

Diplomarbeit

In vitro Untersuchungen: Reaktion von dentalen Pulpazellen auf einem LAPONITE® - Hydrogel

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Zahnheilkunde

(Dr. med. dent.)

an der

Medizinischen Universität Wien

ausgeführt an der

Universitätszahnklinik Wien

Abteilung für Zahnerhaltung und Parodontologie

Competence Center for Tissue Engineering and Cell-based Therapies

unter der Anleitung von

Assoc.-Prof. Priv.-Doz. DI Hermann Agis, PhD

eingereicht von

Mara Artner

Matrikelnummer: 1007860

Ort, Datum:

Unterschrift:

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei meinem Betreuer Assoc. Prof. PD DI Hermann Agis, PhD und seinem ganzen Research Team des Competence Center for Tissue Engineering and Cell-based Therapies der Universitätszahnklinik Wien, bedanken. Hier möchte ich besonders die unterstützende Betreuung von Manuela Pensch und Klara Janjic, MSc heraus heben. Sie haben mir die Welt der Labor-Arbeit näher gebracht, hatten immer ein offenes Ohr und gestalteten die Zeit der Laborarbeit immer lustig und familiär.

Weiters möchte ich mich herzlichst bei Alwina Schellner und Tracy Osei-Owusu bedanken. Beide haben mich großartig sowohl beim Sortieren der Daten und Bilder sowie bei Formatierungen der Arbeit unterstützt.

Bei Anna Sonja Müller, MD möchte ich mich ebenfalls herzlichst für ihre fachliche und kompetente Unterstützung bedanken. Teile meiner Daten sind in ihrer Publikation („*Synthetic Clay-based Hypoxia Mimetic Hydrogel for Pulp Regeneration: The Impact on Cell Activity and Release Kinetics Based on Dental Pulp-derived Cells In Vitro*“) veröffentlicht worden.

Inhaltsverzeichnis

1	Kurzfassung	5
2	Abstract	6
3	Einleitung	7
3.1	Regenerative Medizin und Tissue Engineering	7
3.1.1	Entwicklung in den regenerativen Verfahren der Zahnmedizin und Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie	7
3.1.2	Neue Therapieverfahren in der regenerativen Medizin	8
3.1.3	Stammzellen	9
3.1.4	Trägermatritzen	10
3.1.5	Wachstumsfaktoren	10
3.1.6	Methoden des Tissue Engineerings	11
3.2	Tissue Engineering für die Pulparegeneration	12
3.2.1	Aufbau des Zahnes	12
3.2.2	Aufbau und Aufgabe des Pulpa-Dentin-Komplexes	13
3.2.3	Pathologien der Pulpa	14
3.2.4	Reparative Maßnahmen der Pulpa	16
3.2.5	Tissue Engineering und Regenerative Maßnahmen in der Endodontologie	19
3.2.6	Zellen für die Pulparegeneration	20
3.2.7	Trägermatritzen der Pulparegeneration	22
3.2.8	Wachstumsfaktoren der Pulparegeneration und die Methode der zellfreien Regeneration des Pulpa-/Dentin Komplexes	29
3.3	Trägermatritzen	30
3.3.1	Anforderungen und Voraussetzungen von Trägermatritzen	30
3.3.2	Hydrogele	32
3.4	LAPONITE[®]	37
3.4.1	Herstellung von einem LAPONITE [®] -Hydrogel	37
3.4.2	Eigenschaften und Vorteile von einem LAPONITE [®] -Hydrogel als Trägermatrix für das Tissue Engineering	38
3.4.3	Einsatzgebiete von LAPONITE [®]	42
3.4.4	Erfolge mit LAPONITE [®] -Hydrogel im Bereich des Tissue Engineerings	42
4	Zielsetzung	44
5	Material und Methoden	45
5.1	Herstellung von LAPONITE[®] XLG-Hydrogel	45
5.2	Zellkultivierung im einschichtigen Zellmodell	45
5.3	Vitalitäts- und Toxizitäts-Tests	46
5.3.1	Live-Dead Färbung	46
5.3.2	MTT- Test	47
5.3.3	Resazurin-basierender Toxizitäts Test	47
5.4	Untersuchung der Zellproliferation	48
5.4.1	Bromdesoxyuridin-Test	48
5.5	Untersuchung der Zelldifferenzierung, Mineralisation und Genexpression	49
5.5.1	Histochemische Färbung für Alkalische Phosphatase	49
5.5.2	Genexpression	49
5.5.3	Mineralisationsnachweis mit Alizarin Rot-Färbung	51
6	Ergebnisse	52
6.1	Nachweis der Vitalität, Toxizität, Proliferation	52
6.1.1	Live-Dead Färbung	52
6.1.2	MTT-Test	53

6.1.3	Resazurin-basierender Toxizitäts-Test.....	54
6.1.4	BrdU-Proliferationstest.....	56
6.2	Nachweis der Zelldifferenzierung, Genexpression und Mineralisation.....	57
6.2.1	histochemische Färbung für Alkalische Phosphatase.....	57
6.2.2	RNA-Isolierung und qPCR.....	58
6.2.3	Alizarin Rot-Färbung.....	58
7	Diskussion.....	60
8	Abkürzungsverzeichnis.....	65
	Literaturverzeichnis.....	67

1 Kurzfassung

Hintergrund: Durch Karies oder Zahntraumen kommt es meist zu einem massiven Zahnhartsubstanzverlust, welcher in einer Wurzelbehandlung enden kann. Das Resultat ist ein desensibilisierter, fraktur anfälliger und in seiner Funktion eingeschränkter Zahn. Die derzeit angewendeten therapeutischen Strategien sind als ein reparativer und kein regenerativer Prozess anzusehen. Um die Struktur und folglich die wichtigen Aufgaben des entfernten Pulpagewebes wieder herzustellen, wäre die Regeneration des Pulpa-Dentinkomplexes, durch die Methode des Tissue Engineerings eine Möglichkeit. Aufgrund der komplexen Gewebszusammensetzung sowie der speziellen Anatomie des Zahnes und der daraus folgenden Anforderungen ist noch keine ideale Matrix gefunden worden. Ein innovatives Matrixmaterial wäre das Hydrogel aus synthetischen Tonmineralien. Unklar ist, wie dentale Pulpazellen auf einem Hydrogel aus synthetischen Tonmineralien reagieren. Deshalb ist das Ziel meiner Arbeit die Vitalität, Proliferation und Differenzierung dieser Zellen in Gegenwart von Hydrogel aus synthetischen Tonmineralien zu untersuchen.

Material und Methoden: Für diese Untersuchungen, wurde das synthetische Tonmineral LAPONITE[®] als Hydrogel mit unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt. Die dentalen Pulpazellen wurden auf das Gel gesetzt. Um die Auswirkung des Hydrogels auf die dentale Pulpazellen zu klären, wurde ihre Vitalität mittels Resazurin-basierenden Toxizitätstest, MTT-Test und Live-Dead-Färbung analysiert. Für die Untersuchung der Proliferation war der BrdU-Test geplant. Für die Zelldifferenzierung war die Anwendung der histochemischen Färbung für Alkalische Phosphatase, sowie Alizarin Rot-Färbung und qPCR geplant.

Ergebnisse: Die Ergebnisse zeigten keine Beeinträchtigung der Vitalität der dentalen Pulpazellen auf dem LAPONITE[®]-Hydrogel von unterschiedlichen Konzentrationen. Die Untersuchung der Proliferation lieferte, aufgrund der hohen Absorptionsfähigkeit des Gels, falsch-positive Ergebnisse und konnte nicht ausgewertet werden. Die Zellen konnten sich auf dem Hydrogel zu Alkalische Phosphatase positive Zellen differenzieren. Alizarin Rot-Färbung und qPCR konnten aufgrund der chemischen und physikalischen Eigenschaften des Gels nicht untersucht werden.

Schlussfolgerung: Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Hydrogel-Trägermatrix aus LAPONITE[®]-Tonmineralien, aufgrund der einfachen Herstellung, ihrer thixotropen Eigenschaft und nicht toxischen Wirkung auf dentale Pulpazellen, ein erfolgsversprechendes Material für eine mögliche Anwendung in der regenerativen Endodontie ist.

2 Abstract

Background: Caries or dental trauma can lead to massive loss of hard tooth substance. This sometimes ends in root canal treatment and the total removal of the pulp nerve tissue. The remaining tooth is left desensitized, brittle and prone to fracture with limited function. Currently used therapeutic strategies are regarded as a reparative rather than a regenerative process. In order to restore the structure and the essential functions of the compromised tooth material, tissue engineering represents a promising method to achieve regeneration of the pulp-dentin complex. Due to the sophisticated tissue composition and consequent requirements, no ideal matrix material has yet been found. A promising matrix material is hydrogel made from synthetic clay minerals. However, it is unclear how dental pulp cells react to a hydrogel made from synthetic clay minerals (LAPONITE[®]). Therefore, the aim of this study is to examine the vitality, proliferation and differentiation of these cells in response to treatment with hydrogel of synthetic clay materials.

Material and methods: For this study, a LAPONITE[®]-Hydrogel of various concentrations was prepared. The dental pulp cells were cultivated and set on the gel. In order to test the effects of the Hydrogel made from synthetic clay materials on the dental pulp cells, their vitality was tested using Resazurin-based toxicity assay, MTT-assay, and Live-Dead Staining. For the study of proliferation, the BrdU-assay was planned. The cell differentiation was detected with histochemical staining for Alkaline Phosphatase. Furthermore, qPCR and Alizarin Red staining was planned.

Results: The study revealed vital dental pulp cells on LAPONITE[®] hydrogels at various concentrations. Proliferation could not be evaluated because false positive results were observed due to the high absorbency of the gel. Alkaline phosphatase positive cells could be detected.

Conclusion: The results suggest synthetic clay-based hydrogels, due to its ease of application, thixotropic properties and non-toxic effects on dental pulp cells, provides a suitable substance to promote pulpal regeneration.

3 Einleitung

3.1 Regenerative Medizin und Tissue Engineering

3.1.1 Entwicklung in den regenerativen Verfahren der Zahnmedizin und Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

Durch Trauma, Tumorresektion, Infektionen oder degenerative Erkrankungen kann es zum Verlust von Geweben oder ganzen Organen kommen. Die Aufgabe der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie ist die Rehabilitation und Wiederherstellung der Funktion dieses verloren gegangenen Gewebes (1). Defekte oder Verluste der maxillo-fazialen und oralen Gewebe behindern lebensnotwendige Funktionen wie das Atmen, Kauen und Schlucken. Aus diesem Grund ist das Gebiet der Regenerativen Medizin seit vielen Jahren ein großer Aufgabenbereich der Forschung.

Erste Einsätze im Jahr 1997 von Thrombozyten reichen Plasma (Platelet Rich Plasma, PRP) (2) die Weiterführung mit einem Wachstumsfaktor reichen Plasma (Plasma Rich in Growth Factors, PRGF) im Jahre 1998 (3) und die Evolution von einem Thrombozyten reichen Fibrinnetz (Platelet Rich Fibrin, PRF) (4,5), zeigten in Kombination mit Operationen im Bereich der oralen-, oder Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie erhebliche Vorteile für die Wundheilung und Regeneration der Gewebe (2).

PRF besteht aus einem Thrombozytenkonzentrat, welches mit Wachstumsfaktoren gemischt wird und in einer elastischen dreidimensionalen Fibrin-Matrix eingebettet ist (1). Mit dieser Errungenschaft legte man schon um das Jahr 1990 den Grundstein für die heutigen drei Säulen (Zellen, Wachstumsfaktoren, Matrix) des Tissue Engineerings (siehe Abbildung 1).

3.1.2 Neue Therapieverfahren in der regenerativen Medizin

Wenn Gewebe aus unterschiedlichen Gründen zerstört wird, ist der Körper meist selbst in der Lage diesen Verlust, durch Wund- bzw. Defektheilung aufgrund von ubiquitär im Körper vorkommenden Stammzellen wieder herzustellen. Jedoch je älter der Patient (6) und je größer der Defekt ist (7), desto größer ist die Herausforderung für die körpereigene Heilung. Tissue Engineering ist ein neuer Ansatz in der regenerativen Medizin, um degeneriertes, traumatisch oder chronisch zerstörtes Gewebe *in vitro* herzustellen und somit die körpereigene Wundheilung zu unterstützen (8). Mit Stammzellen, als Basisbaustein eines Organs und hohem Differenzierungsgrad, einem Gerüst, als Struktur und Schutz verleihendes Medium und Wachstumsfaktoren, die es Zellen erst ermöglichen sich zu proliferieren und zu differenzieren, gelingt es, spezifische Gewebe *in vitro* zu entwickeln.

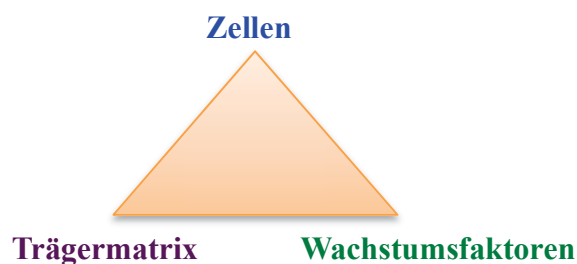


Abbildung 1 Die drei Säulen des Tissue-Engineerings: Zellen, Trägermatritzen und Wachstumsfaktoren (8).
Abbildung modifiziert aus (8).

3.1.3 Stammzellen

Alle Gewebe-Arten eines Organismus entwickeln sich aus pluripotenten Stammzellen. Pluripotente Stammzellen sind embryonale, unreife und unspezifische Zellen mit einem hohen Potenzial sich selbst zu vermehren und zu multipotenten Stammzellen weiter zu entwickeln. Multipotente Stammzellen sind adulte Stammzellen, die sich im Knochenmark, in der Haut, im Muskel, im Magen-Darmtrakt, im Epithel und in allen mesenchymalen Geweben aufhalten. Sie differenzieren sich umgebungsspezifisch während der Entwicklung entweder zu epithelialen, mesenchymalen oder Gewebe-spezifischen Stammzellen. Also zu allen Zellen eines Gewebetyps, die aus den drei Keimblättern Mesoderm, Endoderm und Ektoderm entstehen (1,9).

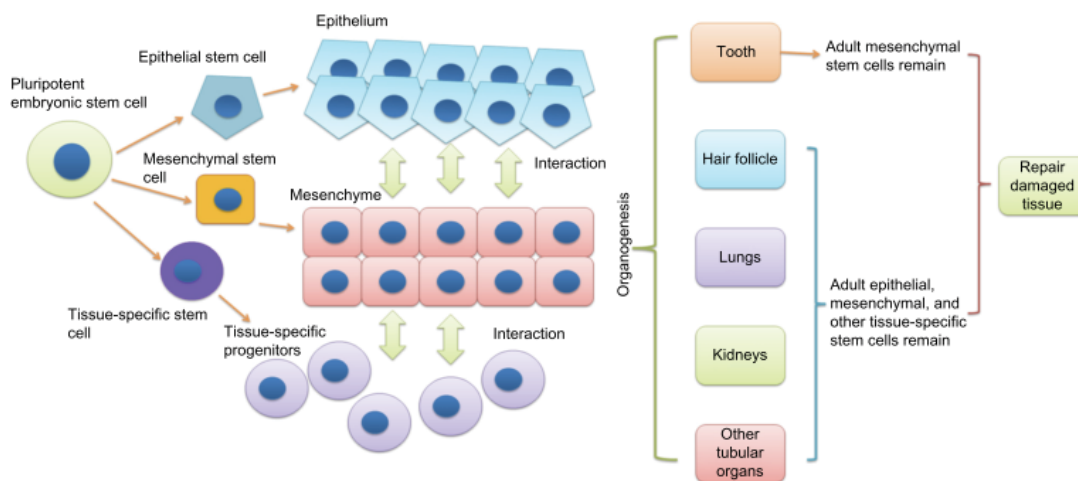


Abbildung 2 Tabelle menschlicher Stammzellen und der Organogenese. Embryonale pluripotente Stammzellen differenzieren sich zu multipotenten Stammzellen, die sich weiter zu epithelialen, mesenchymalen oder gewebe-spezifische Stammzellen differenzieren. Aus diesen drei Säulen der Stammzellen entstehen die Gewebe und Organe des menschlichen Körpers (10). Abbildung entnommen aus (10)

Aufgrund des reichlichen Vorkommens von multipotenten Stammzellen, ihrem hohen Potenzial zur Selbsterneuerung, ihrer Kapazität sich in unterschiedliche mesenchymale Zellen, wie Osteozyten, Chondrozyten oder Adipozyten zu differenzieren, erfüllen diese Stammzellen viele Anforderungen für die Verwendung im Bereich des Tissue Engineerings und der Gewebewiederherstellung (1).

3.1.4 Trägermatritzen

Eine Trägermatrix ist ein dreidimensionales Netzwerk, das als temporäre Schutz- und Leitstruktur für Stammzellen, Wachstumsfaktoren, Abbauprodukten und Nährstoffen dient. Das Gerüst soll Stammzellen ermöglichen sich anzuhafte (Zelladhäsion), sich zu vermehren (Zellproliferation), sich in spezialisierte Zellen zu entwickeln (Zelldifferenzierung), um die neue Gewebbildung zu unterstützen (11).

Wissenschaftler sind derzeit dabei die, für jeden zu rekonstruierenden Gewebetyp ideale Matrix, zu erforschen. Bisher konnten mit natürlichen und synthetischen Polymeren, inorganischen Materialien, wie Hydroxylapatit und Hydrogelen Erfolge in der Knochen-/Knorpel- (12,13) oder in der Regeneration von Dentin-/Pulpakomplex erzielt werden (14).

3.1.5 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind Proteine und die dritte Säule im Tissue Engineering. Sie sind wichtige Signalmoleküle während der Entwicklung und Reparatur von Zahngeweben.

