

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE
Prof. Dr. Wolfgang Buchalla
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**IN-VITRO-UNTERSUCHUNGEN ZUR FREISETZUNG UND WIRKUNG VON
TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β 1 AUS HUMANEM DENTIN**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Niklas Bruckner

2017

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE
Prof. Dr. Wolfgang Buchalla
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**IN-VITRO-UNTERSUCHUNGEN ZUR FREISETZUNG UND WIRKUNG VON
TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β 1 AUS HUMANEM DENTIN**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Niklas Bruckner

2017

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Kerstin Galler, Ph.D.
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Carola Kolbeck
Tag der mündlichen Prüfung:	09.04.2018

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	3
2.	Literaturübersicht.....	5
2.1	Morphogenese von Dentin und Pulpa.....	5
2.2	Der Pulpa-Dentin-Komplex.....	6
2.3	Stammzellen.....	7
2.3.1	Dentale Stammzellen.....	7
2.4	Dentinmatrixproteine.....	10
2.4.1	Zusammensetzung der organischen Dentinmatrix.....	10
2.4.2	Freisetzung und Wirkung der Proteine.....	12
2.5	Der Wachstumsfaktor TGF- β	14
2.6	Grundlagen der regenerativen Endodontie.....	15
3.	Zielsetzung.....	21
3.1	Ultraschall als Hilfsmittel zur Isolierung von Dentinmatrixproteinen.....	21
3.2	Wirkung verschiedener Nährlösungen auf humane Pulpazellen.....	22
4.	Material und Methoden.....	23
4.1	Verwendete Nährmedien und Chemikalien.....	23
4.2	Verwendete Materialien und Geräte.....	24
4.3	Freisetzung von Dentinmatrixproteinen aus Dentinscheiben.....	27
4.3.1	Testgruppen und Herstellung der Dentinscheiben.....	27
4.3.2	Versuchsdurchführung.....	27
4.3.3	Quantifizierung mittels ELISA.....	28
4.4	Freisetzung von Dentinmatrixproteinen im Wurzelkanalmodell.....	29
4.4.1	Aufbereitung der Wurzelkanäle.....	29
4.4.2	Herstellung des Wurzelkanalmodells.....	30
4.4.3	Testgruppen und Versuchsdurchführung.....	30

4.4.4	Quantifizierung mittels ELISA	31
4.5	Untersuchungen zu Zellproliferation und Mineralisation	31
4.5.1	Versuchsaufbau	31
4.5.2	Isolierung von Dentinmatrixproteinen	32
4.5.3	Analyse des DMP-Mediums	33
4.5.4	Vorbereitung der Zellen	33
4.5.5	Nährlösungen	34
4.5.6	Bestimmung der Zellviabilität	36
4.5.7	Alizarinfärbung	36
5.	Ergebnisse	38
5.1	Freisetzung von TGF- β 1 aus Dentinscheiben	38
5.2	Freisetzung von TGF- β 1 im Wurzelkanalmodell	41
5.3	Analyse des DMP-Mediums	43
5.4	Nachweis der Zellviabilität mittels MTT-Test	44
5.5	Mineralisationsnachweis durch Alizarinfärbung	46
6.	Diskussion	49
6.1	Verwendung von Ultraschall zur Freisetzung von Dentinmatrixproteinen	49
6.2	Freisetzung und Aufbewahrung von Dentinmatrixproteinen unter klinischen Bedingungen	51
6.3	Wirkung von Dentinmatrixproteinen auf humane Pulpazellen	53
6.4	Verwendung autologer Wachstumsfaktoren im Rahmen der regenerativen Endodontie	55
7.	Zusammenfassung	58
8.	Literaturverzeichnis	60
9.	Danksagung	78
10.	Lebenslauf	79

1. Einleitung

„Gesunde, eigene Zähne bis ins hohe Alter“. Mit Slogans wie diesem Werben heute viele Zahnärzte, um Patienten von ihrer Praxis zu überzeugen. Eine wichtige Säule im Rahmen des Zahnerhalts spielt dabei die Endodontie. Obwohl die Kariesprävalenz über die letzten Jahrzehnte stark abgenommen hat und dadurch etwa im Jahr 2015 im Vergleich zum Jahr 1991 ca. 40% weniger Füllungen gelegt wurden, hat sich die Anzahl der Wurzelkanalbehandlungen im gleichen Zeitraum sogar um 1,7% erhöht (1). Diese Zahlen belegen den hohen Stellenwert und Erfolg der Endodontie als eigenes Fachgebiet innerhalb der Zahnheilkunde, dessen Behandlungsstrategien durch wissenschaftliche Evidenz untermauert sind. Seit 1838, als Edward Maynard eine feine Uhrfeder als erstes Aufbereitungsinstrument verwendete (2), haben der technische und wissenschaftliche Fortschritt den Ablauf und die Prognose einer Wurzelkanalbehandlung stetig verbessert. Dennoch ist unabhängig von Aufbereitungsinstrumenten, Spülprotokoll oder Abfülltechnik ein wesentliches Ergebnis der klassischen endodontischen Behandlung immer gleichgeblieben: die Zahnpulpa ist nach der Behandlung entfernt und der Zahn somit avital. Diese fehlende Vitalität und der damit verbundene Verlust wesentlicher Eigenschaften des Pulpa-Dentin-Komplexes bringen mehrere Nachteile mit sich. So fehlt die Fähigkeit der Schmerzweiterleitung als Warnsystem ebenso wie die Bildung von Tertiärdentin als körpereigener Abwehrmechanismus. Im Sonderfalle des jugendlichen Patienten mit nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum entstehen weitere Probleme, da mit dem Verlust der Zahnpulpa das Wurzelwachstum arretiert. Es verbleiben dünne frakturgefährdete Dentinwände, die die herkömmliche Wurzelkanalbehandlung schwierig oder nicht möglich machen. Eine endodontische Behandlung ist dann nur durch Schaffung einer Hartschichtbarriere mittels Kalziumhydroxideinlage oder einem apikalen Plug aus Mineral Trioxid Aggregat (MTA) möglich. Die frakturgefährdeten Dentinwände sowie das ungünstige Kronen-Wurzel-Verhältnis bestehen allerdings weiterhin. Ausgehend von diesen Problematiken ist es erstrebenswert, eine Behandlungsmethode zu etablieren, die zum einen zur Ausheilung der vorhandenen Entzündung führt und zum anderen die Vitalität und Integrität des Pulpa-Dentin-Komplexes erhält oder wiederherstellt. Diesem Spagat widmet sich das Forschungsgebiet der regenerativen Endodontie. Zur Revitalisierung von Zähnen mit nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum

existiert ein Behandlungsprotokoll, das am Patienten bereits vielfach erfolgreich durchgeführt wurde. An dieser Stelle sei auf die Behandlungsempfehlungen der European Society of Endodontology (ESE) (3) und der American Association of Endodontists (AAE) (4) verwiesen. Daneben wird mit Hilfe von Tissue Engineering, bisher noch in Tierversuchen, daran geforscht, die regenerativen Behandlungstechniken zu erweitern und zu optimieren. Im Rahmen dieser Forschung sind die in der Dentinmatrix eingebetteten, bioaktiven Moleküle von großem Interesse. Man erhofft sich den Einsatz dieser Substanzen als autologe Zusätze in endodontischen Verfahren, um dadurch den Revitalisierungsprozess effektiver steuern und stimulieren zu können.

Die vorliegende Arbeit widmet sich der Extraktion von bioaktiven Proteinen aus der Dentinmatrix, die im Rahmen der regenerativen oder reparativen endodontischen Therapie eingesetzt werden könnten.

Ziel der durchgeführten *in-vitro* Studie war es, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren aus Dentin in physiologischer Lösung zu isolieren. Dabei wurde untersucht, ob die Aktivierung der Lösungen mittels Ultraschall die Menge an freigesetzten Proteinen erhöhen kann. Anhand eines kliniknahen Modells sollte die Frage geklärt werden, ob es möglich ist, relevante Mengen an Wachstumsfaktoren aus einem Wurzelkanal zu gewinnen. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die extrahierten Dentinmatrixproteine Effekte auf Zahnpulpazellen haben. Dazu wurde der Einfluss verschiedener Konzentrationen von Dentinmatrixproteinen auf Vitalität und Mineralisationsverhalten humaner Pulpazellen untersucht.

2. Literaturübersicht

2.1 Morphogenese von Dentin und Pulpa

Während der Embryonalentwicklung bilden sich alle Bestandteile des Zahns sowie der Zahnhalteapparat aus dem Ektoderm, welches neben dem Mesoderm und dem Entoderm eines der drei embryonalen Keimblätter darstellt. Das Dentin sowie das Zement, die Pulpa und der Zahnhalteapparat stammen dabei aus dem Kopfmesenchym. Dieses leitet sich aus der Neuralleiste ab, welche wiederum ektodermaler Herkunft ist (5–8). Die Zahnentwicklung beginnt etwa 4-6 Wochen nach dem Eisprung, dabei bilden sich in der primitiven Mundhöhle des Embryos (Stomodeum) zwei bogenförmige Bereiche mit odontogenem Epithel, die den beiden Zahnbögen im Oberkiefer und Unterkiefer entsprechen (5, 7). Vor Bildung der Zahnhartsubstanzen formiert sich zuerst ein Zahnkeim, welcher aus einem Schmelzorgan, einem Zahnsäckchen (Zahnhalteapparat) und einer Zahnpapille (Dentin, Pulpa) besteht (7, 9). Das Schmelzorgan eines jeden Zahnes entsteht durch Ausknospung aus der Epithelleiste. Über ein Kappenstadium differenziert die Schmelzknospe schließlich zur Schmelzglocke, welche aus einem inneren und einem äußeren Schmelzepithel besteht, die eine Schmelzpulpa umschließen (7–10). Auf der Innenseite dieser Schmelzglocke liegt die Zahnpapille. Dort verdichten sich entlang des inneren Schmelzepithels die Zellen des Kopfmesenchyms, wodurch eine epithelartige Anordnung von benachbarten Mesenchymzellen entsteht. Diese Zellen werden als Präodontoblasten bezeichnet, sie werden von den Zellen des Inneren Schmelzepithels durch eine Basallamina (*membrana praeformativa*) getrennt (7, 8). Nur solche Mesenchymzellen, die direkten Kontakt zur Basallamina haben, können zu Präodontoblasten differenzieren, die anderen Zellen verbleiben in der subodontoblastischen Zone als Höhl-Zellschicht und können nach dem Untergang der primären Odontoblasten ausdifferenzieren und als Immunantwort Reparaturdentin bilden (11–14). Zu Beginn der Hartschubstanzbildung verdickt sich die Membrana praeformativa und es kommt durch komplexe Induktionsvorgänge zur Ausbildung der Odontoblasten aus den Präodontoblasten. Diese beginnen dann mit der Ablagerung von organischer Dentinmatrix, dem Prädentin (7, 10). Das unmineralisierte Prädentin wird erst durch Ablagerung von Apatitkristallen zum reifen

Dentin. Dabei werden zuerst kugelförmige Kalkosphäriten gebildet, deren Zwischenräume nachträglich verkalken. Die Bestandteile der organischen Dentinmatrix spielen dabei als Steuerungs- und Strukturelemente (siehe auch 2.4) dieses Prozesses eine entscheidende Rolle (15, 16). Das durch die stetige Apposition von Dentin eingeschlossene Weichgewebsskompartiment stellt die Zahnpulpa dar (8). Im Gegensatz zu den Ameloblasten, welche nach Durchbruch des Zahnes als Schmelzoberhäutchen der Zahnoberfläche aufliegen und durch Mastikation zerstört werden, behalten die Odontoblasten zeitlebens die Fähigkeit zur Dentinbildung (6).

2.2 Der Pulpa-Dentin-Komplex

Die Odontoblasten kleiden als periphere Pulpazellen das Pulpenkavum als einreihiger Zellsaum aus und entsenden jeweils einen Odontoblastenfortsatz, auch Tomessche Faser genannt, in das Dentin. Sie stellen somit das Bindeglied zwischen den beiden Kompartimenten Pulpa und Dentin dar (5). Die Pulpa übernimmt in Bezug auf das Dentin eine formative, sensorische, nutritive und defensive Funktion (5). Dentin besteht zu 70 Gewichtsprozenten aus anorganischem Material, dabei handelt es sich um Apatitkristalle, und zwar um Hydroxylapatit, welches aus Phosphor und Kalzium besteht und die Summenformel $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ besitzt. Daneben finden sich 10% Wasser und 20% organische Anteile. Die organischen Bestandteile des Dentins werden unter 2.4 beschrieben (5, 17). Die Grundsubstanz der Pulpa besteht aus einer gallertartigen extrazellulären Matrix, welche hauptsächlich aus Glykosaminoglykanen besteht, sowie aus Bindegewebsfasern, die ein dreidimensionales Gitternetz ausbilden. Für die Produktion und den Turn-over dieser Grundsubstanz sind die Fibroblasten verantwortlich, welche die größte Zellpopulation innerhalb der Pulpa darstellen. Eingebettet in diese Matrix sind Makrophagen, Lymphozyten und dendritische Zellen als immunkompetente Zellen, welche die defensive Funktion der Pulpa unterstützen (5). So konnte unter anderem gezeigt werden, dass dendritische Zellen vermehrt unter früh-kariösen-Läsionen anzutreffen sind (11). Die Pulpa ist reich innerviert mit myelinisierten und nicht myelinisierten sensiblen Fasern sowie mit autonomen sympathischen Fasern. Außerdem durchziehen sie sowohl Blut- als auch Lymphgefäße.

2.3 Stammzellen

Im Gegensatz zu normalen Körperzellen, welche sich als unipotente Zellen lediglich in zwei identische Tochterzellen gleicher Art teilen können, ist es Stammzellen möglich, sowohl sich selbst zu erneuern, als auch, je nach Art, unterschiedliche Differenzierungswege einzuschlagen. Somit kann eine Stammzelle unterschiedliche Zelllinien bilden und spielt dadurch im Körper nicht nur eine wichtige Rolle im Rahmen der Entwicklung, sondern auch postnatal im Rahmen von Regenerationsprozessen (2, 18–20). Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen ist umstritten, ob adulte Stammzellen die Fähigkeit besitzen, sich keimblattübergreifend zu differenzieren. Diese Fähigkeit wird allgemein als Plastizität bezeichnet. Es gibt wissenschaftliche Bestrebungen, durch „*nuclear reprogramming*“ adulte Stammzellen in einen der embryonalen Stammzelle ähnlichen Zustand zu versetzen, aus dem heraus sie sich in verschiedene Differenzierungswege lenken lassen (7, 20, 21). Die Balance zwischen Differenzierung und Selbsterneuerung wird durch die Stammzellnische gesteuert. Darunter versteht man die Umgebung, in der sich die jeweiligen Stammzellen befinden, also die zellulären und azellulären Komponenten des jeweiligen Gewebes. Dazu gehören Stromazellen sowie deren Oberflächenmoleküle, außerdem Zelladhäsionsmoleküle, neuronale Signale, Wachstumsfaktoren, Bestandteile der extrazellulären Matrix und mechanische Kräfte (22).

2.3.1 Dentale Stammzellen

Dentale Stammzellen sind, mit Ausnahme der Ameloblasten-Stammzellen, welche aus dem Kopfektoderm stammen und sich nicht isolieren lassen, multipotente, mesenchymale Stammzellen. Ihnen wird die Fähigkeit zugeschrieben, in mindestens drei verschiedene Zelltypen differenzieren zu können: odontogen/osteogen, adipogen und chondrogen. Das dentale Mesenchym wird aufgrund seiner Herkunft aus der Neuralleiste häufig als Ektomesenchym bezeichnet. Außerdem unterliegt das Zahngewebe keinem ständigen *remodelling* wie der Knochen. Es wird daher angenommen, dass dentale Stammzellen ein eingeschränkteres Differenzierungspotential im Vergleich zu mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark (BMSCs = *bone marrow-derived mesenchymal stem cells*) besitzen (23–25). Insgesamt wurden fünf verschiedene Arten von humanen dentalen

Stammzellen isoliert und charakterisiert: Dentale Pulpastammzellen (*dental pulp stem cells*, DPSCs), Pulpastammzellen aus Milchzähnen (*stem cells from human exfoliated deciduous teeth*, SHED), Parodontalligamentstammzellen (*periodontal ligament stem cells*, PDLSCs), und Stammzellen der apikalen Papille (*stem cells from apical papilla*, SCAP) (24, 26, 27). Außerdem wird angenommen, dass *dental follicle stem cells* (DFSCs) existieren. Bisher konnten allerdings nur Precursorzellen derselben isoliert werden (28). Nachfolgend werden die DPSCs und SCAPs näher beschrieben, da diesen aktuell im Rahmen der regenerativen Endodontie eine besonders große Bedeutung zukommt.

Dental Pulp Stem Cells (DPSCs)

Im Jahr 2000 konnte eine Arbeitsgruppe um Stan Gronthos erstmals humane Pulpastammzellen isolieren. Nach Implantationsversuchen an Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese Stammzellen in Odontoblasten-ähnliche Zellen oder Pulpafibroblasten differenzieren und eine Dentinmatrix bilden (29). *In vitro* konnten Dentale Pulpastammzellen zu Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten differenziert werden (30–32). Durch Cryokonservierung verlieren die DPSCs nicht ihre Fähigkeit, in verschiedene Zelltypen zu differenzieren (33, 34). DPSCs finden sich hauptsächlich in der zellreichen Zone der Pulpa im perivaskulären Bereich (35, 36). Die dentalen Pulpastammzellen können aus der Pulpa extrahierter dritter Molaren oder aus pulpektomierten, *in situ* belassenen Zähnen gewonnen werden. Auch adulte Molaren können als Quelle von DPSCs dienen (31, 36). Dabei scheinen die DPSCs keine homogene Gruppe von Stammzellen zu sein, sondern vielmehr eine heterogene Ansammlung von Stammzellen und Progenitorzellen unterschiedlichen Differenzierungsgrades, die je nach ihrer Lokalisation innerhalb der Pulpa unterschiedliches Differenzierungspotential besitzen (32, 37).

Stem Cells from Apical Papilla (SCAPs)

Als apikale Papille bezeichnet man das Gewebe am Apex von bleibenden Zähnen mit nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum. Daher stellen extrahierte Weisheitszähne eine optimale Quelle für diese Art von dentalen Stammzellen dar (24, 38). Es ist auch möglich, verschiedene Stammzellen von einem einzigen Zahn zu isolieren (39). Im apikalen Bereich liegt eine zellreiche Zone als Trennschicht zwischen apikaler Papille und Pulpa, die apikale Papille ist dabei zellärmer und weniger reich an Blutgefäßen als die Pulpa (40). Die apikale Papille stellt gewissermaßen das Vorläufergewebe der Wurzelpulpa da. Ob es nach der Umwandlung der apikalen Papille in die Pulpa auch zur Umwandlung der SCAPs in DPSCs kommt, oder ob letztere eine andere Herkunft haben, ist noch nicht geklärt (24). Im Gegensatz zu DPSCs, welche zu Odontoblasten-ähnlichen Zellen differenzieren, die reparatives Dentin bilden, tendieren SCAPs eher dazu, Primärodontoblasten zu bilden, welche Wurzeldentin bilden (24, 40). Es konnte gezeigt werden, dass SCAPs auch bei fortgeschrittener Pulpanekrose und apikaler Parodontitis überleben können und dabei sogar erhöhtes osteogenes und angiogenes Potential zeigen, was ihre bedeutende Rolle im Rahmen der regenerativen Endodontie unterstreicht (26, 41). Die Stammzellcharakteristika von SCAPs ändern sich nicht, wenn die Zellen von verschiedenen Spendern stammen (42). Wie bei DPSCs konnte bei SCAPs nachgewiesen werden, dass sie *in vivo* einen Dentin-Pulpa ähnlichen Komplex bilden. Zusätzlich konnte in Kombination mit PDLSCs *in vivo* ein Zahnhalteapparat an einem wurzelförmigen Hydroxylapatit/Tricalciumphosphat-Block erzeugt werden. SCAPs konnten auch in Chondroblasten, Adipozyten und neurale Zellen differenziert werden (40, 43–45).

2.4 Dentinmatrixproteine

2.4.1 Zusammensetzung der organischen Dentinmatrix

Die Dentinogenese gleicht im Grundsatz der Entstehung von Knochen und Zement. Dabei bildet jeweils eine Zellschicht eine organische Matrix, in welche anorganisches Calciumphosphat in kristalliner Form eingelagert wird. Im Gegensatz dazu steht die Entwicklung des hochkristallinen Zahnschmelzes, welcher kaum organisches Material und nach Abschluss der Entwicklung keine Zellen enthält. In Gewichtsprozent gesehen besteht Dentin zu 70% aus anorganischem Material, zu 20% aus organischem Material und zu 10% aus Wasser. In Volumenprozent ausgedrückt besteht es zu 50% aus anorganischem Material, zu 30% aus organischem Material und zu 20% aus Wasser. Der organische Anteil des Dentins wird mit Ausnahme eines kleinen Gehalts an Serumproteinen ausschließlich von den Odontoblasten sezerniert (16). In einer Studie konnten mithilfe von Massenspektrometrie insgesamt 147 verschiedene ESTPs (*ethylen-diamintetraacetat* [EDTA] *soluble tooth proteins*) aus der organischen Matrix des menschlichen Zahnes nachgewiesen werden (46). Der organische Anteil des Dentins besteht zu 90% aus Kollagen. Dieses Kollagen wiederum besteht überwiegend aus Kollagen Typ 1 und zusätzlich zu ca. 1-3% aus Kollagen Typ 3 und 5 (16, 47). Kollagen Typ 1 ist ein Heterotrimer und besteht aus zwei α_1 und einer α_2 Kette (47–50). 11% des Kollagens bestehen dabei aus einem Homotrimer, welches sich aus drei α_1 Ketten zusammensetzt (47, 51). Das Kollagen bildet eine Art strukturelle Matrix, in welche die Hydroxylapatitkristalle eingelagert werden. Die restlichen 10% der organischen Dentinmatrix bestehen aus NCPs (*noncollagenous proteins*), welche aufgrund ihrer vielfältigen Wirkung im Rahmen der Dentinogenese und bei regenerativen Prozessen häufig auch als bioaktive Moleküle bezeichnet werden. Zu deren Wirkung siehe 2.4.2 (46). Die NCPs lassen sich noch in zwei Großgruppen unterteilen, und zwar die phosphorylierten und die nicht-phosphorylierten Proteine (47). Zu den phosphorylierten Proteinen gehören die SIBLINGs (*small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins*), Amelogenin und Proteolipide. Die Gruppe der nicht-phosphorylierten Proteine beinhaltet Osteocalcin, Osteonectin, Serumproteine, SLRPs (*small leucine-rich proteoglycans*), Wachstumsfaktoren, Enzyme und calciumbindende Proteine. Darüberhinaus konnten auch Transkriptionsfaktoren, Neuropeptide und Zytokine im Dentin nachgewiesen werden (46, 47, 52, 53). Die

SIBLINGs bestehen aus BSP (*bone sialo protein*), OPN (*osteopontin*), MEPE (*matrix extracellular phosphoglycoprotein*), DMP-1 (*dentin matrix protein-1*), sowie dem DSPP (*dentin sialo phospho protein*). Das DSPP Gen ist auf dem vierten Chromosom lokalisiert und wird nach seiner Sekretion durch MMPs (Matrix-Metalloproteinasen) zu drei Molekülen gespalten: DSP (*dentin sialoprotein*), DPP (*dentin phosphoprotein*) und DGP (*dentin glycoprotein*). Während viele Proteine in der organischen Matrix von Knochen und Dentin gleichermaßen vorkommen, wurde lange Zeit angenommen, dass die von DSPP abstammenden Proteine Zahnspezifisch sind. Mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass diese im Knochen ebenfalls vorkommen, jedoch in einem Verhältnis von 1:400 im Vergleich zu Dentin (9, 47, 53–58). Wachstumsfaktoren wie *transforming growth factor* (TGF- β 1), *fibroblast growth factor 2* (FGF-2), *insulin-like growth factors 1* und 2 (IGF-1 und IGF-2), *placenta growth factor* (PIGF), *epidermal growth factor* (EGF) und *bone morphogenetic protein 2* (BMP-2) konnten im Dentin nachgewiesen werden. Darüberhinaus wurden angiogene Wachstumsfaktoren wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *platelet-derived growth factor* (PDGF) entdeckt (46, 59–63). Die Mechanismen, mittels derer die bioaktiven Moleküle innerhalb der Dentinmatrix eingebettet sind, konnten noch nicht vollständig geklärt werden (52). Eine wichtige Rolle im Rahmen der Einbettung dieser Moleküle spielen die Heparansulfat-Proteoglykane, welche in der Lage sind, über ihre Glykosaminoglykan-Seitenketten eine große Anzahl an verschiedenen Proteinen zu binden (64, 65). Biglycan und Decorin gehören zu den SLRPs und sind bezogen auf die Menge die wichtigsten Proteoglykane im Dentin. Moleküle, welche in der extrazellulären Matrix von Dentin vorkommen und an Heparansulfat binden sind beispielsweise Interleukine, TNF α , BMP und VEGF (52, 60, 62). Darüber hinaus wird auch angenommen, dass Kollagene an der Bindung der bioaktiven Moleküle beteiligt sind. So konnte nachgewiesen werden, dass TGF- β und Interleukin 2 von Kollagen gebunden werden können (66, 67). Auch das Glykoprotein Fibronectin könnte an der Bindung von Wachstumsfaktoren beteiligt sein (68). Eine andere Möglichkeit stellen spezifische Bindungsproteine wie das *IGF-binding protein* dar, welche wiederum ihrerseits an Glykosaminoglykane anbinden können (69).

