x Vergrößerung (Messbalken= 25 µm) zeigt die Anfärbung von Blutgefäßen (**#**) und Nervenfasern (\*), die oft einen gemeinsamen Weg beschreiben. Links unten im Bild ist ein schwach gefärbtes Blutgefäß (**#**) dargestellt, wohingegen die anderen Blutgefäße (**#**) im Bild eher stark gefärbt sind.



**Abbildung 23:** Histologie der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit bei iDK. Immunhistochemische Färbung mit CD34. Entkalkter Schnitt, Messbalken = 29,6 µm, Prädentin (**pd**), Odontoblasten (**o**), degenerierte Odontoblasten (**do**), Nervenfasern und Nervenfaserbündel (\*), Blutgefäße (**#**).

**(A)** Übersichtsaufnahme in 10x Vergrößerung, Messbalken= 100 µm: In der Odontoblastenschicht (**o**) befinden sich vereinzelt große, degenerierte, ballionierte Odontoblasten (**do**). Es sind Intensitätsunterschiede der Blutgefäße (**#**) untereinander erkennbar. Einige sind nur blass gefärbt, wohin gegen andere stark gefärbt sind.

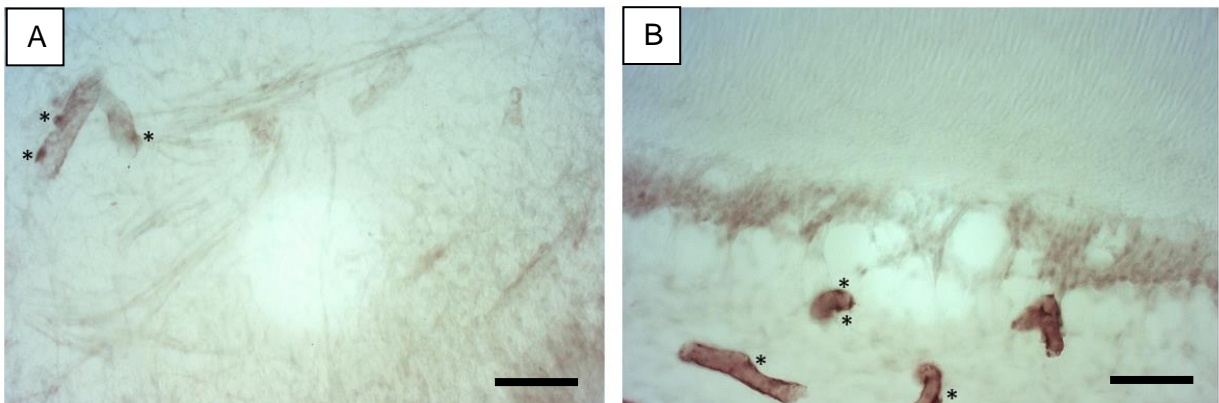
**(B)** Die 20x Vergrößerung (Messbalken= 50 µm) zeigt die Anfärbung von Blutgefäßen (**#**), die eine starke Assoziation zur teilweise degenerierten Odontoblastenschicht (**o/do**) haben.



**Abbildung 24:** Histologie der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit bei iDK. Immunhistochemische Färbung mit CD90 (A) und CD34 (B) am selben Zahn. Entkalkter Schnitt. 40x Vergrößerung, Messbalken= 25 µm.

**(A)** CD 90: Deutlich ist der Verlauf eines Nervenfaserbündels entlang der Blutgefäße zu erkennen. Innerhalb des Nervenfaserbündels erscheinen einige Zellen stärker gefärbt (\*).

**(B)** CD34: Ein breites Blutgefäß und mehrere Kapillaren werden von einem Nervenfaserbündel begleitet. Eine Subpopulation von Zellen innerhalb des Nervenfaserbündels ist deutlich intensitätsstärker (\*).

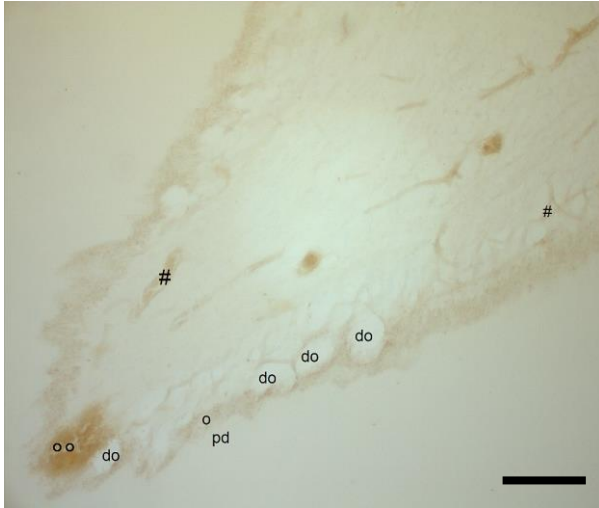


**Abbildung 25:** Histologie der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit bei iDK. Immunhistochemische Färbung mit CD90 (A) und CD34 (B). Entkalkter Schnitt. 40x Vergrößerung, Messbalken= 25 µm.

**(A)** CD 90: Darstellung von Kapillaren mit Perizyten (\*).

**(B)** CD34: Darstellung von Kapillaren mit Perizyten (\*).

In den Kontrollschnitten wurde lediglich eine schwache Hintergrundfärbung detektiert (Abb. 26).



**Abbildung 26:** Histologie der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit bei iDK. Kontrollschnitt. Entkalkter Schnitt, 10x Vergrößerung, Messbalken= 100 µm. Prädentin (**pd**), Odontoblasten (**o**), degenerierte Odontoblasten (**do**), Blutgefäße (**#**), Erythrozyten (**°°**). Dargestellt ist eine leichte Hintergrundfärbung der Odontoblastenschicht (**o**) sowie der Blutgefäße (**#**) und Erythrozyten (**°°**).

### 8.3 Densitometrische Auswertung der CD90 und CD34 positiven Zellen

Um zu testen, ob es durch eine Entzündung der dentalen Pulpa zu einer Intensitätssteigerung der Färbungen in Blutgefäßen bzw. in Perizyten und somit zu einer Expressionssteigerung von CD90 und CD34 kommt, wurde eine densitometrische Messung durchgeführt und diese statistisch ausgewertet.

Es wurden zunächst pro Zahn jeweils die gemittelten Färbungsintensitäten von CD90 und CD34 im Bereich von Blutgefäßen bzw. Perizyten von den gemittelten Grauwerten im Bereich ohne Präparat (Hintergrundfärbungen) subtrahiert, um für jedes Präparat einen eigenen Intensitätswert zu bestimmen. Somit konnten statistisch die Färbungsintensitäten der gesunden Zähne (n=6) mit den Färbungsintensitäten der entzündeten Zähne (n=6) verglichen werden.

### 8.4 Statistische Analyse

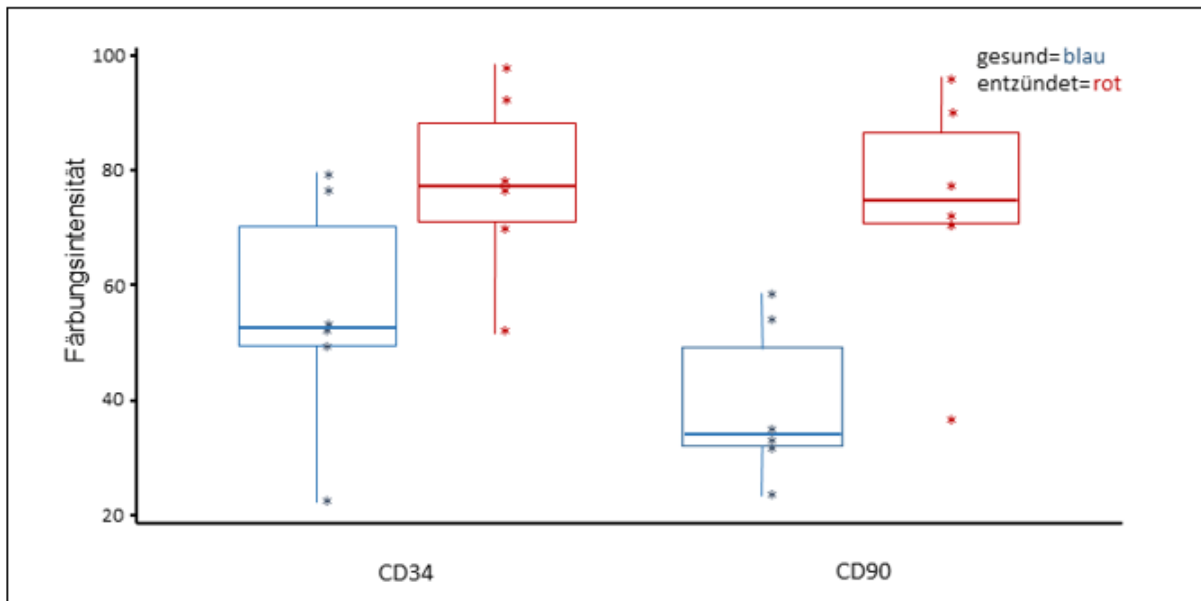
Die Ergebnisse der statistischen Analyse ergaben eine statistisch signifikante Expressionssteigerung von CD90 und CD34 in der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit. Die Ergebnisse bezogen sich sowohl auf die Messungen der Blutgefäße als auch auf die Messungen in Perizyten. Im Folgenden sind die Ergebnisse der statistischen Analysen aufgeführt.

#### 8.4.1 Statistische Analyse der Intensität der Blutgefäßfärbungen

Der t-Test ergab einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen für die Expression von CD34 ( $t = -2,07$ ,  $df = 9,47$ ,  $p = 0,033$ ) und CD90 ( $t = -3,38$ ,  $df = 8,69$ ,  $p = 0,004$ ).

Die ANOVA (Analysis of Variance) ergab einen signifikanten Haupteffekt für die Gruppe, was darauf hindeutet, dass die gesunde Gruppe im Vergleich zu den kariösen Zähnen insgesamt niedrigere Werte für beide Proteine aufwies ( $F(1,18) = 15,29$ ,  $p = 0,001$ ). Es wurde keine signifikante Interaktion zwischen Gruppe und Proteintyp gefunden ( $F(1,18) = 0,69$ ,  $p = 0,416$ ), was darauf hindeutet, dass der Unterschied zwischen den Proteinexpressionen in den verschiedenen Gruppen nicht signifikant war.

Es wurde eine statistisch signifikant niedrigere Expression von CD34 und CD90 bei den gesunden Zähnen im Vergleich zu den kariösen Zähnen festgestellt ( $p = 0,043$  bzw.  $p = 0,003$ ) (Abb. 27).



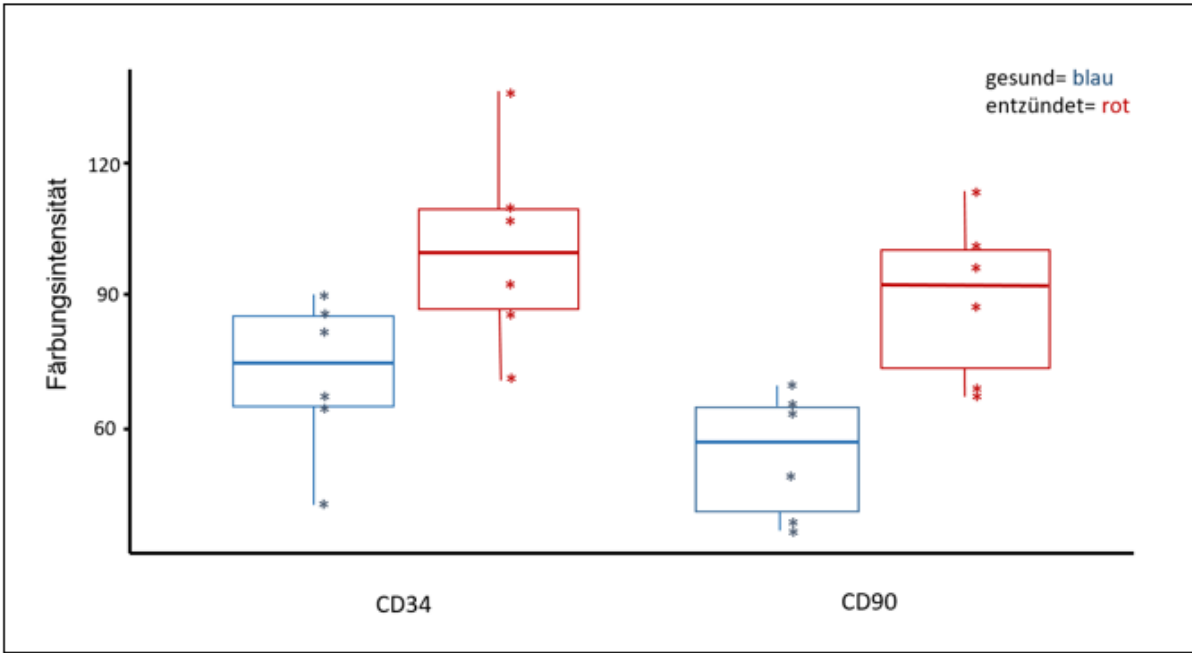
**Abbildung 27:** Blutgefäßfärbung: Statistische Analyse der Färbungsintensitäten für die Proteine CD34 und CD90 im gesunden und entzündeten (kariösen) Zahn. Verglichen werden die Gruppen gesund ( $n=6$ ) und kariös ( $n=6$ ). Gesund = blau; kariös = rot.