Wachstumsfaktoren, wie Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) und Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) zum Beispiel, aktivieren über die Bindung an Rezeptoren intrazelluläre Signalkaskaden und induzieren somit die Proliferation und Differenzierung von Odontoblasten (15).

3.1.6 Methoden des Tissue Engineerings

Es gibt zwei unterschiedliche Ansätze im Tissue Engineering um Gewebe herzustellen. Es werden eine zellbasierte und eine zellfreie Strategie beschrieben (16).

Bei der zellbasierten Strategie werden Stammzellen zusammen mit Wachstumsfaktoren auf eine Trägermatrix gesetzt. Diese fangen an, sich zu vermehren, zu differenzieren und das gewünschte Gewebe aufzubauen, welches im Anschluss in die Defektstelle implantiert werden kann. Die klassische Methode des Tissue Engineerings (siehe **Abbildung 6**)

Die zellfreie Strategie, auch „Cell-Homing“ genannt, verwendet ausschließlich eine Trägermatrix, die mit Wachstumsfaktoren besetzt wird. Dieses Konstrukt wird in die Defektstelle implantiert. Stammzellen werden durch die Wachstumsfaktoren angelockt, heften sich an und beginnen sich zu differenzieren, um so das fehlende Gewebe zu bilden (16). Diese günstigere Methode bringt eine einfache Handhabung im Labor mit sich, da keine Zellkultivierung notwendig ist. Ein weiterer Vorteil ist das verminderte Risiko einer Immunreaktion oder Krankheitsübertragung, aufgrund der Verwendung von körpereigenen Zellen (16).

3.2 Tissue Engineering für die Pulparegeneration

3.2.1 Aufbau des Zahnes

Ein Zahn wird in die Krone, den sichtbaren in die Mundhöhle hineinragenden Abschnitt, und in die Wurzel, der im Knochen verankerte und nicht sichtbare Abschnitt eingeteilt. Den Hauptteil eines Zahnes bilden drei unterschiedlich stark mineralisierte Schichten. Der Zahnschmelz, Dentin und Zement. Sie umschließen die sich im Zentrum des Zahnes befindende Pulpakammer. Die Pulpakammer ist der Hohlraum, welcher das Weichgewebe eines Zahnes, die Zahnpulpa beinhaltet (11,21).

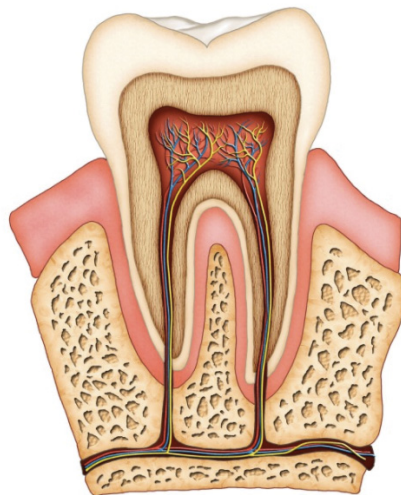


Abbildung 3 Zahnaufbau: Ein Zahn wird allgemein in Zahnkrone und Zahnwurzel eingeteilt. Die Zahnkrone besteht aus Zahnschmelz, Dentin und Pulpa. Die Pulpa ist auch ein wesentlicher Bestandteil der Wurzelkanäle (82). Abbildung entnommen aus (82).

3.2.2 Aufbau und Aufgabe des Pulpa-Dentin-Komplexes

Die Pulpa wird allgemein in Kronen- und Wurzelpulpa eingeteilt. Im Inneren des Zahnes von einer dünnen Dentinschicht umfasst, bildet sie eine visköse Matrix. Diese besteht aus einem lockeren Bindegewebe mit Blutgefäßen, sensiblen Nerven sowie Zellen und interzellulären Typ-I und Typ-III Kollagen Fibrillen. Bei den Zellen unterscheidet man zwischen Fibroblasten, Endothelzellen, Neuronen, Odontoblasten, Immun- bzw. Entzündungszellen (dendritische Zellen, Makrophagen, T-Lymphozyten) und latente Pulpastammzellen (10,17).

Während die meisten Zellen der Pulpa gleichmäßig im Pulpagewebe verteilt sind bilden Odontoblasten eine einlagige Zellschicht an der Peripherie der Pulpa. Ihre Zellkörper liegen palisadenartig dem unreifen, an die Pulpa grenzenden Prädentin an und ihre langen Fortsätze ziehen in den Dentintubuli von der Pulpa bis zur Schmelz-Dentingrenze. Dentintubuli sind feine Kanälchen mit einem Durchmesser von 1-2µm und einer Länge von 2,5-3,5mm. In den Dentintubuli werden Odontoblastenfortsätze von feinen Blut- und Nervengefäßen begleitet und von Dentinliquor umspült. Dentinliquor ist eine nährreiche, extrazelluläre Flüssigkeit, reich an Phosphaten, ohne welche es Odontoblasten nicht möglich wäre während der Zahnentwicklung das primäre Dentin und nach Abschluss der Zahnentwicklung das sekundäre Dentin zu produzieren (18,19,21).

Die, für die Gefäßversorgung verantwortlichen Blut- und Lymphgefäße dringen durch das *Foramen apicale* in die Pulpa ein, ziehen durch die Wurzelpulpa-Kammer nach koronar und verzweigen sich in der Kronenpulpa zu einem feinen Netzwerk. Da das *Foramen apicale*, welches nicht größer als 250µm im Durchmesser ist, gelangen verhältnismäßig wenig Nährstoffe und Sauerstoff in die Pulpa. Die in der Pulpakammer herrschende Hypoxie ist für Pulpastammzellen von Vorteil (20), jedoch schlecht für ihre Infektions- bzw. Abwehrkontrolle des Gewebes (10).

Die sensible und sensorische Innervierung der Pulpa erfolgt über sympathische Nervenfasern, die ebenfalls durch das *Foramen apicale* in die Pulpa eintreten, sie longitudinal durchziehen und unter der Odontoblasten-Schicht den „Raschkow’schen Plexus“ bilden. Sie sind für die Schmerzempfindung durch thermale, mechanische und toxische Reize verantwortlich (11,16,17).

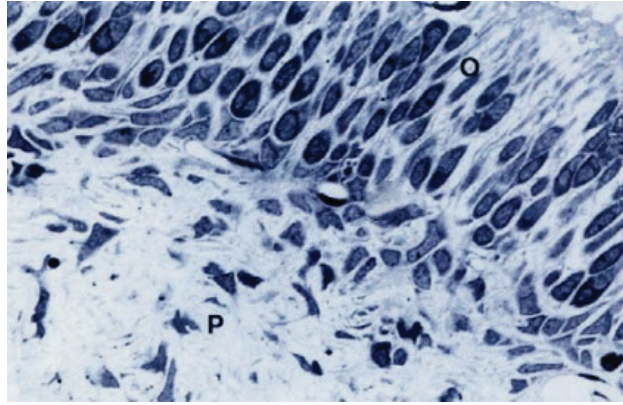


Abbildung 4 Ein histologischer Schnitt eines Pulpa-Dentin-Komplexes von einem Ratten-Molar. Mit (P) gekennzeichnet das Pulpa-Gewebe bestehend aus lockerem Bindegewebe mit Kollagenfasern, Blutgefäßen, Fibroblasten und Nervenzellen. Mit (O) gekennzeichnet die polarisierten Odontoblasten. Ihre Zellkörper mit dem Zellkern liegen in einer Reihe an die Pulpa angrenzend. Ihre Fortsätze verlaufen durch das Dentin in den Dentintubuli (26). Abbildung entnommen aus (26).

3.2.3 Pathologien der Pulpa

Reversible Pulpitis

Wird ein Zahn konstant mit zuckerhaltigen Nahrungsmitteln umspült, ist die Mundhygiene schlecht, oder ist der Speichelfluss gering, haben Bakterien der Mundflora die besten Voraussetzungen, um Karies zu bilden. Sie verdauen niedermolekulare Kohlenhydrate und das Ergebnis sind Säuren. Die dabei entstehende Milchsäure führt zu einem pH-Wert Abfall an der Zahnoberfläche. Der kritische Bereich für die Demineralisation von Zahnschmelz liegt bei einem des pH-Wert von 5,2-5,7 (22). Bei einem pH-Wert-Abfall unter 5,2 werden die Mineralstoffe der Hartgewebe (Zahnschmelz, Dentin) herausgelöst. Die Folge ist Karies und Kavitätenbildung. Bakterien, vor allem gram-negative und anaerobe Bakterien wie Streptococcus mutans und Lactobazillus (23) können durch die Hartgewebszerstörung in das Pulpagewebe eindringen, es infizieren und entzündliche Prozesse in der Pulpa auslösen (24).

Sobald Bakterien die tiefen, pulpanahen Dentinschichten erreicht haben, beginnt ein Entzündungsprozess. Die dadurch angelockten Immunzellen zusammen mit der Freisetzung von pro-inflammatorischen Faktoren wie Interleukine und Tumornekrosefaktor $-\alpha$ (TNF- α), sowie durch die Toxine der Bakterien, führen zu katabolen Prozessen und diese können den Zelltod von Odontoblasten zur Folge haben. Die Schutzbarriere zur Pulpa wird damit zerstört und dadurch haben Bakterien ungehinderten Zugang zur Pulpa. Diese Phase ist das Frühstadium einer Entzündungsreaktion (17). Durch die weitere Einwanderung von

Lymphozyten kommt es aufgrund von einer gesteigerten Angiogenese und Gefäßdilatation, zur Hyperämie in der Pulpa. Die Hyperämie stellt das erste Stadium der Pulpaentzündung dar und wird als noch reversibel angesehen, wenn die schädliche Noxe entfernt und der Zahn mit einer Füllung versorgt wird (19).

Irreversible Pulpitis

Bleibt die Gefäßerweiterung und somit der erhöhte Druck im Pulpenkavum vorhanden, kommt es zum Austritt von serösem und zellfreiem Exsudat. Das stellt das Stadium der *Pulpitis acuta serosa* dar und ist als irreversibel anzusehen. Sie kann nur noch in eine chronische Form übergehen. Durch das Einwandern von Leukozyten wird die seröse Entzündung schnell zu einer eitrigen Infektion. Das Stadium der *Pulpitis acuta purulenta* ist somit erreicht. Da durch die geringe Blutzufuhr von apikal die benötigte antimikrobielle Dosis nicht erreicht werden kann, ist in dieser Phase der Pulpaerkrankung nur noch die Maßnahme der Exstirpation des infizierten und irreversibel zerstörten Pulpagewebes möglich, um ein weiteres Fortschreiten der Entzündung zu vermeiden (10,17,19).

Pulpanekrose

Wird das infizierte Pulpagewebe nicht entfernt, der Wurzelkanal nicht gereinigt und aufbereitet, kommt es zur Besiedelung von anaeroben Bakterien in der Pulpa. Diese schmelzen kontinuierlich das Pulpagewebe ein und es entsteht eine Nekrose. Das abgestorbene Pulpagewebe wird durch eine graue, schmierige Masse ersetzt und ist als ein chronischer Zustand anzusehen. Die Pulpanekrose stellt mit einer bakteriellen Mischinfektion (obligat anaeroben Bakterien) das Endstadium aller akuten Pulpitiden dar.

Sie wird in eine nicht infizierte oder infizierte Nekrose eingeteilt. Die nicht infizierte Pulpanekrose ist meist ein schmerzloser und beim Eröffnen der Pulpakammer blutloser Zufallsbefund. Die Therapie der Wahl ist eine Wurzelkanalbehandlung. Geschieht dies nicht, kann sich die nekrotische Pulpa sekundär infizieren und zu einer infizierten Nekroseform übergehen. Im Unterschied zu der nicht infizierten Form präsentiert sich die infizierte Nekrose mit einer intensiven Perkussionsempfindlichkeit des Zahnes. In beiden Formen fällt der Sensibilitätstest negativ aus und das Pulpagewebe muss entfernt werden, um ein weiteres Fortschreiten der Infektion nach apikal in den Knochen zu unterbinden (11,19).

3.2.4 Reparative Maßnahmen der Pulpa

Klinisch vitalerhaltende Maßnahme der Zahnpulpa: Pulpaüberkappung

Wird die schädliche Noxe nicht entfernt oder ist der Dentindefekt zu groß für die körpereigene Abwehrreaktion gibt es die klinische Maßnahme der Pulpaüberkappung, um die Vitalität und Funktion der Pulpa aufrecht zu erhalten. Voraussetzung für diese Maßnahme sind bleibende, gesunde Zähne, die reversibel geschädigt wurden oder bei denen das Pulpenkavum künstlich eröffnet wurde. Außerdem ist eine erfolgreiche Blutstillung der eröffneten Stelle eine wichtige Voraussetzung für den Erfolg der Pulpaüberkappung (19,25).

Nach Freilegung der Pulpa und abgeschlossener Blutstillung wird die eröffnete Stelle mit einem Kalziumhydroxid ($\text{Ca}(\text{OH})_2$)-Präparat oder mit Mineraltrioxid Aggregat (MTA) im Sinne eines Wundverbandes abgedeckt. Kalziumhydroxid weist einen hohen pH-Wert auf und diese Tatsache bringt zwei Reaktionen mit sich. Zum einen produziert ein basischer pH-Wert eine Umgebung in der sich Bakterien unwohl fühlen, was zu einem relativ sterilem Umfeld führt und zum anderen wird eine lokale Nekrose induziert (26).

Das Ziel der Pulpaüberkappung ist die Bildung von Reparaturdentin. Dieses entstandene Reparaturdentin ist eine inhomogene Struktur aus Dentinbrücken und Osteodentin, mit Lakunen, in denen sich Zell- und Pulparesten befinden. Aufgrund der Inhomogenität ist das entstandene Produkt anfälliger für eine erneute Kolonialisierung von Bakterien (27,28).

Der Vergleich von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und MTA zeigt, dass das entstandene Dentin durch MTA homogener und somit auch weniger anfällig für Bakterien ist als das Reparaturdentin nach $\text{Ca}(\text{OH})_2$ Applikation (29).

Tertiärdentinbildung

Die Tertiärdentinbildung wird auch Reaktionsdentinbildung genannt. Pulpastammzellen bilden als körpereigene Abwehrreaktion auf Verlust des Zahnhartgewebe (Bakterien, pathologische Attrition oder einer iatrogenen Präparation), Tertiärdentin. Nach einer Immunreaktion auf die schädliche Noxe werden Pulpastammzellen durch proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 α (IL-1 α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder das Zytokin Transforming Growth Factor- β (TGF- β) an den Ort des Dentindefekts rekrutiert. Dort vermehren sie sich und differenzieren sich zu Odontoblasten-ähnlichen Zellen, welche das Reparaturdentin produzieren. Das Reparaturdentin weist ähnliche strukturelle Eigenschaften auf, wie das sekundäre Dentin (17). Im Vergleich zum Sekundärdentin verlaufen die Dentintubuli irregulärer und die Mineralisationsrate (Kalzium- und Phosphat-Level) ist geringer (30). Das Reparaturdentin präsentiert sich als dünne Dentinbrücke oder als eine Knochen-ähnliche Struktur, auch Osteodentin genannt (11,17,26).

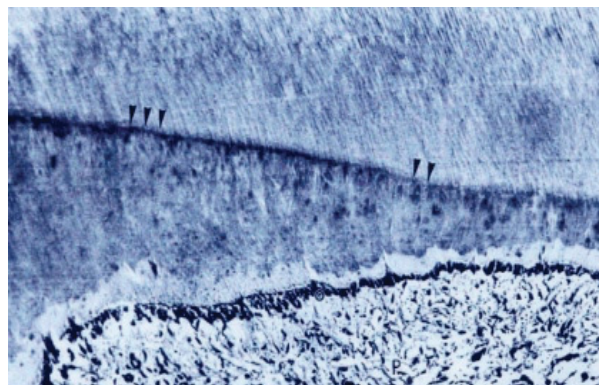


Abbildung 5 Ein histologischer Schnitt von einem menschlichen Zahn: Bildung von reaktionären Dentin, von dem sekundären Dentin (darüber) durch eine kalzio-traumatische Linie (Pfeile) abgegrenzt. Darunter (von oben nach unten) eine hellere Schicht Prädentin, Odontoblastenzellkörper und das Pulpagewebe (26). Abbildung entnommen aus (26).

Devitalisierung des Zahnes: Wurzelkanalbehandlung

Wird die Pulpa aufgrund einer bakteriellen Infektion oder eines Zahntraumas irreversibel geschädigt oder nekrotisch, breiten sich Bakterien weiter aus und infizieren nicht nur das pulpale Weichgewebe, sondern auch das zirkumpulpale Dentin bis zu 1.2mm in die Tiefe der Wurzelkanalwand (19). Zeigen sich klinische und/oder röntgenologische Auffälligkeiten am periapikalen Gewebe oder bleibt die Schmerzsymptomatik nach vitalerhaltenden Maßnahmen (Pulpaüberkappung) weiterhin bestehen, oder führt ein primär

parodontales Problem zu einer Bakterieninvasion in die Pulpa, ist der nächste Schritt die Exstirpation des Pulpagewebes, sowie eine instrumentelle und chemisch-medikamentöse Desinfektion, um ein weiteres Voranschreiten der Entzündung in die periapikalen Regionen zu verhindern (19). Die Pulpa wird entfernt, der Kanal erweitert, desinfiziert und eine Zeit lang mit einer medikamentösen Zwischeneinlage (Kalziumhydroxid) versorgt. Kalziumhydroxid löst auch in diesem Fall eine lokale Nekrose aus, induziert somit eine Entzündungsreaktion als zahneigene Abwehr und somit die Entstehung von Tertiärdentin an der betroffenen Stelle (26). Der Zahn wird somit desensibilisiert und definitiv mit einer synthetischen und bakteriedichten Wurzel- und Kronenfüllung versorgt.