2.4.2 Freisetzung und Wirkung der Proteine

Die während der Dentinogenese ins Dentin eingelagerten und wie unter 2.4.1 beschrieben gebundenen Moleküle befinden sich in einer Art immobilisiertem Zustand. Zur Freisetzung der Proteine gibt es verschiedene Möglichkeiten: Kariöse Prozesse (70), Einsatz von Mineral Trioxid Aggregaten (71), Calciumhydroxid (72) oder selbstätzenden Adhäsivsystemen (73) im Rahmen von zahnerhaltenden oder prothetischen Maßnahmen, sowie EDTA, einem Chelator, der häufig in der Endodontie als Spülflüssigkeit benutzt wird (52, 74, 75). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Enzyme wie MMPs (Matrix Metalloproteinasen), welche im Verdacht stehen, die Adhäsivschicht durch Abbau von Kollagen zu degradieren, durch Ätzung mit Phosphorsäure oder auch in geringem Maße durch Anwendung von selbstätzenden Adhäsivsystemen freigesetzt werden können (76–78). Die Eigenschaften und die Wirkung der unter 2.4.1 beschriebenen NCPs während der Dentinogenese und nach ihrer Freisetzung durch oben beschriebene Mechanismen sind Gegenstand zahlreicher Publikationen. So ist die Gruppe der SIBLINGS hauptsächlich für die Initiierung, Inhibierung und Steuerung des Mineralisationsprozesses sowie für die Reifung des Dentins verantwortlich. Vor allem die extrazelluläre Spaltung von DSPP scheint eine entscheidende Rolle im Rahmen der Reifung von Prädentin zu Dentin einzunehmen. Daneben konnte jedoch auch gezeigt werden, dass diese Moleküle nach ihrer Freisetzung aus dem Dentin entzündungsfördernde Eigenschaften besitzen und zur Migration von Immunzellen beitragen (52, 79–85). Es konnte nachgewiesen werden, dass Phosphat, welches möglicherweise im Rahmen von Karies durch die Auflösung des Dentins freigesetzt wird, zur Apoptose von Odontoblasten führen kann. DPP ist in der Lage, die Bildung von Calcium-Phosphat-Ionen-Clustern zu verhindern, zusätzlich kann es an die Cluster binden und dadurch das Andocken dieser Cluster an die Zellmembran der Odontoblasten verhindern (86). *Dentin matrix protein-1* kann die Differenzierung von Pulpastammzellen zu Odontoblasten-ähnlichen Zellen stimulieren (87). SLRPs wie Decorin und Biglycan sind nicht nur an der Bindung von bioaktiven Molekülen im Dentin beteiligt, sondern scheinen durch ihre Fähigkeit, Calcium zu binden, auch eine Rolle im Rahmen der Mineralisierung des Dentins zu spielen (88, 89). Die im Dentin nachgewiesenen Wachstumsfaktoren zeigen chemotaktische Wirkung auf DPSCs und SCAPs und können deren Proliferation, Differenzierung und Mineralisierung fördern. Des Weiteren unterstützen sie die Angiogenese (46, 59, 63,

90–98). Studien zeigten, dass EDTA-lösliche Dentinproteine die Proliferation und Differenzierung von Pulpazellen stimulieren können (99, 100). Über die während der Zahnentwicklung ins Dentin eingelagerten Serumproteine gibt es relativ wenig Evidenz, man kann vermuten, dass diese eine Rolle bei der Bindung und Stabilisierung von TGF- β 1 spielen (52, 101). Im Dentin konnten auch neurotrophe Faktoren und Neuropeptide nachgewiesen werden, die regenerative Prozesse stimulieren und von Odontoblasten während der Zahnentwicklung sezerniert werden (52, 102, 103).

	Einteilung	Wirkung/Eigenschaft
90 % Kollagen	~ 89 % Kollagen Typ 1 Heterotrimer ~ 11 % Kollagen Typ 1 Homotrimer ~ 1-3% Kollagen Typ 3 / 5	- strukturelle Matrix - Bindung von Wachstumsfaktoren - Unterstützend bei der Bildung von Kalkospheriten
10 % NCP (= <i>non collagenous proteins</i>)	<u>SIBLINGs</u>	
	DSP	Reguliert die Formation der Dentinmatrix
	DPP	Involviert in die Reifung des intertubulären Dentins
	DMP-1	Mineralisierung und Kristallwachstum, Differenzierung von Stammzellen
	BSP	Initiierung der Mineralisationskristalle und Kollagenfibrillierung
	OPN	Rolle bei Entzündungsprozessen
	MEPE	Differenzierung von Pulpazellen zu Odontoblasten
	<u>SLRPs:</u> - Decorin - Biglycan	Dentinmineralisation und Bindung von Wachstumsfaktoren
	Proteolipide / Phospholipide	Unterstützen die initiale Mineralisierung des Dentins
	Osteocalcin	Wichtig für Knochen turn-over, Rolle im Dentin unklar
<u>Wachstumsfaktoren:</u> - TGF-beta 1 - VEGF - BMPs - FGF 2 - PDGF - IGF 1 / IGF 2 - EGF - PIGF	entscheidende Rolle bei Reparatur- und Regenerationsvorgängen durch Stimulierung der Migration, Proliferation und Differenzierung von pulpalen Vorläuferzellen in und um den Zahn. Immunmodulation und Förderung der Angiogenese.	

Tabelle 1: Auflistung der wichtigsten Dentinmatrixproteine mit jeweiliger Funktion, in Anlehnung an Goldberg et al. 2011 (47).

2.5 Der Wachstumsfaktor TGF- β

Die Gruppe der *transforming growth factors* umfasst TGF- α und die TGF- β -Familie. TGF- α ist zu 35% mit dem Wachstumsfaktor *epidermal growth factor* (EGF) in seiner Sequenz identisch, nutzt den gleichen Rezeptor an Zellmembranen und besitzt eine fast identische biologische Wirkung. Die TGF- β -Familie besteht aus 33 verschiedenen Abkömmlingen, davon unter anderem die drei Wachstumsfaktoren TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3, sowie 10 BMPs (*bone morphogenetic proteins*). TGF- β 1 ist dabei ein Dimer, welches aus zwei durch Disulfidbrücken verbundenen Peptidketten besteht, die jeweils aus 112 Aminosäuren zusammengesetzt sind. *Transforming growth factors* finden sich in primitiven Spezies ebenso wie beim Menschen (104–108). TGF- β Wachstumsfaktoren haben vom Embryo bis zum adulten Organismus zahlreiche Funktionen. Die wohl wichtigste und gleichzeitig am besten erforschte Wirkung von TGF- β besteht in seiner Rolle als Tumorsuppressor durch Induktion von Apoptose und einer inhibitorischen Wirkung auf den Zellzyklus im normalen Epithel und bei frühen Tumorzellen. Zusätzlich fördert TGF- β jedoch in ausgereiften Tumorzellen das invasive Wachstum und die Metastasierung, unter anderem durch EMT (*epithelial to mesenchymal transition*), also der Umwandlung von epithelialen in mesenchymale Zellen, wodurch die Progression des Tumors begünstigt wird (105, 109, 110). Darüber hinaus fördert TGF- β die Sekretion von Bestandteilen der extrazellulären Matrix, sowie die Hämatopoese und Angiogenese. TGF- β besitzt chemotaktische Wirkung und reguliert Funktionen des Immunsystems. Außerdem sind die Proteine an der Aufrechterhaltung der Pluripotenz von humanen Stammzellen beteiligt und fördern die Proliferation und Differenzierung derselben, weshalb deren Erforschung und Verständnis für die regenerative Endodontie von großer Bedeutung ist (104, 105, 111–113). TGF- β wird als Proprotein synthetisiert. Das Propeptid mit der Bezeichnung LAP (*latency associated peptid*) wird intrazellulär vom Wachstumsfaktor abgespalten, bindet aber mit starker Affinität weiterhin an diesen. Dieser Komplex wird als SLC (*small latent complex*) bezeichnet. Dieser Komplex, exakter das LAP als Teil des Komplexes, bindet dann kovalent an das *latent TGF- β -binding protein* (LTBP). Der daraus resultierende Molekülverbund heißt *large latent complex* (LLC) und wird als solcher in die extrazelluläre Matrix sezerniert. Das LTBP im *large latent complex* ist wiederum in der Lage, an verschiedene Moleküle der extrazellulären Matrix des Dentins, wie Heparansulfat-Proteoglykane

und Kollagen (siehe auch 2.4.1) anzubinden und somit das TGF- β in einem immobilisierten und inaktiven Zustand innerhalb der Dentinmatrix zu fixieren (60, 114–121). Die verschiedenen Vorgänge, welche zur Degradation der Bindung und damit zur Freisetzung und Aktivierung der Wachstumsfaktoren führen, werden unter 2.4.2 beschrieben. Es gibt auch Evidenz, dass das LAP selbst, unabhängig von TGF- β , chemotaktische und immunologische Eigenschaften besitzt (122). Von den drei Wachstumsfaktoren TGF- β 1, 2 und 3 wird angenommen, dass nur TGF- β 1 im Dentin eingelagert ist (123, 124). In Bezug auf den Pulpa-Dentin Komplex konnte gezeigt werden, dass TGF- β die Migration, Proliferation und insbesondere auch die Differenzierung von dentalen Stammzellen fördert, sowie die Sekretion von extrazellulärer Matrix stimuliert (94, 98, 125–128). Zusätzlich reguliert TGF- β 1 auch die Expression von Genen für DMP-1 und DSPP, also von zwei Schlüsselproteinen der Dentinmineralisation (129).

2.6 Grundlagen der regenerativen Endodontie

Das Verständnis, die Optimierung und klinische Anwendung von Tissue Engineering und Revaskularisierungsprozessen sind aktuelle Forschungsansätze der regenerativen Endodontie. Die oben beschriebenen Wachstumsfaktoren spielen aber nicht nur bei diesen modernen Behandlungsmethoden eine entscheidende Rolle, sondern sind möglicherweise auch an bereits etablierten zahnärztlichen Behandlungsstrategien wie den vitalerhaltenden Maßnahmen beteiligt, weshalb diese hier ebenfalls aufgeführt werden. Des Weiteren soll an dieser Stelle auch kurz auf die konventionelle endodontische Behandlung eingegangen werden, um die Unterschiede zur regenerativen Endodontie verständlich zu machen. Zudem wird die Wirkung von Ultraschall und EDTA erläutert.

Vitalerhaltende Maßnahmen

Zu den vitalerhaltenden Maßnahmen zählen die indirekte und direkte Überkappung sowie die Pulpotomie, also die Vitalamputation der Kronenpulpa. Diese Verfahren haben das Ziel, die Pulpa bzw. den apikalen Teil der Pulpa vital zu erhalten und damit die Integrität des Pulpa-Dentin Komplexes zu sichern. Zum genauen Ablauf und zur Indikationsstellung dieser Behandlungsmethoden sei an dieser Stelle auf

einschlägige Lehrbücher der Endodontie verwiesen. Bei den sehr häufig als Teil der *caries profunda*-Therapie angewandten Überkappungen kommen in der Regel Kalziumhydroxidpräparate zum Einsatz. Kalziumhydroxid wird dabei entweder als wässrige Suspension oder in Form von Lacken, Linern und selbst-, oder lichthärtenden Zementen angewandt (130). Je nach Ausmaß der Schädigung kommt es dann zur Bildung von reaktivem Tertiärdentin oder zur Bildung von reparativem Ersatzdentin. Dabei werden entweder die vorhandenen Odontoblasten zur verstärkten Sekretion von extrazellulärer Dentinmatrix angeregt oder es werden, bei stärkerer Schädigung und lokaler Nekrose von Odontoblasten, Vorläuferzellen zu Odontoblastenähnlichen-Zellen ausdifferenziert. Diese Vorläuferzellen sind entweder am Ort der Schädigung vorhanden (Höhl-Zellen, Präodontoblastenschicht) oder migrieren durch chemotaktische Vorgänge dorthin, um dann reparatives Dentin zu bilden. Es gibt Evidenz, dass die physiologischen Prozesse, die hinter diesen Vorgängen stehen, durch Wachstumsfaktoren initiiert und gesteuert werden, welche Kalziumhydroxid aus der Dentinmatrix freisetzt (72, 124, 131).

Die konventionelle endodontische Behandlung

Die konventionelle Wurzelkanalbehandlung besteht i.d.R. aus 4 Phasen: Trepanation, Wurzelkanalaufbereitung und Desinfektion, Wurzelfüllung und postendodontische Versorgung. Nur eine korrekte Ausführung aller Einzelschritte sichert den langfristigen Erfolg der Behandlung. Die Erfolgsrate von endodontischen Behandlungen liegt je nach Studie und Ausgangssituation zwischen 79% und 98% (132–135). Nach der Indikationsstellung durch klinische Untersuchung und Röntgendiagnostik erfolgen die Trepanation des Zahnes und die Darstellung aller Kanäleingänge. Nach Festlegung der Arbeitslänge, also der Distanz von einem koronalen Referenzpunkt bis zum Endpunkt der Instrumentierung, erfolgt die Wurzelkanalaufbereitung. Neben der Verwendung von Handfeilen haben sich mittlerweile viele verschiedene maschinelle Feilensysteme am Markt etabliert. Zusätzlich zur mechanischen Aufbereitung erfolgt zeitgleich eine Reinigung des Kanalsystems durch desinfizierende Spüllösungen. Diese Kombination wird als chemo-mechanische Aufbereitung bezeichnet (136, 137). Die Spülung des Wurzelkanalsystems ist dabei unerlässlich, so wurde nachgewiesen, dass je nach Kanal Anatomie und Aufbereitungsmethode teilweise bis zu 80% der

Wurzelkanaloberfläche nicht durch die Feilen berührt werden (138). Nach erfolgreicher Aufbereitung und Überprüfung derselben durch eine Masterpoint-Aufnahme folgt die Abfüllung des Kanalsystems. Auch hier haben sich viele verschiedene Systeme und Vorgehensweisen etabliert. Als Goldstandard gilt aktuell die Verwendung von Guttapercha in Kombination mit einem Sealer in pastenförmiger Konsistenz. Nach Obturation des Kanalsystems erfolgt je nach Situation eine postendodontische Restauration des Zahnes mittels Adhäsivtechnik, Einlagefüllung oder prothetischer Restauration. Da die erste Sitzung aufgrund des Charakters einer Notfallbehandlung häufig wenig Zeit bietet, wird nach Indikationsstellung und Trepanation der Zahn mit einer medikamentösen Einlage versehen und bis zur nächsten Sitzung provisorisch verschlossen. Es stehen verschiedene medikamentöse Einlagen zur Verfügung, als Mittel der Wahl gilt Kalziumhydroxid (5, 130, 137, 139). Als Spüllösungen während der Aufbereitung kommen klassischerweise Natriumhypochlorit (NaOCl), Chlorhexidindigluconat (CHX) oder EDTA bzw. eine Kombination derer in Form eines Spülprotokolls zum Einsatz. EDTA ist ein sechszähliger Komplexbildner, welcher die Fähigkeit besitzt, mit mindestens zweifach positiv geladenen Kationen einen stabilen Chelatkomplex zu bilden. Diese Eigenschaft macht man sich in der Endodontie zunutze, um den Biofilm abzulösen und die Schmierschicht zu entfernen, die sich nach der mechanischen Bearbeitung der Kanalwand gebildet hat, um dadurch die Dentintubuli freizulegen (75, 140). EDTA führt durch Herauslösen der Kalziumionen zu einer Verminderung der Dentinhärte. Im Rahmen einer endodontischen Behandlung beschränkt sich die Eindringtiefe auf etwa 20-30 µm. Allerdings wird auch bei Einwirkzeiten von über 24 Stunden eine Eindringtiefe von 50 µm nicht überschritten (141). EDTA zeigt eine zytotoxische Wirkung, die mit steigender Konzentration zunimmt (142, 143). Darüber hinaus unterbindet EDTA den Adhäsionsprozess von Makrophagen, wodurch die periapikale Entzündungsreaktion eingeschränkt sein könnte (144, 145). EDTA und die anderen Spüllösungen können durch Anregung mittels Ultraschall in Ihrer Wirkung verstärkt werden. Als Ultraschall bezeichnet man Schallwellen mit einer Frequenz von 20 kHz bis 1 GHz. Neben einer Verwendung von Ultraschallansätzen zum Aufsuchen von Kanaleingängen oder zur Entfernung von Wurzelstiften hat sich die Aktivierung von Spüllösungen während der Aufbereitung etabliert. Dabei führt man in die mit Spüllösung gefluteten Kanäle feilenähnliche Ansätze ein, welche durch einen Ultraschallgenerator in eine sinusförmige Schwingung versetzt werden.

Die Wirkung des Ultraschalls beruht dabei auf drei Prinzipien: Kavitation, Wärme und akustische Mikroströmung. Durch die Schwingung entsteht außerdem ein Materialabtrag, der an der Spitze durch die größte Amplitude am stärksten ist. Als Folge dieser Wirkmechanismen zeigt sich eine effektivere Entfernung von Debris, Schmierschicht und Pulparestgewebe. Die erhöhte antibakterielle Wirksamkeit ist auf das Abspülen planktonischer Bakterien, das Zerreißen des Biofilms, sowie auf das direkte Abtöten von Bakterien zurückzuführen (137, 140, 146–148). Das Zusammenspiel von Spüllösungen und Ultraschall wurde unter anderem durch Widbiller et al. (59) anhand von REM-Aufnahmen dokumentiert. Die Grafik zeigt verschiedene Spüllösungen (PBS (*phosphat buffered saline*), EDTA, NaOCl) und ihre Wirkung auf Dentin mit und ohne Ultraschall.

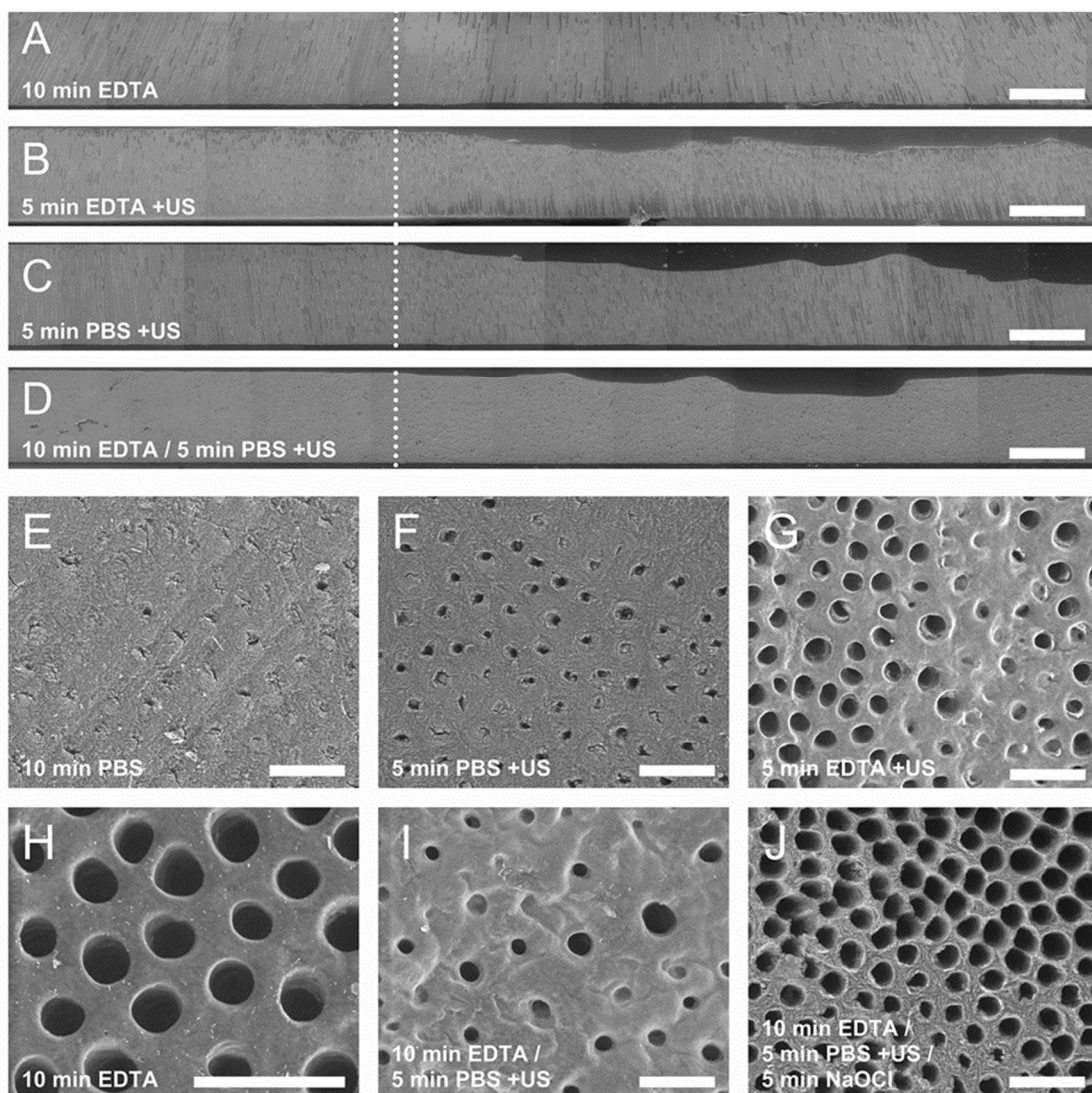


Abbildung 1: Aus Widbiller et al. 2017 (59). Darstellung der Wirkung verschiedener endodontischer Spüllösungen auf die Dentinoberfläche, mit und ohne Aktivierung mittels Ultraschall. Die gepunktete weiße Linie markiert die Grenze zum linken Drittel, auf welches kein Ultraschall bzw. keine Spüllösung einwirkte. Maßstabsleiste: (a-d) 400 µm, (e-j) 10 µm.