#### 8.4.2 Statistische Analyse der Intensität der Perizytenfärbungen

Bei der Analyse der Intensität der Perizytenfärbung, ergab der t-Test ebenso einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen für die Expression von CD34 ( $t = -2,42$ ,  $df = 9,48$ ,  $p = 0,019$ ) und CD90 ( $t = -3,73$ ,  $df = 9,47$ ,  $p = 0,002$ ).

Die ANOVA zeigte einen signifikanten Haupteffekt für die Gruppe, was darauf hindeutet, dass die gesunde Gruppe im Vergleich zu den kariösen Molaren insgesamt niedrigere Werte für beide Proteine aufwies ( $F(1,18) = 16,89$ ,  $p = 0,001$ ). Es wurde keine signifikante Interaktion zwischen Gruppe und Proteintyp nachgewiesen ( $F(1,18) = 0,22$ ,  $p = 0,645$ ), was darauf hindeutet, dass der Unterschied zwischen den Proteinexpressionen in den verschiedenen Gruppen nicht signifikant variierte.

Es wurde eine statistisch signifikant niedrigere Expression von CD34 und CD90 bei den gesunden Zähnen im Vergleich zu den kariösen Zähnen festgestellt ( $p = 0,019$  bzw.  $p = 0,005$ ) (Abb. 28).



**Abbildung 28:** Perizytenfärbung: Statistische Analyse der Färbungsintensitäten für die Proteine CD34 und CD90 im gesunden und entzündeten (kariösen) Zahn. Verglichen werden die Gruppen gesund (n=6) und kariös (n=6). Gesund = blau; kariös = rot.

## 9 Diskussion

In der adulten gesunden dentalen Pulpa sind bisher drei Typen von Stammzellen beschrieben: die von der Neuralleiste abstammenden mesenchymalen pulpalen Stammzellen (ektomesenchymale Stammzellen), die glialen Stammzellen und die Perizyten. Im Endoneurium wurden ebenfalls mesenchymale Stammzellen beschrieben, die sich unter entzündlichen Bedingungen zu Osteoblasten-ähnlichen Zellen differenzieren können und in der Lage sind, Knochen zu regenerieren (Carr et al., 2019, Adameyko and Ernfors, 2019). Durch die Verwendung der Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode wurde in der vorliegenden Studie die Expression des mesenchymalen Stammzellmarkers CD90 und des hämatopoetischen Stammzellmarkers CD34 in Zellen der adulten Dentin-Pulpa-Einheit unter physiologischen und kariösen Bedingungen untersucht.

In den gewonnenen Ergebnissen wurde eine moderate Expression von CD90 und CD34 in Zellen der Blutgefäße (Endothelzellen und glatte Muskelzellen von Arterien, Arteriolen, Venen und Venolen) und in Perizyten (um Arteriolen, Kapillaren und Venolen) der gesunden dentalen Pulpa detektiert. Im Vergleich zu der gesunden dentalen Pulpa wurde in gleichen zellulären Strukturen der entzündeten dentalen Pulpa eine signifikant stärkere Expression für CD90 und CD34 gefunden. In neurovaskulären Elementen der dentalen Pulpa wurde ebenso die Expression von CD90 und CD34 mit unterschiedlichen Färbungsintensitäten detektiert. Die Ergebnisse der zellulären Expressionen von CD90 und CD34 in neurovaskulären Strukturen konnten immunhistochemisch keiner bestimmten Zellart zugeordnet werden. Die Vermutung liegt nahe, dass die CD90 und CD34 exprimierenden Zellen endoneuronale Stammzellen sein könnten.

Es ist bekannt, dass die Anzahl der Stammzellen im adulten Zahn im Vergleich zur Anzahl der Stammzellen in Zahnanlagen quantitativ abnimmt. Daher ist es schwierig, die Existenz und Aktivität der pulpalen Stammzellen auch unter entzündlichen Bedingungen zu charakterisieren. Die gewonnenen In-vitro-Befunde können für das regenerative Potenzial der dentalen Pulpa von wichtiger Bedeutung sein, um klinisch neue Behandlungsstrategien für die Tertiärdentinbildung entwickeln zu können.

### 9.1 Interpretation der Ergebnisse der ABC-Methode

In der vorliegenden Studie wurde zum ersten Mal mittels der ABC-Methode die Expression von CD90 und CD34 in Zellen der gesunden dentalen Pulpa mit der Expression von CD90 und CD34 in Zellen der entzündeten dentalen Pulpa, nach einer kariösen Läsion, verglichen.

#### 9.1.1 CD90 und CD34 in Zellen der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit

Insbesondere wurde im Vergleich des gesunden und des kariösen Zustandes der Dentin-Pulpa-Einheit besonderes Augenmerk auf die Färbungen von Nervenfaserbündeln, Blutgefäßen und Perizyten gelegt. Die Unterschiede werden im Folgenden erläutert.

##### 9.1.1.1 *Expression von CD90 und CD34 in einer Subpopulation von Zellen in Nervenfaserbündeln der gesunden dentalen Pulpa*

Die Nervenfaserbündel lassen sich histologisch in der dentalen Pulpa gut darstellen. Innerhalb der Nervenfaserbündel sind Schwann-Zellen mit ihren länglichen Zellkernen von anderen zellulären Strukturen differenzierbar. In der vorliegenden Studie wurden CD90 und CD34 unter anderem als mesenchymale Stammzellmarker verwendet (Joseph et al., 2004, Carr et al., 2019, Sidney et al., 2014), um zu zeigen, ob in neurovaskulären zellulären Strukturen (glatten Muskelzellen, Endothelzellen, mesenchymalen endoneuronale Zellen) CD90 oder CD34 exprimiert werden.

In Zellen der Gefäßwand (Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Perizyten) innerhalb von Nervenfaserbündeln wurden Expressionen für CD90 und CD34 nachgewiesen. Bei einer kleinen Subpopulation der Zellen war ein Unterschied der Intensität der Färbungen für CD90 und CD34 erkennbar. Die Färbungsintensität von Zellen der Blutgefäßwände stellte sich jedoch insgesamt stärker dar als die Expression von Zellen, die in Nervenfaserbündeln vorkommen.

Von peripheren Nervenfasern ist bekannt, dass eine Population von mesenchymalen Stammzellen im Endoneurium vorkommen kann (Joseph et al., 2004, Richard et al., 2014). In der vorliegenden Studie wurde die Expression für CD90 und CD34 in einer Subpopulation von Zellen in Nervenfaserbündeln mit unterschiedlicher Färbungsintensität detektiert. Es ist daher anzunehmen, dass diese Zellen endoneuronale mesenchymale pulpale Stammzellen sein können. Die Expression von CD90 (Joseph et al., 2004, Carr et al., 2019) und CD34 (Carr et al., 2019, Richard et al., 2014) in mesenchymalen Stammzellen im Endoneurium unterstützt diese Annahme.

Es besteht der Verdacht, dass in der gesunden dentalen Pulpa endoneuronale Stammzellen ruhig verbleiben und erst bei Regenerationsprozessen der entzündeten adulten Pulpa (bei einer kariösen Läsion) aktiviert werden. In der Literatur wurde ebenfalls beschrieben, dass im unbeschädigten, gesunden Nervengewebe keine signifikante Proliferation und Differenzierung beobachtet wurde (Carr et al., 2019, Adameyko and Ernfors, 2019).

Ob die detektierten Färbungen endoneuronale mesenchymale Stammzellen darstellen, konnte mit der ABC-Methode nicht abschließend geklärt werden. Es bedarf weiterer Forschung zur Analyse und Bestimmung der mesenchymalen endoneuronalen Stammzellen in der humanen dentalen Pulpa.

#### *9.1.1.2 Expression von CD90 und CD34 in Blutgefäßen der gesunden dentalen Pulpa*

Das Gefäßsystem besteht aus Arterien, präkapillaren Arteriolen, Kapillaren, postkapillaren Venolen und Venen, die den Blutkreislauf zwischen Herz, Lunge und Zielgewebe fördern (Herbert and Stainier, 2011, Wang et al., 2022, Korkmaz Y, 2025). Mit einem Durchmesser von 5-10 µm sind die Kapillaren die kleinsten Blutgefäße, denen eine durchgehende Schicht von vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs) fehlen (Hall et al., 2014). VSMCs umgeben die Endothelzellen von Arterien, Arteriolen, Venolen und Venen (Armulik et al., 2011, Herbert and Stainier, 2011). Die VSMCs regulieren die Vasodilatation und Vasokonstriktion und steuern die Permeabilität und Stabilität der Blutgefäße (Haefliger et al., 1994, Hall et al., 2014).

In der vorliegenden Studie wurde eine Expression für CD90 und CD34 in Zellen der Blutgefäßwand der gesunden dentalen Pulpa detektiert. Basierend auf den Färbungsmustern kann angenommen werden, dass CD90 und CD34 sowohl in Endothelzellen als auch in VSMCs exprimiert werden. Es ist anzunehmen, dass CD90 und CD34 positive Endothelzellen sowie VSMCs unter physiologischen Bedingungen an den normalen Regenerationsprozessen der Blutgefäße beteiligt sind.

#### *9.1.1.3 Expression von CD90 und CD34 in Perizyten der gesunden dentalen Pulpa*

In kultivierten Perizyten wurde bereits eine Expression für CD90 beschrieben (Park et al., 2016). In der vorliegenden Studie wurde zum ersten Mal eine In-vivo-Expression von CD90 in Perizyten der humanen dentalen Pulpa nachgewiesen. Eine Expression von CD34 wurde bereits in Perizyten der Tunica Adventitia von Blutgefäßen beschrieben (Lin and Lue, 2013, Wang et al., 2019, Traktuev et al., 2008). Die Perizyten der humanen dentalen Pulpa, die sowohl in der Tunica Adventitia als auch um Arteriolen und Venolen vorkommen, zeigten in der hier durchgeführten Studie ebenso eine Expression für CD34.

Im Gefäßsystem sind Perizyten in die Basalmembran von Kapillaren, präkapillaren Arteriolen und postkapillaren Venolen eingebettet (Armulik et al., 2005, Herbert and Stainier, 2011). Perizyten wurden in der Vergangenheit bereits hinsichtlich ihrer Lage, ihres Phänotyps und ihrer Funktion in unterschiedlichen Organen charakterisiert (Armulik et al., 2011). Obwohl mehrere Marker für Perizyten beschrieben wurden, schränken die unterschiedlichen Expressionen dieser Marker die Verwendung eines einzelnen Proteins als Pan-Perizyten-Marker ein (Armulik et al., 2011, Aue et al., 2023). Die präzise Lage um präkapillaren Arteriolen, Kapillaren und postkapillare Venolen herum und die unterschiedliche Expressionsstärke im Vergleich zu anderen Zellen (z.B. Endothelzellen und glatten Muskelzellen), die CD90 und CD34 exprimieren, ermöglichten eine präzisere Zuordnung von Perizyten, um diese mit der Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode zu identifizieren. Es liegt die Vermutung nahe, dass jedoch einige Perizyten, die sich in unterschiedlichen Differenzierungsphasen befinden, sich von VSMCs und Endothelzellen schwer unterscheiden lassen.