Schwierigkeiten reparativer Methoden

Wurzelkanalbehandlungen ziehen zahlreiche Zahnarztbesuche, die viel Geld und Zeit beanspruchen, nach sich. Außerdem können einige Komplikationen, wie ein Feilenbruch, Perforationen oder Überinstrumentalisierung damit einhergehen und in weiterer Folge dessen der Transport von infiziertem Kanalinhalt oder Füllungsmaterial in das periapikale Gewebe (19,28) auftreten. Ein wurzelbehandelter Zahn wird desensibilisiert, dadurch ist die Kaubelastung und in Folge die Frakturgefahr erhöht. Durch die Entfernung der Pulpa wird der Zahn spröder und brüchiger und kann sich dunkel verfärben (31).

Die Entfernung des infizierten Pulpagewebes ist nur ein Versuch den Zahn zu retten, da Odontoblasten ohne große Blutgefäße und Nerven keine Möglichkeit mehr haben, Tertiärdentin zu bilden. Die Homöostase eines Zahnes wird somit stillgelegt. Der größte Nachteil dieser endodontologischen Behandlungen ist, dass das alte, zerstörte Gewebe repariert und nicht regeneriert wird (11,28).

3.2.5 Tissue Engineering und Regenerative Maßnahmen in der Endodontologie

Regeneration des Pulpagewebes bedeutet, dass sich in dem leeren, desinfizierten Raum des Wurzelkanals ein neuer Pulpa-Dentinkomplex (palisadenartig, polarisiert ausgerichtete Odontoblasten und lockeres Bindegewebe mit Blut- und Nervengefäßen, mobilen Zellen, Fasern und extrazellulärer Matrix) bildet und die ursprünglich homöostatische Funktion wieder hergestellt wird (32). Nach dieser Definition sind alle derzeit angewendeten therapeutischen Strategien als ein reparativer und kein regenerativer Prozess anzusehen, da die ursprünglichen Funktionen der Pulpa durch das neue synthetische Material nicht wieder hergestellt werden können. Um die Struktur und folglich die wichtigen Aufgaben des, aus den unterschiedlichen Gründen entfernten Pulpagewebes wieder herzustellen, sind regenerative Maßnahmen für die Zukunft der Zahnerhaltung ein großes Interessensgebiet der Forschung.

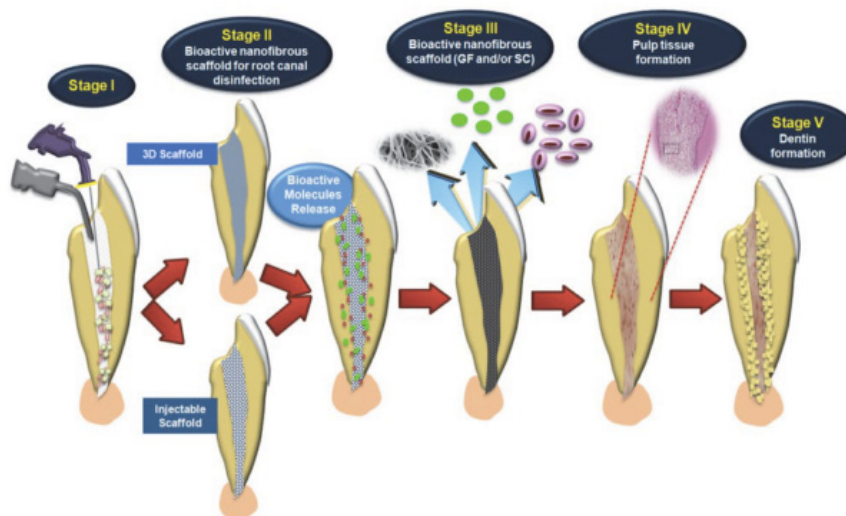


Abbildung 6 Pulparegeneration basierend auf der Strategie des Tissue-Engineering für Regenerative Endodontie für permanente Zähne mit unvollständigem Wurzelwachstum. Stage I: Nach Pulpektomie wird der Wurzelkanal mit Spüllösungen desinfiziert. Stage II: Applikation einer antibiotischen Paste durch eine nanofibröse Trägermatrix als Transporter. Stage III: Applikation von einer Trägermatrix, beladen mit Stammzellen und/oder Wachstumsfaktoren. Stage IV: Pulpagewebe bildet sich. Stage V: Dentin-Bildung. (43)
Abbildung entnommen aus (43).

3.2.6 Zellen für die Pulparegeneration

Orale mesenchymale Stammzellen

Orale mesenchymale Stammzellen sind adulte multipotente Stammzellen. Werden sie kultiviert, dann können sie sich schnell vermehren und sich, aufgrund ihres multipotenten Differenzierungspotenzials, zu Knochen-, Knorpel-, Fettzellen oder Odontoblasten entwickeln (10,33). Zusätzlich können Stammzellen aus oralen Geweben, im Vergleich zu Knochenmarkstammzellen, weniger invasiv gewonnen werden (33,34). Orale mesenchymale Stammzellen werden in zwei Gruppen, die dentalen mesenchymalen und die nicht-dentalen mesenchymalen Stammzellen, eingeteilt.

Dentale mesenchymale Stammzellen sind dentale Pulpastammzellen (Dental Pulp Stemcells, DPSC), Stammzellen von ausgefallenen Milchzähnen (Stemcells from Human Exfoliated Deciduous Teeth, SHED) oder Stammzellen der apikalen Papilla (Stemcells from Apical Papilla, SCAP). Sie teilen ihre Fähigkeit, *in vivo* und *in vitro* einen Dentin-/Pulpa Komplex zu bilden.

Nicht-dentale mesenchymale Stammzellen sind Parodontal-Ligament-Stammzellen (Periodontal Ligament Stemcells, PDLSC) oder Gingiva-Fibroblasten Stammzellen (Gingival Mesenchymal Stemcells, GMSC), welche Gewebe des Parodontalen- Ligaments, Sehnen oder Muskelfasern wieder herstellen können (10). Da ihr Differenzierungsverhalten vom Ort der Transplantation abhängig ist, sollte der passende Stammzelltyp für das gewünschte, zu regenerierende Gewebe, angewendet werden (35,36).

Dentale Pulpastammzellen (Dental Pulp Stemcells, DPSC)

Dentale Pulpastammzellen sind mobile Zellen, welche sich verstreut im Pulpagewebe aufhalten. Sie dienen, aufgrund ihres odontogenen Differenzierungspotenzials, als beliebte Quelle für die Wiedererstellung von dentalen Geweben (33). Die ersten Pulpastammzellen wurden im Jahr 2000 von *Gronthos et al.* aus extrahierten Weisheitszähnen isoliert (37). Dabei wurden die Zellen mit einem keramischen Pulver aus Hydroxylapatit und Trikalziumphosphat vermischt und in immunsupprimierte Mäuse transplantiert. Nach sechs Wochen konnte anhand, der für Odontoblasten spezifisch nachgewiesenen Mineralisationsmarker Dentinsialophosphoprotein (DSPP) und Dentin Phosphoprotein (DPP) eine Dentin-ähnliche Struktur beobachtet werden (37). Eine weitere Erkenntnis war, dass

Pulpastammzellen sich zusätzlich mit spezifischen Signalmolekülen, in Knochen-bildende Zellen differenzieren können (34,37).

Stammzellen aus humanen Milchzähnen (Stemcells from Human Exfoliated Deciduous Teeth, SHED)

Wie die Pulpa von extrahierten Zähnen sind ebenfalls auch ausgefallene Milchzähne eine beliebte nicht-invasive Quelle, ohne ethische Bedenken für die Entnahme von dentalen Stammzellen. Stammzellen von Milchzähnen zeigen im Vergleich mit Knochenmarkstammzellen und dentalen Pulpastammzellen eine höhere Proliferationsrate, da sie sich noch in einem früheren Stadium der Entwicklung befinden als die adulten Stammzellen aus dem Knochenmark oder der Pulpa (34). Sie haben die Fähigkeit Wachstumsfaktoren (Fibroblast-Growthfactor-2, FGF-2 und Transforming Growth Factor- β , TGF- β) zu exprimieren. Diese Faktoren sind für die Wundheilung, Bildung von extrazellulärer Matrix und Kollagensynthese zuständig sind (34). Da Kollagen eine Hauptkomponente der extrazellulären Matrix der Zahnpulpa ist, bilden SHED ebenfalls eine interessante Stammzellquelle für den Neubau von Pulpagewebe. *Cordeiro et al.* konnten Pulpa-ähnliches Gewebe aus einer Trägermatrix, welche mit SHED beladen wurde, züchten (38).

Die Fähigkeit von Stammzellen aus Milchzähnen sich schnell zu vermehren und die Kollagensynthese induzieren zu können, sind zwei essentielle Vorteile und erweckt großes Interesse bei der Anwendung für Geweberegeneration.

Stammzellen der apikalen Papilla (Stemcells from Apical Papilla, SCAP)

Die Zahnpapille, welche sich apikal des Zahnes an der Wurzelspitze befindet, ist ein Überrest der embryonalen Zahnentwicklung. Das Gewebe der Zahnpapille entsteht aus dem Mesenchym von der Neuralleiste und liegt in der Einsenkung der Zahnknospe. Es wird vom inneren Schmelzepithel ausgekleidet. Im Glockenstadium differenzieren sich die Mesenchymzellen der Zahnpapille zu Odontoblasten, welche das Prädentin produzieren. Die restlichen Zellen der Zahnpapille bilden die spätere Zahnpulpa. Die Stammzellen der Zahnpapille befinden sich bei Zähnen mit unvollendetem Wurzelwachstum an der Wurzelspitze und stellen eine natürliche Quelle für dentale Progenitorzellen dar. Im Vergleich zu dentalen Pulpastammzellen haben sie ein höheres Proliferations- und Mineralisationspotenzial (39,40).

3.2.7 Trägermatritzen der Pulparegeneration

Anfänge der Trägermatritzen für Pulparegeneration: die Methode der „Revaskularisierung“

Der erste experimentelle Versuch der regenerativen Endodontie war die Technik der Revaskularisierung (11,41). Hierbei wird nach einem mechanischen Debridement und einer Antibiotikaeinlage (42), durch Überinstrumentalisierung eine Blutung der periapikalen Region induziert. Dieses Blut strömt in das Kanallumen ein und bildet ein proteinreiches Netz für Stammzellen und Wachstumsfaktoren aus der direkten Umgebung der Wurzelspitze (28,31). Diese Methode der Regeneration erweist sich jedoch als schlecht vorhersehbar. Das neu gebildete Gewebe ist nicht immer von pulpaler Herkunft, da Stammzellen der apikalen Papilla oder des parodontalen Ligaments ebenfalls einwandern können und zement- oder knochenartiges Gewebe bilden (41).

Um einen nekrotischen Wurzelkanal für die Revaskularisierung vorzubereiten, sind sterile Bedingungen für Stammzellen unumgänglich. Dafür ist eine antibiotische Einlage (Metronidazol, Ciprofloxacin, Minoxicyclin) (32,42) von großer Bedeutung. Neben dem wichtigen Effekt der Reinigung des Wurzelkanals, haben diese Antibiotika jedoch bei einer kritischen Konzentration von 100mg/ml einen negativen Einfluss auf die Vitalität (Vitalität <20%) dieser Stammzellen (42). Andere Nachteile wie die Verfärbung der Zähne oder die Obliteration des Wurzelkanals konnten gezeigt werden und sind ebenfalls Faktoren um weitere Forschung an anderen Methoden für die Regeneration der Pulpa zu betreiben (28,41).

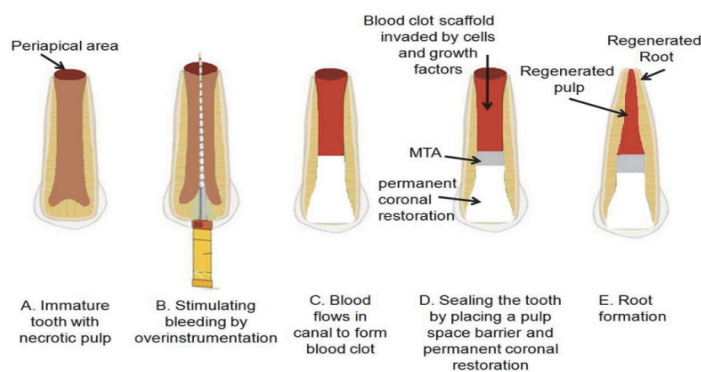


Abbildung 7 Regenerative Endodontie: Revaskularisierung. (A) Zahn mit unvollendetem Wurzelwachstum und nekrotischer Pulpa. (B) Reinigung des Wurzelkanals und Überinstrumentalisierung, um Blutung zu induzieren. (C) Einströmen von Blut und Bildung eines Blutkoagels. (D) Zellen und Wachstumsfaktoren dringen in die natürlich gebildete Trägermatrix ein, Abdeckung mit einem Mineral Trioxid Aggregat (MTA) und koronaler Verschluss. (E) Ausbildung der Wurzelspitze. Abbildung entnommen aus (44).

Anforderungen an Trägermatrizen

Die ideale Trägermatrix für die Pulpa-Dentin Regeneration sollte aus einem biokompatiblen Material bestehen, um keine Immunreaktion oder Entzündungen auszulösen. Um die Anwendung und Handhabung zu erleichtern, ist die Applikationsart eine wichtige Komponente. Die ideale Trägermatrix sollte einfach und unkompliziert in den Wurzelkanal appliziert werden können. Für diesen Fall, gibt es bereits Studien mit injizierbaren Strukturen wie zum Beispiel Hydrogele (28,43).

Eine biokompatible, dreidimensionale, poröse, nanofibröse, Matrix dient Stammzellen als Schutz- und Leitstruktur, beherbergt Nährstoffe und erleichtert Signalwege. Sie sollen es Zellen ermöglichen, aufgrund ihrer Oberflächenstruktur (negative Oberfläche etc.), sich anzuheften ihre typische Fibroblasten-ähnliche Morphologie zu behalten, sich zu vermehren und in die gewünschte Zielzelle zu differenzieren, um die Gewebsneubildung zu erleichtern. Nach Ausbildung der Zielstruktur, sollte eine ideale Trägermatrix resorbierbar und abbaubar sein, um dem neuen Gewebe den benötigten Platz zur Verfügung zu stellen und um keine Fremdkörperreaktion auszulösen (43). Für die Regeneration der Pulpa sind bisher einige verschiedene Materialien von Gerüsten untersucht worden: Natürlich vorkommende oder synthetisch hergestellte Polymere oder Hydrogele (11,28).

Polymer-Trägermatrizen für die Pulparegeneration

Ein Polymer ist ein aus mindestens drei Monomeren aufgebautes Makromolekül. Für die Pulparegeneration werden natürliche oder synthetische Polymere angewendet.

Ein synthetisches Polymer ist ein Polymer, welches industriell durch ein Polymerisationsverfahren hergestellt wird. Für die Pulparegeneration sind bisher mit Polylactid-Säure (PLA), Polyglykolsäure (PGA) oder Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) einige Versuche durchgeführt worden. Diese Polymere sind von der Food and Drug Administration (FDA) für die Verwendung im medizinischen und wissenschaftlichen Bereich genehmigt worden (39) und sind viel erforschte Materialien im Bereich des Tissue Engineerings.

Huang et. al haben humane dentale Pulpastammzellen und Stammzellen der apikalen Papilla isoliert, auf eine Poly-D, L-Lactid und Glycolid-Matrix (PLG-Matrix) gesetzt (siehe Abbildung 8). Die Matrix mit den Stammzellen wurde in ein Zahnwurzelfragment eingesetzt und in ein immunkomprimiertes Maus-Modell transplantiert. Das Ergebnis war ein Pulpa-ähnliches, gefäßreiches Gewebe mit einer dünnen Schicht von Dentin-ähnlichem Hartgewebe, welches durch Odontoblasten-ähnliche Zellen produziert wurde (44).

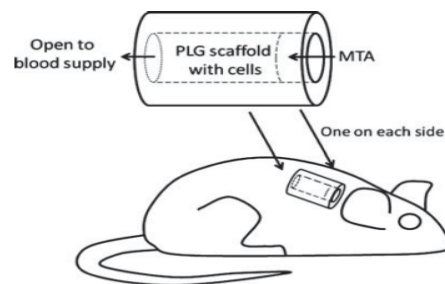


Abbildung 8 Aufbau des immunkomprimierten Maus-Modell mit subcutan transplantiertem Zahnwurzelfragment, welches eine PLG- Matrix beladen mit dentalen Pulpastammzellen und Stammzellen der apikalen Papilla beinhaltet. Das Wurzelfragment wurde an einer Seite mit MTA (Mineral Trioxid Aggregat) verschlossen. Zur Pulpa-Dentinkomplex Regeneration (44). Abbildung entnommen aus (44).

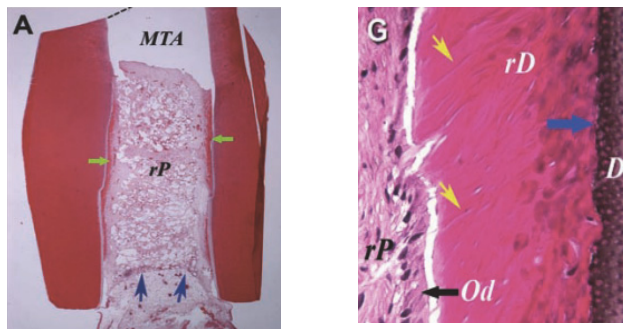


Abbildung 9 Histologische Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin Färbung von einem *in vivo* Modell für Pulp/Dentin Regeneration. Stammzellen der apikalen Papilla (SCAP) und dentale Pulpastammzellen (DPSC) werden zusammen auf eine PLG-Matrix gesetzt und mit einem Zahnwurzelfragment subcutan in ein immunsupprimiertes Maus-Modell transplantiert. An einer Seite wurde das Wurzelfragment mit MTA (Mineral Trioxid Aggregat) verschlossen. Nach drei Monaten ist eine neue Pulpa-Matrix (rP-regeneriertes Pulpa-ähnliches Gewebe), welche von Odontoblasten-ähnlichen Zellen (Od) produziert wurde und ein Dentin-ähnliches Gewebe (rD-regeneriertes Dentin), über der originalen Dentinschicht (D) nachweisbar (44). Abbildung entnommen aus (44).