Revitalisierung von Zähnen mit nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum

Wenn es bei Zähnen mit nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum durch Trauma oder Karies zu einer Pulpanekrose kommt, ist die konventionelle Therapie die sogenannte Apexifikation. Dabei wird durch Langzeiteinlagen von Calciumhydroxid in den Wurzelkanal am Apex eine Hartsubstanzbarriere induziert und somit ein Abschluss zwischen Wurzelkanal und umgebendem Knochen erzielt. Diese schon sehr lange in der Zahnmedizin angewandte Behandlungsmethode wurde zwar in vergangenen Jahren durch das Einbringen von MTA statt Calciumhydroxid verkürzt und verbessert, jedoch haben beide Verfahren den Nachteil, dass der Zahn zeitlebens dünne Dentinwände besitzt, was insgesamt seine Frakturanfälligkeit erhöht (3, 149–154). Als Alternative für dieses Vorgehen hat sich im Bereich der regenerativen Endodontie ein Verfahren etabliert, welches als Revaskularisierung oder Revitalisierung bezeichnet wird. Durch sorgfältige Diagnostik müssen vorab Zähne ausgeschlossen werden, die für dieses Verfahren nicht in Frage kommen, wie etwa Zähne, die nach Abschluss der endodontischen Behandlung mit einem Stift versorgt werden müssen oder solche nach Avulsion und Replantation, bei denen eine Spontanrevitalisierung abgewartet werden kann. Die Behandlung wird in der Regel in zwei Sitzungen durchgeführt. In einer ersten Sitzung wird nekrotisches Gewebe entfernt, anschließend der Wurzelkanal gereinigt und desinfiziert, wobei auf eine minimale Instrumentation der Dentinwand geachtet werden sollte. Nach Applikation von Calciumhydroxid in den Wurzelkanal folgt der provisorische Verschluss. In der zweiten Sitzung wird der Wurzelkanal gereinigt und dann durch Reizung des apikalen Gewebes mittels einer Handfeile eine Einblutung in den Kanal erzeugt. Der entstandene Thrombus wird mit einer Kollagenmembran und einem hydraulischen Kalziumsilikatzement wie etwa MTA überdeckt. Abschließend wird mittels Dentinadhäsiven und Komposit ein bakteriendichter Verschluss erzielt. Danach folgen mehrere Termine zur Kontrolle des Therapieerfolgs (3, 155–160). Obwohl größere klinische Studien zu dieser Behandlungsmethode fehlen, gibt es ausreichend Evidenz, so dass sie von Behandlern als Therapieoption im Rahmen der Behandlung von Zähnen mit nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum in Erwägung gezogen werden sollte (161–163). Das Ziel dieser Behandlung ist eine *restitutio ad integrum*, also eine Regeneration und damit eine Wiederherstellung des ursprünglichen Pulpagewebes. Allerdings kann nicht wesentlich beeinflusst werden,

welches Gewebe sich bildet und so kommt es oftmals zu einer Reparatur oder Heilung, also zur Bildung von ektopischem Gewebe, welches in Grundzügen der Pulpa ähnelt, allerdings auch andere Bestandteile wie Osteoblasten oder Zement enthält bzw. manche Komponenten der Pulpa wie z.B. Odontoblasten nicht aufweist. Für den Patienten spielt die Art des gebildeten Gewebes dabei eher eine untergeordnete Rolle, sofern das gewünschte Behandlungsziel, also die Ausheilung der Knochenläsion sowie ein Fortschreiten des Längen- und Dickenwachstum der Zahnwurzel erreicht werden (3, 155, 164–166).

Tissue Engineering in der Endodontie

Mittels *tissue engineering* erhofft man sich eine bessere Vorhersagbarkeit über die Art von Gewebe, das sich nach der Behandlung im Wurzelkanal bildet. Beim *tissue engineering* werden drei Elemente zusammengeführt: Stammzellen, Trägermaterial (*scaffold*) und Wachstumsfaktoren. Diese Elemente können dabei getrennt oder kombiniert zum Einsatz kommen (156). In Bezug auf Wachstumsfaktoren geht es in der Endodontologie darum, die unter 2.4 beschriebenen NCPs aus dem Dentin freizusetzen oder zu isolieren, um sich so deren zahlreichen Eigenschaften und Wirkungen zunutze zu machen. Insbesondere ihre Wirkung auf Migration, Proliferation und Differenzierung von Stammzellen ist hierbei von Bedeutung. Die unter 2.3 beschriebenen Stammzellen können entnommen und im Sinne einer Transplantation zur Regeneration des Pulpa-Dentin Komplexes eingesetzt werden, oder man macht sich im Rahmen eines zellfreien Ansatzes ortsständige Stammzellen zunutze, welche bereits im Gewebe in und um den Zahn vorhanden sind. Dadurch können auch Problematiken wie hohe Kosten und medizinrechtliche Hürden umgangen werden (160, 163, 167). Das Trägermaterial bietet eine dreidimensionale Struktur, die als Vorlage für das spätere Gewebe dient. Die verwendeten Materialien sollen die native extrazelluläre Matrix möglichst optimal nachbilden, um das Zellverhalten und die Gewebsentwicklung entsprechend zu stimulieren. Als mögliche Substanzen kommen dafür etwa Hydrogele, Polymere, selbstorganisierende Moleküle oder Biokeramiken zum Einsatz. Die Entwicklung eines optimalen *scaffold*-Materials zur Pulparegeneration ist Gegenstand der aktuellen Forschung (168–170).

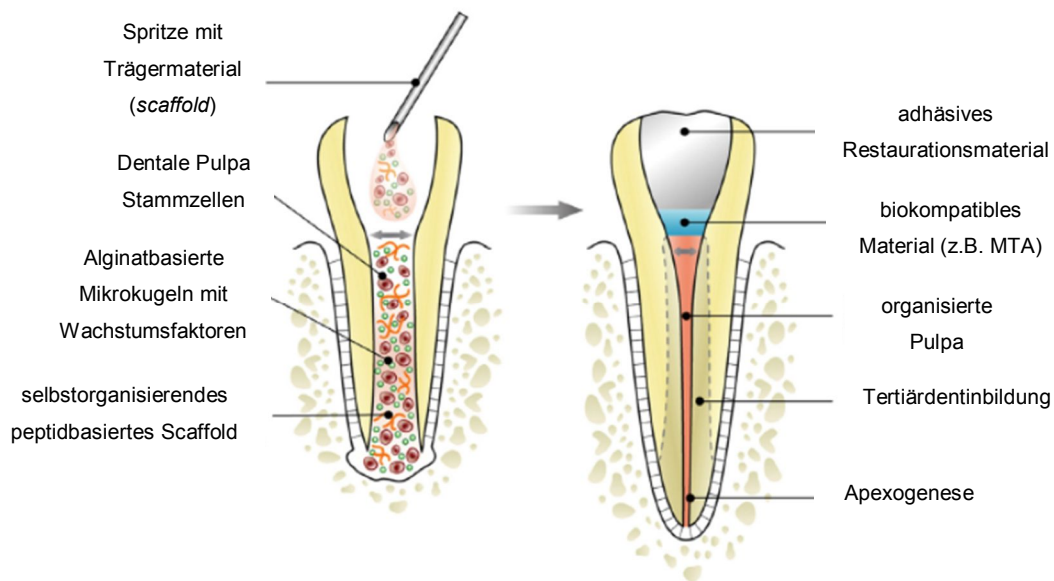


Abbildung 2: Beispielhafte Darstellung von Tissue Engineering in der Zahnheilkunde. Abgewandelt nach (171)

3. Zielsetzung

3.1 Ultraschall als Hilfsmittel zur Isolierung von Dentinmatrixproteinen

In der Endodontie werden die Phänomene des Ultraschalls wie Mikroströmung und Erwärmung genutzt, um die Effektivität des Spülvorgangs zu erhöhen. Dabei können bei Verwendung von EDTA als Spüllösung auch Wachstumsfaktoren freigesetzt werden. Diese in der organischen Dentinmatrix eingebauten bioaktiven Moleküle können beim *tissue engineering* und bei Revitalisierungsprozessen genutzt werden. Neben einer reinen Freisetzung der Moleküle innerhalb des Kanals besteht auch die Option, die Proteine zu sammeln und in Kombination mit einem Trägermaterial wieder in den Zahn oder eventuell auch einen anderen Zahn des Patienten einzubringen.

Ausgehend von diesen Überlegungen sollten anhand von *in vitro*- Untersuchungen folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Kann durch die Verwendung von Ultraschallansätzen die freigesetzte Menge an Wachstumsfaktoren aus dem Wurzelkanaldentin erhöht werden? Welches Spülprotokoll ist dabei am effektivsten?

2. Wie hoch ist der Gehalt des repräsentativ ausgewählten Wachstumsfaktors TGF- β 1 in den gewonnenen Proben?
3. Ist es möglich, die Wachstumsfaktoren in relevanter Menge in einem physiologischen Medium zu sammeln?
4. Können relevante Mengen an Wachstumsfaktoren auch in einem kliniknahen Modell isoliert werden, welches vom Aufbau und Zeitansatz einen realistischen Vergleich zu einer realen Behandlungssituation zulässt?

Zur Evaluierung dieser Fragestellungen wurden sowohl Dentinscheiben als auch ein kliniknahes Modell mit extrahierten Zähnen verwendet.

3.2 Wirkung verschiedener Nährlösungen auf humane Pulpazellen

Wie unter 2.4 erläutert, gibt es hunderte EDTA-lösliche Zahnproteine mit vielfältigen Aufgaben und Wirkungen. Ziel eines zweiten Versuchs war es, die Wirkung der EDTA-löslichen Proteine des Dentins auf humane Pulpazellen zu testen. Die aus Weisheitszähnen isolierten Pulpazellen wurden dafür mit einem selbst hergestellten Nährmedium mit Dentinmatrixproteinen in verschiedenen Konzentrationen versetzt. Als Vergleichsproben wurden gängige Nähr- und Differenzierungsmedien in unterschiedlichen Konzentrationen gewählt. Über einen Zeitraum von 14 Tagen sollte evaluiert werden, wie sich die humanen Pulpazellen im Hinblick auf Proliferation und Differenzierung verhalten. Zur Analyse wurden MTT-Assays zur Ermittlung der Zellviabilität und Alizarinfärbungen zum Nachweis der Mineralisation durchgeführt.

4. Material und Methoden

4.1 Verwendete Nährmedien und Chemikalien

- MEM α (Gibco[®] / 11900-073 produziert in Paisley, Scotland / Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- FBS (Fetal Bovine Serum / 10500 -064 / Gibco[®] / Thermo Fisher Scientific Inc.)
- PBS (9,55 g/l, L 182-05 = Dulbecco-PBS ohne Ca²⁺, Mg²⁺ / Biochrome GmbH, Berlin, Deutschland)
- Trypsin-EDTA (Nr. 25200 / 0,25% / Gibco[®] / Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Chloramin-T Lösung 0,5% (Chloramin-T trihydrate, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- EDTA: 10%, pH 7, 268 mM (Disodium Salt Dihydrate BioChemica, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumhydrogencarbonat (1.06329.1000 / Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- Penicillin-Streptomycin (Penstrep / P0781-100ML / Sigma Aldrich[®], St. Louis, MO, USA)
- Corning Collagen 1 (Rat Tail / 100mg / #354236 / Corning Inc., Corning, NY, USA)
- StemPro[®] Osteogenesis Differentiation Kit (A10072-01 / Gibco[®] / Thermo Fisher Scientific Inc.)
- Human TGF- β -1 (10 μ g / Lot# 1012209 / Cat# 100-21 / Peprotech[®] Inc., Rocky Hill, NJ, USA)
- Zitronensäure (1.00244.0500 / Citronensäure-Monohydrat / Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- BSA (01400 / Bovines Serum Albumin / Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland)
- MTT-Lösung (0,5 mg MTT pro ml PBS) MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide / M-2128 / Sigma Aldrich)

- DMSO (1.02931.1000 / Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- 37% Formaldehyd mit Methanol (1.04003.1000 / MerckKGaA)
- Alizarinrot S (Art.-Nr.: 0348.1 / Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- Tween[®]20 (Polysorbat 20, Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA)
- Gentamycin (G1397 / Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA)

4.2 Verwendete Materialien und Geräte

- 96-Well Mikrotiterplatten (Bottom Clear 96 Well Cell Culture Microplates / #3598 / Corning Inc., Corning, NY, USA)
- Kryoröhrchen (121263 / CRYO.S[®], 2ml, PP / Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich)
- Stickstoffbehälter (LN₂, -196°C, Arpege 110, Air Liquide, Düsseldorf, Deutschland)
- Cellstar[®] Tube (15ml, Artikel:188 271, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich)
- Cellstar[®] Tube (50ml, Artikel:227 261, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich)
- Cellstar[®] T75 Zellkulturflasche (250ml / 75 cm² / 658175 / Greiner Bio-One GmbH)
- Zentrifuge: Hettich Universal 320 (Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland)
- Neubauer Improved Zählkammer (Brand GmbH, Wertheim, Deutschland)
- Diamantinstrumente (Komet[®]-Dental / Gebr. Brasseler GmbH, Lemgo, Deutschland)
- Schwingmühle (Mixer Mill MM 200, RETSCH[®] GmbH, Haan, Deutschland)
- Orbitalschüttler (Miniature Shaker KM 2 / Edmund Bühler[®] GmbH, Hechingen, Deutschland)
- Gefrierschrank (Forma scientific 923 -86°C Freezer / Thermo Fisher Scientific Inc. / Waltham, MA, USA)

- Inkubator (C150 / Binder GmbH / Tuttlingen / Deutschland)
- Spritzen (Plastipak™ 50mL Luer Lok Syringe / BD, Franklin Lakes, NJ, USA)
- Vorfilter: 1,2 µm, 0,45 µm und 0,2 µm (Acrodisc® Syringe Filters with Supor® Membrane / Pall Corporation, Port Washington, NY, USA)
- Amicon® Tube (Amicon® Ultra-15, 3 kDa, Merck Millipore Ltd., Billerica, MA, USA)
- Kühlzentrifuge (Rotina 420 R, Andreas Hettich GmbH & Co.KG)
- ELISA-Kits: TGF-β1 (Human TGF-beta 1 Quantikine® ELISA Kit DB100B, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA), BMP-2 (BMP-2 Quantikine® ELISA Kit, R&D Systems Inc.®), VEGF (Human VEGF Quantikine® ELISA Kit, R&D Systems Inc.)
- Clear Microplate (High Binding / Flat Bottom / 360 µl Well Volume / 12x8 Well Strips with Frame / R&D Systems Inc.®)
- Photometer / Software: Tecan Infinite® F 200 (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) / Magellan® 7.1
- Bildmikroskop: Nikon® Eclipse TS 100 / Kamera: Nikon® DS-Fi2 (Nikon® Corporation, Tokio, Japan)
- Eppendorf Research plus Pipetten (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen (REF: 70.760.002 / Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland)
- Parafilm® (Bemis® Company, Inc. / 54956 / Neenah, WI, USA)
- Sägemikrotom (Leitz SP1600, Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- VDW® ULTRA® (REF: V04 1400 000 501, VDW® GmbH, München, Deutschland)
- VDW® IRR I K-Feile (Länge/ISO: 25/25, REF: 1463 025 025, VDW® GmbH)
- Eppendorf Tube® 3810x (1,5ml, Katalog-Nr. 0030125215, Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
- Diamanttrennscheibe (Komet® Dental, REF: 918PB.104.220, Gebr. Brasseler GmbH, Lemgo, Deutschland)
- ProTaper Next® Feilensystem (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Deutschland)

- x-smart® plus Endo Motor (Dentsply DeTrey GmbH, REF: A 1032, Konstanz, Deutschland)
- Omnifix®-F Spritze (Luer Solo / REF: 9161406 / B. Braun AG, Melsungen, Deutschland)
- Panasil® tray Soft Heavy (Type 1) (Vinyl Polysiloxane ISO 4823 / Kettenbach® GmbH, Eschenburg, Deutschland)
- Dynamischer Mischer (für 380ml Kartuschen/ REF: 17900/ Kettenbach® GmbH, Eschenburg, Deutschland)
- Sympress [Mischgerät] (REF: 60000000 / Renfert GmbH, Hilzingen, Deutschland)
- TPP® Filteraufsatz 250 (99255 / PES-Membrane 0.22 µm Porengrösse / Techno Plastic Products® AG, Trasadingen, Schweiz)

4.3 Freisetzung von Dentinmatrixproteinen aus Dentinscheiben

4.3.1 Testgruppen und Herstellung der Dentinscheiben

Für den Dentinscheibenversuch wurden 13 Testgruppen festgelegt:

	1. Spüllösung	2. Spüllösung
Ein-Schritt-Spülung	PBS für 10 min ± US	
	EDTA für 1 min ± US	
	EDTA für 3 min ± US	
	EDTA für 10 min - US	
Zwei-Schritt-Spülung	PBS für 10 min - US	PBS für 1 min + US
	EDTA für 1 min - US	PBS für 1 min + US
	EDTA für 10 min - US	PBS für 3 min ± US
	EDTA für 10 min - US	PBS für 5 min ± US

± US = Spülung mit (+ US) und ohne (- US) Ultraschallaktivierung

Tabelle 2: Testgruppen des Dentinscheibenversuchs

Zur Durchführung der Untersuchungen wurden humane Zähne der zweiten Dentition verwendet, welche nach Extraktion und bis zur Verwendung für diesen Versuch bei 6°C in 0,5%iger Chloramin-T Lösung lagerten. Die Dentinscheiben wurden aus den Zahnkronen von Weisheitszähnen von Patienten im Alter von 15-25 Jahren hergestellt. Mithilfe einer Innenlochsäge wurden die Dentinscheiben unter Wasserkühlung bei 600 U/min und einer Vorschubgeschwindigkeit von 0,6 mm/s gesägt, die Dicke betrug 200 µm und der Durchmesser 6 mm.

4.3.2 Versuchsdurchführung

Zur Versuchsdurchführung wurden die Dentinscheiben 24h vorher in *aqua dest.* gelegt um sie von Chloramin-T zu reinigen. Als Versuchsgefäße dienten 96 Well-Mikrotiterplatten, die mit einer Dentinscheibe je Well bestückt wurden. Es gab 9 Scheiben pro Testgruppe und jede Scheibe durchlief den Testzyklus dreimal. Dabei wurden alle Dentinscheiben jeder Gruppe dreimal dem gleichen Spülprotokoll unterzogen. Die Testlösungen waren PBS und EDTA (10%, pH 7, 268 mM) mit einem Volumen von 115 µl. Nach Einbringen der Testlösung auf die Dentinscheibe wurde, falls für diese Testgruppe vorgesehen, direkt mit der Ultraschallanregung begonnen und die Zeit gestoppt. Die Ultraschallaktivierung erfolgte mittels VDW ULTRA im Irrigation Mode, als Ultraschallansatz kam eine VDW IRRI K-Feile

(Länge/ISO: 25/25) zum Einsatz. Um einen Verlust von Testlösung und damit von Wachstumsfaktoren zu verhindern, wurde das Well vorher mit Parafilm abgedeckt. Durch diese Abdeckung konnte mit der Ultraschallspitze hindurchgestochen werden. Während der gesamten Versuchszeit wurde der Ultraschallansatz drucklos in einem Winkel von 30° zur Dentinscheibe gehalten und in kreisförmigen Bewegungen geführt, während die Spitze des Ansatzes die Dentinscheibe berührte. Nach Ende der Testzeit wurde die Lösung in einem Eppendorf Tube in flüssigen Stickstoff überführt und anschließend bis zur Durchführung des ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) bei -80°C gelagert. Bei Zwei-Schritt-Spülprotokollen wurde nur die zweite Lösung aufbewahrt, die erste wurde verworfen.

4.3.3 Quantifizierung mittels ELISA

Die Quantifizierung der Menge an Wachstumsfaktor TGF- β 1 in Lösung erfolgte mittels ELISA. Nach zwölfstündigem *coating* der Wells mit dem *capture* Antikörper wurden diese am nächsten Tag gewaschen und 1h mit Blockpuffer inkubiert. Zum Abblocken der freien Bindungsstellen wurden 100 μ l des Standards bzw. der Proben in die entsprechenden Wells pipettiert. Nach der Inkubation wurde der *detection* Antikörper hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von Streptavidin-HRP (*horseradish peroxidase* = Meerrettichperoxidase). Die HRP setzte das im nächsten Schritt zugegebene Substrat enzymatisch um und verursachte so eine Blaufärbung der Flüssigkeit. Der Grad der Blaufärbung war dabei direkt proportional zur Menge des gebundenen TGF- β 1. Nachdem die HRP-Reaktion 30 min im Dunkeln abgelaufen war, wurde diese Reaktion mittels Chlorwasserstoffsäure abgestoppt. Dabei fand ein Farbumschlag ins Gelbe statt. Die Messung erfolgte anschließend photometrisch bei 450 nm und mit einer Referenzmessung bei 540 nm, die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Magellan 7.1. Als Referenz wurde eine Verdünnungsreihe mit rekombinantem TGF- β 1 gemessen. Der Referenzbereich reichte von 7,8125 pg/ml bis 4000 pg/ml. Die Standardkurve wurde aus 20 Proben des Referenzbereiches erstellt. Außerdem wurde durch zweifache Messung des Reagent Diluent, der Lösung zum Verdünnen von Standard und Proben, ein Leerwert ermittelt. Die Nachweisgrenze für TGF- β 1 lag bei 7,1825 pg/ml (172).

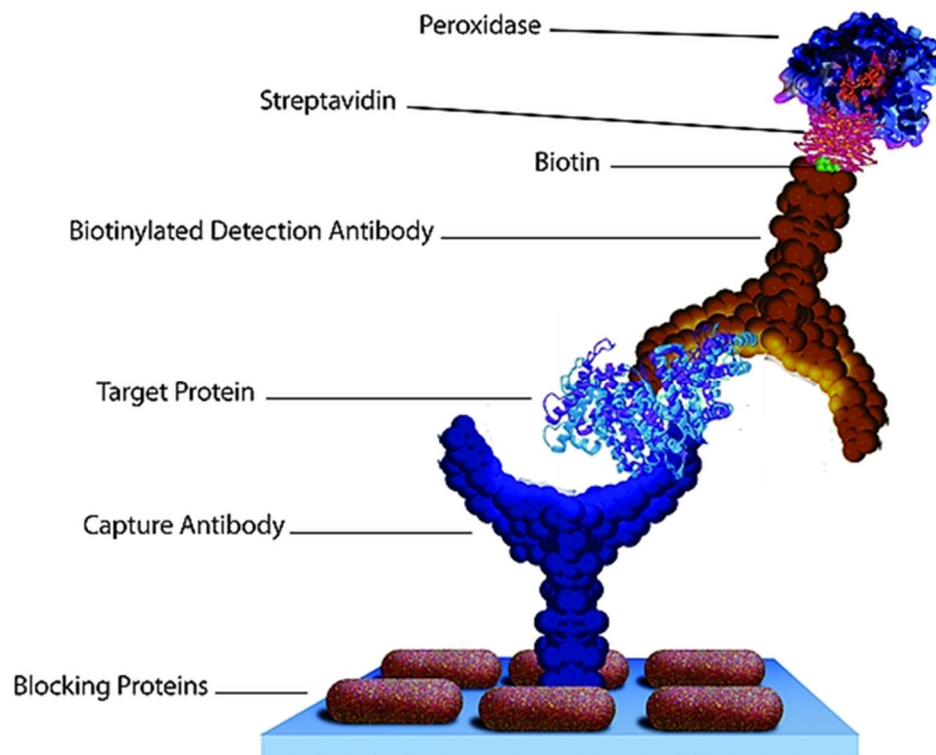


Abbildung 3: ELISA – Reaktionsprinzip (173).

Abbildung 3 zeigt das Prinzip des durchgeführten ELISA. Als Zielprotein fungierte in diesem Fall TGF- β 1.

4.4 Freisetzung von Dentinmatrixproteinen im Wurzelkanalmodell

4.4.1 Aufbereitung der Wurzelkanäle

Zur Durchführung dieses Versuchs wurden ebenfalls humane Zähne der zweiten Dentition verwendet, welche nach Extraktion und bis zur Verwendung für diesen Versuch bei 6°C in Chloramin-T Lösung 0,5% lagerten. Verwendet wurden erste und zweite Molaren von Patienten aller Altersklassen, welche nicht endodontisch behandelt waren und ein abgeschlossenes Wurzelwachstum aufwiesen. Die Normierung der Wurzeln auf 10 mm Länge erfolgte mit Hilfe einer Diamanttrennscheibe. Anschließend erfolgte die Aufbereitung der Wurzelkanäle bis 1 mm vor Apex, also auf 9 mm Arbeitslänge, mit dem ProTaper Next Feilensystem bis Feilengröße X5 (ISO 50, Konizität 0.6). Die von Herstellerseite angegebenen Drehmoment- und Drehzahlwerte (300 rpm / 2 Ncm) wurden bei der Aufbereitung eingehalten. Die aufbereiteten Wurzelkanäle lagerten dann bis zur Erstellung des Wurzelkanalmodells weiterhin in Chloramin-T Lösung 0,5%.