Perizyten werden als Stammzellen der dentalen Pulpa betrachtet (Yianni and Sharpe, 2019). Genetische Abstammungsstudien (genetic lineage tracing studies), die mit Cre-Rekombinase-Mauslinien durchgeführt wurden, zeigten, dass eine Teilpopulation der Odontoblasten-Vorläuferzellen von Perizytenpopulationen der dentalen Pulpa abstammen (Feng et al., 2011). Perizyten regulieren die Vasodilatation und Vasokonstriktion und steuern die Permeabilität und Stabilität der Blutgefäße (Haefliger et al., 1994, Hall et al., 2014). Perizyten der dentalen Pulpa können an ihrem Standort Blutgefäßfunktionen (Vasodilatation und Vasokonstriktion) sowie Permeabilität und Stabilität der Blutgefäße unter physiologischen Bedingungen regulieren. Die Expression von CD90 und CD34 in Perizyten der adulten humanen dentalen Pulpa zeigt, dass mehrere Perizyten innerhalb des Subodontoblastenplexus existieren und sich möglicherweise als Antwort auf eine Dentinwunde oder Dentinläsion (z.B. Karies) zur Differenzierung zu Odontoblasten-Vorläufer-Zellen bereithalten.

### **9.1.2 CD90 und CD34 in Zellen der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit**

Im Folgenden wird genauer auf die Expressionen der Stammzellmarker CD90 und CD34 im entzündeten Zustand der Dentin-Pulpa-Einheit eingegangen.

#### **9.1.2.1 *Expression von CD90 und CD34 in neurovaskulären Strukturen der Nervenfaserbündel der entzündeten humanen dentalen Pulpa***

In neurovaskulären zellulären Strukturen wurde die Expression für CD90 als auch CD34 mit unterschiedlichen Färbungsintensitäten detektiert. Obwohl die zellulären Färbungsintensitäten unter entzündlichen Bedingungen im Vergleich zum physiologischen Zustand der Pulpa als tendenziell stärker beobachtet wurden, konnte keine densitometrische Analyse anhand der Färbungen von Nervenfaserbündeln durchgeführt werden, da die Expression von CD90 oder CD34 keinem bestimmten Zelltyp sicher zugeordnet werden konnte.

Es wurde in der Literatur beschrieben, dass sich mesenchymale Stammzellen im Endoneurium aus geschädigten Nervenfasern zu mesenchymalen Progenitoren, die an der Regeneration von Knochen und Dermis beteiligt sind, proliferieren und differenzieren (Johnston et al., 2013, Johnston et al., 2016, Carr et al., 2019). Diese Proliferationen und Differenzierungen wurden in endoneuronalen mesenchymalen Stammzellen von gesunden und unbeschädigten Nervenfasern nicht beobachtet (Carr et al., 2019, Adameyko and Ernfors, 2019). In allen Fällen induziert eine Karies im Dentin eine Entzündung in der dentalen Pulpa. Es ist daher anzunehmen, dass endoneuronale Stammzellen in der humanen dentalen Pulpa unter entzündlichen Bedingungen aktiv werden und sich differenzieren.

In der vorliegenden Studie wurden die Expressionen für CD90 und CD34 in einer kleinen Subpopulation von Nervenfaserbündeln der dentalen Pulpa beobachtet. Es könnte sich bei diesen Zellen um Schwann-Zellen (sie lassen sich mit ihren länglichen Zellkernen von anderen Zellen

unterscheiden) und um endoneuronale mesenchymale Stammzellen handeln. Da endoneuronale Stammzellen sich zu Osteoblasten-ähnlichen Zellen differenzieren können (Carr et al., 2019), kann spekuliert werden, ob CD90- und CD34-positive pulpare Gliale-Stammzellen und pulpare mesenchymale endoneuronale Stammzellen unter entzündlichen Bedingungen im Nervenfaserbündel eine Aktivierung erfahren, um sich zu Odontoblasten-ähnlichen Zellen zu differenzieren. In der Folge könnte reparatives Tertiärdentin gebildet werden. Diese Annahmen müssen jedoch mit weiteren In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen unterstützt werden.

#### *9.1.2.2 Expression von CD90 und CD34 in Blutgefäßen der entzündeten humanen dentalen Pulpa*

In der vorliegenden Studie wurde getestet, ob eine Intensitätszunahme der immunhistochemischen Färbungen im Bereich von Blutgefäßen der entzündeten Pulpa nachweisbar und statistisch signifikant ist. Sowohl der Antikörper für CD90 als auch der Antikörper für CD34 zeigte eine deutliche Immunreaktivität in Blutgefäßen der entzündeten dentalen Pulpa an. Die statistische Analyse der Ergebnisse der unterschiedlichen Präparate von gesunden und entzündeten dentalen Pulpen ergab eine statistisch signifikante Intensitätssteigerung der immunhistochemischen Färbungen in Blutgefäßen von entzündeten dentalen Pulpen mit CD34 als auch mit CD90 ( $p = 0,043$  bzw.  $p = 0,003$ ).

Die beobachtete Intensitätssteigerung hat mit dem möglichen positiven Einfluss von CD90 auf die Wundheilung und einer verbesserten Durchblutung im Entzündungsgewebe zu tun. Entzündungszellen können besser in das hyperämische Gewebe migrieren. In einer Studie mit Thy1/CD90 Knockout-Mäusen wurde eine Wundheilungsverzögerung von Hautwunden nachgewiesen (Pérez et al., 2022). Das Fehlen dieses Proteins scheint einen negativen Einfluss auf die Geweberegeneration zu haben, was auf eine Rolle von CD90 in der Regeneration der dentalen Pulpa hinweisen könnte.

Die Intensitätssteigerung von CD90 deutet auf eine verstärkte Expression dieser Proteine hin, wenn eine kariöse Läsion besteht. Wie bereits in der Literatur beschrieben, konnte mit einer Studie gezeigt werden, dass CD90 in Endothelzellen nachweisbar ist und eine Hochregulation im inflammatorischen Zustand erfolgt (Pérez et al., 2022, Brenet et al., 2020, Schubert et al., 2013, Schubert et al., 2011). Die beschriebene gesteigerte Angiogenese wurde statistisch in dieser Studie nicht untersucht, jedoch war diese anhand der erhobenen histopathologischen Ergebnisse zu vermuten (Pérez et al., 2022, Brenet et al., 2020, Schubert et al., 2013, Schubert et al., 2011).

Im Vergleich zur Expression von CD34 in Blutgefäßen der gesunden dentalen Pulpa kann die signifikant erhöhte Expression von CD34 in Blutgefäßen der entzündeten Pulpa auf eine Beteiligung von CD34-positiven Zellen bei der Angiogenese hindeuten. In der Literatur wurde CD34 bereits in Endothelzellen, die auch an der Angiogenese beteiligt sind, nachgewiesen (Sidney et al., 2014, Fina et al., 1990, Hristov and Weber, 2008). Ein angiogener Stimulus kann eine Subpopulation von CD34 positiven Endothelzellen anregen, neue Gefäße zu bilden (Sidney et al., 2014, Siemerink et al., 2012). Die Intensitätssteigerung der immunhistochemischen Färbungen in der entzündeten Pulpa zeigen einen möglichen Zusammenhang der Expressionszunahme des Proteins CD34 und einer gesteigerten Angiogenese im Zuge der Immunreaktion. Histopathologisch war in den Präparaten eine Zunahme der Gefäßanzahl unterhalb der kariösen Läsion erkennbar. Da CD34 positive Endothelzellen als länglicher beschrieben werden und weniger tight junctions besitzen, liegt es nahe anzunehmen, dass diese morphologischen Unterschiede zu anderen Endothelzellen einen faszilierten Austausch von Molekülen und Zellen der Immunabwehr ermöglichen (Sidney et al., 2014, Siemerink et al., 2012, Fina et al., 1990).

### 9.1.2.3 *Expression von CD90 und CD34 in Perizyten der entzündeten dentalen Pulpa*

In der vorliegenden Studie wurde eine statistisch signifikant stärkere Expression sowohl für CD90 als auch für CD34 in Perizyten der entzündeten dentalen Pulpa detektiert ( $p = 0,019$  bzw.  $p = 0,005$ ), wenn die Ergebnisse mit den Ergebnissen von der gesunden dentalen Pulpa verglichen wurden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass CD90 und CD34 bei der Aktivität, Migration und Differentiation der Perizyten unter entzündlichen Bedingungen eine regulatorische Funktion ausüben können.

In der dentalen Pulpa der Maus wurde bereits gezeigt, dass eine Population von Vorläuferzellen der Odontoblasten-ähnlichen Zellen von Perizyten der dentalen Pulpa abstammen (Kaukua et al., 2014). Eine tiefe kariöse Läsion, die in allen Fällen eine Entzündung in der dentalen Pulpa induziert, kann die Ausschüttung von entzündlichen Mediatoren durch Entzündungszellen in der dentalen Pulpa verursachen, auf die die Perizyten reagieren (Sharpe, 2016). Dann wandern die Perizyten von ihrem Standort zum Ort der Läsion und differenzieren sich zu Odontoblasten-ähnlichen Zellen (Feng et al., 2010). In Antwort auf die kariöse Läsion bilden Odontoblasten-ähnliche Zellen das reparative tertiäre Dentin, um die freiliegende Pulpa vor kariösen Bakterien zu schützen (Mitsiadis et al., 2011b). Basierend auf den vergleichenden Ergebnissen der gesunden Pulpa mit der entzündeten dentalen Pulpa und den oben genannten Befunden, kann angenommen werden, dass die Perizyten unter entzündlichen Bedingungen in der humanen dentalen Pulpa aktiv werden, indem sie eine signifikante, gesteigerte Expression für CD90 und CD34 zeigen. Es ist anzunehmen, dass sich die CD90- und CD34-positiven Perizyten unter entzündlichen Bedingungen zu Odontoblasten-ähnlichen Zellen differenzieren, um reparatives Tertiärdentin zu bilden.

Eine wichtige Rolle von Perizyten bei der Angiogenese, Immunmodulation, Osteogenese und Odontogenese wurde in der Literatur beschrieben (Traktuev et al., 2008, Feng et al., 2011, Wang et al., 2019). In der Zahnheilkunde ist der Erfolg bei der Behandlung der tiefen Dentinkaries oder der eröffneten dentalen Pulpa gering, was neue Behandlungsstrategien erforderlich macht. Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Studie könnten durch pharmakologische Manipulation der Perizyten zwei neue Behandlungsstrategien entwickelt werden:

Eine erste Behandlungsstrategie stellt die Therapie mit Substanzen oder Faktoren dar, die als Unterfüllungsmaterialien nach selektiver Kariesexkavation in die Kavität eingebracht werden. Diese könnten in Perizyten eine Odontogenese-Differenzierung auslösen. Auch können diese pharmakologischen Substanzen nach einer Eröffnung der dentalen Pulpa im Rahmen der partiellen Pulpotomie in die Pulpa-Wunde eingebracht werden, um die pulpalen Perizyten zur Differenzierung zu Odontoblasten-ähnlichen Zellen zu aktivieren. In beiden Fällen kann somit die Bildung von reparativem Tertiärdentin erzielt werden.