Bottino et al. stellten dreidimensionale Nanokomposite aus Polydioxanon (PDS), ein synthetisches Polymer mit Halloysit- Aluminiumsilikat Nanoröhrchen (Halloysit-Aluminiumsilikat Nanotubules, HNT) aus Tonmineralien her. Das Lumen des HNT-Nanoröhrchens wurde zuvor mit Antibiotika (Tetrazyklin) beladen und durch die Methode des Elektrosplinnings (43) mit dem Netzwerk aus Polydioxanon (PDS) zusammengefügt. Es wurde gezeigt, dass diese 3D- Trägermatrix durch die Zugabe von HNT-Mineralien, die mechanischen Eigenschaften der Matrix verbessert hat und die Antibiotika-Freigabe kontinuierlicher ablief. Dadurch konnten die Stammzellen geschont und trotzdem die notwendige Bakterienfreiheit geschaffen werden. Zusätzlich konnte die Zelladhäsion und -proliferation von dentalen humanen Pulpastammzellen angeregt werden (45).

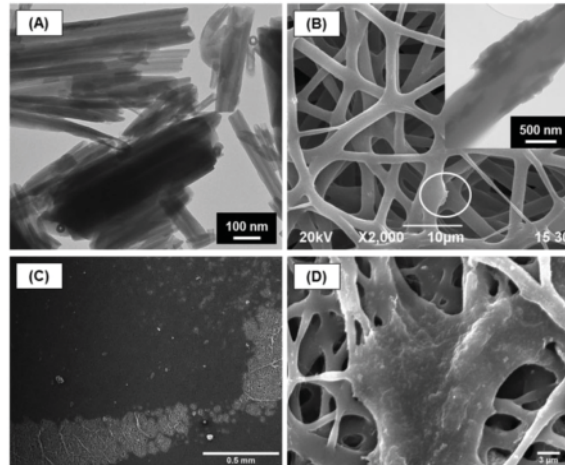


Abbildung 10 Aufnahmen von synthetischen Polymeren Nanokompositen aus Polydioxanon (PDS) mit inkorporierten Aluminiumsilikat Nanoröhrchen zur Verbesserung der mechanischen Eigenschaften der Matrix. (A): eine Transmissionselektronenmikroskopie-Aufnahme von Aluminiumsilikat- Halloysite Nanoröhrchen (HNT). (B): Rasterelektronenmikroskopie- Aufnahme von Halloysite Nanoröhrchen inkorporiert in ein Polydioxanon-Polymernetzwerk. (C+D): Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen von der Interaktion zwischen humanen dentalen Fibroblasten mit Polydioxanon Polymernetz mit inkorporierten Halloysite-Aluminiumsilikat Mineralien (45). Abbildung entnommen aus (45).

Zu den natürlichen Polymeren, welche für die Regeneration der Pulpa eingesetzt wurden, zählen das Kollagen, Chitosan oder Gelatine.

Kollagen ist ein Faserprotein, welches überall im Körper vorkommt und ein wesentlicher extrazellulärer Bestandteil der dentalen Pulpa ist. Kollagen ist daher biokompatibel und schafft somit eine vorteilhaft natürliche Umgebung für dentale mesenchymale Stammzellen und kann als Transportmaterial für Wachstumsfaktoren oder Medikamente eingesetzt werden. Ein weiterer Vorteil von Kollagen als Trägermatrize ist die Fähigkeit von Kollagenfibrillen, die sich bei neutralem pH-Wert, selbst zu gebündelten Kollagenfasern organisieren, welche eine injizierbare Hydrogel Matrix formen. So ist die Anwendbarkeit und Verarbeitungsmöglichkeit von Kollagen im Bereich des Tissue Engineerings erleichtert. Dieser Vorteil führt jedoch zu einer geringen mechanischen Stabilität von Kollagen als Hydrogel Trägermatrize. Um die Stabilität zu erhöhen und die Abbaukinetik zu regulieren, werden Vernetzungsmittel wie Glutaraldehyd oder Matrixmetalloproteinase-7 (MMP-7) hinzugefügt und die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix näher zu imitieren (46). Mit Kollagen als eine Hydrogel-Matrix ist es Forschern gelungen mit dentalen Stammzellen eine geeignete dreidimensionale Matrix zu

bilden, welche der natürlich vorkommenden extrazellulären Matrix ähnelt und eine gute Leitstruktur für die Stammzell-Differenzierung und Mineralisation darstellt (47).

Chitosan ist ein natürlich vorkommendes Biopolymer, welches aus Chitin abgeleitet wird. Es wird im Bereich der regenerativen Medizin in vielen Fällen als experimentelle Matrix für Stammzellen eingesetzt. Die Abbauprodukte sind nicht toxisch oder allergen und somit ist Chitosan als biokompatibel anzusehen. Der Abbauprozess kann durch Enzyme, wie Lysozym reguliert werden und ist ebenfalls ein Vorteil in der Anwendung als Trägermatrix (46). Chitosan löst sich nur im sauren Milieu. Diese Eigenschaft erschwert die Herstellung eines Gels. Durch die Zugabe von Glycerol-2-Phosphat (β -GP) ist die Herstellung eines injizierbaren Hydrogels möglich, da der pH-Wert von sauer auf neutral modifiziert werden kann. Nachteile von Chitosan sind die fragliche Zellverträglichkeit (48) und die komplexere Herstellung eines Chitosan- Gels als Trägermatrix (46).

Gelatine ist ein denaturiertes Protein und entsteht durch die Hydrolyse, also den Abbau von Kollagen. Vorteilhaft für die Anwendung als Trägermatrix sind die eingebauten RGD-Sequenzen, jene Aminosäure-Sequenzen, welche die Zellbindung erleichtert (46). Zusätzlich verfügt Gelatine über Matrixmetalloproteinasen-Bindungsstellen, welche den biologischen Abbau möglich macht. Bei einer Temperatur von 37 °Celsius findet die Sol-Gel Transformation statt und Gelatine verwandelt sich in ein injizierbares, im Bereich des Tissue Engineerings als Trägermatrizen anwendbares, Medium (46).

Synthetische Polymere vs. natürliche Polymere für die Pulparegeneration

In einer Pilot-Studie von *Leong et al.* wurde Kollagen Typ 1 mit einer synthetischen Poly(lactid-Co-Glykolid Säure (PLGA), beide beladen mit verschiedenen Antibiotika, verglichen und die Biokompatibilität von humanen dentalen Pulpastammzellen getestet. Es konnte gezeigt werden, dass dentale Pulpastammzellen auf einer Kollagen-Matrix unter dem Lichtmikroskop gesünder und vitaler wirkten als im Vergleich zu den Zellen auf dem synthetischen Polymer (PLGA). Zusätzlich zeigten Zellen auf dem synthetischen Polymer Zeichen von Degeneration und Apoptose (49).

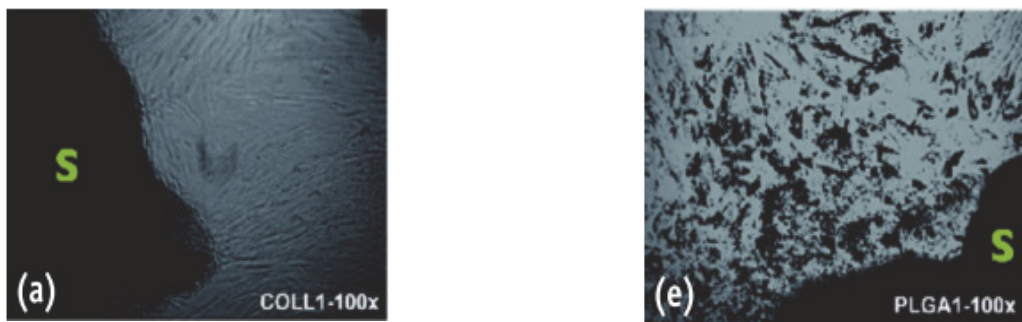


Abbildung 11 Lichtmikroskopische Aufnahmen von humanen dentalen Pulpastammzellen. (a): Zeigt dentale Pulpastammzellen auf einer Kollagen Typ 1 Matrix (S:Scaffold). Ihre Morphologie erscheint gesünder, da sie sich spindelförmiger darstellen. (e): Zeigt humane dentale Pulpastammzellen auf einer Poly(lactid-Co-Glykolid Säure Matrix (S: Scaffold). Hier erscheinen sie wesentlich dichter bei einander und es gibt Zeichen von Degeneration und Apoptose der Zellen (49). Abbildung entnommen aus (49).

3.2.8 Wachstumsfaktoren der Pulparegeneration und die Methode der zellfreien Regeneration des Pulpa-/Dentin Komplexes

Zu den Wachstumsfaktoren der Pulparegeneration zählen Bone Morphogenic Proteins (BMPs), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Nerve Growth Factor (NGF) (50). Diese Signalmoleküle haben eine chemotaktische, mitogene, angiogene Wirkung. Speziell BMP-2, -4, -7 weisen zusätzlich eine osteogene, dentinogene und zementogene Wirkung auf. Diese Signalmoleküle sind eine Untergruppe der Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Familie. Sie wirken über den TGF- β -Signalweg und können so die Zellproliferation, -differenzierung, sowie eine antiinflammatorische Wirkung induzieren (51).

Da die Zelltransplantations-Methode (zellfreie Methode) mit hohen Kosten verbunden ist und einige Risiken wie Kontamination, Infektionsübertragung, hohe Kosten etc. hat, gibt es ein Interesse an der Forschung für zellfreie Methoden für die Regeneration von Dentin-/Pulpagewebe. Für die zellfreie Methode („cell homing“) der Pulpa-/Dentinregeneration wird eine Kollagen-Gel Matrix mit chemotaktischen Signalmolekülen beladen und in die Defektstelle appliziert, um Stammzellen zu rekrutieren, sich zu proliferieren, zu differenzieren und Dentin- oder Pulpa-ähnliches Gewebe zu produzieren (siehe **3.1.6 Methoden**) (16,52).

3.3 Trägermatritzen

Eine Trägermatrix ist ein dreidimensionales, strukturverleihendes Medium, welches in vitro zur Proliferation und Differenzierung von Stammzellen im Gebiet des Tissue Engineerings und Regenerativen Medizin angewendet werden kann. Sie dient als funktionelle Schutz- und Leitstruktur für Zellen und Wachstumsfaktoren, ähnlich wie eine extrazelluläre Matrix. Um Stammzellen den Sauerstoff und die benötigten Nährstoffe zu liefern oder Medikamente zu Verfügung zu stellen, kann eine Trägermatrix ebenfalls als Transporter dienen (11,53,54).

3.3.1 Anforderungen und Voraussetzungen von Trägermatritzen

Porosität

Damit Zellen wachsen und sich vermehren können, ist eine gute Vaskularisierung, Flüssigkeits- und Nährstofftransport unerlässlich. Um diesen Austausch gewährleisten zu können, ist die Porengröße einer Trägermatrize von großer Bedeutung. Da die durchschnittliche Zellgröße einer Stammzelle in etwa 100 μm beträgt, ist eine Porengröße von $> 100\mu\text{m}$ notwendig, um Zellmigration, -adhäsion und -proliferation zu erleichtern (55). Um das Einsprossen von Blutgefäßen des Hostgewebes oder die Bildung neuer Gefäße zu ermöglichen, ist eine Porengröße $>400\mu\text{m}$ im Durchmesser notwendig (9,56). Bei einer Porengröße $>50\mu\text{m}$ (Makroporosität) ist das Einwachsen von Blutgefäßen erleichtert, der Nährstofftransport gewährleistet und somit die neue Gewebbildung ermöglicht (56).

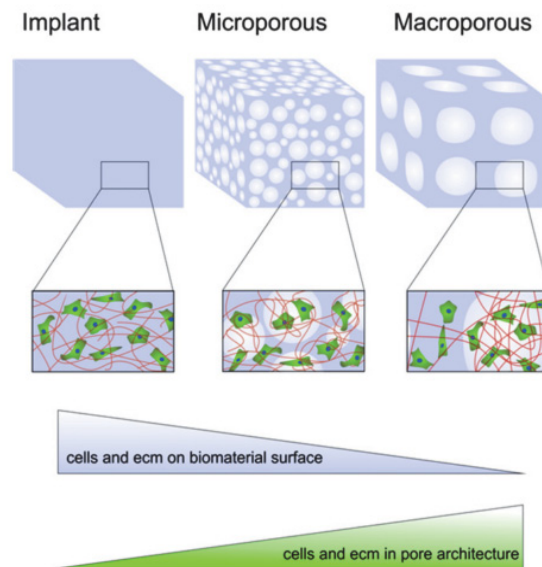


Abbildung 12 Vergleich von Mikroporosität ($<10\ \mu\text{m}$) und Makroporosität ($>50\ \mu\text{m}$) einer Trägermatrize. Durch die vergrößerte Oberfläche einer mikroporösen Matrize, wird die Zelladhäsion erleichtert. Makroporöse Matrizen haben größere Öffnungen, können daher mehr Volumen aufnehmen und erleichtern das Einwachsen von Geweben und Blutgefäßen (55). Abbildung entnommen aus (55).

Biokompatibilität und biologische Abbaubarkeit

Eine Matrix ist dann biokompatibel, wenn sie keine Immunreaktion oder Fremdkörperreaktion auslöst (9,57). Synthetisch abbaubare Polymere, wie zum Beispiel Polyglycolsäure (Polyglycolic Acid, PGA), Poly(lactid-co-glycolid (PLGA), Polymilchsäure (Polylactid Acid, PLA) sind Polyester und werden über den Prozess der Hydrolyse in ihre Abbauprodukte (Milchsäure und Glykolsäure) aufgespalten und abgebaut (55). Wichtig ist hierbei, dass diese Abbauprodukte biokompatibel, nicht toxisch sind und keine Immun- oder Fremdkörperreaktion auslösen (58).

Mechanische Stabilität und kontrollierbarer Abbau

Während der Neubildung von Gewebe und Wundheilung ist die Trägermatrix *in vivo* gewissen Zug- und Kontraktionskräften ausgesetzt. Daher soll eine ideale Trägermatrix initial fest und mechanisch stabil sein und eine dreidimensionale Struktur aufweisen. Mit diesen Eigenschaften imitiert sie den Aufbau einer extrazellulären Matrix und liefert somit gute Voraussetzungen für die Stammzellanhaftung, -proliferation und -differenzierung (7). Um dem neugebildeten Gewebe genügend Platz zu schaffen, ist der gleichzeitige und kontrollierbare Abbauprozess der Trägermatrix essentiell. Die Abbaukinetik der Trägermatrix kann, wenn nötig durch den Einbau von proteolytischen Enzymen, wie

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) modifiziert werden. MMPs bauen Kollagen und andere extrazelluläre Bestandteile ab (53,59).

Zusätzlich sollte zwischen Hart- und Weichgewebsregeneration und ihrer unterschiedlichen Ansprüche unterschieden werden. Es ist vorteilhaft für die Wiederherstellung von mineralisiertem oder nicht-mineralisiertem Gewebe, eine entsprechende Trägermatrix für die Stammzellen zu verwenden. Materialien wie Keramik oder Hydroxylapatit sind eher geeignet für hoch mineralisierte Gewebearten, wie Knochen oder Dentin, sowie Polymere oder Hydrogele für die Weichgewebsregeneration, wie Pulpa oder Gingiva (53).

3.3.2 Hydrogele

Hydrogele sind hydrophile, dreidimensionale Netzwerke und können aus unterschiedlichen Materialien durch Hinzufügen eines Lösungsmittels oder Wasser hergestellt werden. Im Bereich des Tissue Engineerings werden Hydrogele meist aus natürlich vorkommenden und synthetisch hergestellten Polymeren oder Tonmineralien erzeugt. Die Gel-Bildung, also die Transformation von einem wenig viskösen Sol zu einem hoch viskösen Gel, kann durch Veränderungen der umliegenden Faktoren, wie Temperatur, pH-Wert oder Elektrolytgehalt des Lösungsmittels, beeinflusst werden (46).

Einteilung von Hydrogelen

Hydrogele können nach Art der Quervernetzung ihrer Polymere in physikalisch- oder chemisch-quervernetzende Hydrogele eingeteilt werden (46).

Physikalisch quervernetzte Hydrogele werden durch Wasserstoffbrückenbindung, Ionenbindung oder Temperatur-Induzierung zusammengehalten. Durch Veränderung von pH-Wert, Temperatur oder Ladung (Ionen) der äußeren Umgebung oder durch Menge der Polymere, kann die Viskosität von Hydrogelen beeinflusst werden (46,60).

Chemisch-quervernetzte Hydrogele sind durch kovalente Bindungen verbunden. Zwischen kovalent verbundenen Atomen wirken stärkere Kräfte als bei physikalisch-quervernetzten Bindungen, was dieser Art von Hydrogelen eine höhere Stabilität verleiht und sie resistenter gegen äußere Bedingungen, wie Temperatur, Ladung oder pH-Wert macht (46).

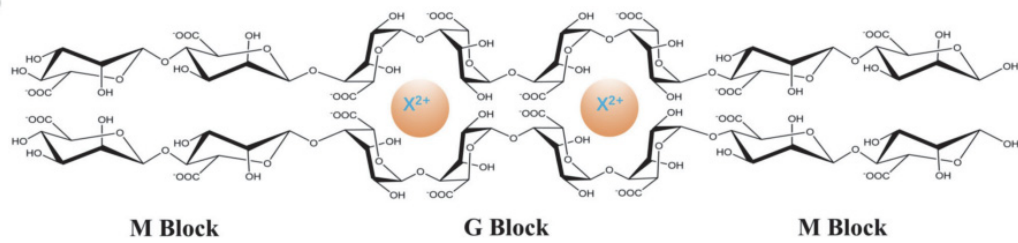


Abbildung 13 Molekularer Aufbau eines physikalisch quervernetzten Hydrogels durch Ionenbindung. Abbildung entnommen von Chang et al. (46). Abbildung entnommen aus (46).