4.4.2 Herstellung des Wurzelkanalmodells

In einem ersten Schritt wurden die aufbereiteten Wurzelkanäle durch Spülung mit *aqua dest.* gereinigt und anschließend getrocknet. Als nächstes erfolgte das Einbringen von Abformmaterial (Panasil, Kettenbach) in eine 1000 µl Pipettenspitze bis etwa 1,5 cm unterhalb der oberen Öffnung. Die getrocknete Wurzel wurde in die Pipettenspitze eingeführt, bis die Trennfläche des Wurzelkanals und das Panasil eine Ebene bildeten. Dann wurde das Abformmaterial beiseite gestellt um den Abbindevorgang abzuwarten. Im fertigen Wurzelkanalmodell bildeten Panasil und der Wurzelkanal eine Ebene, weiterhin war der gesamte Wurzelkanal von Panasil umgeben, lediglich die Öffnung sowie die Trennfläche waren sichtbar. Das Panasil dichtete außerdem den gesamten Rand der Pipettenspitze ab und befüllte es blasenfrei bis zur unteren Spitzenöffnung.

4.4.3 Testgruppen und Versuchsdurchführung

Vor Versuchsdurchführung wurden 3 Testgruppen festgelegt:

- X: 10 min EDTA, dann 5 min PBS + US
- Y: 3 min EDTA + US
- Z: 10 min PBS + US

Für jede Testgruppe standen 12 Wurzelkanalmodelle zur Verfügung. Das für den jeweiligen Wurzelkanal ausgewählte Spülprotokoll wurde jeweils dreimal durchgeführt. Zur Durchführung wurde der Wurzelkanal mit 100 µl der entsprechenden Lösung befüllt. Als Testlösungen wurden analog zu den Versuchen an Dentinscheiben PBS und EDTA (10%, pH 7, 268 mM) verwendet. Nach dem Einbringen der Testlösung wurde eine Ultraschallspitze in den Wurzelkanal eingebracht und die Zeit der Aktivierung gestoppt. Zur Erzeugung des Ultraschalls wurde ein VDW ULTRA im *irrigation mode* verwendet, als Ultraschallansatz kam eine VDW IRRRI K-Feile (Länge/ISO: 25/25) zum Einsatz. Mit der bis auf Arbeitslänge, also 1 mm vor den anatomischen Apex eingeführten Feile wurden leichte, gleichmäßige Feilbewegungen über die gesamte Versuchszeit durchgeführt. Nach dem Ende der Testzeit wurde die Pipettenspitze kopfüber in ein 15 ml Röhrchen überführt, die Flüssigkeit abzentrifugiert, in ein Eppendorf Tube® überführt, in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bis zur Durchführung des ELISA bei -80°C gelagert. Bei

den Zwei-Schritt-Spülprotokollen wurde nur die zweite Lösung aufbewahrt, die erste wurde verworfen.

4.4.4 Quantifizierung mittels ELISA

Die Quantifizierung der freigesetzten Menge an TGF- β 1 erfolgte analog zum Dentinscheibenversuch mittels ELISA.

4.5 Untersuchungen zu Zellproliferation und Mineralisation

4.5.1 Versuchsaufbau

Zur Durchführung dieses Versuchs wurden humane Weisheitszähne verwendet. Die Vorgehensweise zu Isolierung und Kultivierung orientierte sich an Galler et al. (174). Eine Unbedenklichkeitserklärung der Ethikkommission des Universitätsklinikums Regensburg zur Kultivierung von primären humanen Pulpazellen liegt vor. In 96-Well Mikrotiterplatten wurden HPCs (Humane Pulpazellen), die von 16- bis 25-jährigen Patienten gewonnen wurden, über einen Zeitraum von 14 Tagen mit verschiedenen Nährlösungen in verschiedenen Konzentrationen (siehe Tabelle 1) kultiviert. Für die insgesamt 11 verschiedenen Testlösungen standen jeweils 3 Zellkulturen unterschiedlicher Spender zur Verfügung, pro Zellkultur gab es ein Triplet an Wells für jede Nährlösung. Die Analyse der Zellviabilität mittels MTT-Test fand an den Tagen 0, 1, 3, 5, 7 und 10 statt. Die Alizarin-Färbung wurde nach 14 Tagen durchgeführt.

DMP	FBS	TGF- β 1	StemPro	Kollagen 1
100 pg/ml	1%	1000 pg/ml	siehe 4.3.5	0,05 mg/ml
200 pg/ml	10%	2500 pg/ml		
500 pg/ml		5000 pg/ml		
1000 pg/ml				

Tabelle 3: Konzentrationen der Nährlösungen für den MTT-Test

4.5.2 Isolierung von Dentinmatrixproteinen

Dentinmatrixproteine (DMP) wurden aus extrahierten Weisheitszähnen isoliert, welche für maximal 12 Monate in Chloramin-T Lösung 0,5% bei 4°C gelagert waren. Initial erfolgte die Entfernung von Schmelz und Zement mittels rotierender Diamantinstrumente, dann erfolgte die Zerkleinerung der Zähne mittels eines Stahlhammers und sterilen Servietten zu Fragmenten unter 3 mm. Anschließend wurden Pulpagewebereste mit einer zahnärztlichen Pinzette entfernt. Die vorgekühlte Mahltrommel einer Schwingmühle mit zwei Mahlkugeln wurde mit Zahnfragmenten von jeweils zwei Zähnen beladen. Diese wurden für 90 s bei 25 s⁻¹ in der Schwingmühle zerkleinert. Nach Kontrolle des Mahlerfolgs und Lösen von Mehl und Fragmenten von der Innenseite der Trommel wurden die Fragmente samt Trommel für 60 s auf Eis gelagert. Danach erfolgte ein erneuter Zerkleinerungsvorgang für 90 s bei 25 s⁻¹. Das so gewonnene Dentinmehl wurde zu je 15g (~ 15 Zähne) in 50 ml Röhrchen auf Eis gelegt und anschließend in PBS abzentrifugiert (2 min, 3000g). Jetzt erfolgte das Dekantieren und Bestimmen des Feuchtgewichts. Pro 1 g Dentinmehl wurde dann 1 ml von 10% EDTA-Lösung mit pH 7 hinzugefügt. Die Röhrchen wurden auf Eis bei 250 rpm für 30 min auf einen Orbitalschüttler gelegt und anschließend für 2 min bei 3000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt. Dann folgte ein erneutes Abzentrifugieren für 2 min bei 3000 g. Der Flüssigkeitsüberstand wurde abpipettiert. Als Sammelbehälter fungierte eine auf Eis gelegte sterile Glasflasche. Das übrige Dentinmehl wurde erneut in einem 50 ml Röhrchen mit 10% EDTA in einem Verhältnis 1 g Mehl / 1 ml EDTA vermischt und für 5 s auf einem Vortex-Mischer durchmischt. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt. Die durch diesen Prozess gewonnene Flüssigkeit an Dentinmatrixproteinen wurde abschließend noch steril filtriert. Bei diesem Vorgang gingen etwa 25% des Volumens verloren. Zur Filtration wurde die Flüssigkeit in Volumina von 10-20 ml zuerst durch Spritzen mit Acrodisc® Vorfilter gepresst. Als Porengröße wurden sukzessive 1,2 µm, 0,45 µm und 0,2 µm verwendet. 15 ml des gewonnenen Filtrats wurden in ein Amicon® Tube gegeben und für 30 min bei 4000 g und 4°C in einer Kühlzentrifuge aufkonzentriert. Danach wurden weitere 5 ml Extrakt in das Amicon® Tube nachgelegt, der Durchlaufbehälter geleert und erneut für 15 min bei 4000 g und 4°C zentrifugiert. Dieser Schritt wurde viermal wiederholt bis ein Restvolumen von 500 µl vorlag. Abschließend wurde 1 ml PBS hinzugefügt und für 5 min bei 4000 g und 4°C unter ständiger Kontrolle, um ein Reißen des Filters zu

verhindern, zentrifugiert. Das so gewonnene Konzentrat wurde zu je 100 µl aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

4.5.3 Analyse des DMP-Mediums

Drei Chargen des DMP-Mediums wurden mithilfe von ELISAs auf ihren Gehalt an TGF-β1, BMP-2 und VEGF untersucht. Die Durchführung der ELISAs erfolgte wie unter 4.3.3 beschrieben.

4.5.4 Vorbereitung der Zellen

Die humanen Pulpazellen wurden bis zur Verwendung für diesen Versuch in Kryoröhrchen in der Gasphase eines Stickstoffbehälters bei -196°C gelagert. Danach erfolgte zunächst das Auftauen und Aussäen der Zellen und anschließend die Zellaussaat. Für diesen Versuch wurden drei Zellkulturen mit der Bezeichnung #214, #314 und #914 verwendet.

Auftauen und Aussäen:

Die Kryoröhrchen wurden bei 37°C ins Wasserbad gegeben und angetaut, bis noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Dann wurden die Zellen in ein 15ml-Röhrchen mit Medium (90% MEMα, 9% FBS, 1% Penstrep) überführt und 6 min bei 900 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in 10 ml neuem Medium resuspendiert. Nach Überführen der Zellen in eine T75 Zellkulturflasche wurden diese bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert.

Die Zellaussaat:

Nach 72h wurden diese Zellen aus dem Inkubator entnommen und das Medium abgesaugt. Danach wurden die Kulturflaschen mit sterilem PBS gewaschen. Als nächstes wurden die Zellen trypsinisiert und anschließend die Trypsin-Reaktion durch Zugabe von 7 ml Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15ml-Röhrchen überführt und für 6 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in einem ml neuem Medium resuspendiert und auf 10 ml verdünnt. Abschließend erfolgte das Ermitteln der Zellzahl je Zellkultur mittels einer Zählkammer (Neubauer Improved):

214: 274 Zellen $274/4 * 10.000 = 685.000$ Zellen pro ml

→ 2 ml Zelllösung + 48 ml Medium = 26.666 Zellen pro ml

314: 126 Zellen $126/4 * 10.000 = 315.000$ Zellen pro ml

→ 4,3 ml Zelllösung + 45,7 ml Medium = 26.666 Zellen pro ml

914: 79 Zellen $79/4 * 10.000 = 197.500$ Zellen pro ml

→ 6,8 ml Zelllösung + 43,2 ml Medium = 26.666 Zellen pro ml

Das Ausbringen der Zellen erfolgte in die 96-Well Mikrotiterplatten (Insgesamt 24 Platten, 8 pro Zellkultur): Je Well (Fläche: $0,32 \text{ cm}^2$ / Volumen: 0,3 ml) wurde ein Volumen von 0,15 ml = 150 μl an Zelllösung eingebracht. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bis nach vier Tagen eine Konfluenz von 70% erreicht war und eine erste Baseline-Messung (Messtag 0) durchgeführt werden konnte. Nach dieser Messung wurden die Zellen mit dem individuell bestimmten Nährmedium für die jeweiligen Gruppen kultiviert.

4.5.5 Nährlösungen

Für den Versuch wurden insgesamt 5 Nährlösungen verwendet. Die verschiedenen Konzentrationen können der Tabelle 1 entnommen werden. Nachfolgend ist die exakte Zusammensetzung der einzelnen Nährmedien beschrieben.

FBS:

Zusammensetzung (für 1l):

- 10,2 g MEM α / 2,2 g Natriumhydrogencarbonat / 10 ml Penstrep
- FBS: 10 ml für 1% oder 100 ml für 10%
- 980 ml (1%) oder 890 ml (10%) Aqua dest.

Die fertige Lösung wurde abschließend durch einen TPP Filteraufsatz 250 sterilfiltriert.

DMP (Dentin Matrix Proteine)

Die Extraktion der DMPs wird unter Punkt 4.5.3 erläutert. Für diesen Versuch wurde das Basismedium mit 1% FBS gemischt und die jeweils gewünschte Endkonzentration an DMP eingestellt.

Kollagen (*corning collagen 1*)

Durch Verdünnen mit 1% FBS-Medium wurde eine Konzentration von 0,05 mg/ml eingestellt.

StemPro (*osteogenesis differentiation kit*)

Enthält:

- StemPro *osteocyte/chondrocyte differentiation basal medium*
- StemPro *osteogenesis supplement*

Zusammensetzung für diesen Versuch:

- 90 ml *basal medium*
- 10 ml *supplement*
- 10 µl Gentamycin

Anmerkung zu StemPro®: Das StemPro® Kit von Life Technologies™ dient zur osteogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen. Von Herstellerseite wird eine Differenzierungsdauer von mind. 21 Tagen unter Kultivierung mit StemPro® angegeben (175).

Rekombinantes TGF-β1:

Inhalt: *human* TGF-β-1 / Zitronensäure / BSA / PBS

Herstellung:

- Lösung 1: 2,1 g Zitronensäure (M = 210,14 g/mol) in einem Liter *aqua dest.* (ergibt 10mM Zitronensäure).
- Lösung 2: 0,1 g BSA in 100 ml PBS (ergibt 0,1% Lösung)

- Lösung 3: 2 x 10 µg TGF-β1 in 100 µl der 10mM Zitronensäure (Konz.: 200 µg/ml = 200.000 ng/ml)

Lösung 3 wurde in einem Verhältnis von 1:200 mit Lösung 2 verdünnt (100 µl Lösung 3 + 19,9 ml Lösung 2). Dies ergab eine Endkonzentration an TGF-β1 von 1000 ng/ml. Diese Lösung wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Für die gewünschte Konzentration in diesem Versuch wurde diese Lösung mit 1% FBS-Medium verdünnt.

4.5.6 Bestimmung der Zellviabilität

Initial wurde an den Messtagen mittels eines Umkehrmikroskops ein Foto je Triplet erstellt. Nach dem Absaugen der Nährmedien erfolgte das Einbringen von 100 µl MTT-Lösung je Well mit 37°C. Das MTT wird durch die vitalen Zellen in Formazan umgewandelt. Nach Inkubation für 1h wurde die MTT-Lösung wieder abgesaugt. Anschließend wurden 200 µl DMSO (Zimmertemperatur) je Well eingebracht. Die Mikrotiterplatten wurde für 15 min bei 275 MOT 1/min auf den Orbitalschüttler gestellt. DMSO diente dazu, das Formazan in einen löslichen Zustand zu überführen. Abschließend erfolgte die photometrische Messung bei 570 nm.

4.5.7 Alizarinfärbung

Die Alizarinfärbung wurde nach 14 Tagen, mit je einer Mikrotiterplatte der drei Zellkulturen #214, #314, #914 durchgeführt.

Fixierung:

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 200 µl PBS pro Well gewaschen und 200 µl der 10%igen Formaldehyd-Lösung je Well eingebracht. Die 37%ige Formaldehyd-t Methanol - Lösung wurde dafür mittels PBS auf 10% verdünnt. Im Anschluss wurden die Wells nach einer Inkubationszeit von 15 min zweimal mit *aqua dest.* gewaschen. Als letztes wurden 200 µl PBS in jedes Well pipettiert, die Well Platten mit Parafilm verschlossen und bis zur Färbung im Kühlschrank gelagert.

Färbung:

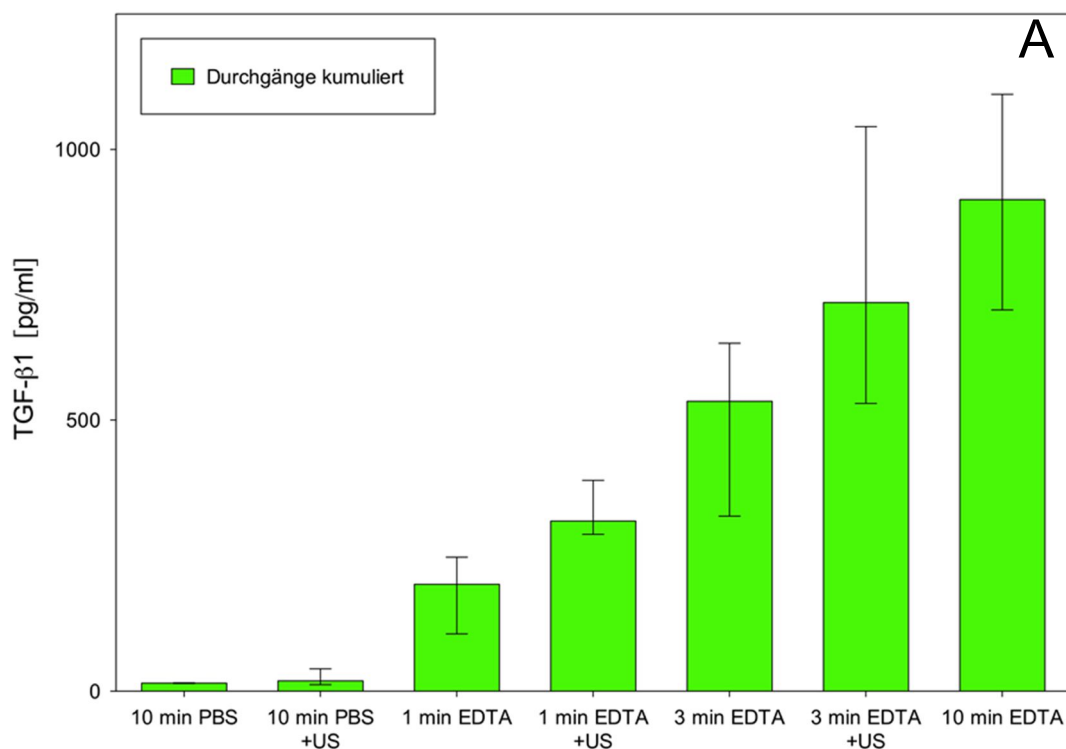
Die 40 mM Färbelösung bestand aus 273,8 mg Alizarinrot S und 20 ml *aqua dest.*, der pH-Wert wurde mittels 0,1% Ammoniumhydroxid auf 4,2 eingestellt. Nach dem Abnehmen des PBS wurden 200 µl der Alizarinrot-Färbelösung pro Well zugegeben und die Proben wurden für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde jedes Well viermal mit *aqua dest.* gewaschen, bis sich keine Farbe mehr auswusch. Als letztes wurden mittels Umkehrmikroskop Aufnahmen der Zellkulturen erstellt.

5. Ergebnisse

Bei der Datenanalyse wurden Mediane mit 25-75% Perzentilen berechnet und anschließend grafisch dargestellt. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz wurden nichtparametrische Mann-Whitney U-Tests auf dem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ angewandt (SPSS, Version 22.0 und 23.00, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Bei der Analyse der ELISA-Daten wurde das Detektionslimit als die Hälfte der geringsten Konzentration des von Herstellerseite mitgelieferten Standards festgelegt.

5.1 Freisetzung von TGF- β 1 aus Dentinscheiben

Die Darstellung und Analyse der Ergebnisse unter 5.4 und 5.5 ist angelehnt an die Veröffentlichung dieser Daten durch Widbiller et. al. 2016 (59) im *Journal of Clinical Oral Investigations*.



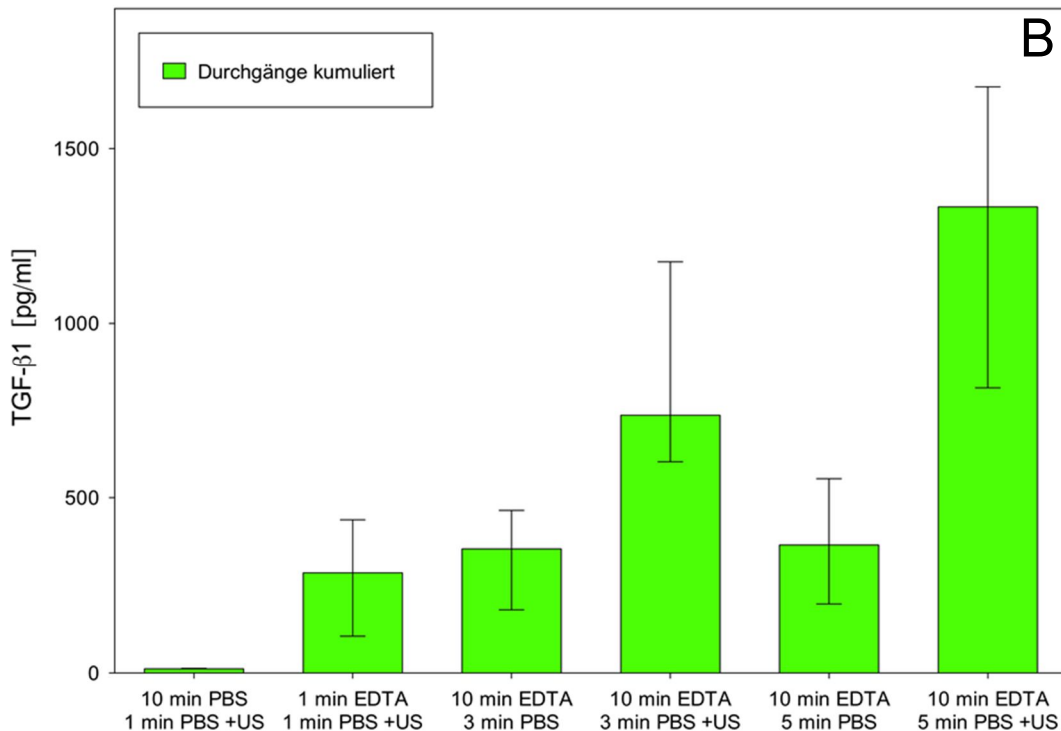


Abbildung 4: Darstellung der kumulierten Freisetzung von TGF-β1 aus Dentinscheiben. A) Mit einer Spüllösung. B) Mit zwei Spüllösungen, wobei erstere nach Anwendung verworfen wurde und in letzterer die Menge an TGF-β1 bestimmt wurde.

Die Anwendung von PBS als alleinige Spüllösung führte weder mit noch ohne Ultraschall zu einer Freisetzung von TGF-β1. Die Spülung mit EDTA in einem Schritt ohne Ultraschallanwendung führte zu einer höheren ($p = 0,000$) TGF-β1 Freisetzung, welche sich zeitabhängig signifikant erhöhte (1 min: 197 pg/ml | 3 min: 535 pg/ml | 10 min: 908 pg/ml). Die Verwendung von Ultraschall führte bei gleichem Zeitansatz zu einer signifikant ($p = 0,000$) erhöhten TGF-β1 Freisetzung (1 min ohne US: 197 pg/ml | 1 min mit US: 313 pg/ml). Wurde eine Dentinscheibe zuerst für 1 min mit EDTA konditioniert und anschließend für 1 min mit ultraschallaktiviertem PBS behandelt, konnte im PBS, im Vergleich zur alleinigen Anwendung von PBS ohne EDTA, eine erhöhte ($p = 0,000$) Menge an TGF-β1 nachgewiesen werden (268 pg/ml). Wirkte EDTA für 10 min auf die Dentinscheiben ein, war es möglich, TGF-β1 anschließend in PBS zu isolieren. Dieser Effekt nahm bei Ultraschallaktivierung von PBS zu ($p = 0,004$) (735 pg/ml nach 3 min und 1334 pg/ml nach 5 min).