Die zweite Behandlungsstrategie bezieht sich auf eine zurzeit in der Endodontologie entwickelte Stammzelltherapie. Die in unterschiedlichen Tiermodellen gewonnene Ergebnisse zeigten, dass pulpal Stammzellen bei der Bildung von reparativem Tertiärdentin zur klinischen Anwendung kommen können (Kwack and Lee, 2022, Yang et al., 2023). Es ist möglich Perizyten, die nach einer partiellen Pulpotomie aus Weisheitszähnen isoliert und *in vitro* zu Odontoblasten-ähnlichen Zellen differenziert werden, in die Pulpa-Wunde einzubringen, um die Tertiärdentinbildung zu initiieren. Diese Behandlungsstrategie kann in Zukunft auch an anderen pulpalen Stammzellen weiterentwickelt und optimiert werden. Da sich die Ergebnisse der vorliegenden Studie auf die Zustände und den Vergleich gesunder und entzündeter humaner Dentin-Pulpa-Einheit beziehen, sind diese Ergebnisse von wichtiger klinischer Relevanz.

### 9.1.3 Schlussfolgerungen der Ergebnisse und klinische Relevanz

Die mesenchymalen Stammzellmarker CD90 und der hämatopoetische Stammzellmarker CD34 wurden in bestimmten Subpopulationen von Zellen in Nervenfaserbündeln, in der Blutgefäßwand (Endothelzellen, VSMCs) und in Perizyten der gesunden dentalen Pulpa detektiert. Die Expression von CD90 und CD34 in Zellen der Blutgefäßwand und in Perizyten der durch Karies entzündeten humanen dentalen Pulpa nahm statistisch signifikant zu. Eine erhöhte Expression von CD90 und CD34 in Endothelzellen und VSMCs zeigt, dass CD90- und CD34-positive Zellen unter entzündlichen Bedingungen aktiv werden können, um die Angiogenese zu regulieren. Die starke Expression von CD90 und CD34 in Perizyten der entzündeten humanen Pulpa deutet darauf hin, dass Perizyten unter entzündlichen Bedingungen stimuliert werden, um sich zu Odontoblasten-ähnlichen Zellen zu differenzieren. Eine entzündungsinduzierte Migration und Differenzierung der Perizyten zu Odontoblasten-ähnlichen Zellen ist von wichtiger klinischer Bedeutung, um im Rahmen der Therapie einer tiefen kariösen Läsion die reparative Tertiärdentinbildung induzieren zu können. Unterfüllungsmaterialien, die eine Migration und Differenzierung von Perizyten zu Odontoblasten-ähnlichen Zellen fördern, könnten somit in der Zukunft eine Anwendung in der regenerativen Zahnheilkunde finden.

### 9.2 Limitationen der Studie

Mit fortschreitender Entwicklung und zunehmender Reife werden Stammzellen in adulten Organen seltener und die Gewebeerneuerung sowie Gewebereparatur nehmen in der Regel ab (Corselli et al., 2010). Diese Tatsache erschwert es in der vorliegenden Studie die Existenz und Aktivität von allen Stammzellen in der adulten humanen dentalen Pulpa zu charakterisieren. Darüber hinaus bestünde die Möglichkeit die Stammzellen mit Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen optimal darzustellen, wenn ein präziser Marker für diese Stammzelle vorhanden wäre. Da die individuellen Stammzellen mehrere Marker exprimieren, kann eine Stammzelle nicht nur mit einem Marker detektiert werden. Durch eine Abstammungsanalyse (genetic lineage tracing studies) in Kombination mit Doppelfärbungen bestünde die Möglichkeit die Stammzellen optimal zu charakterisieren (Carr et al., 2019, Kaukua et al., 2014). Es müssen in der vorliegenden Studie folgende Limitationen berücksichtigt werden:

1. Die endgültige Existenz von endoneuronalen Stammzellen in der dentalen Pulpa kann nur in einem Mausmodell mit der „genetic lineage tracing“ Methode in Kombination mit Fluoreszenz-Doppelfärbungen nachgewiesen werden.
2. In der vorliegenden Studie wurde die Expression von CD90 und CD34 in Perizyten der dentalen Pulpa unter In-vivo-Bedingungen detektiert. In welcher Subpopulation der Perizyten CD90 und CD34 exprimiert sind, könnte mit Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit spezifischen Markern in zukünftigen Studien geklärt werden.

## 10 Zusammenfassung

Rekrutierung, Expansion, Migration und Differenzierung von Stammzellen während der Embryonalentwicklung lassen sich mit Hilfe histologischer Marker beurteilen. In adulten Organen nimmt die Anzahl der Stammzellen ab. Expressionen des mesenchymalen Stammzellmarkers CD90 und des hämatopoetischen Stammzellmarkers CD34 in Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs) sind bekannt. Eine Expression für CD90 in kultivierten Perizyten und für CD34 in adventitialen Perizyten wurde ebenfalls beschrieben. Die dentale Pulpa enthält drei Typen von Stammzellen: ektomesenchymale pulpale Stammzellen, gliale pulpale Stammzellen (Schwann-Zellen) und Perizyten. Für die Erneuerung der adulten humanen Pulpa unter physiologischen Bedingungen und für die Dentinreparatur mit reparativer Tertiärdentinbildung bei kariösen Läsionen fehlen bisher Kenntnisse über die Expansion, Migration und Differenzierung pulpaler Stammzellen.

Um die Expression von CD90 und CD34 in Stammzellen der gesunden und entzündeten adulten dentalen Pulpa zu untersuchen, wurden zunächst humane Molaren, die im Rahmen einer kieferorthopädischen- und/oder zahnärztlich-chirurgischen-Therapie extrahiert wurden in PFA-Fixativ-Lösung fixiert, in Ameisensäure entkalkt, in PBS für eine Woche gewaschen, in Saccharose-Lösung kryoprotectiert und in Tissue-Tek mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und eingebettet. Die Proben wurden in einem Kryostaten geschnitten. Die Schnitte wurden zunächst mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt, um die histopathologische Diagnose für die gesunde und entzündete Dentin-Pulpa-Einheit zu stellen. Im Anschluss folgte die Inkubation der freischwimmenden Schnitte mit den Antikörpern gegen CD90 und CD34 im Rahmen der Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex-Methode. Intensitäten der Immunreaktivität für CD90 und CD34 wurden nachfolgend in Blutgefäßwänden und Perizyten der gesunden und entzündeten dentalen Pulpa ausgewertet und statistisch analysiert.

Die Ergebnisse zeigten eine moderate Expression von CD90 und CD34 in Zellen der Blutgefäße sowie in Perizyten der gesunden dentalen Pulpa. Innerhalb von Nervenfaserbündeln der dentalen Pulpa wurde ebenfalls eine Expression von CD90 und CD34 in vaskulären Strukturen und in einer Subpopulationen von Zellen innerhalb der Nervenfaserbündel identifiziert. Die Expression von CD90 wurde in Perizyten der gesunden und entzündeten humanen dentalen Pulpa unter In-vivo-Bedingungen beobachtet. CD34 wurde sowohl in Perizyten um Arteriolen, Kapillaren und Venolen herum als auch in der Tunica Adventitia detektiert. In der vorliegenden Studie wurde nachgewiesen, dass es unter entzündlichen (kariösen) Bedingungen der humanen dentalen Pulpa zu einer statistisch signifikant gesteigerten Expression der Proteine CD90 und CD34 in Blutgefäßen und Perizyten kommt.

Die Expression von CD90 und CD34 in Zellen der Blutgefäßwand und in Perizyten der gesunden dentalen Pulpa deutet auf die Rolle von CD90 und CD34 bei der Regulierung der Gefäßpermeabilität, der Gefäßstabilität und der Homöostase der humanen dentalen Pulpa hin. Eine erhöhte Expression der beiden Stammzellmarker in Zellen der Blutgefäßwand (Endothelzellen und VSMCs) und in Perizyten der entzündeten humanen dentalen Pulpa zeigt, dass CD90 und CD34 bei der Rekrutierung, Migration und Differenzierung von Stammzellen in der entzündeten humanen dentalen Pulpa beteiligt sind.

Die bisher beschriebene Beteiligung von Perizyten bei der Angiogenese, Immunmodulation, Osteogenese und Odontogenese weist auf die hohe klinische Relevanz der Ergebnisse dieser Studie hin: Pharmazeutisch stimulierende Substanzen (z.B. in Unterfüllungsmaterialien), die die Rekrutierung, Migration und Differenzierung der CD90- und CD34-positiven Perizyten zu Odontoblasten-ähnlichen Zellen auslösen, können bei der Therapie einer tiefen Dentinkaries Anwendung finden, um die Bildung von reparativem Tertiärdentin zu induzieren.

Dies unterstützt die Heilung der entzündeten dentalen Pulpa als eines der wichtigsten Ziele in der regenerativen Zahnmedizin.

## 11 Literaturverzeichnis

- © AMBOSS GMBH, B. U. K., GERMANY 2021. Bindegewebshüllen einer (peripheren) Nervenfasern.
- ADAMEYKO, I. & ERNFORS, P. 2019. Nerves Do It Again: Donation of Mesenchymal Cells for Tissue Regeneration. *Cell Stem Cell*, 24, 195-197.
- ALMUSHAYT, A., NARAYANAN, K., ZAKI, A. E. & GEORGE, A. 2006. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Ther*, 13, 611-20.
- ARMULIK, A., ABRAMSSON, A. & BETSHOLTZ, C. 2005. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res*, 97, 512-23.
- ARMULIK, A., GENOVÉ, G. & BETSHOLTZ, C. 2011. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*, 21, 193-215.
- AUE, A., ENGLERT, N., HARRER, L., SCHWIERING, F., GAAB, A., KÖNIG, P., ADAMS, R., SCHMIDTKO, A., FRIEBE, A. & GRONEBERG, D. 2023. NO-sensitive guanylyl cyclase discriminates pericyte-derived interstitial from intra-alveolar myofibroblasts in murine pulmonary fibrosis. *Respir Res*, 24, 167.
- BÈGUE-KIRN, C., SMITH, A. J., RUCH, J. V., WOZNEY, J. M., PURCHIO, A., HARTMANN, D. & LESOT, H. 1992. Effects of dentin proteins, transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. *Int J Dev Biol*, 36, 491-503.
- BELTRAMI, A. P., CEsSELLI, D., BERGAMIN, N., MARCON, P., RIGO, S., PUPPATO, E., D'AURIZIO, F., VERARDO, R., PIAZZA, S., PIGNATELLI, A., POZ, A., BACCARANI, U., DAMIANI, D., FANIN, R., MARIUZZI, L., FINATO, N., MASOLINI, P., BURELLI, S., BELLUZZI, O., SCHNEIDER, C. & BELTRAMI, C. A. 2007. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood*, 110, 3438-46.
- BIRBRAIR, A. 2018. Pericyte Biology: Development, Homeostasis, and Disease. *Adv Exp Med Biol*, 1109, 1-3.
- BJØRNDAL, L., SIMON, S., TOMSON, P. L. & DUNCAN, H. F. 2019. Management of deep caries and the exposed pulp. *Int Endod J*, 52, 949-973.
- BLEICHER, F. 2014. Odontoblast physiology. *Exp Cell Res*, 325, 65-71.
- BRENET, M., MARTÍNEZ, S., PÉREZ-NUÑEZ, R., PÉREZ, L. A., CONTRERAS, P., DÍAZ, J., AVALOS, A. M., SCHNEIDER, P., QUEST, A. F. G. & LEYTON, L. 2020. Thy-1 (CD90)-Induced Metastatic Cancer Cell Migration and Invasion Are  $\beta 3$  Integrin-Dependent and Involve a Ca(2+)/P2X7 Receptor Signaling Axis. *Front Cell Dev Biol*, 8, 592442.
- BYERS, M. R. 1984. Dental sensory receptors. *Int Rev Neurobiol*, 25, 39-94.
- BYERS, M. R. & NÄRHI, M. V. 1999. Dental injury models: experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions. *Crit Rev Oral Biol Med*, 10, 4-39.
- BYERS, M. R. & TAYLOR, P. E. 1993. Effect of sensory denervation on the response of rat molar pulp to exposure injury. *J Dent Res*, 72, 613-8.
- CARR, M. J., TOMA, J. S., JOHNSTON, A. P. W., STEADMAN, P. E., YUZWA, S. A., MAHMUD, N., FRANKLAND, P. W., KAPLAN, D. R. & MILLER, F. D. 2019. Mesenchymal Precursor Cells in Adult Nerves Contribute to Mammalian Tissue Repair and Regeneration. *Cell Stem Cell*, 24, 240-256 e9.
- CASSIDY, N., FAHEY, M., PRIME, S. S. & SMITH, A. J. 1997. Comparative analysis of transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. *Arch Oral Biol*, 42, 219-23.
- CATTIN, A. L. & LLOYD, A. C. 2016. The multicellular complexity of peripheral nerve regeneration. *Curr Opin Neurobiol*, 39, 38-46.
- CAUFIELD, P. W. & GRIFFEN, A. L. 2000. Dental caries. An infectious and transmissible disease. *Pediatr Clin North Am*, 47, 1001-19, v.
- CHŁOPEK, D. P. 2018. *Subzelluläre Expression und Phosphorylierung der ERK1/2 in gesunden und degenerierten humanen Odontoblasten mit der Berücksichtigung einer*

*neuen Klassifizierung der Odontoblastendegeneration* Dissertationsarbeit, Hohe Medizinische Fakultät der Universität zu Köln.