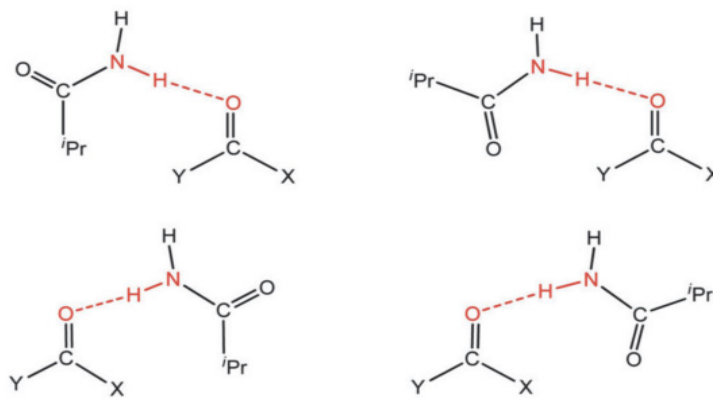


Abbildung 14 molekularer Aufbau eines physikalisch vernetzten Hydrogels durch Wasserstoffbrückenbildung. Abbildung entnommen von Chang et al. (46). Abbildung entnommen aus (46).

Eigenschaften und Anforderungen von Hydrogelen

Um aus Zellen und Trägermatrizen ein neues Gewebe herzustellen, versucht man Trägermatrizen zu verwenden, welche den Eigenschaften einer extrazellulären Matrix ähneln (53). Hydrogele weisen einige dieser Anforderungen auf. Da sie bis zu einem Vielfachen ihres eigenen Trockengewichts Wasser absorbieren können, entstehen reversible dreidimensionale Netzwerke (60). Diese Struktur und Form verleihende Eigenschaft verschafft Zellen eine Umgebung, um sich fest zu halten, zu vermehren und zu differenzieren (53). Hydrogele aus natürlichen Polymeren, wie zum Beispiel Kollagen oder Alginat weisen diese Eigenschaft auf und ähneln damit der extrazellulären Matrix (60).

Bindungen zwischen den einzelnen Polymeren können beliebig oft aufgebrochen und wieder neu gebildet werden. Diese Reversibilität ermöglicht eine einfache Anwendbarkeit

und Handhabung *in vitro*, sowie *in vivo* (60). Stammzellen, Medikamente oder Wachstumsfaktoren werden auf das Gel gesetzt oder inkorporiert und durch Injektion mittels einer Spritze, an schwer zugängliche Stellen, wie zum Beispiel der kleine irregulär verlaufende Wurzelkanal appliziert. Zusätzlich ist durch diese minimal invasive Anwendung das Infektionsrisiko vermindert (46). Die gute Injizierbarkeit von Hydrogelen ist durch den Prozess der Sol-Gel Transformation („Gelation“) zu begründen. Idealerweise soll ein Hydrogel vor der Anwendung flüssig sein (Sol), um es durch eine Spritze zu injizieren und sich nach der Applikation, *in situ* zu einer starren Gel-Matrix verformen (46,61). Dieser „Gelationsprozess“ sollte kontrollierbar ablaufen, da bei zu schnell verlaufender Gel-Bildung die Diffusion erschwert wird und somit die Zellaktivität abnimmt (46,60). Durch Variierung des pH-Wertes oder der Temperatur kann der Prozess der Sol-Gel Transformation beeinflusst und somit kontrollierbar gemacht werden (46,61).

Wichtig ist, dass alle Komponenten eines Hydrogels und vor allem die chemischen Zusatzstoffe biokompatibel und nicht toxisch sind, um die Vitalität der Zellen oder des umliegenden Gewebes nicht zu gefährden. Natürliche Polymere wie Kollagen, Alginate oder Chitin und synthetische Polymere wie PLA, PEG und PLGA sind von der Food and Drug Administration (FDA) genehmigt und für die Herstellung von Hydrogelen viel geforschte Materialien (46,60).

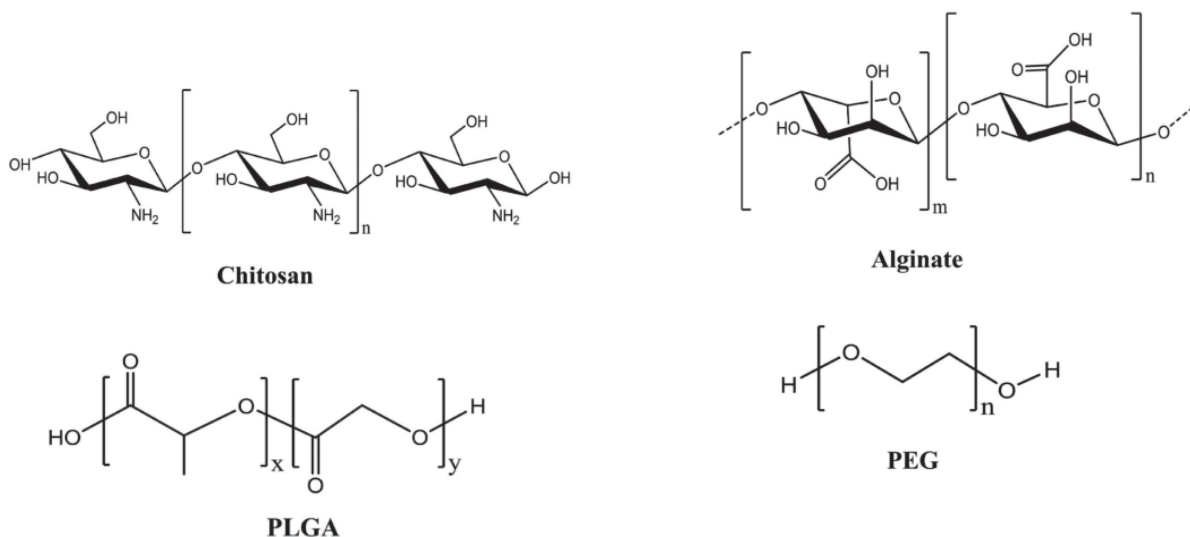


Abbildung 15 Strukturformeln der Moleküle, welche zur Erzeugung von natürlichen oder synthetischen Polymeren und weiter zu Hydrogel-Herstellung verwendet werden. Abbildung entnommen aus (47).

Modifikationen von Hydrogelen aus Polymeren

Hydrogele sind biokompatible, gewebeschonende, hydrophile, injizierbare und einfach anwendbare Materialien, welche bereits vielfältig im Bereich des Tissue Engineerings eingesetzt wurden. Trotz der vielen Vorteile und erfüllenden Anforderungen als Trägermatrix, weisen Hydrogele, aufgrund ihrer elastischen und dynamischen Konsistenz eine reduzierte Stabilität auf (46,62). Dies ist durch schwache Wasserstoffbrückenbildungen oder elektrostatische Anziehungskräfte (siehe Abbildung 13 und Abbildung 14), welche die einzelnen Moleküle eines Gels zusammenhalten, zu begründen.

Eine gewisse Stabilität für den Schutz von den inkorporierten Zellen ist für die Überlebensrate und Zellaktivität unumgänglich. Die mechanische Stabilität von Hydrogelen ist abhängig von der Festigkeit und Länge der Polymer-Ketten, den Typen und der Anzahl von Quervernetzern (46,60). Durch die Zugabe von anorganischen Keramik-Partikel, wie β -Tricalciumphosphat (β -TCP) oder Hydroxylapatit (HA), kann die Stabilität eines Hydrogels verbessert werden (62). Durch Zugabe von Metall-Ionen (Ca^{2+} , Zn^{2+} etc.) wird die Permeabilität eines Hydrogels beeinflusst. Somit ist die Freisetzung von inkorporierten Partikeln (Zellen, Wachstumsfaktoren, Medikamente) steuerbar (63).

Da Hydrogele aus synthetischen Polymeren wenig Stellen für die Zelladhäsion aufweisen, ist es durch die Zugabe von RGD- (Arginin, Glycin, Asparaginsäure-Sequenz) Peptide, Oberflächenrezeptoren (CD44, CD168) (64) oder Fibronectin möglich, die Zelladhäsion zu verbessern (64).

Hydrogele werden durch Hydrolyse oder enzymatische Spaltung in ihre Einzelteile zerlegt und abgebaut. Idealerweise findet dieser Abbauprozess gleichzeitig mit dem Prozess der neuen Gewebekonstruktion statt, um die inkorporierten Substanzen freizusetzen und Platz für das neu gebildete Gewebe zu schaffen (46). Durch Veränderung von Temperatur oder pH-Wert kann der Abbauprozess gesteuert und kontrollierbar gemacht werden. Viele Faktoren, welche ein Hydrogel stabiler machen, verlangsamen die Abbau- bzw. Hydrolyserate eines Hydrogels. Je höher die Anzahl der Quervernetzer oder der eingebauten inorganischen Materialien sind, oder je hydrophober oder poröser ein Hydrogel ist, desto langsamer ist seine Hydrolyserate (46).

Beispiele von Hydrogelen für Pulpa- und Dentinregeneration

Hydrogele als Trägermatrizen oder Transportmittel bilden, aufgrund ihrer Injizierbarkeit und der damit verbundenen einfachen Anwendung *in vitro* sowie klinischen Applikation in schwer erreichbare Stellen (irregulärer Wurzelkanal) im Bereich des Tissue Engineerings und Pulparegeneration, eine interessante Sparte (46). Sowohl natürliche Polymere wie Kollagen oder Fibrin, als auch synthetische Polymere wie Puramatrix™ (65), ein nanofibröses Peptid-Hydrogel wurden für die Pulparegeneration bereits getestet. Es konnte sowohl die Zellvitalität und -differenzierung (66), als auch die Angiogenese (65) im Wurzelkanal mit dentalen Pulpastammzellen induziert werden.

Huang hat Kollagen als Hydrogel-Trägermatrix und eine PLG (Poly-D,L-Lactid und Glycolid)- Matrix miteinander verglichen. Er konnte feststellen, dass Kollagen mit dentalen Pulpastammzellen (Dental Pulp Stemcells, DPSC) kontrahiert und dadurch die Differenzierung zu Dentin-ähnlichen Zellen nicht gegeben war (67). Im Vergleich wurde beobachtet, dass sich dentale Pulpastammzellen auf einem PLG-Gel zu Odontoblasten-ähnlichen Zellen entwickeln und nach vier Monaten vaskularisiertes Pulpa-ähnliches Gewebe produzierten (67).

Eine neue Sparte für die Herstellung von Hydrogelen bilden Tonmineralien. Tonmineralien können Medikamente oder Zellen aufnehmen oder sich mit Polymerketten verbinden. Dadurch wird der Transport von Medikamenten, sowie die Bereitstellung von Stammzellen verbessert und zusätzlich erhöhen sie die mechanische Stabilität von anderen Trägermatrizen. Diese Eigenschaften machen Tonmineralien zu einer interessanten Sparte in der Herstellung oder Modifikation von Trägermatrizen im Bereich des Tissue Engineerings (68–70).

LAPONITE[®], ein synthetisches Schichtsilikat aus Silizium-, Magnesium-, Lithium- und Natriumsalzen ist ein neuer, noch nicht viel geforschter Vertreter dieser Gruppe (68,71). Die einzelnen Nanopartikel haben eine große Gesamtoberfläche ($> 350 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) und bilden in Wasser gelöst, scheibenförmige, negativ geladene Partikel und formen ein makroporöses Hydrogel (68,69).

3.4 LAPONITE[®]

LAPONITE[®] ist ein Schichtsilikat aus natürlich vorkommenden Tonmineralien. Das synthetisch hergestellte LAPONITE[®]-Pulver besteht aus Natrium-, Silizium-, Magnesium- und Lithium-Salzen ($\text{Na}^{+0.7} [(\text{Si}_8 \text{Mg}_{5.5} \text{Li}_{0.3}) \text{O}_{20} (\text{OH})_4]^{-0.7}$) (71). Das Präzipitat wird in destilliertem Wasser gelöst und das Ergebnis ist eine farblose, hochviskose Dispersion (siehe Abbildung 17). Je höher die Konzentration des Pulvers ist, desto höher ist auch die Viskosität des Gels. Eine Mindestkonzentration von 3% Kolloidanteil, ist notwendig um eine gelförmige Struktur zu erhalten (71). Die einzelnen, in Wasser gelösten LAPONITE[®]-Kristalle sind scheibenförmig, haben eine negativ geladene Oberfläche und einen positiv geladenen Rand, welche Interaktionen zwischen Polymeren, Zellen oder Medikamenten ermöglichen (71).

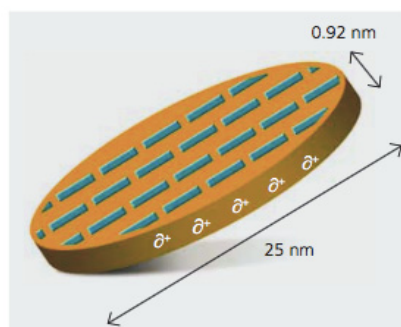


Abbildung 16 Abbildung eines einzelnen LAPONITE[®]-Kristalls. In Wasser gelöst bildet Laponite scheibenförmige Kristalle mit einer negativ geladenen Oberfläche (69). Abbildung entnommen aus (69).

3.4.1 Herstellung von einem LAPONITE[®]-Hydrogel

Durch die Vermengung von LAPONITE[®]-Kolloiden mit Wasser, lagern sich die Wassermoleküle zwischen die positiv geladenen Natrium-Ionen und gehen eine Verbindung ein. Dadurch entsteht der schichtartige Aufbau des Hydrogels mit einer negativ geladenen Oberfläche (71). Wird die primäre Dispersion erneut mit destilliertem Wasser verdünnt, entsteht ein farbloses, makroporöses, thixotropes dreidimensionales Gelnetzwerk.

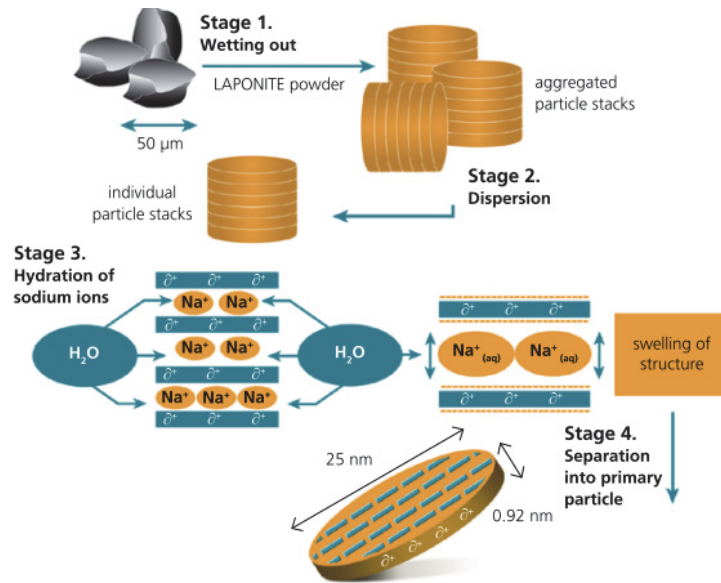


Abbildung 17 LAPONITE® Hydrogel Herstellung (71). Abbildung entnommen aus (71).

3.4.2 Eigenschaften und Vorteile von einem LAPONITE®-Hydrogel als Trägermatrix für das Tissue Engineering

Thixotropie

Thixotropie beschreibt die Abhängigkeit der Viskosität von mechanischer Krafteinwirkung. Während der Dauer der Scher- oder Schubkrafteinwirkung kommt es zur Transformation von Gel zu Sol (Viskosität vermindert sich). Nach Beendigung der Krafteinwirkung kommt es zur Wiederherstellung des Ausgangszustandes (Sol zu Gel) (71). Aufgrund der thixotropen Eigenschaft ist es möglich ein LAPONITE®-Hydrogel durch eine Injektionsnadel zu drücken (Gel zu Sol Transformation), welches sich nach Applikation wieder in eine gelartige Matrix (Sol zu Gel Transformation) verwandelt (69).

LAPONITE®-Hydrogel kann daher zu den reversibel, durch Ionenbindung quervernetzten Hydrogelen gezählt werden (46). Aufgrund der reversibel thixotropen Eigenschaft lässt sich LAPONITE®-Hydrogel einfach verarbeiten und an schwer erreichbare Stellen (kleiner, irregulär verlaufender Wurzelkanal) applizieren. In Folge dessen erweist sich ein Hydrogel aus LAPONITE®-Tonmineralien zu einer vorteilhaften Substanz zur Herstellung einer Trägermatrix im Bereich der Pulpa-/Dentin-Regeneration.

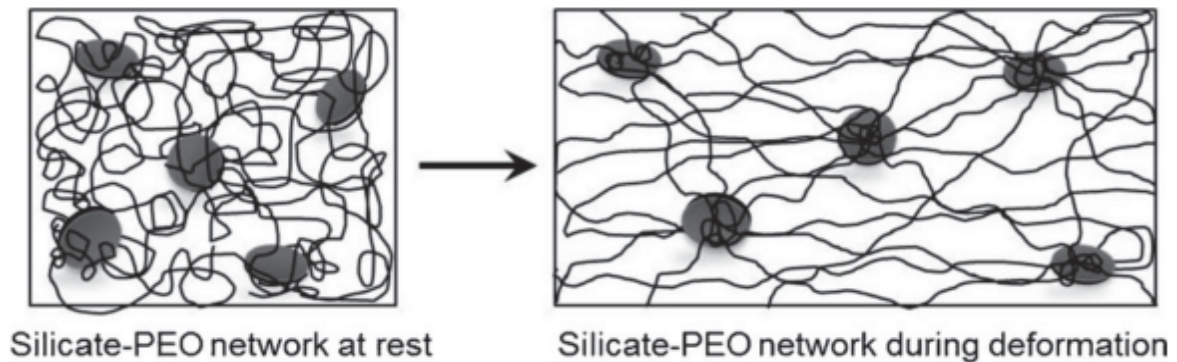


Abbildung 18 LAPONITE® -modifizierte, thixotrope Polyethylenoxid (PEO)- Polymer Matrix. Die Silicate nehmen in Ruhe die Polymerketten auf (Gel-Netzwerk Bildung) und geben sie unter Krafteinwirkung wieder ab (Sol-Bildung). Abbildung entnommen aus (74).