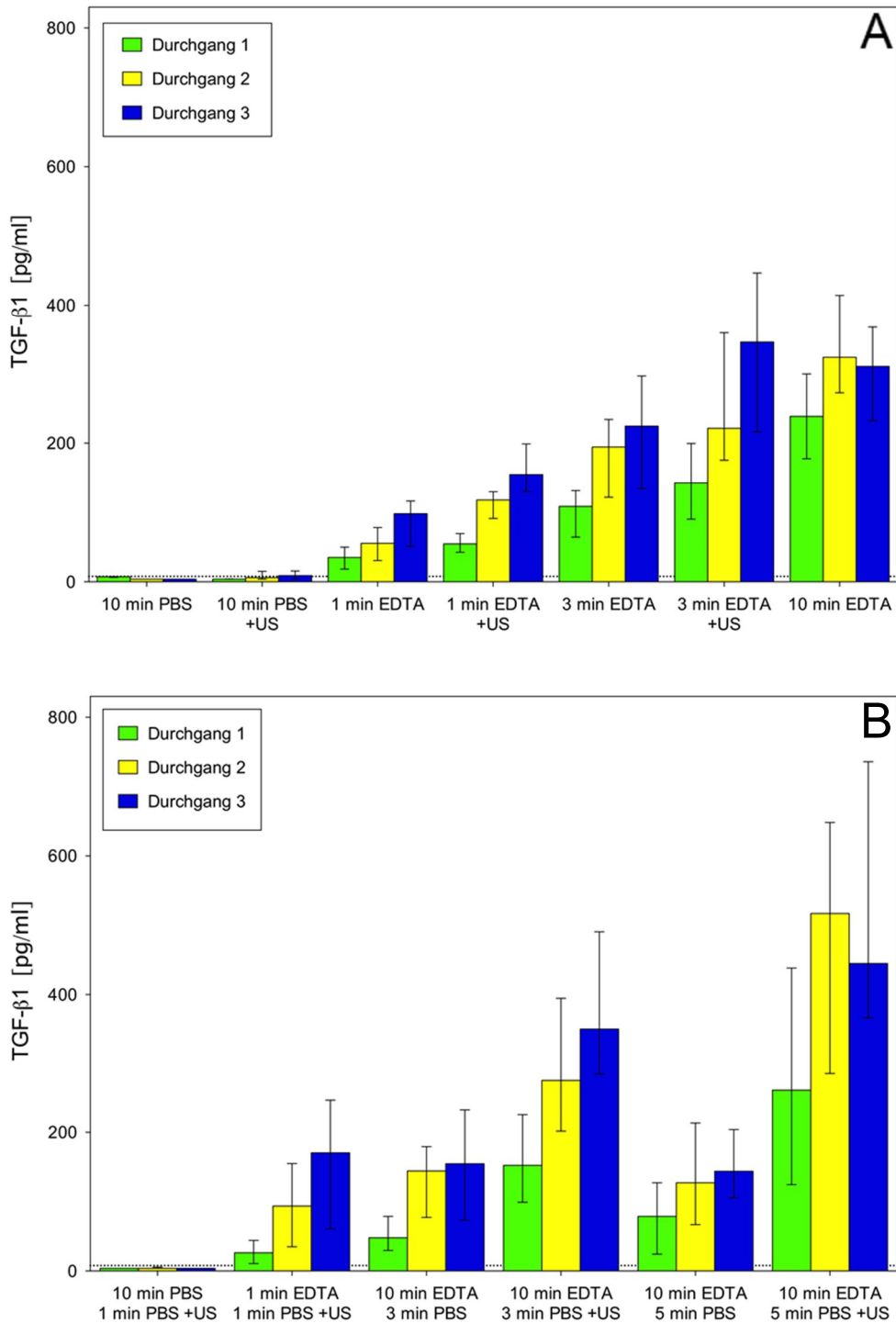


Abbildung 5: Nach Durchgängen unterteilte Darstellung der Freisetzung von TGF-β1 aus Dentinscheiben. A) Mit einer Spüllösung. B) Mit zwei Spüllösungen, wobei erstere nach Anwendung verworfen wurde und in letzterer die Menge an TGF-β1 bestimmt wurde.

Während die Freisetzung von TGF-β1 bei alleiniger Behandlung der Dentinscheiben mit PBS nicht möglich war, konnte bei Behandlung der Dentinscheiben mit EDTA oder mit EDTA und PBS eine erhöhte Freisetzung von TGF-β1 im zweiten und dritten Durchgang festgestellt werden. Dabei war der Unterschied zwischen Durchgang eins

und zwei in den meisten Gruppen statistisch signifikant ($p = \leq 0,05$), zwischen Durchgang zwei und drei jedoch nicht.

5.2 Freisetzung von TGF- β 1 im Wurzelkanalmodell

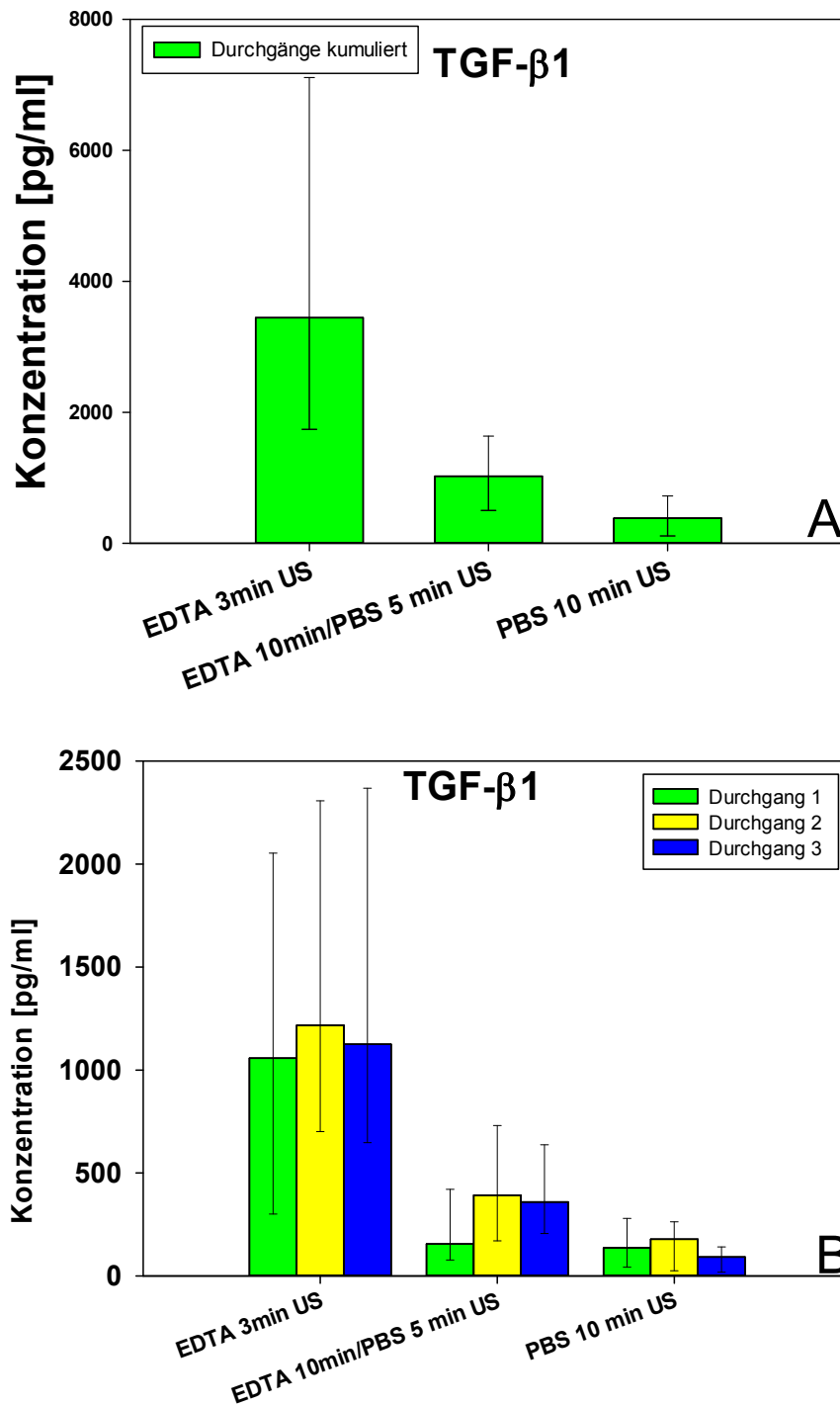


Abbildung 6: TGF- β 1 - Freisetzung am Wurzelkanalmodell. A) kumulierte Darstellung B) nach Durchgängen unterteilte Darstellung

Im Gegensatz zu den Ergebnissen an Dentinscheiben konnte durch zehnmünütige Ultraschallaktivierung von PBS im Wurzelkanal eine nachweisbare Menge an TGF- β 1 freigesetzt und isoliert werden (382 pg/ml). Dabei fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Wiederholungen. Die höchste Menge an TGF- β 1 konnte durch dreiminütige Ultraschallaktivierung von EDTA isoliert werden (3445 pg/ml), auch hier fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den drei Wiederholungen. Auffällig ist hier allerdings die große Spannweite bei der freigesetzten Menge an TGF- β 1 von 1740 pg/ml (25% Perzentil) bis 7112 pg/ml (75% Perzentil). Nach zehnmünütiger EDTA Konditionierung und anschließender fünfminütiger Ultraschallaktivierung von PBS konnte eine Gesamtmenge von 1023 pg/ml an TGF- β 1 in 3 Durchgängen isoliert werden. Der Anteil des zweiten und dritten Durchgangs war dabei etwas höher als der des ersten, allerdings ohne statistische Signifikanz. Bei Betrachtung der kumulierten Ergebnisse ergeben sich Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen allen drei Testgruppen.

5.3 Analyse des DMP-Mediums

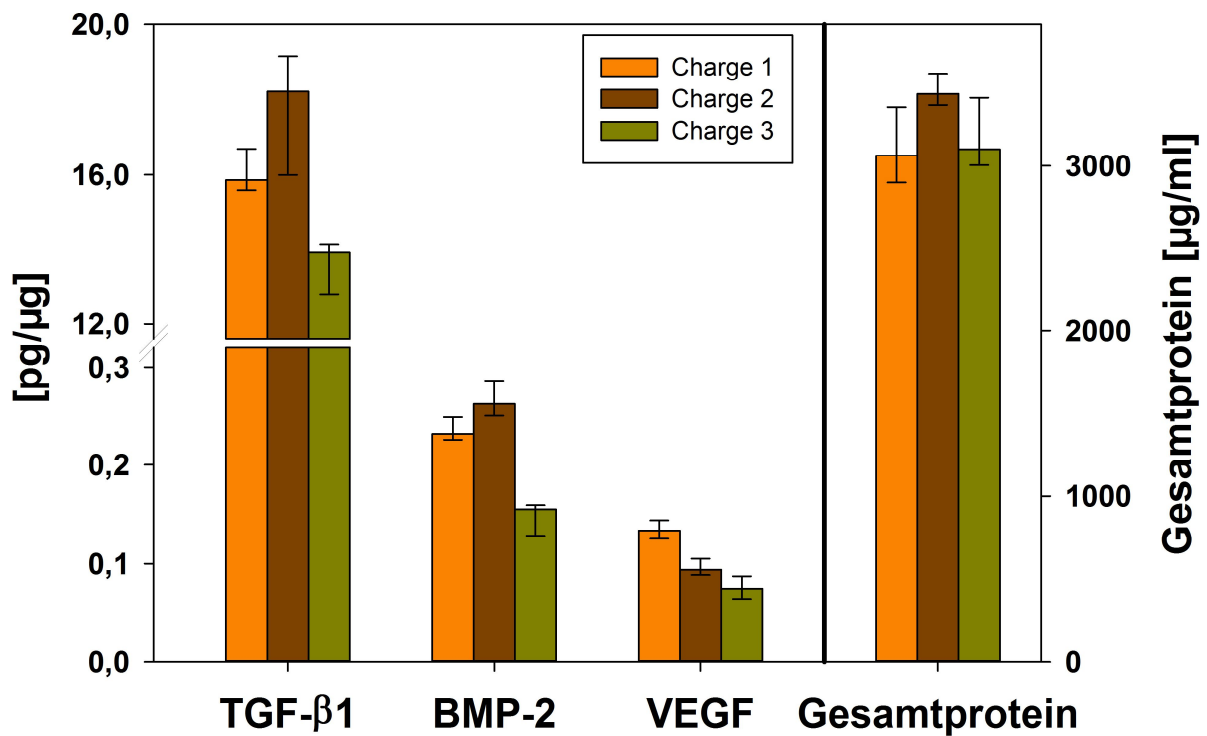


Abbildung 7: Analyse des DMP-Mediums

Das Diagramm zeigt die Menge an Wachstumsfaktoren in pg pro μg Dentinmehl, sowie die Gesamtproteinkonzentration in μg pro ml DMP-Medium. Die Analyse von drei verschiedenen Chargen des DMP-Mediums zeigte reproduzierbare Werte für die einzelnen Wachstumsfaktoren sowie für die Gesamtproteinmenge. Für die Wachstumsfaktoren betragen die drei Mediane: TGF- β 1 (15,8 / 18,2 / 13,9), BMP-2 (0,23 / 0,26 / 0,15), VEGF (0,13 / 0,09 / 0,07). Die Gesamtproteinkonzentration bewegte sich zwischen 3061 und 3429 μg pro ml.

5.4 Nachweis der Zellviabilität mittels MTT-Test

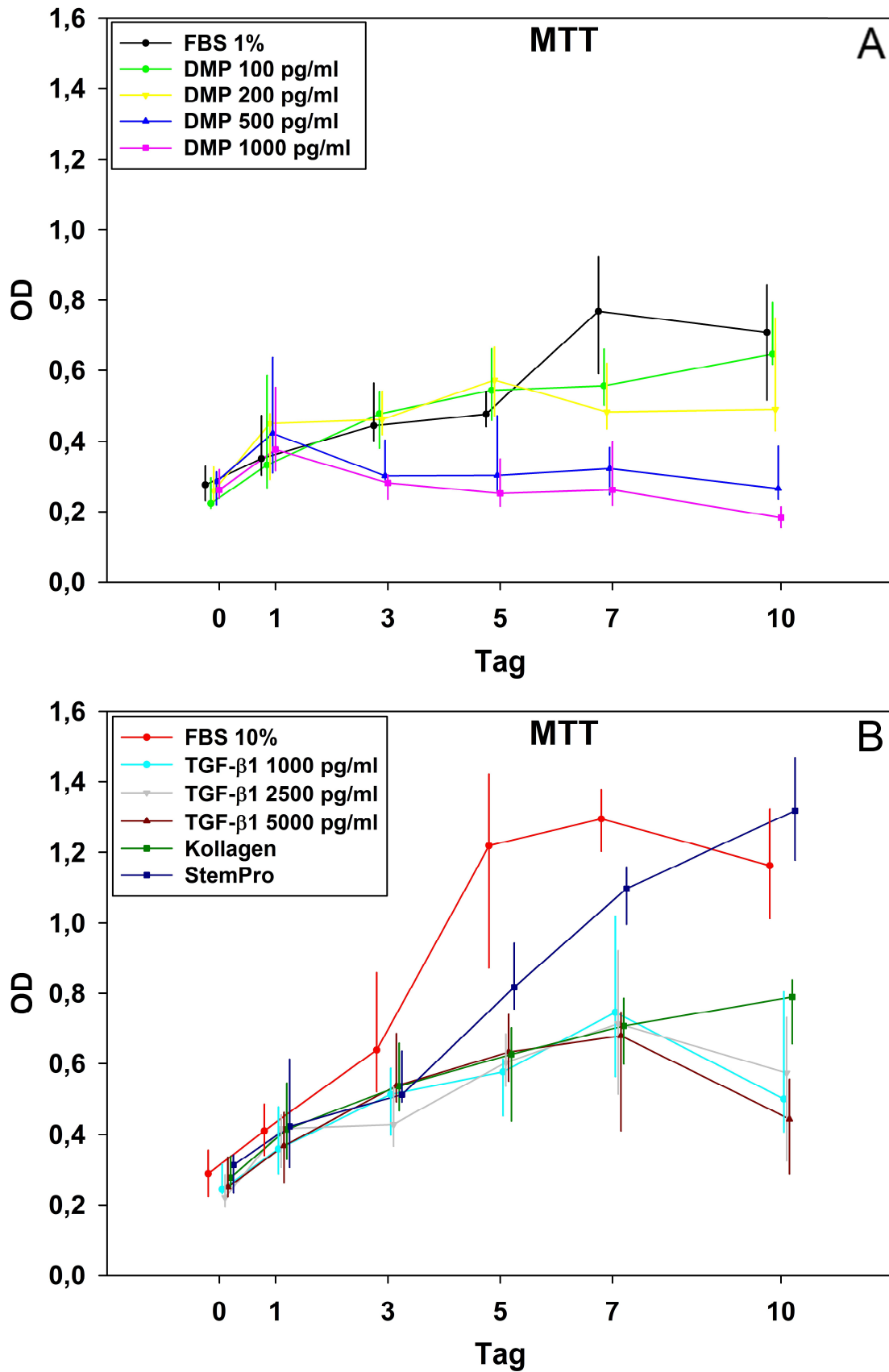


Abbildung 8: Analyse der Zellviabilität mittels MTT-Test an 10 Messtagen. Aufgeteilt in A und B zur besseren Übersicht.

Die DMP-Medien führten bei allen Testgruppen (100 pg/ml, 200 pg/ml, 500 pg/ml, 1000 pg/ml) zu einem signifikanten ($p \leq 0,05$) Anstieg der Zellviabilität an Messtag 1. Danach konnte lediglich bei DMP 100 pg/ml ein kontinuierlicher Anstieg der Zellviabilität festgestellt werden, während diese bei den anderen Testgruppen nicht mehr anstieg oder sogar rückläufig war. Dabei war der Rückgang umso stärker, je höher die Konzentration des verwendeten DMP-Mediums war. So bestand zwischen DMP 500 pg/ml bei Vergleich zwischen Messtag 0 und 10 kein signifikanter ($p = 0,546$) Unterschied hinsichtlich der Zellviabilität.

Bei Betrachtung der Gruppen mit rekombinantem TGF- β 1 fand sich an Messtag 3 ein Unterschied ($p = 0,019$) zwischen TGF- β 1 2500 pg/ml und 5000 pg/ml, ansonsten konnte an allen Messtagen zwischen allen drei Gruppen (1000 pg/ml, 2500 pg/ml, 5000 pg/ml) kein signifikanter ($p \leq 0,05$) Unterschied festgestellt werden. Zwischen Messtag 0 und 7 kam es in allen TGF- β 1 Gruppen zu einem kontinuierlichen Anstieg der Zellviabilität. Von Messtag 7 auf 10 kam es in allen drei Gruppen zu einem abrupten Absinken der Zellviabilität, eine statistisch signifikante Abnahme ($p = 0,050$) fand sich dabei allerdings nur bei TGF- β 1 5000 pg/ml.

StemPro induzierte einen statistisch signifikanten Anstieg der Zellviabilität an jedem Messtag. Lediglich von Messtag 1 zu Messtag 3 konnte hier kein signifikanter ($p = 0,161$) Unterschied festgestellt werden. Kollagen Typ 1 führte ebenfalls zu einem kontinuierlichen Anstieg der Zellviabilität an allen Messtagen. Der Anstieg war allerdings nur an Messtag 1 ($p = 0,008$) und Messtag 3 ($p = 0,050$) statistisch signifikant, danach führte der Anstieg der Zellviabilität zu keinem signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Messtagen. Beim Vergleich zwischen StemPro und Kollagen ist auffallend, dass an den Messtagen 0, 1 und 3 kein statistisch signifikanter Unterschied ($p_0 = 1,000$ / $p_1 = 0,931$ / $p_3 = 1,000$) bestand. Danach kam es zu einem steilen Anstieg der Zellviabilität bei StemPro während dieser bei Kollagen deutlich moderater ausfiel. Zwischen den Messtagen 5, 7 und 10 bestand dabei ein deutlicher ($p_5 = 0,000$ / $p_7 = 0,000$ / $p_{10} = 0,000$) Unterschied.

Bei FBS 1% und FBS 10% kam es zwischen Messtag 0 und Messtag 7 zu einem kontinuierlichen Anstieg der Zellviabilität. An Messtag 10 kam es bei beiden Gruppen zu einem Absinken der Zellviabilität, allerdings ohne statistische Signifikanz im Vergleich zu Messtag 7. An den Messtagen 0 und 1 fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen 1% und 10%, danach stieg die Viabilität bei FBS 10% deutlich

steiler an und so fand sich an allen anderen Messtagen ein signifikanter ($p_3 = 0,003$ / $p_5 = 0,000$ / $p_7 = 0,000$ / $p_{10} = 0,000$) Unterschied.

5.5 Mineralisationsnachweis durch Alizarinfärbung

Von den insgesamt drei Zellkulturen, die jeweils mit elf verschiedenen Nährlösungen kultiviert wurden, wird hier von jeder Nährlösung eine repräsentative Darstellung nach Alizarinfärbung gezeigt. Die mit DMP-Medium kultivierten Zellen zeigten nach 14 Tagen deutliche Anzeichen von Mineralisation, die Kontrollgruppen nicht. Die Mineralisation äußerte sich sowohl in Form kleiner Knötchen, als auch in Gestalt größerer Felder um die Zellen herum.