- CHMILEWSKY, F., AYAZ, W., APPIAH, J., ABOUT, I. & CHUNG, S. H. 2016. Nerve Growth Factor Secretion From Pulp Fibroblasts is Modulated by Complement C5a Receptor and Implied in Neurite Outgrowth. *Sci Rep*, 6, 31799.
- CHMILEWSKY, F., JEANNEAU, C., LAURENT, P. & ABOUT, I. 2014. Pulp fibroblasts synthesize functional complement proteins involved in initiating dentin-pulp regeneration. *Am J Pathol*, 184, 1991-2000.
- CHUNG, G., JUNG, S. J. & OH, S. B. 2013. Cellular and molecular mechanisms of dental nociception. *J Dent Res*, 92, 948-55.
- CORSELLI, M., CHEN, C. W., CRISAN, M., LAZZARI, L. & PÉAULT, B. 2010. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30, 1104-9.
- COVAS, D. T., PANEPUCCI, R. A., FONTES, A. M., SILVA, W. A., JR., ORELLANA, M. D., FREITAS, M. C., NEDER, L., SANTOS, A. R., PERES, L. C., JAMUR, M. C. & ZAGO, M. A. 2008. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol*, 36, 642-54.
- DELLAVALLE, A., SAMPAOLESI, M., TONLORENZI, R., TAGLIAFICO, E., SACCHETTI, B., PERANI, L., INNOCENZI, A., GALVEZ, B. G., MESSINA, G., MOROSETTI, R., LI, S., BELICCHI, M., PERETTI, G., CHAMBERLAIN, J. S., WRIGHT, W. E., TORRENTE, Y., FERRARI, S., BIANCO, P. & COSSU, G. 2007. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol*, 9, 255-67.
- DIGKA, A., LYROUDIA, K., JIRASEK, T., KASAMPALIDIS, I. N., KARAYANNOPOULOU, G. & KUBINOVA, L. 2006. Visualisation of human dental pulp vasculature by immunohistochemical and immunofluorescent detection of CD34: a comparative study. *Aust Endod J*, 32, 101-6.
- DUNCAN, H. F., SMITH, A. J., FLEMING, G. J., REID, C., SMITH, G. & COOPER, P. R. 2017. Release of bio-active dentine extracellular matrix components by histone deacetylase inhibitors (HDACi). *Int Endod J*, 50, 24-38.
- DUNG, S. Z., GREGORY, R. L., LI, Y. & STOOKEY, G. K. 1995. Effect of lactic acid and proteolytic enzymes on the release of organic matrix components from human root dentin. *Caries Res*, 29, 483-9.
- FARGES, J. C., ALLIOT-LICHT, B., RENARD, E., DUCRET, M., GAUDIN, A., SMITH, A. J. & COOPER, P. R. 2015. Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators Inflamm*, 2015, 230251.
- FAYAZI, S., TAKIMOTO, K. & DIOGENES, A. 2017. Comparative Evaluation of Chemotactic Factor Effect on Migration and Differentiation of Stem Cells of the Apical Papilla. *J Endod*, 43, 1288-1293.
- FEATHERSTONE, J. D. 2000. The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc*, 131, 887-99.
- FEATHERSTONE, J. D. 2004. The continuum of dental caries--evidence for a dynamic disease process. *J Dent Res*, 83 Spec No C, C39-42.
- FENG, J., MANTESSO, A., DE BARI, C., NISHIYAMA, A. & SHARPE, P. T. 2011. Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 6503-8.
- FENG, J., MANTESSO, A. & SHARPE, P. T. 2010. Perivascular cells as mesenchymal stem cells. *Expert Opin Biol Ther*, 10, 1441-51.
- FINA, L., MOLGAARD, H. V., ROBERTSON, D., BRADLEY, N. J., MONAGHAN, P., DELIA, D., SUTHERLAND, D. R., BAKER, M. A. & GREAVES, M. F. 1990. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*, 75, 2417-26.
- FINKELMAN, R. D., MOHAN, S., JENNINGS, J. C., TAYLOR, A. K., JEPSEN, S. & BAYLINK, D. J. 1990. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF-beta in human dentin. *J Bone Miner Res*, 5, 717-23.
- GALLER, K. M., WEBER, M., KORKMAZ, Y., WIDBILLER, M. & FEUERER, M. 2021. Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine-Pulp Complex and the Periapical Tissues. *Int J Mol Sci*, 22.

- GALLER, K. M., WIDBILLER, M., BUCHALLA, W., EIDT, A., HILLER, K. A., HOFFER, P. C. & SCHMALZ, G. 2016. EDTA conditioning of dentine promotes adhesion, migration and differentiation of dental pulp stem cells. *Int Endod J*, 49, 581-90.
- GOLDBERG, M., KULKARNI, A. B., YOUNG, M. & BOSKEY, A. 2011. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)*, 3, 711-35.
- GRANDO MATTUELLA, L., WESTPHALEN BENTO, L., DE FIGUEIREDO, J. A., NÖR, J. E., DE ARAUJO, F. B. & FOSSATI, A. C. 2007. Vascular endothelial growth factor and its relationship with the dental pulp. *J Endod*, 33, 524-30.
- GRONTHOS, S., BRAHIM, J., LI, W., FISHER, L. W., CHERMAN, N., BOYDE, A., DENBESTEN, P., ROBEY, P. G. & SHI, S. 2002. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*, 81, 531-5.
- GRONTHOS, S., MANKANI, M., BRAHIM, J., ROBEY, P. G. & SHI, S. 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13625-30.
- GULDNER PHA, L. K. 1987. *Endodontologie, Diagnostik und Therapie*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- GÜVEN, G., ALTUN, C., GÜNHAN, O., GURBUZ, T., BASAK, F., AKBULUT, E. & CEHRELI, Z. C. 2007. Co-expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in inflamed human pulp: an immunohistochemical study. *J Endod*, 33, 18-20.
- HAEFLIGER, I. O., ZSCHAUER, A. & ANDERSON, D. R. 1994. Relaxation of retinal pericyte contractile tone through the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35, 991-7.
- HAHN, C. L. & LIEWEHR, F. R. 2007. Innate immune responses of the dental pulp to caries. *J Endod*, 33, 643-51.
- HALL, C. N., REYNELL, C., GESSLEIN, B., HAMILTON, N. B., MISHRA, A., SUTHERLAND, B. A., O'FARRELL, F. M., BUCHAN, A. M., LAURITZEN, M. & ATTWELL, D. 2014. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*, 508, 55-60.
- HELLWIG E, S. E., KLIMEK J, ATTIN T 2018. *Einführung in die Zahnerhaltung*, Köln, Deutscher Zahnärzte Verlag.
- HERBERT, S. P. & STAINIER, D. Y. 2011. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 551-64.
- HORST, J. A., ELLENIKIOTIS, H. & MILGROM, P. L. 2016. UCSF Protocol for Caries Arrest Using Silver Diamine Fluoride: Rationale, Indications and Consent. *J Calif Dent Assoc*, 44, 16-28.
- HOSOYA, A., HIRAGA, T., NINOMIYA, T., YUKITA, A., YOSHIBA, K., YOSHIBA, N., TAKAHASHI, M., ITO, S. & NAKAMURA, H. 2012. Thy-1-positive cells in the subodontoblastic layer possess high potential to differentiate into hard tissue-forming cells. *Histochem Cell Biol*, 137, 733-42.
- HRISTOV, M. & WEBER, C. 2008. Endothelial progenitor cells in vascular repair and remodeling. *Pharmacol Res*, 58, 148-51.
- HUANG, G. T., GRONTHOS, S. & SHI, S. 2009. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*, 88, 792-806.
- INOUE, A., TANAKA, J., TAKAHASHI, H., KOHNO, S., OHUE, S., UMAKOSHI, A., GOTOH, K. & OHNISHI, T. 2016. Blood vessels expressing CD90 in human and rat brain tumors. *Neuropathology*, 36, 168-80.
- JOHNSTON, A. P., NASKA, S., JONES, K., JINNO, H., KAPLAN, D. R. & MILLER, F. D. 2013. Sox2-mediated regulation of adult neural crest precursors and skin repair. *Stem Cell Reports*, 1, 38-45.
- JOHNSTON, A. P., YUZWA, S. A., CARR, M. J., MAHMUD, N., STORER, M. A., KRAUSE, M. P., JONES, K., PAUL, S., KAPLAN, D. R. & MILLER, F. D. 2016. Dedifferentiated Schwann Cell Precursors Secreting Paracrine Factors Are Required for Regeneration of the Mammalian Digit Tip. *Cell Stem Cell*, 19, 433-448.
- JONTELL, M., OKIJI, T., DAHLGREN, U. & BERGENHOLTZ, G. 1998. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9, 179-200.