Quervernetzer für eine verbesserte mechanische Stabilität

Eine poröse Polymer-Matrix verbessert die Zelladhäsion und es konnte in mehreren Studien eine gute Zelldifferenzierung nachgewiesen werden (56). Je poröser eine Matrix jedoch ist, desto schwächer wird die Zug- bzw. Druckfestigkeit einer Matrix (68). Polymer-Hydrogele haben einen hohen Wassergehalt und sind wenig stabil gegenüber äußeren Kräften (68). Die LAPONITE®-Kristalle können sich, aufgrund ihrer negativ geladenen Oberfläche mit den Polymerketten einer Matrix verbinden und sogenannte „Nanokomposit-Hydrogele“ bilden (68). Sie legen sich als Quervernetzer zwischen die Polymerketten und stabilisieren diese, indem sie, die auf die Matrix einwirkenden Scherkräfte entschärfen (72). Somit wird die Zug-Druckfestigkeit sowie die Elastizität von Polymeren verbessert (68).



Abbildung 19 Modifikation von Polymeren mit Tonmineralien. Aufgrund der Schichtstruktur der einzelnen Kristalle wird eine Verbindung zwischen Polymerketten und den Tonmineralien möglich und die mechanische Stabilität und Belastbarkeit der Matrizen kann verbessert werden. Abbildung entnommen aus (70).

Verbindungen mit Biomolekülen und Zellen

Die Schichtsilikat-Tonminerale des LAPONITE[®]-Hydrogels fächern sich während der Gel-Bildung in Wasser auf. In diesem Zustand erhöht sich die Mischbarkeit von Tonmineralien mit einem Polymer und Zellen, da zusätzlich vermehrte Zelladhäsions-Stellen entstehen. Während die Matrix dadurch poröser wird, bleibt das Polymer weiterhin stabil und bietet Zellen eine extrazelluläre Matrix-ähnliche Umgebung (68,71).

Gaharwar et al. stellten, mit LAPONITE[®] quervernetzte Polyethylenoxid (PEO)-Polymere her, und untersuchten den Effekt von LAPONITE[®] auf die Zelladhäsion und Zell-Formation. Durch die Zugabe von LAPONITE[®], konnte eine konzentrationsabhängige (siehe Abbildung 20) Verbesserung der Zelladhäsion und Zellverteilung von Prä-Osteoblasten festgestellt werden (72).

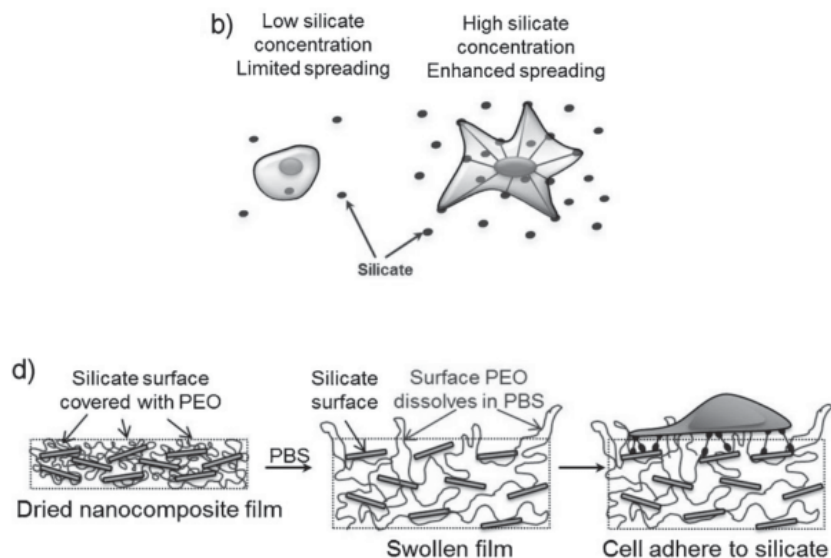


Abbildung 20 LAPONITE[®] modifizierte Polyethylenoxid (PEO)- Polymer Matrix. Effekt auf die Zelladhäsion und Zellformation. Die LAPONITE[®] (Silikat) Partikel gehen im feuchten, aufgefülltem Zustand vermehrt Verbindungen mit den Polymerketten ein und stellen zusätzlich Stellen für die Zelladhäsion zur Verfügung. Positiver Vergleich mit Tissue Culture Polystyrene surface (TCPS) Abbildung entnommen aus (76).

Absorptionsfähigkeit: Aufnahme und Abgabe von Wachstumsfaktoren und Proteinen

Ein essenzieller Faktor für eine ideale Trägermatrize ist, Medikamente, Stammzellen oder Wachstumsfaktoren temporär aufzunehmen, anfänglich als Leit- und Schutzstruktur zu fungieren und sie an die gewünschte Umgebung kontrollierbar abzugeben, um lokale Geweberegeneration zu unterstützen (46). LAPONITE[®]-Tonmineralien neigen dazu, bei tröpfchenweiser Zugabe einer Elektrolytlösung (Zellmedium oder Proteinlösung) auszuflocken und Gelkapseln zu bilden, welche Zellen oder Moleküle einschließen können. Dadurch wird die Absorptionsfähigkeit des Gels erhöht und die Zell- oder Proteinaufnahme verbessert (68,71). Aufgrund der Gel-Kapselbildung ist auch der Abbau der Matrix verlangsamt und die Abgabe der eingekapselten Strukturen wird steuerbar (68).

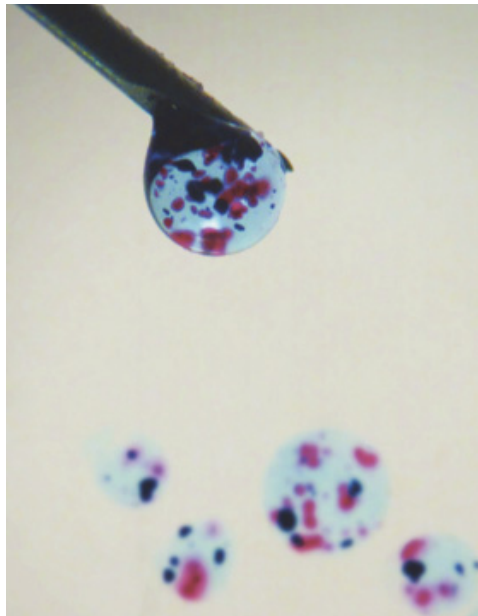


Abbildung 21 Elektrolyt-induzierte Gel-Kapselbildung aus Tonmineralien. Applikation von Gel-Mikrokapseln durch eine Injektionsnadel. Abbildung entnommen aus (72).

3.4.3 Einsatzgebiete von LAPONITE®

Aufgrund der stabilisierenden Eigenschaften und Barriere-bildenden Funktionen, ist LAPONITE® bereits in vielen Alltagsprodukten wie Putzmittel, Kosmetika oder Zahnpasten in Verwendung (71). Zum Beispiel hat Colgate-Palmolive Co. die Verwendung von LAPONITE® in Colgate® Zahnpasta patentieren lassen (73).

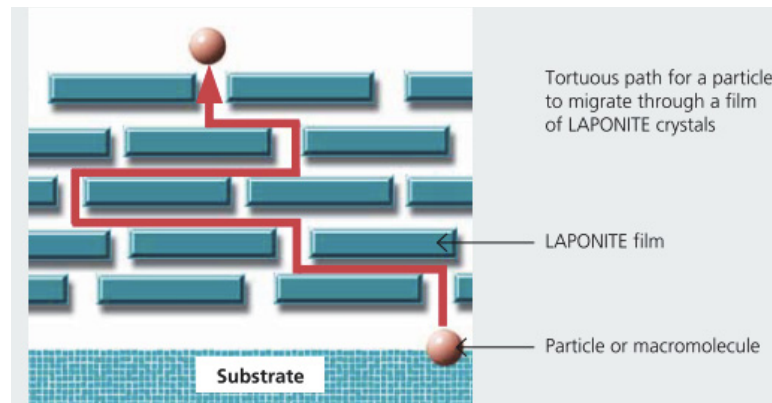


Abbildung 22 LAPONITE®-Film bildet erschwerte Bedingungen für die Durchlässigkeit von Partikeln. Abbildung entnommen aus (71).

3.4.4 Erfolge mit LAPONITE®-Hydrogel im Bereich des Tissue Engineerings

Angiogenese

Eine rasche Neubildung von Gefäßen für die Ausbildung von Anastomosen zwischen den neuen Gefäßen und den Gefäßen des Host-Gewebes ist für die Sauerstoffversorgung und den Nährstofftransport von großer Bedeutung (58).

Dawson et al. konnten eine LAPONITE®-abhängige, verbesserte Gefäßbildung nachweisen. Das LAPONITE®-Gel wurde vor der Besetzung mit humanen Endothelzellen der Vena umbilicalis (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC) in einem Medium mit vaskulärem endothelialen Wachstumsfaktor (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) inkubiert und mit Kollagen als Kontrolle verglichen. Durch die gute Aufnahme und Bereitstellung des Wachstumsfaktors, konnte in der Gruppe mit Kollagen, LAPONITE® und VEGF sowohl eine Zunahme von Gefäßvolumen als auch von der Gefäßzahl beobachtet werden (69).

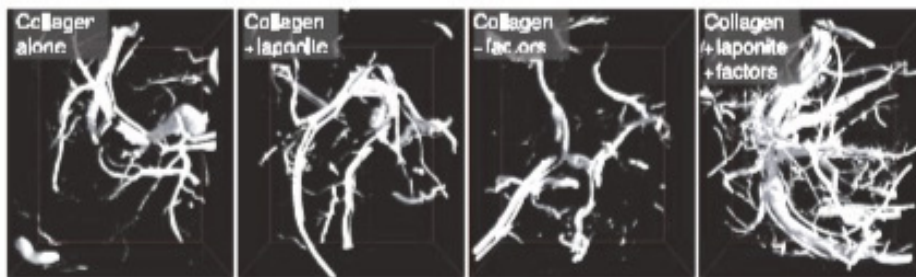


Abbildung 23 Untersuchung von dem Einfluss von LAPONITE[®]-Hydrogel auf Neoangiogenese im Vergleich mit einem reinem Kollagen-Hydrogel. Die Gefäßneubildung konnte in der dreier Kombination (LAPONITE[®], Kollagen, VEGF) am stärksten nachgewiesen werden. Abbildung entnommen aus (69).

Osteogene Differenzierung

Shi et al. beschichteten Glasoberflächen mit einem getrockneten LAPONITE[®]-Film (2,5 mg/ml). Darauf setzten sie humane Knochenmark Stromazellen (human bone marrow stromal cells, HBMSCs), um die Genexpression von Knochenmarkern (Kollagen Typ 1, Osteokalzin, runx2) zu untersuchen. Im Vergleich zu einer unbehandelten Oberfläche konnten ähnliche mRNA Expressionsprofile beobachtet werden (54).

4 Zielsetzung

Eine gesunde Zahnpulpa ist für die Vitalerhaltung eines Zahnes essentiell. Daher ist eine Regeneration des hoch-vaskularisierten und sensibilisierten Gewebes, nach einem Zahntrauma oder Bakterieninvasion, zu erstreben. Die Methode des Tissue Engineerings ist eine vielversprechende Möglichkeit für die funktionelle Erhaltbarkeit und Integration eines Zahnes.

Trägermatrizen sind neben den Zellen und den Wachstumsfaktoren eine der drei Säulen im Bereich des Tissue Engineerings. Für die Wiederherstellung der Zahnpulpa ist es Forschern bereits gelungen aus synthetisch und natürlich vorkommenden Polymer-Trägermatrizen Dentin-ähnliches Gewebe und Gefäße wiederherzustellen. Jedoch ist aufgrund dieses komplexen Systems aus Weich- und Hartgewebe noch keine ideale Trägermatrix gefunden worden.

LAPONITE[®]-Hydrogel bildet ein makroporöses, reversibles (thixotropes) Gelnetzwerk. Ein gute Protein- und Zellaufnahme, sowie die Thixotropie sind günstige Eigenschaften für den Wiederaufbau einer Zahnpulpa. Im Bereich der Knochen- und Gefäßregeneration gibt es bereits erfolgreiche Untersuchungen. Zusätzlich wird LAPONITE[®] bereits in der Verarbeitung von Kosmetikartikeln und Zahnpasten angewendet. Über den Einfluss von LAPONITE[®] auf dentale Pulpazellen gibt es noch keine Erfahrungen. Unklar ist jedoch wie Zellen der dentalen Pulpa auf LAPONITE[®] reagieren. Deshalb ist das Ziel dieser Arbeit den Einfluss von einem LAPONITE[®]-Hydrogel auf die Vitalität, Proliferation und Differenzierung von dentalen Pulpazellen zu untersuchen.

5 Material und Methoden

5.1 Herstellung von LAPONITE[®] XLG-Hydrogel

Der Premix (5%) wurde aus dem LAPONITE[®] XLG Pulver (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von IMCD South East Europe GmbH, Austria) mit destilliertem Wasser hergestellt und anschließend autoklaviert. Anfangs stellten wir zwei unterschiedliche LAPONITE[®]-Hydrogele, einmal mit destilliertem Wasser und einmal mit α -MEM (α -Minimal Essential Medium) her. In einem nächsten Schritt wurde das LAPONITE[®]-Gel in unterschiedlichen Konzentrationen (5%, 2,5 %, 1,25 %, 0,62%, 0,31% und 0,15%) in die 96-Well Platten appliziert.

5.2 Zellkultivierung im einschichtigen Zellmodell

Wir stellten Zellkulturen aus humanen dentalen Pulpazellen her. Diese wurden aus extrahierten 3.Molaren gewonnen, nachdem die Spender ihre informierte Zustimmung gegeben hatten (positiver Ethikbescheid der Ethikkommission der Medizinischen Universität Wien, Wien, Österreich, 1065/2013).

Das dentale Pulpagewebe wurde freigelegt und gesammelt. Die dentalen Pulpastammzellen wurden daraus isoliert und mit α -Minimal Essential Medium (α -MEM, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) mit 10% Fetal Calf Serum (FCS; PAA Laboratories, Linz, Oberösterreich, Österreich) und Antibiotika bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit aufbereitet. Für die weiteren Versuche haben wir 50.000 Zellen/cm² auf das LAPONITE[®]-Hydrogel gesetzt und für 24 Stunden inkubiert.

Um die Zellvitalität, Zellproliferation und Zelldifferenzierung der humanen dentalen Pulpastammzellen nachweisen zu können, haben wir diese auf das LAPONITE[®]-Hydrogel gesetzt und unterschiedliche Tests (Resazurin-basierender Toxizitäts-Test, MTT-Test (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Test), Live-Dead-Färbung, Bromdesoxyuridin-Test (BrdU-Test), quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (qPCR), histochemische Färbung mit Alkalischer Phosphatase) durchgeführt.

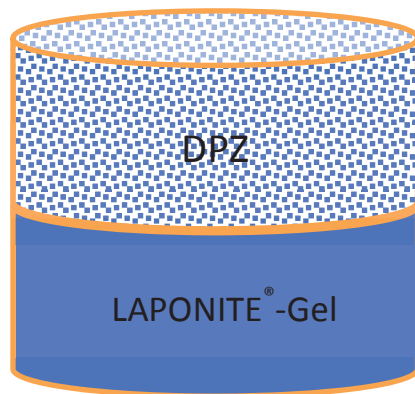


Abbildung 24: Versuchsaufbau: Ausschnitt einer 96-Well Platte mit LAPONITE[®]-Hydrogel und das darauf gesetzte Zellmedium mit dentalen Pulpazellen (DPZ). Nach einer Inkubationszeit von 24h wurden die Tests durchgeführt.

5.3 Vitalitäts- und Toxizitäts-Tests

5.3.1 Live-Dead Färbung

Mit der Live-Dead Färbung ist es möglich, gleichzeitig zwischen lebenden und toten Zellen zu unterscheiden. Enzo[®] Life Sciences AG, Lausen, BL, Schweiz, stellt eine fertige Flüssigkeit mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen zur Verfügung. Der „Lebend-Farbstoff“, ein Calcein-Acetoxyethyl Ester (Calcein-AM) ist lipophil und somit zellpermeabel. Er dringt in die lebenden Zellen ein und färbt diese grün. Der zweite Farbstoff, das Propidium-Iodid kann die Zellmembran von lebenden Zellen nicht durchkreuzen und färbt tote Zellen rot (74). Die Zellen wurden mit der Live-Dead-Färbung nach Benutzervorschriften gefärbt und mit Fluoreszenzmikroskopie für grün und rot mit einem B-2A Filter (Anregungsfilter für Wellenlänge: 450-490 nm) ausgewertet und Bilder erstellt.