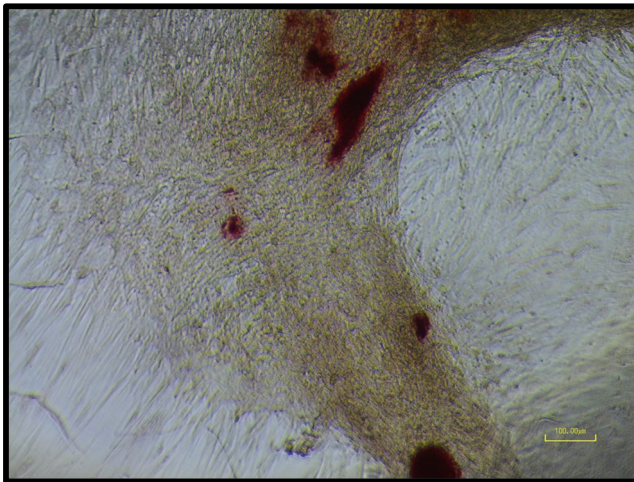


Abbildung 9: DMP 100 pg/ml

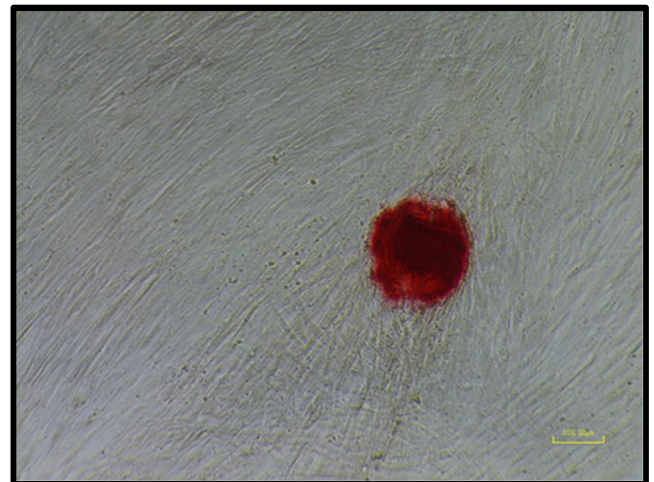


Abbildung 10: DMP 200 pg/ml

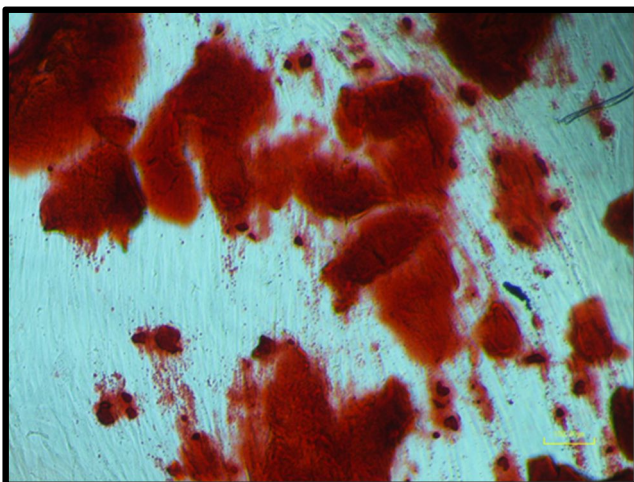


Abbildung 11: DMP 500 pg/ml

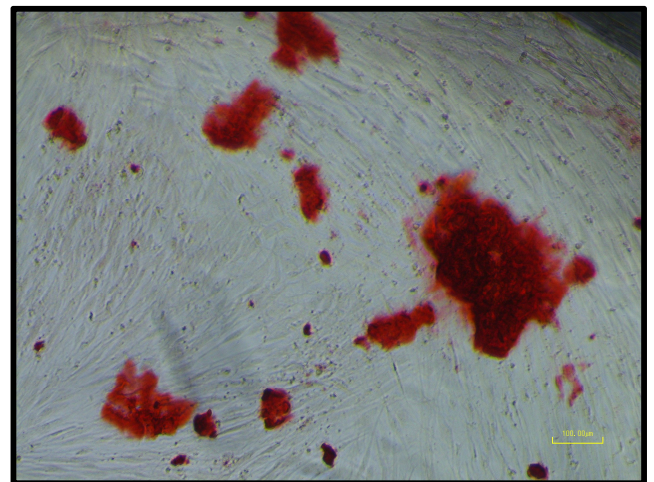


Abbildung 12: DMP 1000 pg/ml

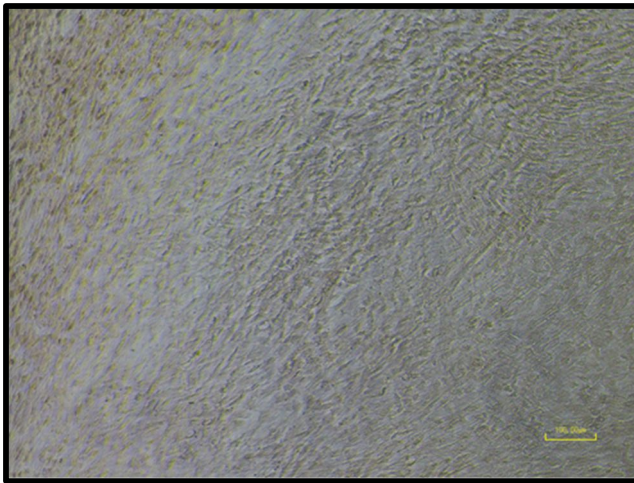


Abbildung 13: FBS 1%

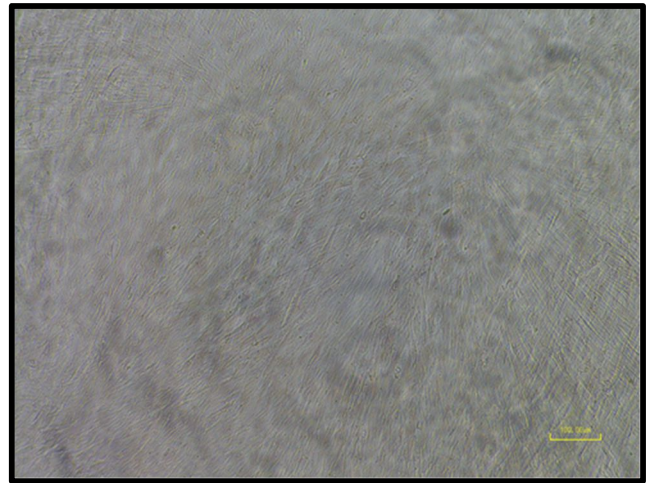


Abbildung 14: FBS 10%

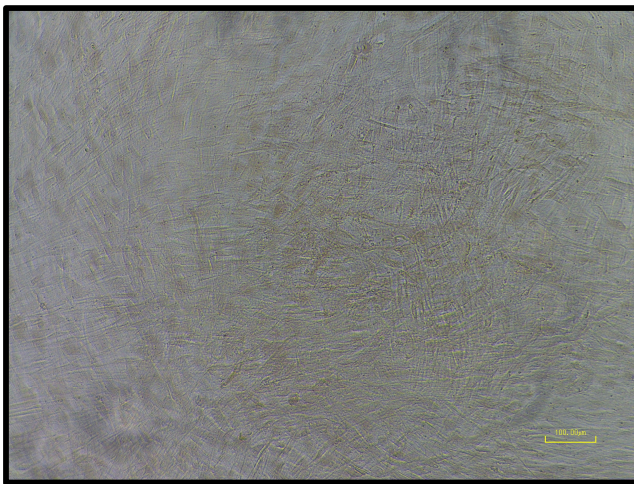


Abbildung 15: StemPro®

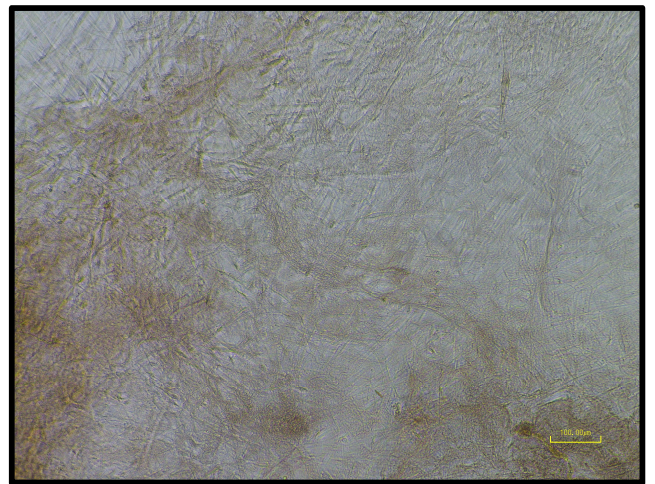


Abbildung 16: Kollagen Typ 1

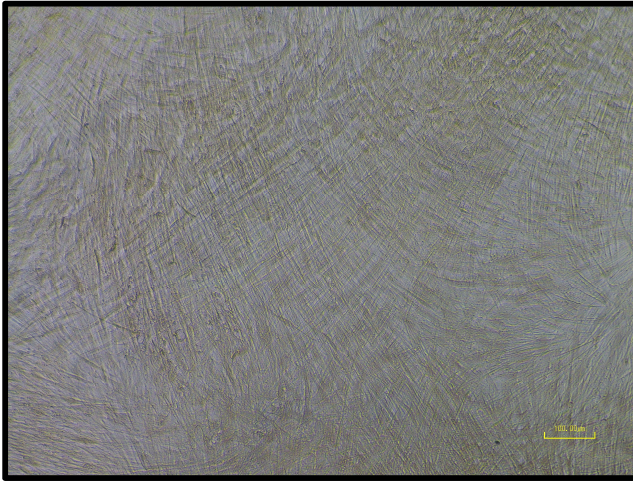


Abbildung 17: TGF- β 1 1000 pg/ml

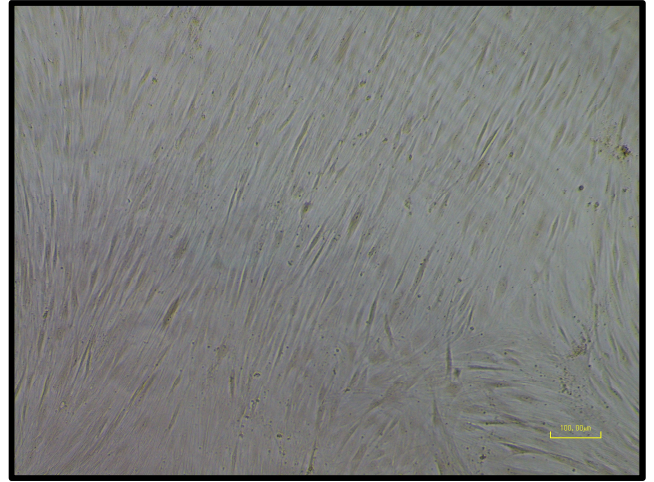


Abbildung 18: TGF- β 1 2500 pg/ml

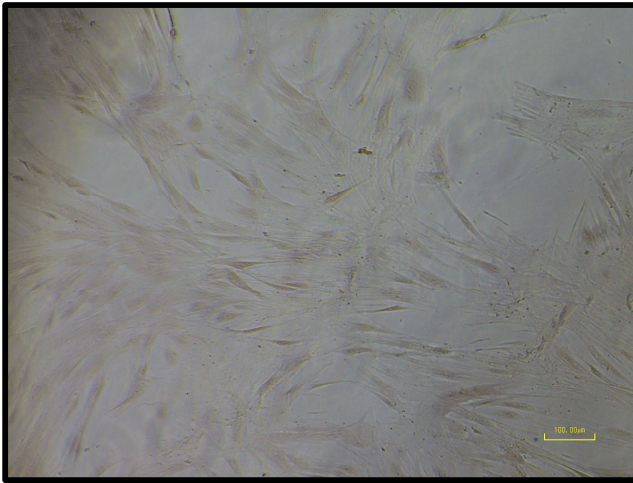


Abbildung 19: TGF- β 1 5000 pg/ml

Abbildung 9-19: Die gelbe Maßstabsleiste entspricht auf allen Bildern 100 μ m.

6. Diskussion

6.1 Verwendung von Ultraschall zur Freisetzung von Dentinmatrixproteinen

Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass eine 10% EDTA-Lösung bei einem pH-Wert von 7 die besten Ergebnisse im Hinblick auf die Menge an isolierten Wachstumsfaktoren aus Dentin liefert (176). Ziel der hier vorliegenden *in-vitro* Studie war es, zu klären, welcher Zusammenhang zwischen verschiedenen Einwirkzeiten von EDTA und der freigesetzten Menge an TGF- β 1 besteht. Des Weiteren sollte der Einfluss einer Ultraschallaktivierung dieser Spüllösung auf die Menge an freigesetztem TGF- β 1 evaluiert werden. Abschließend sollte geklärt werden, ob die Isolierung von TGF- β 1 auch in einer physiologischen Pufferlösung (PBS) möglich ist.

Bei der Konzeption der einzelnen Spülprotokolle war ein im Klinikalltag praktikabler Zeitansatz wichtig, der eine Integration der Spülprotokolle in eine reale Behandlungssituation zulässt und damit eine Verwendung im Rahmen verschiedener regenerativer endodontischer Behandlungsverfahren ermöglicht. Im Hinblick auf die Anwendung von Ultraschall sollte eine Gesamtaktivierungszeit von 10 min nicht überschritten werden um die Hitzeentwicklung möglichst zu limitieren und eine Degradation der Wachstumsfaktoren zu verhindern. Auf jegliche Vorbehandlung der Dentinscheiben mit anderen in der Endodontie gebräuchlichen Spüllösungen oder Medikamenten wurde bewusst verzichtet, um die Wachstumsfaktorfreisetzung nicht anderweitig zu beeinflussen. Üblicherweise wird während der ersten Sitzung einer Revitalisierungsbehandlung mit NaOCl desinfiziert, wie in den Protokollen der ESE und AAE empfohlen. Aus einer jüngeren Studie ist bekannt, dass diese Spülung mit NaOCl die nachfolgende Freisetzung von TGF- β 1 in EDTA nur leicht negativ beeinflusst und die negativen Effekte von NaOCl im Bezug auf das Überleben der Vorläuferzellen durch nachfolgendes Spülen mit EDTA überwiegend kompensiert werden können. Darüber hinaus wird zwischen der ersten und zweiten Sitzung der regenerativen Behandlung eine Einlage mit Kalziumhydroxid empfohlen, welches die Freisetzung von TGF- β 1 aus Dentin noch zusätzlich erhöhen kann (59) und dazu SCAPs zur Proliferation auf humanem Dentin anregt (59, 176–178).

Die Ergebnisse an Dentinscheiben zeigten eine deutliche interindividuelle Diskrepanz hinsichtlich der freigesetzten Menge von Wachstumsfaktoren. Erklärungsansätze

hierfür sind das unterschiedliche Alter sowie die unterschiedliche Lokalisation der Dentinscheiben innerhalb eines Zahns. Aufgrund der lebenslangen Sekundärdentinbildung und den damit verbundenen Kalzifizierungsvorgängen scheint das Alter des Spenders eine Rolle zu spielen. Darüberhinaus nimmt die Anzahl und der Durchmesser der Dentinkanälchen von der Schmelz-Dentin Grenze bis hin zur Pulpa zu. Je nach ursprünglicher Lage der Dentinscheibe ergab sich also ein verändertes Oberflächenvolumen welches von EDTA angegriffen werden konnte (12, 59, 179, 180). Hingegen ergeben sich bei Betrachtung der kumulierten Menge an TGF- β 1 über die drei Zyklen am selben Zahn ähnliche Ergebnisse. Dies scheint darauf zu beruhen, dass bei gleicher Einwirkdauer von EDTA in den einzelnen Durchgängen das Dentin weiter demineralisiert wurde, was eine erneute Freisetzung von TGF- β 1 ermöglichte.

Die gewonnenen Ergebnisse konnten die anfänglich erstellten Hypothesen bestätigen. Durch Spülung mit EDTA wurden zeitabhängig größere Mengen an TGF- β 1 freigesetzt. Mittels Ultraschallaktivierung ließ sich dieser Effekt noch einmal verstärken. Die alleinige Spülung mit PBS, ob mit oder ohne Ultraschall, vermag keine Wachstumsfaktorfreisetzung aus Dentinscheiben zu bewirken. Wenn jedoch vorher mit EDTA gespült wurde, konnte anschließend TGF- β 1 in PBS isoliert werden. Auch dieser Effekt ließ sich durch Ultraschallaktivierung verstärken. Anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen ließ sich darstellen, dass durch Ultraschallaktivierung Partikel aus dem Dentin herausgelöst wurden. Dass dennoch kein TGF- β 1 bei alleiniger Aktivierung von PBS ohne EDTA in der PBS-Lösung nachweisbar war, legt die Vermutung nahe, dass die Wachstumsfaktoren noch in den losgelösten Dentinpartikeln gebunden waren und deshalb durch den ELISA nicht nachgewiesen werden konnten (59). EDTA konditionierte also das Dentin durch Entfernung der Schmierschicht und durch Dekalzifizierung, wodurch die Wachstumsfaktoren in PBS in Lösung gehen konnten. Dadurch war es sogar möglich, ähnliche Mengen an TGF- β 1 in PBS zu isolieren wie bei alleiniger Spülung mit EDTA. Bei fehlender Ultraschallaktivierung machte die vorherige Einwirkdauer von EDTA in Bezug auf die freigesetzte Menge an TGF- β 1 in PBS keinen Unterschied. Dies könnte ein Hinweis auf eine limitierte Penetrationstiefe des PBS sein. Durch Ultraschallaktivierung konnte die Freisetzung in PBS jedoch deutlich gesteigert werden, was auf eine erhöhte Penetrationstiefe des PBS und auf Effekte

des Ultraschalls wie Kavitation und Mikrozirkulation zurückgeführt werden kann. Dies führte zu einer effektiveren Freisetzung der durch EDTA an der Dentinoberfläche freigelegten Wachstumsfaktoren. Bei Betrachtung der einzelnen Durchgänge ist auffällig, dass es in fast jeder Gruppe einen signifikanten Anstieg der TGF- β 1 Freisetzung vom ersten auf den zweiten Zyklus gab. Dies ist wahrscheinlich auf eine Veränderung der Mikrostruktur des Dentins durch Einwirkung des EDTA im ersten Zyklus zurückzuführen. Durch Freilegung der Dentinkanälchen und Reinigung der Oberfläche im ersten Schritt schien es im zweiten Zyklus zu einer effektiveren Freisetzung von Wachstumsfaktoren zu kommen. Aufgrund ähnlicher Beobachtungen mit und ohne Ultraschallaktivierung schienen die Veränderungen der Oberflächenstruktur, die durch den Ultraschall hervorgerufen wurden, vernachlässigbar zu sein (59).

6.2 Freisetzung und Aufbewahrung von Dentinmatrixproteinen unter klinischen Bedingungen

Um möglichst kliniknahe Ergebnisse zu erhalten, wurde nach den Versuchen an Dentinscheiben ein Wurzelkanalmodell entwickelt, um drei repräsentative Spülprotokolle noch einmal zu untersuchen. Durch entsprechende Aufbereitung der Kanäle wurde eine vollständige Penetration der Spüllösung in alle Kanalabschnitte gewährleistet (181). Durch manuelle oder Ultraschall-unterstützte Instrumentierung wurde dem Phänomen des *vapor lock* vorgebeugt. Als *vapor lock* wird in der Literatur die Bildung einer Gasblase im Kanal bezeichnet. Diese Gasblase verhindert eine suffiziente Spülung des apikalen Kanalbereichs, da sich hier zwei Kompartimente, also Luft und Flüssigkeit, gegenüberstehen. Der Entstehung einer Gasblase kann durch Kanalerweiterung, Einbringen der Spülnadel möglichst nahe an die Arbeitslänge oder Erhöhung der Fließrate der Spülflüssigkeit vorgebeugt werden (140). Bei der Entwicklung des Wurzelkanalmodells war deshalb auch ein geschlossener Apex wichtig, der einer realen Behandlungssituation nahekommt. Es wurde nachgewiesen, dass sich unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf das Verhalten von Spülflüssigkeiten zeigen, je nachdem ob in Studien Versuche an Kanälen mit geschlossenem oder offenem Apex durchgeführt wurden (182). Ein Studiendesign, bei dem Versuche an Kanälen mit offenem Apex durchgeführt wurden, bei dem die Spülflüssigkeit beliebig nach apikal austreten kann, entspricht

keiner realen Behandlungssituation und kann daher nicht mit den hier vorliegenden *in-vitro* Untersuchungen verglichen werden (183).

Die Ergebnisse am Wurzelkanalmodell bestätigen die Beobachtungen an Dentinscheiben. Sowohl bei ultraschallaktivierter Spülung mit EDTA, als auch bei aktivierter Spülung mit PBS nach Konditionierung mit EDTA konnte TGF- β 1 nachgewiesen werden. Am Wurzelkanalmodell konnte im Gegensatz zu den Dentinscheiben jedoch auch TGF- β 1 nachgewiesen werden, wenn lediglich mit PBS unter Ultraschallaktivierung gespült wurde. Darüberhinaus konnte am Wurzelkanalmodell mehr TGF- β 1 isoliert werden als mittels Dentinscheiben. Dies ist insofern interessant, als dass die Dentinscheiben eine Oberfläche von 60 mm² besitzen, die auf ProTaper X5 (ISO 50, Konizität 0.6) aufbereiteten Wurzelkanäle allerdings nur eine Kontaktfläche von 10 mm² haben. Wenn man bedenkt, dass nur Wurzelkanäle verwendet wurden, ohne Zugangskavität, kann man davon ausgehen, dass sich während einer realen Behandlungssituation noch mehr Wachstumsfaktoren isolieren lassen. Als Ursache für die erhöhte Freisetzung von TGF- β 1 in den Wurzelkanälen kann die veränderte Wirkung des Ultraschalls vermutet werden. Kavitation und akustische Mikroströmung können im geschlossenen Kanal viel effektiver wirken als auf der Dentinscheibe. Während die Dentinscheibe nur mit der Spitze des Ultraschallansatzes berührt wurde, konnten im Wurzelkanal die Eigenschaften des Ultraschalls über die gesamte Länge des Instruments wirken (59, 184–186).

Die ansteigenden Konzentrationen an TGF- β 1 über drei Zyklen, die sich bei den Dentinscheiben beobachten ließen, konnten am Wurzelkanalmodell in diesem Maße nicht beobachtet werden. Ein Erklärungsansatz hierfür könnte die geringere Zahl an Dentinkanälchen im Wurzeldentin sein. Dadurch konnte wahrscheinlich, im Gegensatz zu den aus Kronendentin stammenden Dentinscheiben, keine signifikante Steigerung der Kontaktfläche durch Einwirkung von EDTA erzielt werden. Die Kontinuität, mit der TGF- β 1 über drei Zyklen freigesetzt wurde, zeigt, dass die Spülung mit EDTA zur Freilegung von Wachstumsfaktoren auf der Dentineoberfläche führt und zusätzlich die kontinuierliche und wiederholte Freisetzung der bioaktiven Moleküle aus dem Dentin ermöglicht (59).

6.3 Wirkung von Dentinmatrixproteinen auf humane Pulpazellen

Für die Durchführung dieser Untersuchungen wurden primäre humane Pulpazellen von unterschiedlichen Spendern verwendet. Dadurch können die Ergebnisse als allgemeingültig für humane Pulpazellen und nicht als spenderspezifische Eigenschaften betrachtet werden. Die Auswahl der Konzentrationen des DMP-Mediums erfolgte aufgrund der Untersuchungen an Dentinscheiben und Wurzelkanälen. Es sollte sichergestellt werden, dass die eingesetzten Mengen an TGF- β 1 zwischen 100 und 1000 pg/ml den Konzentrationen entsprechen, wie sie auch in einer realen Behandlungssituation am Patienten isoliert werden können.

Die Höhe des detektierten Signals, also die optische Dichte, ist beim MTT-Test von mehreren Faktoren abhängig: Konzentration an MTT, Inkubationszeit, Gesamtzahl der lebenden Zellen, sowie deren metabolische Aktivität (187). Da jedes Well für die gleiche Zeit mit derselben Konzentration an MTT inkubiert wurde, unterschieden sich die gemessenen Signale lediglich durch die Zellviabilität, also die Gesamtaktivität der lebenden Zellen in der Zellpopulation.

Bei Betrachtung der mit DMP kultivierten Zellen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellviabilität nach einem initialen Anstieg an Messtag 1. Lediglich die Versuchsgruppe mit 100 pg/ml zeigte einen kontinuierlichen Anstieg der Zellviabilität. Der insbesondere ab 500 pg/ml zu beobachtende antiproliferative Effekt von DMP deckte sich auch mit den Ergebnissen der Alizarinfärbung. Vor allem die Zellen unter Kultivierung mit 500 und 1000 pg/ml zeigten die größten Mineralisierungserscheinungen. Es kam also nach einer initialen Proliferation bis Messtag 1 augenscheinlich anschließend zu einer Differenzierung. Dadurch erhöhte sich die Zellzahl nicht mehr und auch die Zellviabilität, die ja im Wesentlichen von der Zellzahl abhängig ist, wie in anderen Studien gezeigt wurde (188), zeigte keine erhöhten Werte mehr. Konzentrationen von 500-1000 pg/ml an Dentinmatrixproteinen scheinen also gute Voraussetzungen zu liefern, um humane Pulpazellen zu differenzieren. Die hier vorliegenden Effekte von Wachstumsfaktoren auf Pulpazellen konnten auch in anderen Studien bestätigt werden. Diese bedienten sich jedoch entweder nur rekombinanter Wachstumsfaktoren (94, 95) oder die eingesetzten Konzentrationen an Wachstumsfaktoren waren willkürlich gewählt (46, 188, 189). Diese Studie zeigte erstmals auf, dass aus humanem Dentin gewonnene Wachstumsfaktoren in einer Konzentration, wie sie in einer realen

Behandlungssituation isoliert werden können, in der Lage sind, humane Pulpazellen zur Differenzierung und Mineralisierung zu stimulieren.

Die mit rekombinantem TGF- β 1 kultivierten Zellen zeigten kaum Unterschiede zwischen den drei eingesetzten Konzentrationen. Auch zeigte sich hier kein antiproliferativer Effekt wie bei den DMP-Medien. Lediglich am letzten Messtag kam es zu einem leichten Absinken der Zellviabilität in allen drei Gruppen. Obwohl also TGF- β 1 der mengenmäßig bedeutendste Wachstumsfaktor innerhalb der Dentinmatrixproteine ist, zeigte sich ein unterschiedliches Verhalten zwischen DMP-Medium und rekombinantem TGF- β 1. TGF- β 1 besitzt eine antiproliferative und apoptotische Wirkung (109, 190), jedoch kann dies alleine keine Erklärung für die antiproliferative Wirkung des DMP-Mediums sein, da diese Erscheinung bei rekombinantem TGF- β 1 nicht auftrat. Es ist also anzunehmen, dass die zahlreichen anderen Wachstumsfaktoren und bioaktiven Moleküle der Dentinmatrix im DMP-Medium möglicherweise ebenfalls über die TGF- β SMAD-Proteine 2/3 bzw. die BMP SMAD-Proteine 1/5/8 und andere Signalwege wirken und dadurch der antiproliferative Effekt erklärt werden kann (188, 191). Auch zeigten die mit rekombinantem TGF- β 1 kultivierten Zellen keine Mineralisationszeichen, die Zellviabilität blieb außerdem hinter den mit FBS 1%, 10% und den mit Kollagen kultivierten Kontrollgruppen zurück.