- JOSEPH, N. M., MUKOUYAMA, Y. S., MOSHER, J. T., JAEGLE, M., CRONE, S. A., DORMAND, E. L., LEE, K. F., MEIJER, D., ANDERSON, D. J. & MORRISON, S. J. 2004. Neural crest stem cells undergo multilineage differentiation in developing peripheral nerves to generate endoneurial fibroblasts in addition to Schwann cells. *Development*, 131, 5599-612.
- KAUKUA, N., SHAHIDI, M. K., KONSTANTINIDOU, C., DYACHUK, V., KAUCKA, M., FURLAN, A., AN, Z., WANG, L., HULTMAN, I., AHRLUND-RICHTER, L., BLOM, H., BRISMAR, H., LOPES, N. A., PACHNIS, V., SUTER, U., CLEVERS, H., THESLEFF, I., SHARPE, P., ERNFORS, P., FRIED, K. & ADAMEYKO, I. 2014. Glial origin of mesenchymal stem cells in a tooth model system. *Nature*, 513, 551-4.
- KORKMAZ, Y., IMHOF, T., KAMMERER, P. W., BLOCH, W., RINK-NOTZON, S., MOST, T., WEBER, M., KESTING, M., GALLER, K. M. & DESCHNER, J. 2021. The colocalizations of pulp neural stem cells markers with dentin matrix protein-1, dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein in human denticle (pulp stone) lining cells. *Ann Anat*, 239, 151815.
- KORKMAZ, Y., LANG, H., BEIKLER, T., CHO, B., BEHREND, S., BLOCH, W., ADDICKS, K. & RAAB, W. H. 2011. Irreversible inflammation is associated with decreased levels of the  $\alpha$ 1-,  $\beta$ 1-, and  $\alpha$ 2-subunits of sGC in human odontoblasts. *J Dent Res*, 90, 517-22.
- KORKMAZ Y, P. G., SCHROETER MM, PULADI B, PIEKAREK N, APPEL S, BLOCH W, LACKMANN J-W, DESCHNER J, FRIEBE A 2025. The  $\alpha$ 1- and  $\beta$ 1-Subunits of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase in Pericytes of Healthy Human Dental Pulp. *Int. J. Mol. Sci.* 26, 30.
- KORKMAZ, Y., PLOMANN, M., PULADI, B., DEMIRBAS, A., BLOCH, W. & DESCHNER, J. 2023. Dental Pulp Inflammation Initiates the Occurrence of Mast Cells Expressing the  $\alpha$ (1) and  $\beta$ (1) Subunits of Soluble Guanylyl Cyclase. *Int J Mol Sci*, 24.
- KOUSSOULAKOU, D. S., MARGARITIS, L. H. & KOUSSOULAKOS, S. L. 2009. A curriculum vitae of teeth: evolution, generation, regeneration. *Int J Biol Sci*, 5, 226-43.
- KUFAHL, M. 2017. *Zelluläre und subzelluläre Expression und Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2 in Odontoblasten der gesunden und der durch Dentinkaries, Caries profunda und Gangrän entzündlich veränderten humanen Dentin-Pulpa-Einhe.* Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universität zu Köln.
- KUITHAN, L. 2021. *Zelluläre und subzelluläre Lokalisationen der Transkriptionsfaktoren RUNX2 und RUNX3 in gesunden und degenerierten humanen Odontoblasten.* Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universität zu Köln.
- KWACK, K. H. & LEE, H. W. 2022. Clinical Potential of Dental Pulp Stem Cells in Pulp Regeneration: Current Endodontic Progress and Future Perspectives. *Front Cell Dev Biol*, 10, 857066.
- LEE, J. K., CHANG, S. W., PERINPANAYAGAM, H., LIM, S. M., PARK, Y. J., HAN, S. H., BAEK, S. H., ZHU, Q., BAE, K. S. & KUM, K. Y. 2013. Antibacterial efficacy of a human  $\beta$ -defensin-3 peptide on multispecies biofilms. *J Endod*, 39, 1625-9.
- LEE, S. H. & BAEK, D. H. 2012. Antibacterial and neutralizing effect of human  $\beta$ -defensins on *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid. *J Endod*, 38, 351-6.
- LEHMANN, K. M., HELLWIG, E. & WENZ, H.-J. 2015. *Zahnärztliche Propädeutik*, Köln, Deutscher Zahnärzte Verlag.
- LEYTON, L., DÍAZ, J., MARTÍNEZ, S., PALACIOS, E., PÉREZ, L. A. & PÉREZ, R. D. 2019. Thy-1/CD90 a Bidirectional and Lateral Signaling Scaffold. *Front Cell Dev Biol*, 7, 132.
- LIN, C. S. & LUE, T. F. 2013. Defining vascular stem cells. *Stem Cells Dev*, 22, 1018-26.
- LOMBARDI, T., DI FELICE, R. & SAMSON, J. 1992. Human odontoblasts contain S-100 protein-like immunoreactivity. *Anat Rec*, 232, 190-3.
- MARQUARDT, L. M., EE, X., IYER, N., HUNTER, D., MACKINNON, S. E., WOOD, M. D. & SAKIYAMA-ELBERT, S. E. 2015. Finely Tuned Temporal and Spatial Delivery of GDNF Promotes Enhanced Nerve Regeneration in a Long Nerve Defect Model. *Tissue Eng Part A*, 21, 2852-64.

- MATSUMURA, S., QUISPE-SALCEDO, A., SCHILLER, C. M., SHIN, J. S., LOCKE, B. M., YAKAR, S. & SHIMIZU, E. 2017. IGF-1 Mediates EphrinB1 Activation in Regulating Tertiary Dentin Formation. *J Dent Res*, 96, 1153-1161.
- MAZZONI, A., TJÄDERHANE, L., CHECCHI, V., DI LENARDA, R., SALO, T., TAY, F. R., PASHLEY, D. H. & BRESCHI, L. 2015. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J Dent Res*, 94, 241-51.
- MCGRAW-HILL COMPANIES, I. 2021. *Continuous Capillary* [Online]. Available: [https://images.slideplayer.com/10/2776645/slides/slide\\_21.jpg](https://images.slideplayer.com/10/2776645/slides/slide_21.jpg) [Accessed 20.12.24].
- MITSIADIS, T. A., FEKI, A., PAPACCIO, G. & CATON, J. 2011a. Dental pulp stem cells, niches, and notch signaling in tooth injury. *Adv Dent Res*, 23, 275-9.
- MITSIADIS, T. A., FEKI, A., PAPACCIO, G. & CATÓN, J. 2011b. Dental pulp stem cells, niches, and notch signaling in tooth injury. *Adv Dent Res*, 23, 275-9.
- NAKATOMI, M., QUISPE-SALCEDO, A., SAKAGUCHI, M., IDA-YONEMOCHI, H., OKANO, H. & OHSHIMA, H. 2018. Nestin expression is differently regulated between odontoblasts and the subodontoblastic layer in mice. *Histochem Cell Biol*, 149, 383-391.
- NEVES, V. C., BABB, R., CHANDRASEKARAN, D. & SHARPE, P. T. 2017. Promotion of natural tooth repair by small molecule GSK3 antagonists. *Sci Rep*, 7, 39654.
- NEVES, V. C. M. & SHARPE, P. T. 2018. Regulation of Reactionary Dentine Formation. *J Dent Res*, 97, 416-422.
- PARK, T. I., FEISST, V., BROOKS, A. E., RUSTENHOVEN, J., MONZO, H. J., FENG, S. X., MEE, E. W., BERGIN, P. S., OLDFIELD, R., GRAHAM, E. S., CURTIS, M. A., FAULL, R. L., DUNBAR, P. R. & DRAGUNOW, M. 2016. Cultured pericytes from human brain show phenotypic and functional differences associated with differential CD90 expression. *Sci Rep*, 6, 26587.
- PÉREZ, L. A., LEÓN, J., LÓPEZ, J., ROJAS, D., REYES, M., CONTRERAS, P., QUEST, A. F. G., ESCUDERO, C. & LEYTON, L. 2022. The GPI-Anchored Protein Thy-1/CD90 Promotes Wound Healing upon Injury to the Skin by Enhancing Skin Perfusion. *Int J Mol Sci*, 23.
- QUISPE-SALCEDO, A. & OHSHIMA, H. 2021. The Role of Dendritic Cells during Physiological and Pathological Dentinogenesis. *J Clin Med*, 10.
- RICHARD, L., VEDRENNE, N., VALLAT, J. M. & FUNALOT, B. 2014. Characterization of Endoneurial Fibroblast-like Cells from Human and Rat Peripheral Nerves. *J Histochem Cytochem*, 62, 424-435.
- ROBERTS-CLARK, D. J. & SMITH, A. J. 2000. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol*, 45, 1013-6.
- SANO, Y., SUGIUCHI, A., MITOMO, K., YANAGISAWA, A., KAMBE, R., FURUSAWA, M. & MURAMATSU, T. 2019. Changes of CD90 expression and immunoreactive cell localisation in rat dental pulp after cavity preparation. *Aust Endod J*, 45, 189-195.
- SCHUBERT, K., GUTKNECHT, D., KÖBERLE, M., ANDEREGG, U. & SAALBACH, A. 2013. Melanoma cells use Thy-1 (CD90) on endothelial cells for metastasis formation. *Am J Pathol*, 182, 266-76.
- SCHUBERT, K., POLTE, T., BÖNISCH, U., SCHADER, S., HOLTAPPELS, R., HILDEBRANDT, G., LEHMANN, J., SIMON, J. C., ANDEREGG, U. & SAALBACH, A. 2011. Thy-1 (CD90) regulates the extravasation of leukocytes during inflammation. *Eur J Immunol*, 41, 645-56.
- SELWITZ, R. H., ISMAIL, A. I. & PITTS, N. B. 2007. Dental caries. *The Lancet*, 369, 51-59.
- SEMPLE, F. & DORIN, J. R. 2012.  $\beta$ -Defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more? *J Innate Immun*, 4, 337-48.
- SHARPE, P. T. 2016. Dental mesenchymal stem cells. *Development*, 143, 2273-80.
- SHIBA, H., MOURI, Y., KOMATSUZAWA, H., OUHARA, K., TAKEDA, K., SUGAI, M., KINANE, D. F. & KURIHARA, H. 2003. Macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$  and beta-defensin-2 stimulate dentin sialophosphoprotein gene expression in human pulp cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 306, 867-71.

- SIDNEY, L. E., BRANCH, M. J., DUNPHY, S. E., DUA, H. S. & HOPKINSON, A. 2014. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells*, 32, 1380-9.
- SIEMERINK, M. J., KLAASSEN, I., VOGELS, I. M., GRIFFIOEN, A. W., VAN NOORDEN, C. J. & SCHLINGEMANN, R. O. 2012. CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures. *Angiogenesis*, 15, 151-63.
- SMITH, A. J. 2003. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *J Dent Educ*, 67, 678-89.
- SMITH, A. J., DUNCAN, H. F., DIOGENES, A., SIMON, S. & COOPER, P. R. 2016. Exploiting the Bioactive Properties of the Dentin-Pulp Complex in Regenerative Endodontics. *J Endod*, 42, 47-56.
- SMITH, A. J., SCHEVEN, B. A., TAKAHASHI, Y., FERRACANE, J. L., SHELTON, R. M. & COOPER, P. R. 2012a. Dentine as a bioactive extracellular matrix. *Arch Oral Biol*, 57, 109-21.
- SMITH, A. J., TOBIAS, R. S., CASSIDY, N., BEGUE-KIRN, C., RUCH, J. V. & LESOT, H. 1995. Influence of substrate nature and immobilization of implanted dentin matrix components during induction of reparative dentinogenesis. *Connect Tissue Res*, 32, 291-6.
- SMITH, A. J., TOBIAS, R. S., CASSIDY, N., PLANT, C. G., BROWNE, R. M., BEGUE-KIRN, C., RUCH, J. V. & LESOT, H. 1994. Odontoblast stimulation in ferrets by dentine matrix components. *Arch Oral Biol*, 39, 13-22.
- SMITH, J. G., SMITH, A. J., SHELTON, R. M. & COOPER, P. R. 2012b. Recruitment of dental pulp cells by dentine and pulp extracellular matrix components. *Exp Cell Res*, 318, 2397-406.
- SOLÉ-MAGDALENA, A., MARTÍNEZ-ALONSO, M., CORONADO, C. A., JUNQUERA, L. M., COBO, J. & VEGA, J. A. 2018. Molecular basis of dental sensitivity: The odontoblasts are multisensory cells and express multifunctional ion channels. *Ann Anat*, 215, 20-29.
- SONG, W., SHI, Y., XIAO, M., LU, H., QU, T., LI, P., WU, G. & TIAN, Y. 2009. In vitro bactericidal activity of recombinant human beta-defensin-3 against pathogenic bacterial strains in human tooth root canal. *Int J Antimicrob Agents*, 33, 237-43.
- SUPAKUL, S., YAO, K., OCHI, H., SHIMADA, T., HASHIMOTO, K., SUNAMURA, S., MABUCHI, Y., TANAKA, M., AKAZAWA, C., NAKAMURA, T., OKAWA, A., TAKEDA, S. & SATO, S. 2019. Pericytes as a Source of Osteogenic Cells in Bone Fracture Healing. *Int J Mol Sci*, 20.
- SVANDOVA, E., VESELA, B., KRATOCHVILOVA, A., HOLOMKOVA, K., ORALOVA, V., DADAKOVA, K., BURGER, T., SHARPE, P., LESOT, H. & MATALOVA, E. 2023. Markers of dental pulp stem cells in in vivo developmental context. *Ann Anat*, 250, 152149.
- TANI-ISHII, N., WANG, C. Y. & STASHENKO, P. 1995. Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. *Oral Microbiol Immunol*, 10, 213-9.
- TERLING, C., RASS, A., MITSIADIS, T. A., FRIED, K., LENDAHL, U. & WROBLEWSKI, J. 1995. Expression of the intermediate filament nestin during rodent tooth development. *Int J Dev Biol*, 39, 947-56.
- TOMSON, P. L., LUMLEY, P. J., ALEXANDER, M. Y., SMITH, A. J. & COOPER, P. R. 2013. Hepatocyte growth factor is sequestered in dentine matrix and promotes regeneration-associated events in dental pulp cells. *Cytokine*, 61, 622-9.
- TOMSON, P. L., LUMLEY, P. J., SMITH, A. J. & COOPER, P. R. 2017. Growth factor release from dentine matrix by pulp-capping agents promotes pulp tissue repair-associated events. *Int Endod J*, 50, 281-292.
- TRAKTUEV, D. O., MERFELD-CLAUSS, S., LI, J., KOLONIN, M., ARAP, W., PASQUALINI, R., JOHNSTONE, B. H. & MARCH, K. L. 2008. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res*, 102, 77-85.