5.3.2 MTT- Test

Der MTT-Test (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromid) ist ein Tetrazolium-Reduktions-Test zum Messen der Zellvitalität. Das MTT-Substrat wird in einer isotonen Kochsalzlösung gelöst und bildet eine positiv geladene, gelbe Flüssigkeit. Das gelbe Tetrazolium-Salz wird von aktiven Pulpazellen in ein wasserunlösliches, blau-violettes Formazan reduziert. Die Reduktion ist abhängig von den Reduktionsäquivalenten Nicotinamidadenindinucleotid (NADH) und Nicotinamideadeninedinucleotidephosphatase (NADPH), die bei Glykolyse frei werden und die Tetrazolium-Salze in ein farbiges Reaktionsprodukt metabolisieren. Daher ist die gemessene Menge an Farbstoff gleich zu setzen mit der Glykolyserate einer Zelle. Betreibt eine Zelle viel Glykolyse, bedeutet das eine hohe Aktivität und es kann mehr gelbes Tetrazolium in violett Formazan umgewandelt werden (75). Die Quantität des reduzierten Formazans wird mittels Spektrophotometer Synergy HTX multi-mode Reader (BioTek, Winooski, VT, USA) bei einer Wellenlänge von 550 nm evaluiert. Anschließend wurden die Ergebnisse unter dem Lichtmikroskop (Eclipse TS100; Nikon, Wien, Österreich) fotografiert.

5.3.3 Resazurin-basierender Toxizitäts Test

Der Resazurin-basierende Toxizitäts-Test ist ein nicht-radioaktiver Test, um die Zellviabilität zu untersuchen. Der oxidierte Farbstoff Resazurin ist blau, nicht-toxisch, zellpermeabel und nicht-fluoreszierend. Sobald die Resazurin Färbelösung (Sigma-Aldrich, Wien, Österreich) in vitale Zellen eindringt, wird diese zu einem rot-fluoreszierenden Resazurin reduziert. Das Ausmaß der Umwandlung des Wirkstoffes ist proportional zu der Menge der lebenden Zellen (76).

Die dentalen Pulpazellen auf dem LAPONITE[®] Hydrogel in 96-Well-Platten sind bei 37°C inkubiert worden. Die Fluoreszenz wurde einmal nach 4 Stunden und einmal nach 16 Stunden mittels Photometer Synergy HTX multi-mode Reader (BioTek, Winooski, VT, USA) bei einer Anregungswellenlänge von 540 nm und einer Emissionswellenlänge von 600 nm evaluiert. Die Daten wurden normalisiert und mit der Kontrollgruppe, dentalen Pulpazellen in Zellmedium ohne LAPONITE[®], verglichen.

5.4 Untersuchung der Zellproliferation

5.4.1 Bromdesoxyuridin-Test

Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein Pyrimidin-Analogon und kann anstelle des Nukleosid Thymidin während der DNA-Synthese in die neu gebildete DNA eingebaut werden. Dieser Vorgang kommt bei dem Test zur Anwendung, um die Zellproliferation zu quantifizieren. Die Durchführung des Testes wurde anhand des Hersteller Protokolls durchgeführt (77).

Die dentalen Pulpazellen wurden zusammen mit dem BrdU-Reagenz zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit einer Fixierlösung („FixDenat“) gleichzeitig fixiert und denaturiert. Es folgte die Behandlung der denaturierten Zell-DNA mit einer Antikörper Lösung (Anti-BrdU-Peroxidase) für 90 Minuten, welche sich mit den BrdU-Nukleosiden verbinden und diese markierten. Die entstandenen Immunkomplexe (BrdU-Nukleosid und BrdU-Antikörper) erscheinen gelb und wurden mittels Photometer Synergy HTX Multi-Mode Reader (BioTek, Winooski, VT, USA) bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen (77).

5.5 Untersuchung der Zelldifferenzierung, Mineralisation und Genexpression

5.5.1 Histochemische Färbung für Alkalische Phosphatase

Ob das LAPONITE[®]-Hydrogel die geeignete Umgebung für dentale Pulpazellen (DPZ) liefert, um eine odontogene Differenzierung bei der in weiterer Folge mineralisiertes Dentin-ähnliches Gewebe entsteht, haben wir die histochemische Alkalische Phosphatase (ALP) Färbung angewendet. Das Hydrogel aus synthetischen Tonmineralien wurde, wie in **Kapitel 5.1.** beschrieben, hergestellt. Für die Durchführung dieses Tests, kam ausschließlich das Gel mit einer Konzentration von 2,5% LAPONITE[®] zur Anwendung. Die Zellen wurden auf das Gel gesetzt und 7 Tage inkubiert. Nach der Inkubationszeit folgte die Fixation mit einer neutral gepufferten Formalin Lösung für 5 Minuten. Im Anschluss wurde die Alkalische Phosphat- Substrat-Lösung (Naphtol AS-TR Phosphat, N,N⁺ Dimethylformamid und Fast Blue BB Salz, Sigma-Aldrich) hinzugefügt. Die Zellen auf dem LAPONITE[®] Gel sind 30 Minuten bei 37°C inkubiert worden und anschließend wurden Fotos erstellt.

5.5.2 Genexpression

RNA-Isolation

Die RNA-Isolation von dentalen Pulpazellen, welche zuvor kultiviert wurden, dient als Vorbereitung für die qPCR Analyse. Das LAPONITE[®]-Hydrogel (2,5%) wurde in 6-Well Platten appliziert, die dentalen Pulpazellen darauf gesetzt (50.000 Zellen/cm²) und für 24h Stunden inkubiert. Die RNA der dentalen Pulpazellen wird mit dem TRIzol-Reagent (Thermofisher, Scientific) nach Herstellerangaben isoliert. Um die mRNA-Konzentrationen der Proben zu messen, werden sie auf Photometerplatten (BioTek, Winooski, VT, USA) appliziert und anschließend im Photometer evaluiert. Die isolierte RNA wird bei -80°C in Eppendorf Epruvetten aufbewahrt.

cDNA- Analyse

Abhängig von der gemessenen RNA-Konzentration, ist jede RNA-Probe mit Molecular Biology Reagent Wasser (Sigma-Aldrich, Vienna, Austria) verdünnt worden. Die zur RNA entsprechende cDNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure) wurde mittels umgekehrter Transkription (qPCR), mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, Carlsbad, CA, USA) synthetisiert. Dafür haben wir den Master-Mix aus RT Puffer, dNTP Mix (Desoxynucleotid Solution Mix), RT Random Primers, RNase Inhibitor, MultiScribe® Reverse Transcriptase hergestellt. Nach dem Zusammenfügen aller Master-Mix Substanzen, in entsprechender Reihenfolge, wurde der Master-Mix zu jeder Probe in die Eppendorf Epruvetten hinzugefügt und vermischt. Die Epruvetten werden anschließend in den PCR-Thermocycler (Primus 96 advanced®; peqlab; Erlangen, Deutschland) gesetzt und mit dem individuellen BRGA cDNA Programm, die cDNA Synthese durchgeführt.

Quantitative Polymerase Kettenreaktion

Die Methode der quantitativen Polymerase Kettenreaktion (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) wird für die quantitative Analyse von Nukleinsäuren verwendet. Das Konzept der qPCR basiert darauf, dass die Amplifikation des DNA-Moleküls unmittelbar nach dem vollendeten PCR-Zyklus gemessen werden kann (78). Ein spezifischer Master-Mix, bestehend aus freien Nukleotiden (dNTPs), DNA-Polymerase, Salze und zwei spezifische Primer-Sequenzen, wird zu den jeweiligen DNA-Proben hinzugefügt, um die neue DNA-Synthese in idealen Bedingungen zu ermöglichen. Durch das Anbinden der beiden Primer und der DNA-Polymerase wird die DNA-Formation durchgeführt. Mit Hilfe der freien Nukleotide (dNTPs) wird die cDNA synthetisiert. Eine spezifische Sonde dient zum Nachweis der Amplifikation.

In unseren Untersuchungen haben wir versucht die relative mRNA-Konzentration von den Zielgenen Alkalische Phosphatase (AP) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) von dentalen Pulpazellen auf dem LAPONITE®-Gel zu quantifizieren. Die Quantifizierung ist relativ zu dem „housekeeping gene“ Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH). GAPDH ist ein zytoplasmatisches Protein, welches konstant von Zellen produziert wird und fungiert als Indikator für einen intakten Zellmetabolismus. qPCR wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt mittels TaqMan® Tests (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) für die Zielgene AP und VEGF und GAPDH.

5.5.3 Mineralisationsnachweis mit Alizarin Rot-Färbung

Durch Anwendung der Alizarin Rot-Färbung kann die Differenzierung von Stammzellen in hartgewebsbildende Zellen (Osteoblasten, Odontoblasten) nachgewiesen werden. Osteoblasten oder Odontoblasten, welche sich in einem fortgeschrittenen oder terminalen Stadium der Entwicklung befinden, produzieren extrazelluläre Matrixproteine, wie zum Beispiel Osteocalcin oder Kollagen. Diese extrazellulären Matrixproteine lagern Kalziumphosphat-Kristalle ein, welche als Nachweis der osteogenen oder odontogenen Differenzierung herangezogen werden. Alizarin Rot verbindet sich mit den, im Gewebe eingelagerten Kalziumionen zu einem Chelatkomplex. Diese Verbindungen erscheinen unter dem Lichtmikroskop rot.

Um herauszufinden, ob sich dentale Pulpazellen auf einem LAPONITE[®]-Hydrogel (2,5%) in Odontoblasten-ähnliche Zellen entwickeln, fixierten wir die dentalen Pulpazellen auf dem Gel mit Formaldehyd. Nach zweimaliger Waschung mit PBS, folgte das Anfärben der Zellen auf dem Gel mit dem Alizarin Rot-Farbstoff (0,5%). Nach einer Inkubation von 10 Minuten wurde das Gel mit den dentalen Pulpazellen mit destilliertem Wasser gewaschen.

6 Ergebnisse

6.1 Nachweis der Vitalität, Toxizität, Proliferation

Um die Reaktion von dentalen Pulpazellen auf einem LAPONITE[®]-Hydrogel zu untersuchen, haben wir unterschiedliche Zellvitalität-Tests durchgeführt. Die Zellvitalitäts-Tests beinhalten Live-Dead Färbung, MTT-Färbung, Resazurin-basierender Toxizitäts-Test. Die Proliferation wurde mittels BrdU-Proliferationstest versucht zu bestimmen. Während mit den Vitalitätstests relevante Daten erhoben wurden, zeigten sich beim BrdU-Proliferationstest falsch positive Ergebnisse aufgrund der Anwesenheit des Hydrogels.

6.1.1 Live-Dead Färbung

Die, mit dem Live-Dead Färbungs Kit, angefärbten Zellen, haben wir unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem B-2A Filter (Excitation Filter) bei Wellenlängen zwischen 450-490 nm, mit einer 100-fachen Vergrößerung fotografiert. Das LAPONITE[®] bildete kleine „Kristall-Bäumchen“. Es erschien so, als hätten sich die Zellen auf diese „Kristallschollen“ gesetzt und zusammen geklumpt. Dabei konnte beobachtet werden, dass sich die Gel-Konzentration von 2,5% gut eignet. Bei dieser Konzentration konnten grüne, also lebende Zellen dargestellt werden. Wohingegen kaum rote Zellen, also tote Zellen, beobachtet werden konnten.

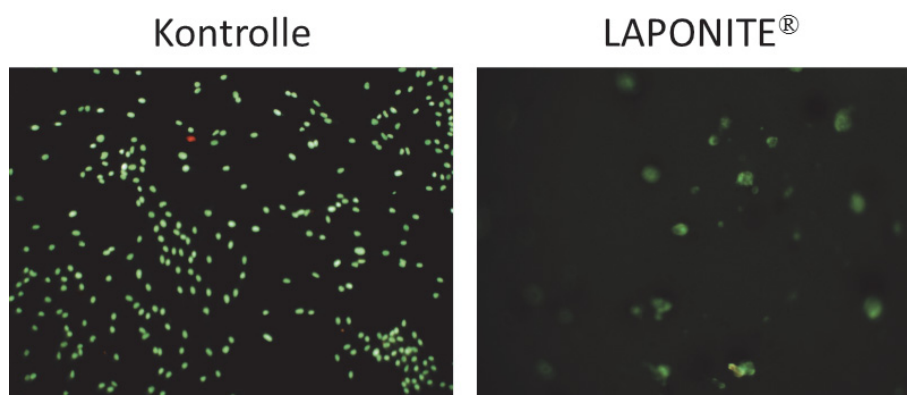


Abbildung 25 Fluoreszenzmikroskopische Fotos von dentalen Pulpazellen auf einem LAPONITE[®]-Hydrogel nach einer Behandlung mit Live-Dead Färbung. Das rechte Bild zeigt runde, grüne Zellen, welche sich einzeln und auch in kleinen Komplexen darstellen. Die Kontrolle (linkes Bild) bilden dentalen Pulpazellen ohne LAPONITE[®].

6.1.2 MTT-Test

Unter dem Lichtmikroskop konnten wir beobachten, dass die Menge des umgewandelten MTTs bei einer Gel-Konzentration von 2,5% am größten war. Die dentalen Pulpazellen erschienen einschichtig und ihre Morphologie fibroblastenartig. Zusätzlich bildeten sie sphäroidförmige bzw. clusterförmige Kolonien. Um die Quantität der Formazan-Bildung zu untersuchen, werden in einem zweiten Schritt die Formazan-Kristalle durch Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöst, um die Lichtabsorption im Photometer zu messen. Da das LAPONITE[®]-Hydrogel das DMSO, aufgrund seiner guten Absorptionsfähigkeit, gebunden hat und die Formazan-Kristalle nicht gelöst werden konnten, war es nicht möglich, die Lichtabsorption zu messen.

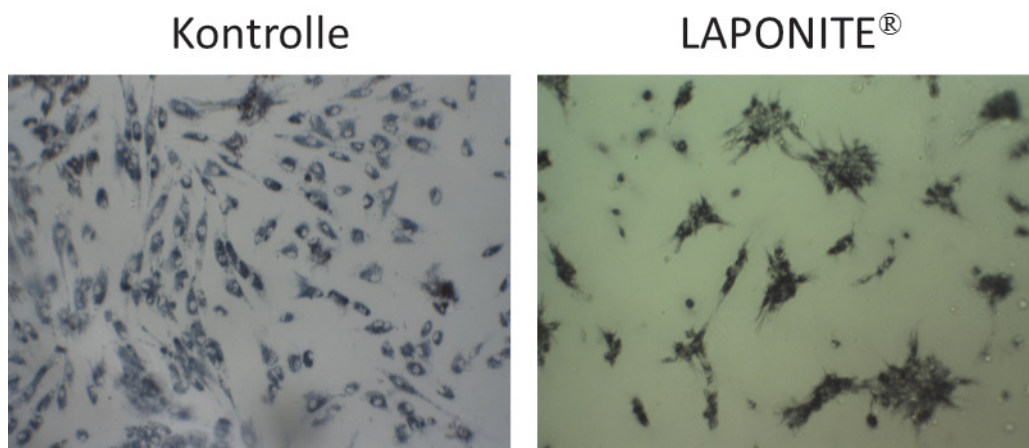


Abbildung 26 Lichtmikroskopische Fotos von dentalen Pulpazellen auf einem LAPONITE[®]-Hydrogel. Im rechten Bild zeigen sich vitale spindelförmige, Fibroblasten-ähnliche Zellen, die sich sowohl in Einzelzellschichten, als auch in sphäroidförmigen Komplexen darstellen. Das linke Bild zeigt die Kontrolle, dentale Pulpazellen ohne synthetische Tonminerale, nur in Zellmedium.

6.1.3 Resazurin-basierender Toxizitäts-Test

Um unsere Ergebnisse auf Reproduzierbarkeit zu prüfen, wendeten wir einen Resazurin-basierenden Toxizitäts-Test an. Der blaue, schwach fluoreszierende Resazurin-Farbstoff wird in lebenden Zellen mit einem aktiven Metabolismus, irreversibel zu einem pink fluoreszierenden Resorufin umgewandelt. Die Quantität von dem umgewandelten Resorufin ist proportional zu der Menge an lebenden dentalen Pulpazellen. Da Resazurin die Zellmorphologie bereits nach 4 Stunden Inkubationszeit beeinflusst und der Farbstoff den ATP-Gehalt (Zellvitalitätsmarker) der Zelle reduziert, sollte die Inkubationsperiode so kurz wie möglich und so lange wie nötig gewählt werden (75). Wir haben die Fluoreszenz einmal nach 4 Stunden und einmal nach 16 Stunden mittels Spektrophotometer gemessen und die Daten wurden normalverteilt und mit der Kontrollgruppe (DPZ ohne LAPONITE[®]), welche eine Vitalität von 100% aufweisen, verglichen.

Nach 4 Stunden Inkubation ist ein konstant, signifikanter Anstieg der Vitalität, bei abnehmender Gel-Konzentration zu beobachten. Bei abnehmender Viskosität des Gels, ist ein Anstieg der Vitalität erkennbar. Bei einer Gel-Konzentration von 0,3125% ist die Vitalität der dentalen Pulpazellen signifikant höher als die Kontrolle (dentale Pulpazellen ohne LAPONITE[®]-Hydrogel), da die Streuung weniger ist, als bei der Konzentration von 0,625%. Die geringste Streuung und die höchste Vitalität zeigte sich bei einer Gelkonzentration von 2,5%, weshalb zukünftige Untersuchungen ausschließlich mit einer Konzentration von 2,5% durchgeführt wurden. Die geringste Vitalität der dentalen Pulpazellen zeigte sich bei einer Gelkonzentration von 5%, da hier das Hydrogel die höchste Viskosität aufwies.

Auch nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden zeigt sich bei keiner Konzentration eine signifikante Abnahme der Resorzin-Umwandlung im Vergleich zur Kontrolle. Ein Trend zur Vitalitätssteigerung zeigt sich bei einer Gelkonzentration von 1,25%-0,3125%.