Es gilt anzumerken, dass das DMP-Medium mit FBS 1% versetzt war. Der Einfluss der Wachstumsfaktoren aus dem Kälberserum kann aber offensichtlich vernachlässigt werden. Bei den einzelnen Testgruppen mit 1% und 10% FBS kam es zu keinen Mineralisierungserscheinungen. Kollagen als größter Bestandteil der organischen Dentinmatrix war auch im DMP-Medium enthalten. Die Differenzierung der Pulpazellen scheint es nicht initiieren zu können, da bei den ausschließlich mit Kollagen kultivierten Zellen der Kontrollgruppe keine Mineralisierung zu beobachten war. StemPro[®] ist ein standardisiertes Medium zur osteogenen Differenzierung von Stammzellen und sollte eingesetzt werden, um den Unterschied zwischen osteogener und dentinogener Differenzierung betrachten zu können. Als Erklärung für die fehlende und eigentlich zu erwartende Mineralisierung bei den mit StemPro[®] behandelten Zellen kann die Versuchsdauer von 14 Tagen gesehen werden. Der Hersteller gibt eine Differenzierungsdauer von mind. 21 Tagen bei Kultivierung mit StemPro[®] vor (175). Dass keine der Kontrollgruppen eine Differenzierung initiieren

konnte, legt nahe, dass speziell die bioaktiven Moleküle der Dentinmatrix eine Differenzierung der humanen Pulpazellen bewirken.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen daher den Schluss zu, dass ein Medium aus humanem Dentin, welches neben einer großen Menge an TGF- β 1 noch unzählige andere Wachstumsfaktoren und bioaktiven Moleküle enthält, besser zur Differenzierung von Pulpazellen geeignet ist als rekombinante Wachstumsfaktoren oder andere Nährmedien und sich der Aufwand einer während der Behandlung am Zahnarztstuhl durchgeführten Isolierung dieser Dentinmatrixproteine für ihren Einsatz beim Tissue Engineering der dentalen Pulpa lohnen könnte. So kann möglicherweise besser beeinflusst werden, dass sich kein ektopisches, sondern Pulpa-ähnliches Gewebe mit Odontoblasten-ähnlichen Zellen bildet, die Fortsätze in die Dentinkanälchen entsenden, womit man einer „*restitutio ad integrum*“ nahekommen würde.

6.4 Verwendung autologer Wachstumsfaktoren im Rahmen der regenerativen Endodontie

TGF- β 1 wurde als repräsentativer Wachstumsfaktor ausgewählt, da dieser eine Schlüsselrolle in der regenerativen Endodontie spielt und auch, wie bereits jüngere Studien zeigten, mengenmäßig am häufigsten im Dentin vorkommt (26, 176, 192). EDTA als Spüllösung wird nicht nur im Rahmen der klassischen endodontischen Behandlung verwendet, um die Schmierschicht und Debris zu entfernen, sondern auch von den Organisationen AAE (4) und ESE (3) in ihren Behandlungsprotokollen zur Revitalisierung empfohlen. Die Spülung mit EDTA führt dabei neben der Reinigung auch zur Freilegung von TGF- β 1 an der Dentinoberfläche. Daher wird es als finale Spülung bei regenerativen endodontischen Behandlungen empfohlen, da es eine optimale Oberflächenbeschaffenheit durch Freilegung der organischen Matrix sowie die Bereitstellung von Wachstumsfaktoren garantiert. Die freigelegten Wachstumsfaktoren fördern dabei unter anderem die Migration und Differenzierung von Stammzellen sowie die Angiogenese (52, 167). Die freigelegte organische Matrix kann die Adhäsion von Zellen fördern und deren Überlebensfähigkeit durch Schaffung einer physiologischen Umgebung steigern (193–196). Problematisch an der Spülung mit EDTA ist dessen zytotoxische Wirkung und die Gefahr einer

Gewebeschädigung (197–199). Daher ist es nicht vermeidbar, die im EDTA gelösten Wachstumsfaktoren während einer Revitalisierungstherapie zusammen mit dem EDTA zu verwerfen. Durch die vorliegenden *in-vitro* Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass es unter klinischen Bedingungen möglich ist, die Wachstumsfaktoren auch in einer physiologischen Lösung zu isolieren und diese so im Rahmen von regenerativen endodontischen Verfahren nutzbar gemacht werden könnten. Insbesondere deren Einsatz beim Tissue Engineering verspricht verbesserte Resultate, da sich mit Hilfe der Wachstumsfaktoren und einem geeigneten Trägermaterial möglicherweise viel besser beeinflussen lässt, welche Art von Gewebe sich im Wurzelkanal bildet. Die Wachstumsfaktoren könnten dabei die Migration von Stammzellen des Periapex ins Innere des Wurzelkanals und dann entlang eines Gradienten an Wachstumsfaktoren zu den Kanälchen des Wurzelzementins initiieren. Dort könnten die Vorläuferzellen zu Odontoblasten-ähnlichen Zellen ausdifferenzieren und Pulpa-ähnliches Gewebe bilden (74, 167, 192).

Dass dieses Verfahren grundsätzlich funktioniert, konnte eine Studie von Galler et al. (200) eindrucksvoll nachweisen. Verschiedene Trägermaterialien wurden in Dentinzylinder eingebracht und für zwei Wochen subkutan in immunkompromittierte Mäuse implantiert. Es konnte durch histologische Aufbereitung der Zylinder gezeigt werden, dass in den Kanälen ein pulpaähnliches Gewebe entstanden war, in welchem eine Zellschicht der Dentinoberfläche auflag, die Fortsätze in die einzelnen Dentinkanäle entsendete. Natürliche Materialien, insbesondere Fibrin, scheinen dabei den synthetischen Materialien in Bezug auf Zellviabilität und ihrer Fähigkeit, die Bildung von Dentin-ähnlichem Gewebe zu stimulieren, überlegen zu sein (200). Dabei ist die Suche nach dem optimalen Trägermaterial in der Endodontie Gegenstand aktueller Forschung. Autologe Faktoren könnten auch in sog. „*slow-release drug delivery systems*“ zum Einsatz kommen, also synthetische Polymere als Teil des Trägermaterials, welche die kontinuierliche Freisetzung der Wachstumsfaktoren durch Degradation des Polymers steuern. Eine andere Möglichkeit besteht in der Kombination aus autologen Wachstumsfaktoren und Glukokortikoiden. Die Kortikoide wirken zwar alleine hemmend auf das Wachstum von mesenchymalen Stammzellen, allerdings führt die Kombination mit Wachstumsfaktoren zu einer signifikanten Steigerung von Wachstum und

Differenzierung der Stammzellen (201). Es ist außerdem möglich, sich den gleichen Mechanismus zunutze zu machen durch den die Wachstumsfaktoren im Dentin gebunden werden. *Scaffolds* könnten so mit Glykosaminoglykanen bestückt werden, um Heparin-bindende Wachstumsfaktoren wie TGF- β 1 aufzunehmen, sie vor proteolytischer Degradation zu schützen und dadurch ein Depot an Wachstumsfaktoren bereitzustellen, welche dann kontinuierlich abgegeben werden. Diese Methode ist insofern interessant, als dass zur Durchführung in PBS gelöste Wachstumsfaktoren benötigt werden. In diesen wird bei Raumtemperatur ein Trägermaterial mit Glykosaminoglykanen inkubiert (201–204). Die hier vorliegende Studie zeigt, dass es möglich ist, genau solch eine Lösung in einer klinischen Behandlungssituation zu isolieren. Somit wäre in Kombination mit einem entsprechenden *scaffold* eine derartige Anwendung am Patienten denkbar.

In der regenerativen Endodontie stellen sich jedoch noch viele offene Fragen im Hinblick auf die bioaktiven Proteine des Dentins, Trägermaterialien sowie auf die Rolle verschiedener Vorläufer- und Stammzellen in und um den Zahn. Zukünftige Studien müssen sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* die verschiedenen Zusammenhänge und Gesetzmäßigkeit verdeutlichen, bevor diese Methoden erfolgreich am Menschen eingesetzt werden können. Autologe Wachstumsfaktoren stellen dabei jedoch eine einfache, kostengünstige und von rechtlichen Stolperfallen freie Möglichkeit dar, *pulpa-tissue engineering* zu optimieren und so dem Ziel einer wirklichen „*restitutio ad integrum*“ näher zu kommen. Auch die Anwendung von Ultraschall zur Steigerung der freigesetzten Menge an Wachstumsfaktoren ist eine einfache, in den Klinikalltag leicht zu integrierende Maßnahme, da die Ultraschallaktivierung von Spüllösungen schon jetzt Teil der konventionellen endodontischen Behandlung ist, also derartige Geräte und Ansätze bereits routinemäßig am Patienten zum Einsatz kommen.

7. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Freisetzung des Wachstumsfaktors TGF- β 1 aus humanem Dentin sowie mit der Wirkung von Dentinmatrixproteinen auf humane Pulpazellen.

Untersuchungen an Dentinscheiben und einem kliniknahen Wurzelkanalmodell sollten zeigen, ob eine Ultraschallaktivierung der Spüllösungen (EDTA, PBS) die freigesetzte Menge des repräsentativ ausgewählten Wachstumsfaktors TGF- β 1 zu erhöhen vermag und ob es möglich ist, diesen auch in einer physiologischen Pufferlösung zu isolieren. Zur Evaluierung der Ergebnisse wurden *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) durchgeführt. In einem zweiten Schritt erfolgte die Kultivierung von humanen Pulpazellen mit verschiedenen Konzentrationen eines Mediums aus EDTA-löslichen Proteinen der Dentinmatrix, sowie anderen Nähr- und Differenzierungsmedien als Kontrollgruppen. Die Analyse von Zellviabilität und Mineralisationsverhalten der Pulpazellen erfolgte mittels MTT-Assay und Alizarinfärbung. Dabei flossen die im ersten Abschnitt gewonnenen Erkenntnisse zur Menge an freigesetztem TGF- β 1 in das Studiendesign des zweiten Teils ein, um ein möglichst realitätsnahes Verhalten der Pulpazellen zu gewährleisten.

Es konnte gezeigt werden, dass TGF- β 1 nicht nur in zytotoxischem EDTA, sondern auch in einer physiologischen Pufferlösung isoliert werden kann. Dies wurde auch erfolgreich an einem kliniknahen Modell durchgeführt, welches in Aufbau und Zeitansatz einer realen Behandlungssituation nachempfunden war. Die Ultraschallaktivierung konnte dabei in allen Fällen die freigesetzte Menge an Wachstumsfaktoren erhöhen. Humane Pulpazellen wurden durch die Dentinmatrixproteine zur Differenzierung angeregt und zeigten deutliche Mineralisationserscheinungen nach Alizarinfärbung. Dagegen vermochte keines der Kontrollmedien eine Mineralisation zu induzieren, auch nicht rekombinantes TGF- β 1, das in deutlich höheren Konzentrationen als im Dentinmatrixmedium eingesetzt wurde.

Diese *in-vitro* Ergebnisse unterstützen nicht nur die Empfehlungen der Fachgesellschaften ADA und ESE zur Anwendung von EDTA im Rahmen einer Revitalisierungsbehandlung, sie zeigen auch, dass es möglich ist, Wachstumsfaktoren nicht nur im Wurzelkanal freizulegen, sondern diese auch in

einer physiologischen Lösung aus jenem zu isolieren. Durch Ultraschallansätze, wie sie bereits in der konventionellen Endodontie eingesetzt werden, kann die freigesetzte Menge an bioaktiven Molekülen effektiv erhöht werden. Die Wirkung der Dentinproteine auf Pulpazellen lässt vermuten, dass die Zusammensetzung der organischen extrazellulären Matrix des Dentins besser zur Differenzierung von dentalen Stammzellen geeignet ist als rekombinante Moleküle oder andere Differenzierungsmedien.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Isolation der im Dentin vorhandenen Wachstumsfaktoren eine einfache, kostengünstige und klinisch realisierbare Option darstellt, um die Behandlungsstrategien der regenerativen Endodontie möglicherweise zu erweitern und zu verbessern. Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, inwiefern die autologen Wachstumsfaktoren im Rahmen von Revitalisierungsverfahren oder Pulpa Tissue Engineering eingesetzt werden könnten.

8. Literaturverzeichnis

1. KZBV. KZBV Jahrbuch 2016: Statistische Basisdaten zur Vertragszahnärztlichen Versorgung: Kassenzahnärztliche Bundesvereinigung; 2016.
2. Hülsmann M. Endodontie: 20 Tabellen. Stuttgart: Thieme; 2008. (Checklisten der Zahnmedizin).
3. Galler KM, Krastl G, Simon S, van Gorp G, Meschi N, Vahedi B et al. European Society of Endodontology position statement: Revitalization procedures. *Int Endod J* 2016; 49(8):717–23.
4. American Association of Endodontists. Clinical Considerations for Regenerative Procedure 2016 [cited 2017 May 21].
5. Klimm W, Arnold M, editors. Endodontologie: Lehrbuch für Studium und Beruf; mit 46 Tabellen. 2., überarb. Aufl. Köln: Dt. Zahnärzte-Verl.; 2011.
6. Lehmann KM, Hellwig E, Wenz H-J. Zahnärztliche Propädeutik: Einführung in die Zahnheilkunde. 13., aktualisierte Aufl. Köln: Deutscher Zahnärzte-Verl.; 2015.
7. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen. 4., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012.
8. Welsch U. Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie; mit 21 Tabellen. 2., völlig überarb. Aufl., 1. Nachdr. München: Elsevier Urban & Fischer; 2006. (Student consult).
9. Hargreaves KM, Seltzer S, Bender IB, editors. Seltzer and Bender's Dental pulp. Rev. ed. of 3. ed. Chicago: Quintessence Publ. Co; 2002.
10. Tucker A, Sharpe P. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet* 2004; 5(7):499–508.
11. Trowbridge HO. Pulp biology: progress during the past 25 years. *Aust Endod J* 2003; 29(1):5–12.
12. Radlanski RJ. Orale Struktur- und Entwicklungsbiologie. Berlin [u.a.]: Quintessenz-Verl.; 2011.
13. Goldberg M, Farges J-C, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup F et al. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res* 2008; 58(2):137–47.

14. Hoehl Erwin. Beitrag zur Histologie der Pulpa und des Dentins. *Dentin Arch Anat Physiol* 1896; 32:31–54.
15. Butler WT, Brunn JC, Qin C, McKee MD. Extracellular Matrix Proteins and the Dynamics of Dentin Formation. *Connect Tissue Res* 2009; 43(2-3):301–7.
16. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4(5):679–728.
17. Fawcett DW, Bloom W, editors. *A textbook of histology*. 11. ed. Philadelphia: Saunders; 1986.
18. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Höfler G, Kreipe H, Moch H et al., editors. *Pathologie*. 5. Aufl. München: Urban & Fischer in Elsevier; 2012.
19. Morsczeck C, Reichert TE, Vollner F, Gerlach T, Driemel O. Stand der humanen dentalen Stammzellforschung. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2007; 11(5):259–66.
20. Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2009; 114:185–99.
21. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003; 102(10):3483–93.
22. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(1):11–21.
23. Viebahn C, editor. *Embryologie: Entwicklungsstadien - Frühentwicklung - Organogenese - Klinik*. 5. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer; 2007.
24. Huang GT-J, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of Dental Research* 2009; 88(9):792–806.
25. Kanao S, Ogura N, Takahashi K, Ito K, Suemitsu M, Kuyama K et al. Capacity of Human Dental Follicle Cells to Differentiate into Neural Cells In Vitro. *Stem Cells Int* 2017; 2017:8371326.
26. Diogenes A, Henry MA, Teixeira FB, Hargreaves KM. An update on clinical regenerative endodontics. *Endod Topics* 2013; 28(1):2–23.
27. Bansal R, Jain A. Current overview on dental stem cells applications in regenerative dentistry. *J Nat Sci Biol Med* 2015; 6(1):29–34.

28. Morsczeck C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kuhn U, Mohl C et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol* 2005; 24(2):155–65.
29. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(25):13625–30.
30. Koyama N, Okubo Y, Nakao K, Bessho K. Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67(3):501–6.
31. Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res* 2005; 20(8):1394–402.
32. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of Dental Research* 2002; 81(8):531–5.
33. Conde MCM, Chisini LA, Grazioli G, Francia A, Carvalho RVd, Alcazar JCB et al. Does Cryopreservation Affect the Biological Properties of Stem Cells from Dental Tissues? A Systematic Review. *Braz Dent J* 2016; 27(6):633–40.
34. Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng* 2006; 12(10):2813–23.
35. Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone* 2001; 29(6):532–9.
36. d'Aquino R, Rosa A de, Laino G, Caruso F, Guida L, Rullo R et al. Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2009; 312B(5):408–15.
37. Sumita Y, Tsuchiya S, Asahina I, Kagami H, Honda MJ. The location and characteristics of two populations of dental pulp cells affect tooth development. *Eur J Oral Sci* 2009; 117(2):113–21.
38. Franziska L. Ulmer, Andreas Winkel, Philipp Kohorst, Meike Stiesch. Stammzellen-eine Perspektive der Zahnmedizin. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2010; (120):865.

39. Bakkar M, Liu Y, Fang D, Stegen C, Su X, Ramamoorthi M et al. A Simplified and Systematic Method to Isolate, Culture, and Characterize Multiple Types of Human Dental Stem Cells from a Single Tooth. *Methods Mol Biol* 2017; 1553:191–207.
40. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod* 2008; 34(2):166–71.
41. Chrepa V, Pitcher B, Henry MA, Diogenes A. Survival of the Apical Papilla and Its Resident Stem Cells in a Case of Advanced Pulpal Necrosis and Apical Periodontitis. *J Endod* 2017.
42. Prateetongkum E, Klingelhofer C, Morsczech C. The influence of the donor on dental apical papilla stem cell properties. *Tissue Cell* 2015; 47(4):382–8.
43. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo B-M, Zhang C et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One* 2006; 1:e79.
44. Abe S, Yamaguchi S, Amagasa T. Multilineage Cells from Apical Pulp of Human Tooth with Immature Apex. *Oral Science International* 2007; 4(1):45–58.
45. Kim B-C, Jun S-M, Kim SY, Kwon Y-D, Choe SC, Kim E-C et al. Engineering three dimensional micro nerve tissue using postnatal stem cells from human dental apical papilla. *Biotechnol Bioeng* 2017; 114(4):903–14.
46. Chun SY, Lee HJ, Choi YA, Kim KM, Baek SH, Park HS et al. Analysis of the soluble human tooth proteome and its ability to induce dentin/tooth regeneration. *Tissue Eng Part A* 2011; 17(1-2):181–91.
47. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)* 2011; 3:711–35.
48. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Biochemie: Mit 40 Tabellen. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl.* Berlin: Springer; 2001. (Springer-Lehrbuch).
49. Löffler G. *Basiswissen Biochemie: Mit Pathobiochemie; mit 139 Tabellen; [jetzt mit Fällen]. 7., komplett überarb. Aufl.* Heidelberg: Springer; 2008. (Springer-Lehrbuch).
50. Bella J. Collagen structure: new tricks from a very old dog. *Biochem J* 2016; 473(8):1001–25.

51. Butler WT, Ritchie H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol* 1995; 39(1):169–79.
52. Smith AJ, Scheven BA, Takahashi Y, Ferracane JL, Shelton RM, Cooper PR. Dentine as a bioactive extracellular matrix. *Arch Oral Biol* 2012; 57(2):109–21.
53. Goldberg M SAJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 2004 [cited 2017 Jan 19]; 15(1):13–27.
54. MacDougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J, Gu TT. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. Dentin phosphoprotein DNA sequence determination. *J Biol Chem* 1997; 272(2):835–42.
55. Qin C, Brunn JC, Cadena E, Ridall A, Tsujigiwa H, Nagatsuka H et al. The expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone. *Journal of Dental Research* 2002; 81(6):392–4.
56. Butler WT, Ritchie HH, Bronckers AL. Extracellular matrix proteins of dentine. *Ciba Found Symp* 1997; 205:107-15; discussion 115-7.
57. Butler WT. Macromolecules of extracellular matrix: determination of selective structures and their functional significance. *Connect Tissue Res* 2008; 49(6):383–90.
58. Butler WT. Dentin matrix proteins. *Eur J Oral Sci* 1998; 106 Suppl 1:204–10.
59. Widbiller M, Eidt A, Hiller K-A, Buchalla W, Schmalz G, Galler KM. Ultrasonic activation of irrigants increases growth factor release from human dentine. *Clin Oral Investig* 2017; 21(3).
60. Baker SM, Sugars RV, Wendel M, Smith AJ, Waddington RJ, Cooper PR et al. TGF-beta/extracellular matrix interactions in dentin matrix: a role in regulating sequestration and protection of bioactivity. *Calcif Tissue Int* 2009; 85(1):66–74.
61. Finkelman RD, Mohan S, Jennings JC, Taylor AK, Jepsen S, Baylink DJ. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF-beta in human dentin. *J Bone Miner Res* 1990; 5(7):717–23.
62. Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol* 2000; 45(11):1013–6.

63. Zhang R, Cooper PR, Smith G, Nor JE, Smith AJ. Angiogenic activity of dentin matrix components. *J Endod* 2011; 37(1):26–30.
64. Dreyfuss JL, Regatieri CV, Jarrouge TR, Cavalheiro RP, Sampaio LO, Nader HB. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. *An Acad Bras Cienc* 2009; 81(3):409–29.
65. Kreuger J, Spillmann D, Li J-p, Lindahl U. Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity. *J Cell Biol* 2006; 174(3):323–7.
66. Paralkar VM, Vukicevic S, Reddi AH. Transforming growth factor beta type 1 binds to collagen IV of basement membrane matrix: implications for development. *Dev Biol* 1991; 143(2):303–8.
67. Somasundaram R, Ruehl M, Tiling N, Ackermann R, Schmid M, Riecken EO et al. Collagens serve as an extracellular store of bioactive interleukin 2. *J Biol Chem* 2000; 275(49):38170–5.
68. Rahman S, Patel Y, Murray J, Patel KV, Sumathipala R, Sobel M et al. Novel hepatocyte growth factor (HGF) binding domains on fibronectin and vitronectin coordinate a distinct and amplified Met-integrin induced signalling pathway in endothelial cells. *BMC Cell Biol* 2005; 6(1):8.
69. Arai T, Busby W, JR, Clemmons DR. Binding of insulin-like growth factor (IGF) I or II to IGF-binding protein-2 enables it to bind to heparin and extracellular matrix. *Endocrinology* 1996; 137(11):4571–5.
70. Dung SZ, Gregory RL, Li Y, Stookey GK. Effect of lactic acid and proteolytic enzymes on the release of organic matrix components from human root dentin. *Caries Res* 1995; 29(6):483–9.
71. Tomson PL, Grover LM, Lumley PJ, Sloan AJ, Smith AJ, Cooper PR. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *J Dent* 2007; 35(8):636–42.
72. Graham L, Cooper PR, Cassidy N, Nor JE, Sloan AJ, Smith AJ. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. *Biomaterials* 2006; 27(14):2865–73.

73. Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ. Dentin matrix component solubilization by solutions of pH relevant to self-etching dental adhesives. *J Adhes Dent* 2013; 15(5):407–12.
74. Galler KM, Widbiller M, Buchalla W, Eidt A, Hiller K-A, Hoffer PC et al. EDTA conditioning of dentine promotes adhesion, migration and differentiation of dental pulp stem cells. *Int Endod J* 2016; 49(6):581–90.
75. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod* 2006; 32(5):389–98.
76. Munck J de, Mine A, van den Steen PE, van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G et al. Enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces produced by mild self-etch adhesives. *Eur J Oral Sci* 2010; 118(5):494–501.
77. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *Journal of Dental Research* 2004; 83(3):216–21.
78. Tay FR, Pashley DH, Loushine RJ, Weller RN, Monticelli F, Osorio R. Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin. *J Endod* 2006; 32(9):862–8.
79. Silva TA, Lara VS, Silva JS, Oliveira SHP, Butler WT, Cunha FQ. Macrophages and mast cells control the neutrophil migration induced by dentin proteins. *Journal of Dental Research* 2005; 84(1):79–83.
80. Silva TA, Lara VS, Silva JS, Garlet GP, Butler WT, Cunha FQ. Dentin sialoprotein and phosphoprotein induce neutrophil recruitment: a mechanism dependent on IL-1beta, TNF-beta, and CXC chemokines. *Calcif Tissue Int* 2004; 74(6):532–41.
81. Goldberg HA, Warner KJ, Stillman MJ, Hunter GK. Determination of the hydroxyapatite-nucleating region of bone sialoprotein. *Connect Tissue Res* 1996; 35(1-4):385–92.
82. He G, Dahl T, Veis A, George A. Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1. *Nat Mater* 2003; 2(8):552–8.
83. Hunter GK, Goldberg HA. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(18):8562–5.