- TURNER, M. D., NEDJAI, B., HURST, T. & PENNINGTON, D. J. 2014. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta*, 1843, 2563-2582.
- VIOLA, A. & LUSTER, A. D. 2008. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 48, 171-97.
- WANG, D., MAHARJAN, S., KUANG, X., WANG, Z., MILLE, L. S., TAO, M., YU, P., CAO, X., LIAN, L., LV, L., HE, J. J., TANG, G., YUK, H., OZAKI, C. K., ZHAO, X. & ZHANG, Y. S. 2022. Microfluidic bioprinting of tough hydrogel-based vascular conduits for functional blood vessels. *Sci Adv*, 8, eabq6900.
- WANG, Y., XU, J., CHANG, L., MEYERS, C. A., ZHANG, L., BRODERICK, K., LEE, M., PEULT, B. & JAMES, A. W. 2019. Relative contributions of adipose-resident CD146(+) pericytes and CD34(+) adventitial progenitor cells in bone tissue engineering. *NPJ Regen Med*, 4, 1.
- WU, Y., ZHOU, C., TONG, X., LI, S. & LIU, J. 2022. Histochemical localization of putative stem cells in irreversible pulpitis. *Oral Dis*, 28, 1207-1214.
- YANG, D., SOLIDUM, J. G. N. & PARK, D. 2023. Dental Pulp Stem Cells and Current in vivo Approaches to Study Dental Pulp Stem Cells in Pulp Injury and Regeneration. *J Bone Metab*, 30, 231-244.
- YIANNI, V. & SHARPE, P. T. 2019. Perivascular-Derived Mesenchymal Stem Cells. *J Dent Res*, 98, 1066-1072.
- YUMKHAM, R., NAGARATHNA, C., SANJENBAM, N., GOPILAL SINGH, A., PHILIP SINGH, H. & ASHEM, A. 2024. Isolation and characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Bioinformation*, 20, 557-561.
- ZAUGG, L. K., BANU, A., WALTHER, A. R., CHANDRASEKARAN, D., BABB, R. C., SALZLECHNER, C., HEDEGAARD, M. A. B., GENTLEMAN, E. & SHARPE, P. T. 2020. Translation Approach for Dentine Regeneration Using GSK-3 Antagonists. *J Dent Res*, 99, 544-551.
- ZHAO, I. S., GAO, S. S., HIRAISHI, N., BURROW, M. F., DUANGTHIP, D., MEI, M. L., LO, E. C. & CHU, C. H. 2018. Mechanisms of silver diamine fluoride on arresting caries: a literature review. *Int Dent J*, 68, 67-76.

## 12 Anhang

**Tabelle 3:** Verwendete Puffer und Lösungen (in Anlehnung an: (Kuithan, 2021, Kufahl, 2017, Chłopek, 2018))

Lösung/Puffer	Ansetzen
<b>Phosphatpuffer (PB)</b>	<p><b>1 L PB Stammlösung, 0,2 M, pH 7,2-7,4</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <math>\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}</math>; 28,8 g/l</li> <li>2. <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}</math>; 5,2 g/l</li> <li>3. Mit NaOH und HCl Einstellung des pH-Wertes auf 7,4</li> <li>4. Lösung auffüllen mit Aqua dest. bis 1 L</li> </ol> <p><b>1 L PB Gebrauchslösung, 0,1 M PB, pH 7,4</b> Stammlösung 1:1 mit Aqua dest. verdünnen, bis pH 7,4 erreicht ist</p>
<b>Phosphatpuffer-Natriumchlorid (PBS)</b>	<p><b>1 L PBS Stammlösung, 0,2 M, pH 7,2-7,4</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <math>\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}</math>; 28,8 g/l</li> <li>2. <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}</math>; 5,2 g/l</li> <li>3. NaCl; 17,53 g/l</li> </ol> <p><b>1 L PBS Gebrauchslösung/Waschlösung, 0,1 M, pH 7,4</b> Stammlösung 1:1 mit Aqua dest. verdünnen, bis pH 7,4 erreicht ist Zusammensetzung:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <math>\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}</math>; 14,4 g/l</li> <li>2. <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}</math>; 2,6 g/l</li> <li>3. NaCl; 8,76 g/l</li> <li>4. Aqua dest.; 900 ml (bzw. auffüllen bis 1000 ml erreicht sind)</li> </ol>
<b>Trispuffer (TB) und Tris-HCL Puffer/Gebrauchslösung</b>	<p><b>1 L TB Stammlösung, 0,5 M, pH 7,6</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan); 60,57 g/l</li> <li>2. Aqua dest., 750 ml/l</li> <li>3. Titration mit HCl auf pH von 7,6; ca. 150 ml</li> <li>4. Mit Aqua dest. auf 1 L auffüllen</li> </ol> <p>Erneute Kontrolle des pH-Wertes von 7,6</p> <p><b>1 L Tris-HCL Gebrauchslösung, 0,05 M, pH 7,6</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Trispuffer Stammlösung; 100 ml/l</li> <li>2. Mit Aqua dest. auf pH von 7,6 einstellen; 800 ml/l</li> <li>3. Mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen und pH erneut kontrollieren</li> </ol>
<b>Trispuffer-NaCl (TBS)</b>	<p><b>1 L TBS Gebrauchslösung, 0,05 M, pH 7,6</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. NaCl; 8,76 g/l</li> <li>2. Aqua dest.; 800 ml/l</li> <li>3. 0,5 M TB hinzugeben und einstellen auf pH 7,6; 100 ml/l</li> <li>4. Mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen und pH erneut kontrollieren.</li> </ol>
<b>Triton® X-100 - 0,25 %</b>	<p><b>Die Lösung 1-3 Tage vor der Inkubation vorbereiten und bei 4 °C aufbewahren!</b></p> <p><b>Für 100 ml:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 0,05 M TBS; 99,750 µl</li> <li>2. 100 % Triton® X-100; 250 µl</li> </ol>
<b>Fixierlösung (Zamboni-Lösung)</b>	<p><b>1 L (4 % Paraformaldehyd (PFA) + 0,1 M PBS + 0,2 % Pikrinsäure)</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Paraformaldehyd; 40,00 g/l</li> <li>2. 0,1 M PBS; pH 7,4; 998,00 ml</li> <li>3. Gesättigte Pikrinsäure, filtriert; 2 ml/l</li> </ol>

<b>Entkalkungslösung</b>	<b>1 L (4 N Ameisensäure + 0,1 M PB oder Aqua dest.)</b> 1. 4 N Ameisensäure; 150,885 ml 2. 0,1 M PB oder Aqua dest.; 849,115 ml
<b>Kryoprotektionslösung</b>	<b>30 %ige Saccharoselösung in 0,1 M PBS, pH 7,4</b> <b>Für 100 ml:</b> 1. Saccharose (in Pulverform); 30 g 2. 0,1 M PBS; 70 ml PH-Wert auf 7,4 einstellen
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lösung - 0,3 %</b>	1. 0,05 M TBS; 990 µl 2. 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; 10 µl Unter Lichtausschluss lagern!
<b>Blockierungspuffer</b>	<b>(2 % BSA + 5 % NGS in 0,05 M TBS) Wird kurz vor Beginn der Immunhistochemie angesetzt</b> <b>Für 1 ml:</b> 1. 0,05 M TBS; 950 µl 2. BSA; 20 mg 3. NGS; 50 µl
<b>DAB-Lösung</b>	<b>Für 50 ml:</b> 1. 0,05 M Tris-HCl; 50 ml 2. Eine Tablette DAB (einrühren, dann filtrieren) 3. Nickelsulfatlösung (13 mg/ml); 50 µl 4. 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; 6,5 µl 15 Minuten vorher, unter dem Abzug, alles vorbereiten. Nach dem Ansetzen mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , zwei Minuten lang abwarten, dann verwenden. Unter Lichtausschluss lagern.
<b>Antikörper-Verdünnungspuffer</b>	1. 0,05 M TBS; 970 µl 2. NGS; 30 µl
<b>ABC-Komplex</b>	1. 0,05 M TBS; 6 ml 2. 1x Tropfen Lösung A; ca. 50 µl 3. 1x Tropfen Lösung B; ca. 50 µl Unter Lichtausschluss lagern und eine Stunde vor dem Start der Immunhistochemie vorbereiten.
<b>Nickelsulfatlösung</b>	1. In Aqua dest. angesetzt; 13 mg/ml 2. In Aliquots von jeweils 50 µl bei -20 °C lagern Unter Lichtausschluss lagern.

**Tabelle 4:** Verwendete gebrauchsfertige Lösungen (in Anlehnung an: (Kuithan, 2021, Kufahl, 2017, Chlopek, 2018))

<b>Handelsname</b>	<b>Wirkstoff</b>	<b>Hersteller, Ort</b>
<b>BSA = bovine serum albumin</b>	Rinderserum Albumin	A7030, Merck, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<b>Entellan™ rapid mounting medium for microscopy</b>	Toluol (Methylbenzen)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<b>H&amp;E</b>	Hämatoxylin/Eosin	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>NGS = normal goat serum</b>	Normales Ziegen Serum	ab7481, abcam, Cambridge, UK
<b>Tissue Tek® O.C.T. Compound</b>	Aus wasserlöslichen Glykolen und Harzen, dient als Einbettmedium	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufeu im Breisgau, Deutschland
<b>Triton™ X-100</b>	Octylphenol Ethoxylat, Octoxinol 9	X100, Merck, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

**Tabelle 5:** Verwendete Chemikalien (in Anlehnung an: (Kuithan, 2021, Kufahl, 2017, Chlopek, 2018))

Handelsname	Wirkstoff/Chemische Formel	Hersteller, Ort
<b>Ameisensäure</b>	Formic acid, CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Ammonium nickel (II) sulfat hexahydrat</b>	Nickelammoniumsulfat, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Ni(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	574988, Merck, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<b>Aqua dest.</b>	H <sub>2</sub> O	
<b>Chlorwasserstoff</b>	Hydrogenchlorid, HCL	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>DAB = Diaminobenzidin</b>	3,3',4,4'-Tetraaminobiphenyl -tetrahydrochlorid, (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> x 4 HCl	D5905, Merck, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
<b>Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Entellan™</b>	Enthält: Acrylharze/ Methacrylat	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Ethanol</b>	Ethanol, C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Flüssigstickstoff</b>	LN oder LN <sub>2</sub>	
<b>Natriumchlorid</b>	Sodium chloride, NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Natriumhydroxid</b>	Sodium hydroxide, NaOH	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Paraformaldehyd</b>	OH(CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub> H <sub>(n=8-100)</sub>	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Saccharose</b>	Sucrose, C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>TNP Pikrinsäure</b>	2,4,6-Trinitrophenol, C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	Fluka Chemical Corp., Neu-Ulm, Deutschland
<b>TRIS</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol, C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Wasserstoffperoxid</b>	Hydrogen peroxide, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Xylol I und II</b>	Dimethylbenzen, C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland

**Tabelle 6:** Verwendete Antikörper bei der ABC-Methode

Antikörper	Antigen	Hersteller, Ort
<b>Rabbit monoclonal Anti CD34 (EPR2999)</b>	Detektiert CD34	ab110643; abcam, Cambridge, UK
<b>Rabbit monoclonal Anti Thy1/CD90 (D3V8A)</b>	Detektiert endogene Level des Thy/CD90 Proteins	#13801; Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA

**Tabelle 7:** Verwendeter sekundärer Antikörper bei der ABC-Methode

Sekundärer Antikörper	Hersteller, Ort
Goat Anti-Rabbit IgG Antibody (H+L), Biotinylated	BA-1000, Vector Lab., Biozol, Inc., Burlingame, USA

### Protokoll zur Sammlung humaner Zähne in der MKG-Klinik Uni-Mainz (14.07.2021)

#### I) Im Labor:

- 1) Unter dem Abzug:  
Fixativ [4% PFA+0.2% Pikrinsäure in 0.1 M PBS] ansetzen.
- 2) Für jeden mit einer Nummer anonymisierten Patienten braucht man ein Falcon-Röhrchen (50ml). Die Falcon-Röhrchen mit dem Fixativ werden in die Klinik transportiert.