84. Butler WT, Brunn JC, Qin C. Dentin extracellular matrix (ECM) proteins: comparison to bone ECM and contribution to dynamics of dentinogenesis. *Connect Tissue Res* 2003; 44 Suppl 1:171–8.
85. Suzuki S, Sreenath T, Haruyama N, Honeycutt C, Terse A, Cho A et al. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol* 2009; 28(4):221–9.
86. Fujisawa R, Mizuno M, Tamura M. Effect of dentin phosphoprotein on phosphate-induced apoptosis of odontoblast-like cells. *Cells Tissues Organs* 2009; 189(1-4):60–4.
87. Almushayt A, Narayanan K, Zaki AE, George A. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Ther* 2006; 13(7):611–20.
88. Embery G, Hall R, Waddington R, Septier D, Goldberg M. Proteoglycans in dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001; 12(4):331–49.
89. Goldberg M, Rapoport O, Septier D, Palmier K, Hall R, Embery G et al. Proteoglycans in predentin: the last 15 micrometers before mineralization. *Connect Tissue Res* 2003; 44 Suppl 1:184–8.
90. Kalyva M, Papadimitriou S, Tziafas D. Transdentinal stimulation of tertiary dentine formation and intratubular mineralization by growth factors. *Int Endod J* 2010; 43(5):382–92.
91. Suzuki T, Lee CH, Chen M, Zhao W, Fu SY, Qi JJ et al. Induced Migration of Dental Pulp Stem Cells for in vivo Pulp Regeneration. *Journal of Dental Research* 2011; 90(8):1013–8.
92. Howard C, Murray PE, Namerow KN. Dental pulp stem cell migration. *J Endod* 2010; 36(12):1963–6.
93. Tziafas D, Alvanou A, Panagiotakopoulos N, Smith AJ, Lesot H, Komnenou A et al. Induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after in vivo implantation of dentine matrix components. *Arch Oral Biol* 1995; 40(10):883–93.
94. He H, Yu J, Liu Y, Lu S, Liu H, Shi J et al. Effects of FGF2 and TGFbeta1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Cell Biol Int* 2008; 32(7):827–34.

95. Mullane EM, Dong Z, Sedgley CM, Hu JC-C, Botero TM, Holland GR et al. Effects of VEGF and FGF2 on the revascularization of severed human dental pulps. *Journal of Dental Research* 2008; 87(12):1144–8.
96. Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. *J Endod* 2011; 37(2):133–8.
97. Chrepa V, Henry MA, Daniel BJ, Diogenes A. Delivery of Apical Mesenchymal Stem Cells into Root Canals of Mature Teeth. *Journal of Dental Research* 2015; 94(12):1653–9.
98. Begue-Kirn C, Smith AJ, Ruch JV, Wozney JM, Purchio A, Hartmann D et al. 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* 1992; 36(4):491–503.
99. Liu J, Jin T, Ritchie HH, Smith AJ, Clarkson BH. In vitro differentiation and mineralization of human dental pulp cells induced by dentin extract. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2005; 41(7):232–8.
100. Tabatabaei FS, Torshabi M. Effects of Non-Collagenous Proteins, TGF-beta1, and PDGF-BB on Viability and Proliferation of Dental Pulp Stem Cells. *J Oral Maxillofac Res* 2016; 7(1):e4.
101. Arandjelovic S, Freed TA, Gonias SL. Growth factor-binding sequence in human alpha2-macroglobulin targets the receptor-binding site in transforming growth factor-beta. *Biochemistry* 2003; 42(20):6121–7.
102. El Karim IA, Linden GJ, Irwin CR, Lundy FT. Neuropeptides regulate expression of angiogenic growth factors in human dental pulp fibroblasts. *J Endod* 2009; 35(6):829–33.
103. Nosrat CA, Fried K, Ebendal T, Olson L. NGF, BDNF, NT3, NT4 and GDNF in tooth development. *Eur J Oral Sci* 1998; 106 Suppl 1:94–9.
104. Barnard JA, Lyons RM, Moses HL. The cell biology of transforming growth factor beta. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1032(1):79–87.

105. Horbelt D, Denkis A, Knaus P. A portrait of Transforming Growth Factor beta superfamily signalling: Background matters. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44(3):469–74.
106. Katagiri T, Watabe T. Bone Morphogenetic Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016; 8(6).
107. Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6:597–641.
108. Patil AS, Sable RB, Kothari RM. An update on transforming growth factor-beta (TGF-beta): sources, types, functions and clinical applicability for cartilage/bone healing. *J Cell Physiol* 2011; 226(12):3094–103.
109. Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell* 2008; 134(2):215–30.
110. Miyazono K. Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2009; 85(8):314–23.
111. Itoh F, Watabe T, Miyazono K. Roles of TGF-beta family signals in the fate determination of pluripotent stem cells. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 32:98–106.
112. Palladino MA, Morris RE, Starnes HF, Levinson AD. The transforming growth factor-betas. A new family of immunoregulatory molecules. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 593:181–7.
113. Schuster N, Kriegstein K. Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res* 2002; 307(1):1–14.
114. Rider CC. Heparin/heparan sulphate binding in the TGF-beta cytokine superfamily. *Biochem Soc Trans* 2006; 34(Pt 3):458–60.
115. Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30(3):293–8.
116. Hyytiainen M, Penttinen C, Keski-Oja J. Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2004; 41(3):233–64.

117. Larrain J, Bachiller D, Lu B, Agius E, Piccolo S, Robertis EM de. BMP-binding modules in chordin: a model for signalling regulation in the extracellular space. *Development* 2000; 127(4):821–30.
118. Zhu Y, Oganesian A, Keene DR, Sandell LJ. Type IIA procollagen containing the cysteine-rich amino propeptide is deposited in the extracellular matrix of prechondrogenic tissue and binds to TGF-beta1 and BMP-2. *J Cell Biol* 1999; 144(5):1069–80.
119. Rifkin DB. Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. *J Biol Chem* 2005; 280(9):7409–12.
120. Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK et al. Human transforming growth factor- β complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 1985; 316(6030):701–5.
121. Bottinger EP, Factor VM, Tsang ML, Weatherbee JA, Kopp JB, Qian SW et al. The recombinant proregion of transforming growth factor beta1 (latency-associated peptide) inhibits active transforming growth factor beta1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(12):5877–82.
122. Ali NA, Gaughan AA, Orosz CG, Baran CP, McMaken S, Wang Y et al. Latency associated peptide has in vitro and in vivo immune effects independent of TGF-beta1. *PLoS One* 2008; 3(4):e1914.
123. Zhao S, Sloan AJ, Murray PE, Lumley PJ, Smith AJ. Ultrastructural localisation of TGF-beta exposure in dentine by chemical treatment. *Histochem J* 2000; 32(8):489–94.
124. Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol* 1995; 39(1):273–80.
125. Smith AJ. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *Journal of Dental Education* 2003; 67(6):678–89.
126. Dobie K, Smith G, Sloan AJ, Smith AJ. Effects of alginate hydrogels and TGF-beta 1 on human dental pulp repair in vitro. *Connect Tissue Res* 2002; 43(2-3):387–90.

127. Melin M, Joffre-Romeas A, Farges JC, Couble ML, Magloire H, Bleicher F. Effects of TGFbeta1 on dental pulp cells in cultured human tooth slices. *Journal of Dental Research* 2000; 79(9):1689–96.
128. Goncalves LF, Fernandes AP, Cosme-Silva L, Colombo FA, Martins NS, Oliveira TM et al. Effect of EDTA on TGF-beta1 released from the dentin matrix and its influence on dental pulp stem cell migration. *Braz Oral Res* 2016; 30(1):e131.
129. Unterbrink A, O'Sullivan M, Chen S, MacDougall M. TGFβ-1 Downregulates DMP-1 and DSPP in Odontoblasts. *Connect Tissue Res* 2009; 43(2-3):354–8.
130. Hellwig E, Klimek J, Attin T. Einführung in die Zahnerhaltung: Prüfungswissen Kariologie, Endodontologie und Parodontologie; mit ... 60 Tabellen. 6., überarb. Aufl. Köln: Dt. Zahnärzte-Verl.; 2013.
131. Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ. Can interaction of materials with the dentin-pulp complex contribute to dentin regeneration? *Odontology* 2010; 98(1):2–14.
132. Alley BS, Kitchens GG, Alley LW, Eleazer PD. A comparison of survival of teeth following endodontic treatment performed by general dentists or by specialists. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 98(1):115–8.
133. Dammaschke T, Steven D, Kaup M, Ott KHR. Long-term survival of root-canal-treated teeth: a retrospective study over 10 years. *J Endod* 2003; 29(10):638–43.
134. Kojima K, Inamoto K, Nagamatsu K, Hara A, Nakata K, Morita I et al. Success rate of endodontic treatment of teeth with vital and nonvital pulps. A meta-analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97(1):95–9.
135. Marending M, Peters OA, Zehnder M. Factors affecting the outcome of orthograde root canal therapy in a general dentistry hospital practice. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 99(1):119–24.
136. Walton RE. Principles and practice of endodontics. 2. ed. Philadelphia [u.a.]: Saunders; 1996.
137. Baumann MA, Arnold M, editors. Farbatlant der Zahnmedizin: Endodontologie: 24 Tabellen. 2., überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2008. (Farbatlant der Zahnmedizin [7]).

138. Paque F, Balmer M, Attin T, Peters OA. Preparation of oval-shaped root canals in mandibular molars using nickel-titanium rotary instruments: a micro-computed tomography study. *J Endod* 2010; 36(4):703–7.
139. Frankenberger R, Blunck U. *Adhäsive Zahnheilkunde: Wissenschaft und Praxis; mit 16 Tabellen ; [mit 3D-Brille].* Köln: Dt. Zahnärzte-Verl.; 2013.
140. Basrani B. *Endodontic irrigation: Chemical disinfection of the root canal system.* Cham [u.a.]: Springer; 2015.
141. Thompson JM, Agee K, Sidow SJ, McNally K, Lindsey K, Borke J et al. Inhibition of endogenous dentin matrix metalloproteinases by ethylenediaminetetraacetic acid. *J Endod* 2012; 38(1):62–5.
142. Serper A, Calt S, Dogan AL, Guc D, Ozcelik B, Kuraner T. Comparison of the cytotoxic effects and smear layer removing capacity of oxidative potential water, NaOCl and EDTA. *J Oral Sci* 2001; 43(4):233–8.
143. Koulaouzidou EA, Margelos J, Beltes P, Kortsaris AH. Cytotoxic effects of different concentrations of neutral and alkaline EDTA solutions used as root canal irrigants. *J Endod* 1999; 25(1):21–3.
144. Segura JJ, Calvo JR, Guerrero JM, Sampedro C, Jimenez A, Llamas R. The disodium salt of EDTA inhibits the binding of vasoactive intestinal peptide to macrophage membranes: Endodontic implications. *J Endod* 1996; 22(7):337–40.
145. Segura JJ, Calvo JR, Guerrero JM, Jimenez-Planas A, Sampedro C, Llamas R. EDTA inhibits in vitro substrate adherence capacity of macrophages: Endodontic implications. *J Endod* 1997; 23(4):205–8.
146. van der Sluis LWM, Gambarini G, Wu MK, Wesselink PR. The influence of volume, type of irrigant and flushing method on removing artificially placed dentine debris from the apical root canal during passive ultrasonic irrigation. *Int Endod J* 2006; 39(6):472–6.
147. van der Sluis LWM, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. *Int Endod J* 2007; 40(6):415–26.
148. Castagna F, Rizzon P, da Rosa RA, Santini MF, Barreto MS, Duarte MAH et al. Effect of passive ultrasonic instrumentation as a final irrigation protocol on debris and smear layer removal--a SEM analysis. *Microsc Res Tech* 2013; 76(5):496–502.

149. Steiner JC, van Hassel HJ. Experimental root apexification in primates. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1971; 31(3):409–15.
150. Piekoff MD, Trott. Apexification: report of case. *J Endod* 1976; 2(6):182–5.
151. Simon S, Rilliard F, Berdal A, Machtou P. The use of mineral trioxide aggregate in one-visit apexification treatment: a prospective study. *Int Endod J* 2007; 40(3):186–97.
152. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod* 2010; 36(3):400–13.
153. Bakland LK, Andreasen JO. Will mineral trioxide aggregate replace calcium hydroxide in treating pulpal and periodontal healing complications subsequent to dental trauma? A review. *Dent Traumatol* 2012; 28(1):25–32.
154. Andreasen JO, Munksgaard EC, Bakland LK. Comparison of fracture resistance in root canals of immature sheep teeth after filling with calcium hydroxide or MTA. *Dent Traumatol* 2006; 22(3):154–6.
155. Galler KM. Clinical procedures for revitalization: current knowledge and considerations. *Int Endod J* 2016; 49(10):926–36.
156. Dhillon H, Kaushik M, Sharma R. Regenerative endodontics--Creating new horizons. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2016; 104(4):676–85.
157. Diogenes A, Ruparel NB, Shiloah Y, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: A way forward. *J Am Dent Assoc* 2016; 147(5):372–80.
158. Bezgin T, Sonmez H. Review of current concepts of revascularization/revitalization. *Dent Traumatol* 2015; 31(4):267–73.
159. Wigler R, Kaufman AY, Lin S, Steinbock N, Hazan-Molina H, Torneck CD. Revascularization: a treatment for permanent teeth with necrotic pulp and incomplete root development. *J Endod* 2013; 39(3):319–26.
160. Hargreaves KM, Giesler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *J Endod* 2008; 34(7 Suppl):S51-6.

161. Kontakiotis EG, Filippatos CG, Agrafioti A. Levels of evidence for the outcome of regenerative endodontic therapy. *J Endod* 2014; 40(8):1045–53.
162. Becerra P, Ricucci D, Loghin S, Gibbs JL, Lin LM. Histologic study of a human immature permanent premolar with chronic apical abscess after revascularization/revitalization. *J Endod* 2014; 40(1):133–9.
163. Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB. Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. *J Endod* 2013; 39(3 Suppl):S30-43.
164. da Silva LAB, Nelson-Filho P, da Silva RAB, Flores DSH, Heilborn C, Johnson JD et al. Revascularization and periapical repair after endodontic treatment using apical negative pressure irrigation versus conventional irrigation plus triantibiotic intracanal dressing in dogs' teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109(5):779–87.
165. Meschi N, Hilkens P, Lambrichts I, van den Eynde K, Mavridou A, Strijbos O et al. Regenerative endodontic procedure of an infected immature permanent human tooth: an immunohistological study. *Clin Oral Investig* 2016; 20(4):807–14.
166. Wang X, Thibodeau B, Trope M, Lin LM, Huang GT-J. Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2010; 36(1):56–63.
167. Galler KM, Eidt A, Schmalz G. Cell-free approaches for dental pulp tissue engineering. *J Endod* 2014; 40(4 Suppl):S41-5.
168. Galler KM, Hartgerink JD, Cavender AC, Schmalz G, D'Souza RN. A customized self-assembling peptide hydrogel for dental pulp tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2012; 18(1-2):176–84.
169. Galler KM, D'Souza RN, Hartgerink JD, Schmalz G. Scaffolds for dental pulp tissue engineering. *Adv Dent Res* 2011; 23(3):333–9.
170. Albuquerque MTP, Valera MC, Nakashima M, Nor JE, Bottino MC. Tissue-engineering-based strategies for regenerative endodontics. *Journal of Dental Research* 2014; 93(12):1222–31.
171. Piva E, Silva AF, Nor JE. Functionalized scaffolds to control dental pulp stem cell fate. *J Endod* 2014; 40(4 Suppl):S33-40.

172. R&D Systems® I. Quantikine®ELISA Human TGF-β1 Immunoassay - Datasheet; 2016.
173. Streptavidin from Streptomyces avidinii recombinant, expressed in E. coli, lyophilized powder | Sigma-Aldrich [cited 2017 Feb 7]. Available from: URL: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s0677?lang=de®ion=DE>.
174. Galler KM, Schweikl H, Thonemann B, D'Souza RN, Schmalz G. Human pulp-derived cells immortalized with Simian Virus 40 T-antigen. Eur J Oral Sci 2006; 114(2):138–46.
175. Gibco® by Life Technologies™. StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit - Anleitung und Protokolle.
176. Galler KM, Buchalla W, Hiller K-A, Federlin M, Eidt A, Schiefersteiner M et al. Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin. J Endod 2015; 41(3):363–8.
177. Diogenes AR, Ruparel NB, Teixeira FB, Hargreaves KM. Translational science in disinfection for regenerative endodontics. J Endod 2014; 40(4 Suppl):S52-7.
178. Althumairy RI, Teixeira FB, Diogenes A. Effect of dentin conditioning with intracanal medicaments on survival of stem cells of apical papilla. J Endod 2014; 40(4):521–5.
179. Carrigan PJ, Morse DR, Furst ML, Sinai IH. A scanning electron microscopic evaluation of human dentinal tubules according to age and location. J Endod 1984; 10(8):359–63.
180. Avery JK. Oral development and histology. 3. ed. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2002.
181. Gregorio C de, Arias A, Navarrete N, Del Rio V, Oltra E, Cohenca N. Effect of apical size and taper on volume of irrigant delivered at working length with apical negative pressure at different root curvatures. J Endod 2013; 39(1):119–24.
182. Tay FR, Gu L-S, Schoeffel GJ, Wimmer C, Susin L, Zhang K et al. Effect of vapor lock on root canal debridement by using a side-vented needle for positive-pressure irrigant delivery. J Endod 2010; 36(4):745–50.

183. Zeng Q, Nguyen S, Zhang H, Chebrolu HP, Alzebdeh D, Badi MA et al. Release of Growth Factors into Root Canal by Irrigations in Regenerative Endodontics. *J Endod* 2016; 42(12):1760–6.
184. Mozo S, Llana C, Forner L. Review of ultrasonic irrigation in endodontics: increasing action of irrigating solutions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012; 17(3):e512-6.
185. Lumley PJ, Walmsley AD, Laird WR. Streaming patterns produced around endosonic files. *Int Endod J* 1991; 24(6):290–7.
186. Ahmad M, Pitt Ford TJ, Crum LA. Ultrasonic debridement of root canals: acoustic streaming and its possible role. *J Endod* 1987; 13(10):490–9.
187. Riss TI, Moravec Ra, Niles AI, et al. *Cell Viability Assays*; 2016.
188. Widbiller M, Eidt A, Lindner SR, Hiller K-A, Schweikl H, Buchalla W et al. Dentine matrix proteins: isolation and effects on human pulp cells. *Int Endod J* 2017.
189. Lee CP, Colombo JS, Ayre WN, Sloan AJ, Waddington RJ. Elucidating the cellular actions of demineralised dentine matrix extract on a clonal dental pulp stem cell population in orchestrating dental tissue repair. *J Tissue Eng* 2015; 6:2041731415586318.
190. Massague J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1(3):169–78.
191. Unsicker K. Cell signaling and growth factors in development: From molecules to organogenesis. Weinheim: Wiley-VCH; 2006. (vol 2).
192. Smith AJ, Duncan HF, Diogenes A, Simon S, Cooper PR. Exploiting the Bioactive Properties of the Dentin-Pulp Complex in Regenerative Endodontics. *J Endod* 2016; 42(1):47–56.
193. Heino J, Kapyla J. Cellular receptors of extracellular matrix molecules. *Curr Pharm Des* 2009; 15(12):1309–17.
194. Marschall Z von, Fisher LW. Dentin matrix protein-1 isoforms promote differential cell attachment and migration. *J Biol Chem* 2008; 283(47):32730–40.

195. Song JS, Wlodarska A, Ko HJ, Grzesik WJ. Targeting and immobilization of bioactive peptides on dentin matrix. *Journal of Dental Research* 2007; 86(10):968–73.
196. Verdelis K, Eliades G, Oviir T, Margelos J. Effect of chelating agents on the molecular composition and extent of decalcification at cervical, middle and apical root dentin locations. *Endod Dent Traumatol* 1999; 15(4):164–70.
197. Malheiros CF, Marques MM, Gavini G. In vitro evaluation of the cytotoxic effects of acid solutions used as canal irrigants. *J Endod* 2005; 31(10):746–8.
198. Ballal NV, Kundabala M, Bhat S, Rao N, Rao BSS. A comparative in vitro evaluation of cytotoxic effects of EDTA and maleic acid: root canal irrigants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 108(4):633–8.
199. Sceiza MF, Daniel RL, Santos EM, Jaeger MM. Cytotoxic effects of 10% citric acid and EDTA-T used as root canal irrigants: an in vitro analysis. *J Endod* 2001; 27(12):741–3.
200. Galler KM, Brandl F, Kirchhof S, Widbiller M, Eidt A, Buchalla W et al. Suitability of different natural and synthetic biomaterials for dental pulp tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2017.
201. Khang G. *Handbook of intelligent scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine*. Singapore: Pan Stanford Publ; 2012.
202. Pieper JS, Hafmans T, van Wachem PB, van Luyn MJA, Brouwer LA, Veerkamp JH et al. Loading of collagen-heparan sulfate matrices with bFGF promotes angiogenesis and tissue generation in rats. *J Biomed Mater Res* 2002; 62(2):185–94.
203. Raman R, Sasisekharan V, Sasisekharan R. Structural insights into biological roles of protein-glycosaminoglycan interactions. *Chem Biol* 2005; 12(3):267–77.
204. Tumova S, Woods A, Couchman JR. Heparan sulfate chains from glypican and syndecans bind the Hep II domain of fibronectin similarly despite minor structural differences. *J Biol Chem* 2000; 275(13):9410–7.

9. Danksagung

Bei Prof. Dr. Dr. Thorsten E. Reichert und Prof. Dr. Wolfgang Buchalla möchte ich mich für die Bereitstellung der Labore, der Infrastruktur und der Finanzierung der Verbrauchsmaterialien bedanken, ohne die die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Bei Frau Prof. Dr. Kerstin Galler möchte ich mich ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die tolle Betreuung in allen Phasen der Doktorarbeit sowie für die Übernahme der Gutachtertätigkeit bedanken. Außerdem gilt mein Dank Ihrer Unterstützung bei der Bewerbung um das Forschungsstipendium des Vereins der ehemaligen Zahnmedizinstudenten Regensburg e.V.

Bei Herrn Dr. Matthias Widbiller und Herrn Andreas Eidt möchte ich mich für die großartige Betreuung und Unterstützung sowohl während der Durchführung der Laborarbeiten als auch während der Anfertigung der Dissertation herzlich bedanken. Sie standen mir jederzeit hilfreich zur Seite und ermöglichten mir einen breiten Einblick in die zahnmedizinische Forschung.

Herrn Dr. Karl-Anton Hiller möchte ich für die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse, sowie für die Erstellung und Bearbeitung der Graphen meinen herzlichen Dank aussprechen.

Zuletzt gilt der Dank meiner Familie und meiner Freundin, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit immerzu unterstützt und motiviert haben.

Niklas Bruckner, November 2017

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Niklas Bruckner
Geburtsdatum / -ort: 16.09.1991 / Straubing
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Beruflicher Werdegang

seit 04|2017 Assistenz Zahnarzt in der zahnärztlichen Praxis
Dr. med. dent. Michael Hösl, Mainburg

Hochschulausbildung

2011 – 2016 Studium der Zahnmedizin an der Universität Regensburg
Universitätsstraße 31, 93053 Regensburg
11|2015 Forschungspreis des Vereins der ehemaligen
Zahnmedizinstudenten Regensburg e.V.
11|2016 Staatsexamen und Approbation als Zahnarzt

Schulbildung

1998 – 2002 Grundschule Viechtach
Jahnstraße 35, 94234 Viechtach
2002 – 2011 Dominicus-von-Linprun-Gymnasium
Jahnstraße 34, 94234 Viechtach
05|2011 Allgemeine Hochschulreife