#### II) In der Klinik:

- 3) Falcon-Röhrchen und Fixativ werden bei 4°C im Kühlschrank, maximal für drei Wochen, in der Klinik aufbewahrt.
- 4) Vor der Extraktion (ein oder mehrere Zähne von dem/der gleichen Patienten/in) wird für jeden Patienten ein Falcon-Röhrchen aus dem Kühlschrank abgeholt und im Extraktionsraum für die Zähne-Sammlung bereitgestellt.
- 5) Nach der Extraktion müssen die Zähne **sofort** innerhalb einer Minute in die Fixativ-Lösung gebracht werden. Wenn die Zähne mehr als eine Minute auf dem Operationstisch gelegt wurden, dürfen sie nicht gesammelt werden. Falcon Röhrchen müssen mit einem wasserfesten Stift mit den folgenden Daten beschriftet werden:
  - a) Anonymisierte Patientenummer (P1)
  - b) Geburtsdatum (nur das Jahr)
  - c) Geschlecht (m/f)
  - d) Zahnnummer (28, 36, ...)
  - e) Diagnose (kurz: gesund, initiale Karies, tiefe Karies, Pulpitis, Parodontitis)
  - f) Erkrankungen (D. Mellitus, Adipositas, Kardiovaskuläre Erkrankungen, ...)
  - g) Extraktionsdatum

Anschließend müssen Falcon-Röhrchen direkt wieder bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt werden.

- 6) Die Zähne in der Fixativ-Lösung werden mit einer Kühlbox in das Labor transportiert. Die Zähne werden im Labor weiterbearbeitet.

Bei Fragen ZÄ Judith Schultheis: +49XYXYXYXY anrufen. Sie ist jederzeit erreichbar.

**Abbildung 29:** Klinischer Dokumentationsbogen vor der Zahnextraktion

**Tabelle 8: Grauwerte des Hintergrundes und die Färbungsintensität der Blutgefäße**

<b>CD34:</b>					
<b>gesund</b>			<b>kariös</b>		
Patient	Grauwerte Hintergrund	Färbungsintensität Blutgefäße	Patient	Grauwerte Hintergrund	Färbungsintensität Blutgefäße
P116	185.058	141.203	P83	184.814	69.605
	213.749	104.918		212.019	115.700
	181.576	105.813		174.922	107.709
P1.135c	184.430	140.734	P112	182.628	146.845
	211.749	145.768		210.872	90.149
	181.536	135.340		180.400	103.427
P135c	183.154	137.603	P115	182.808	129.484
	212.287	132.983		209.232	92.649
	179.293	146.499		177.696	131.991
P39	188.646	148.244	P135b	186.800	140.864
	212.745	114.720		215.061	128.705
	181.870	82.821		182.404	106.245
P123	182.485	173.573	P128	178.209	85.251
	210.352	168.458		211.361	81.226
	182.116	166.088		178.695	126.474
P1003	180.656	135.976	P94	180.843	121.606
	206.408	144.383		208.509	106.121
	179.039	140.020		175.182	108.568

<b>CD90:</b>					
<b>gesund</b>			<b>kariös</b>		
Patient	Grauwerte Hintergrund	Färbungsintensität Blutgefäße	Patient	Grauwerte Hintergrund	Färbungsintensität Blutgefäße
P116	187.942	120.696	P83	182.159	162.903
	214.281	161.389		209.636	141.697
	183.117	142.738		179.406	157.687
P1.135c	181.574	177.796	P112	184.780	104.074
	211.843	167.347		213.960	149.465
	178.375	158.879		180.114	109.773
P135c	182.389	149.134	P115	184.964	120.069
	209.185	172.656		211.856	90.123
	178.868	152.677		180.711	98.496
P39	186.181	167.389	P135b	185.322	93.709
	210.446	146.712		214.626	110.587
	176.289	154.540		184.920	93.687
P123	182.747	158.777	P128	182.784	134.648
	213.402	148.647		212.613	126.327
	181.866	176.450		179.497	102.256
P1003	179.340	150.754	P94	184.993	114.948
	205.964	115.386		213.942	127.292
	175.999	119.738		185.410	111.442

**Tabelle 9: Mittelwerte**

<b>CD34:</b>					
<b>gesund</b>	Mittelwerte (DI=Densitometrische Einheit):	Mittelwerte (DI=Densitometrische Einheit):	<b>kariös</b>	Mittelwerte (DI=Densitometrische Einheit):	Mittelwerte (DI=Densitometrische Einheit):
Patient	Grauwerte Hintergrund	Färbungsintensität Blutgefäße	Patient	Grauwerte Hintergrund	Färbungsintensität Blutgefäße
P116	193,461	117,311	P83	190,585	97,671
P1.135c	192,572	140,614	P112	191,3	113,474
P135c	191,578	139,028	P115	169,912	118,04
P39	194,42	115,262	P135b	194,744	125,271
P123	191,651	169,373	P128	189,421	97,65
P1003	188,701	140,126	P94	188,178	112,098

<b>CD90:</b>					
<b>gesund</b>	Mittelwerte (DI=Densitometrische Einheit):	Mittelwerte (DI=Densitometrische Einheit):	<b>kariös</b>	Mittelwerte (DI=Densitometrische Einheit):	Mittelwerte (DI=Densitometrische Einheit):
Patient	Grauwerte Hintergrund	Färbungsintensität Blutgefäße	Patient	Grauwerte Hintergrund	Färbungsintensität Blutgefäße
P116	195,113	141,608	P83	190,4	154,096
P1.135c	190,597	167,341	P112	192,951	121,104
P135c	190,147	157,156	P115	192,51	102,896
P39	190,972	156,213	P135b	194,956	99,328
P123	192,672	161,291	P128	191,631	121,077
P1003	187,101	128,626	P94	194,782	117,894

**Tabelle 10:** Subtraktion der Färbungsintensitäten der Blutgefäße von den Grauwerten des Hintergrundes

<b>CD34:</b>					
	<b>gesund</b>			<b>kariös</b>	
	Patient	(Grauwert Hintergrund-Intensität der Blutgefäßfärbung)		Patient	(Grauwert Hintergrund-Intensität der Blutgefäßfärbung)
	P116	76,15		P83	97,671
	P1.135c	51,958		P112	77,826
	P135c	52,55		P115	51,872
	P39	79,158		P135b	69,473
	P123	22,278		P128	91,771
	P1003	48,575		P94	76,08
<b>CD90:</b>					
	<b>gesund</b>			<b>kariös</b>	
	Patient	(Grauwert Hintergrund-Intensität der Blutgefäßfärbung)		Patient	(Grauwert Hintergrund-Intensität der Blutgefäßfärbung)
	P116	53,505		P83	36,304
	P1.135c	23,256		P112	71,847
	P135c	32,991		P115	89,614
	P39	34,759		P135b	95,628
	P123	31,381		P128	70,554
	P1003	58,475		P94	76,888

**Tabelle 11:** Grauwerte des Hintergrundes und die Färbungsintensität der Perizyten

<b>CD34:</b>						
	<b>gesund</b>			<b>kariös</b>		
	Patient	Grauwerte Hintergrund	Färbungsintensität Perizyten	Patient	Grauwerte Hintergrund	Färbungsintensität Perizyten
	P116	169,560	112,962	P83	182,246	59,418
		172,368	109,719		191,401	91,178
		169,253	87,074		184,102	86,031
	P1.135c	177,024	93,125	P112	174,041	86,360
		180,627	114,410		185,856	100,827
		186,504	91,310		170,654	65,475
	P135c	173,568	113,262	P115	181,972	115,212
		174,255	116,430		183,810	111,108
		175,829	101,054		185,001	111,097
	P39	163,455	80,510	P135b	182,757	110,390
		169,008	74,086		192,700	92,305
		168,671	88,411		186,965	102,325
	P123	172,286	130,404	P128	190,215	63,243
		175,333	137,276		203,505	56,344
		179,897	130,928		195,353	61,910
	P1003	180,446	102,506	P94	186,925	85,591
		190,746	66,738		190,372	69,358
		182,670	112,785		182,937	75,080
<b>CD90:</b>						
	<b>gesund</b>			<b>kariös</b>		
	Patient	Grauwerte Hintergrund	Färbungsintensität Perizyten	Patient	Grauwerte Hintergrund	Färbungsintensität Perizyten
	P116	164,897	117,424	P83	189,308	83,172
		179,542	133,594		188,144	102,550
		170,931	149,025		177,314	79,928
	P1.135c	203,226	142,940	P112	176,740	113,872
		201,127	136,155		184,840	98,888
		189,766	118,472		169,521	111,006
	P135c	181,998	141,332	P115	170,351	69,209
		191,438	146,372		177,150	55,548
		189,551	128,265		180,495	61,417
	P39	185,432	110,758	P135b	173,128	105,680
		185,552	129,149		177,501	107,460
		172,973	113,971		186,957	121,348
	P123	169,068	123,173	P128	195,698	101,660
		176,666	133,474		207,680	93,517
		168,198	147,171		197,947	101,621
	P1003	187,449	123,226	P94	180,089	96,463
		186,595	118,261		190,449	103,260
		187,761	110,783		186,401	94,605

**Tabelle 12: Mittelwerte**

<b>CD34:</b>					
<b>gesund</b>	Mittelwerte (DI=Densitometrische Einheit):	Mittelwerte (DI=Densitometrische Einheit):	<b>kariös</b>	Mittelwerte (DI=Densitometrische Einheit):	Mittelwerte (DI=Densitometrische Einheit):
Patient	Grauwerte Hintergrund	Färbungsintensität Perizyten	Patient	Grauwerte Hintergrund	Färbungsintensität Perizyten
P116	170,394	103,252	P83	185,916	78,876
P1.135c	181,385	99,615	P112	176,850	84,221
P135c	174,551	110,249	P115	183,594	112,472
P39	167,045	81,002	P135b	187,474	101,673
P123	175,839	132,869	P128	196,358	60,499
P1003	184,621	94,010	P94	186,745	76,676
<b>CD90:</b>					
<b>gesund</b>	Mittelwerte (DI=Densitometrische Einheit):	Mittelwerte (DI=Densitometrische Einheit):	<b>kariös</b>	Mittelwerte (DI=Densitometrische Einheit):	Mittelwerte (DI=Densitometrische Einheit):
Patient	Grauwerte Hintergrund	Färbungsintensität Perizyten	Patient	Grauwerte Hintergrund	Färbungsintensität Perizyten
P116	171,790	133,348	P83	184,922	88,550
P1.135c	198,040	132,522	P112	177,034	107,922
P135c	187,662	138,656	P115	175,999	62,058
P39	181,319	117,959	P135b	179,195	111,496
P123	171,311	134,606	P128	200,442	98,933
P1003	187,268	117,423	P94	185,646	98,109

**Tabelle 13: Subtraktion der Färbungsintensitäten der Perizyten von den Grauwerten des Hintergrundes**

<b>CD34:</b>					
<b>gesund</b>			<b>kariös</b>		
Patient	(Grauwert Hintergrund-Intensität der Perizyten)		Patient	(Grauwert Hintergrund-Intensität der Perizyten)	
P116		67,142	P83		107,041
P1.135c		81,770	P112		92,630
P135c		64,302	P115		71,122
P39		86,042	P135b		85,801
P123		42,969	P128		135,859
P1003		90,611	P94		110,068
<b>CD90:</b>					
<b>gesund</b>			<b>kariös</b>		
Patient	(Grauwert Hintergrund-Intensität der Perizyten)		Patient	(Grauwert Hintergrund-Intensität der Perizyten)	
P116		38,442	P83		96,372
P1.135c		65,517	P112		69,112
P135c		49,006	P115		113,941
P39		63,360	P135b		67,699
P123		36,705	P128		101,509
P1003		69,845	P94		87,537

## 13 Danksagung

## 14 Tabellarischer Lebenslauf



---