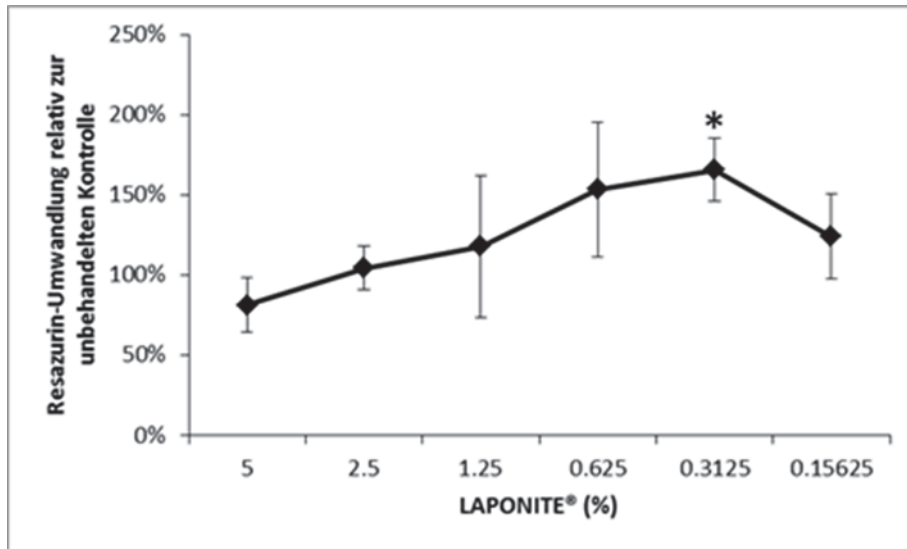


Abbildung 27 Der Effekt von LAPONITE® auf die Vitalität der dentalen Pulpazellen. Dentale Pulpazellen wurden auf dem Hydrogel (5%-0,15625%) aus synthetischen Tonmineralien gesetzt und inkubiert. Die Vitalität der Zellen wurde, auf Basis der Resorufin-Bildung nach 4-stündiger Inkubation untersucht. Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichung. Die Resorufin-Umwandlung wird relativ zur unbehandelten Kontrolle (100%) verglichen. * $<0,05$

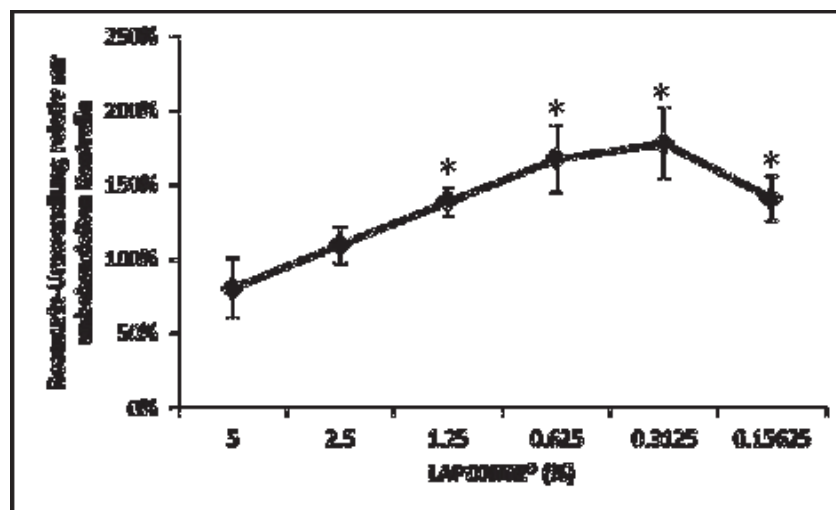


Abbildung 28 Der Effekt von LAPONITE® auf die Vitalität der dentalen Pulpazellen. Dentale Pulpazellen wurden auf dem Hydrogel (5%-0,15625%) aus synthetischen Tonmineralien gesetzt und inkubiert. Die Vitalität der Zellen wurde, auf Basis der Resorufin-Bildung nach 16-stündiger Inkubation untersucht. Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardabweichung. Die Resorufin-Umwandlung wird relativ zur unbehandelten Kontrolle (100%) verglichen. * $<0,05$

6.1.4 BrdU-Proliferationstest

Um zu untersuchen, ob sich DPZ auf dem LAPONITE[®]-Gel vermehren, führten wir den BrdU-Proliferations-Test durch. Die Resultate des BrdU-Tests fielen falsch positiv aus. Je höher die Konzentration von LAPONITE[®], desto mehr BrdU wurde eingebaut. LAPONITE[®] steigerte somit die Proliferation von dentalen Pulpazellen, jedoch mussten wir feststellen, dass auch die Kontrolle von reinem LAPONITE[®]-Gel, ohne Gegenwart von Zellen, BrdU eingebaut hat und es zu einer über 800fachen Proliferationssteigerung gekommen ist. Aus diesem Grund sind unsere Ergebnisse nicht glaubhaft und der Test wurde ausgeschlossen.

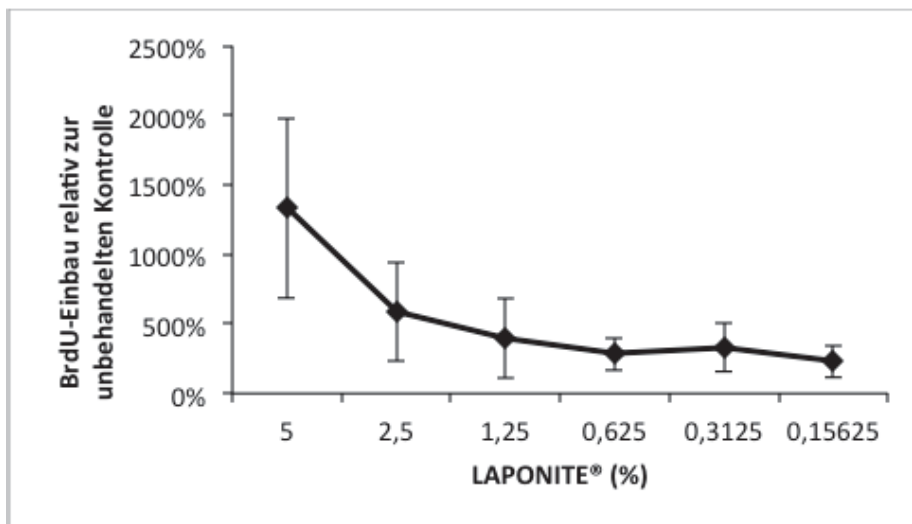


Abbildung 29 Der Effekt von LAPONITE[®] auf die Proliferationsrate von dentalen Pulpazellen. Nach Herstellung des Hydrogels aus synthetischen Tonmineralien und Applikation von DPZ auf dem Gel, wurde der BrdU-Einbau in die Zellen gemessen und mit der unbehandelten Kontrolle (LAPONITE[®] ohne Zellen) verglichen.

6.2 Nachweis der Zelldifferenzierung, Genexpression und Mineralisation

Um die Reaktion von dentalen Pulpazellen auf einem LAPONITE[®]-Hydrogel zu untersuchen, haben wir unterschiedliche Differenzierungs-Tests durchgeführt. Die Fähigkeit sich in Alkalische Phosphatase (AP) positive Zellen zu differenzieren wurde mittels histochemischer Färbung für Alkalische Phosphatase untersucht. Weiters war geplant die Differenzierung über die mRNA-Spiegel von Odontoblasten-Marker-Genen zu bestimmen. Aufgrund der physikalischen und chemischen Eigenschaften des Hydrogels war dies jedoch nicht verlässlich möglich. Auch die Färbung der mineralisierten Matrix mittels Alizarin Rot-Färbung führte zu falsch-positiven Ergebnissen.

6.2.1 histochemische Färbung für Alkalische Phosphatase

Um herauszufinden, ob das LAPONITE[®]-Hydrogel die odontogene Differenzierung von dentalen Pulpazellen in Dentin-produzierende Zellen beeinflusst, haben wir die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP) untersucht. Weisen dentalen Pulpazellen eine hohe AP-Aktivität auf, so wandeln sie das Substrat in einen blauen Farbstoff um. Mit der histochemischen Färbung für AP konnten einige gefärbte Zellen gezeigt werden, jedoch erschienen nicht alle Zellen AP-positiv. Es konnte beobachtet werden, dass die dentalen Pulpazellen, welche auf dem Hydrogel kultiviert wurden, eine geringere Intensität der Alkalischen Phosphatase Färbung aufzeigten, als die dentalen Pulpazellen ohne LAPONITE[®] (Kontrolle).

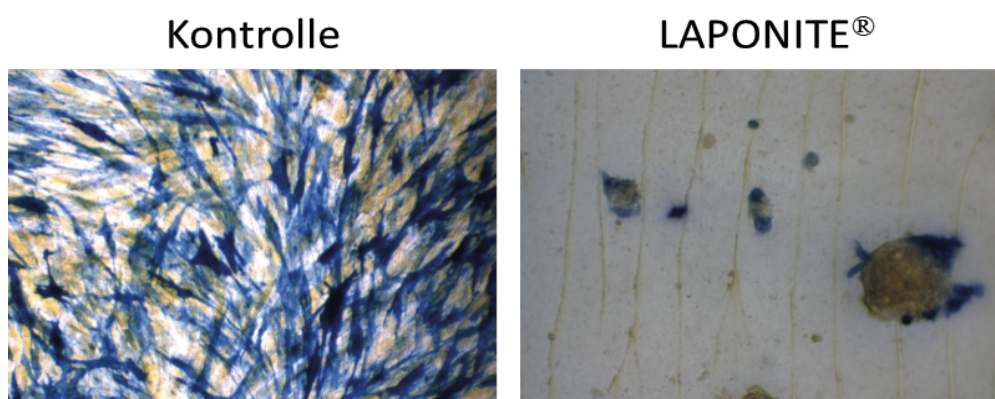


Abbildung 30 Die Reaktion von dentalen Pulpazellen auf einem LAPONITE[®]-Hydrogel. Histochemische Färbung für Alkalische Phosphatase zum Nachweis der Differenzierung von DPZ in Odontoblasten-ähnliche Zellen. (Rechts) Dentale Pulpazellen auf einem LAPONITE[®]-Hydrogel. Es zeigten sich einige AP-positive Zellen. (Links) Kontrolle, DPZ in Medium ohne LAPONITE[®].

6.2.2 RNA-Isolierung und qPCR

Eine valide Auswertung der qPCR konnte nicht durchgeführt werden. Bereits bei dem Vorversuch, die RNA aus dem GAPDH-Gen zu isolieren, musste festgestellt werden, dass der C_T -Wert in der qPCR nach der reversen Transkription kaum nachweisbar war. Der C_T -Wert hängt von dem quantifizierten Anteil der DNA Moleküle bei einer qPCR ab. Bei den dentalen Pulpazellen auf dem LAPONITE[®]-Hydrogel (2,5%), unterlag der C_T -Wert starken Schwankungen und es sind 34 ng/ μ l RNA (VEGF, Alkalische Phosphatase) verwendet worden. Bei reinem LAPONITE[®]-Hydrogel ohne Zellen (Kontrolle) wurden ebenfalls positive RNA-Werte (10 ng/ μ l) gefunden. Deshalb kann in Gegenwart des Hydrogels weder RNA valide quantifiziert noch reproduzierbare C_T -Werte nachgewiesen werden.

6.2.3 Alizarin Rot-Färbung

Um die Differenzierung von dentalen Pulpazellen in Odontoblasten-ähnliche Zellen, welche mineralisiertes Gewebe produzieren, nachweisen zu können, wurden dentale Pulpazellen auf das LAPONITE[®]-Hydrogel mit zwei verschiedenen Konzentrationen gesetzt und die Alizarin Rot-Färbung angewendet. Aufgrund des Vorkommens von freien Kalzium-Ionen in der Tonmineralien-Dispersion und der guten Absorptionsfähigkeit des Gels, wurde der Farbstoff komplett aufgenommen und das Gel gefärbt. Aus diesen Gründen war es nicht möglich zwischen den freien Kalzium-Ionen des Gels und den Kalziumphosphat-Komplexen von Dentin-bildenden Zellen zu unterscheiden. Auch wenn nur das Hydrogel dem Test unterzogen wurde sahen wir eine starke Rotfärbung im Test. Diese war bei 5% und 2,5% sichtbar.

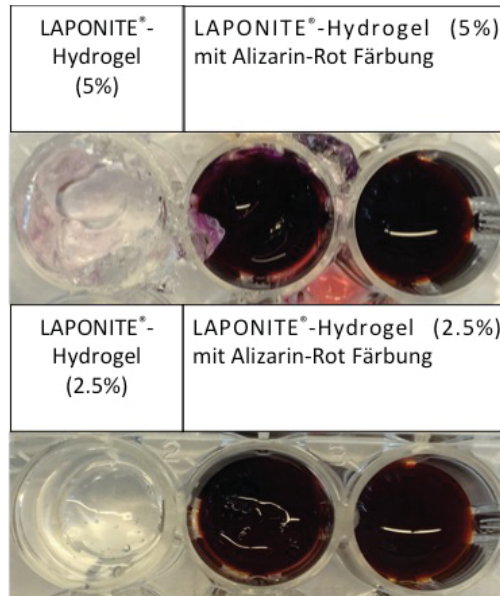


Abbildung 31 LAPONITE®-Hydrogel (oben 2,5% und unten 5%). Färbung des Hydrogels mit Alizarin Rot. Da das Gel aus synthetischen Tonmineralien die Färbung absorbiert hat, konnten keine validen Aussagen über den tatsächlichen Mineralisationsgrad des Gewebes von dentalen Pulpazellen getroffen werden.

7 Diskussion

Durch Trauma, Karies oder parodontale Erkrankungen kommt es schnell zum Verlust von Zahnschubstanz. Reicht dieser Gewebsverlust des Zahnhartgewebes bis hin zur Zahnpulpa und wird diese dadurch irreversibel geschädigt, muss die komplette Entfernung des infizierten Gewebes und eine Desinfektion des Wurzelkanals durchgeführt werden. Dadurch wird weiteres Voranschreiten der Entzündung verhindert. Zurück bleibt ein desensibilisierter, fragiler, spröder und dadurch fraktur- und infektionsanfälliger Zahn (11,31). Für die Regeneration des Dentins ist eine vitale Pulpa notwendig, da diese Stammzellen für die Entwicklung des neuen Gewebes liefert (79). Eine Wiederherstellung der Zahnpulpa stellt jedoch aufgrund des schwierigen Zuganges (eingeschlossen im Wurzelkanal) und der geringen Blutversorgung für rasche Angiogenese (ausschließlich durch die apikale Öffnung), eine Herausforderung dar. Ein Schlüsselfaktor für die Methode des Tissue Engineerings, ist eine dreidimensionale, biologisch abbaubare Trägermatrix als Leitstruktur für die Anheftung, Vermehrung und Differenzierung von vitalen Zellen (28,79). Eine ideale Trägermatrix für die Pulparegeneration sollte zusätzlich in der Handhabung einfach, leicht zu applizieren und oral verträglich sein (11,67,79), um eine rasche Angiogenese für die Entwicklung von Odontoblasten-ähnlichen Zellen und folglich die Entstehung von neuem Dentin-ähnlichem Gewebe zu ermöglichen. Jedoch ist noch kein ideales Material zur Herstellung einer Trägermatrix für die Pulparegeneration gefunden worden.

Tonmineralien bilden eine neue Sparte an thixotropen Materialien. Als Quervernetzer verbinden sie sich mit Polymeren und erhöhen dadurch die mechanische Stabilität (68). LAPONITE® (BYK Additives Ltd, Wesel, Germany) ist ein synthetisch hergestelltes Pulver aus Magnesium-Silikat-Tonmineralien (59,5% SiO₂, 27,5% MgO, 2,8% Na₂O, 0,8% Li₂O) (71). Neben der Funktion als Quervernetzer, für Verbesserung der mechanischen Eigenschaften von Polymer-Matrizen (68,80), bildet LAPONITE® alleine in Wasser gelöst ein injizierbares, thixotropes und makroporöses Hydrogel (54,71), welches viele geeignete Eigenschaften für eine Trägermatrix aufweist. Die gute Aufnahme und gezielte Abgabe von Zellen und Proteinen (68,69) liefert gerade im Bereich des Tissue Engineerings und der Pulparegeneration gute Voraussetzungen (siehe 3.3.1). Dawson *et al.* kamen zu dem Ergebnis, dass LAPONITE® als Modifizierungsmittel einer Kollagen-Matrix (68) die Aufnahme von VEGF verstärkte und damit die Bildung neuer Gefäße erleichterte (siehe Abbildung 23). Anhand von Untersuchungen von Gibbs *et al.* wurde nachgewiesen, dass LAPONITE® als

eigenständige Hydrogel-Matrix die Knochneubildung (54,69) durch das Binden und gezielte Abgabe von BMP-2 (Bonemorphogenic Protein-2) (81) erleichterte.

LAPONITE[®] als eigenständige Hydrogel-Matrix wurde im Bereich der Pulparegeneration noch nicht getestet. Deshalb beschäftigt sich meine Arbeit mit der Reaktion von dentalen Pulpazellen auf einem LAPONITE[®]-Hydrogel. Dafür haben wir ein Vorgemisch aus LAPONITE[®]-Pulver (5%) und destilliertem Wasser hergestellt. Dieser Vorbereitungsschritt der Gel-Herstellung wird in der Produktbeschreibung (71) empfohlen. Denn kommt LAPONITE[®] direkt in Kontakt mit einer Elektrolytlösung, neigt das Pulver zur Ausflockung und es wird schwieriger es zu verarbeiten. Während der Vorversuche verwendeten wir anfangs erst reines Zellmedium (α -Minimal Essential Medium), um Hydrogele mit unterschiedlicher Konzentration herzustellen. Mit diesem Experiment wollten wir die Verträglichkeit und Vitalitäten miteinander vergleichen. Dabei wurde jedoch die Tatsache bestätigt, dass LAPONITE[®] unter Lösungen mit einem höherem Elektrolytgehalt ausflockt (71). Das Gel erschien trüb mit verringerter Viskosität und führte zur Bewegungseinschränkung der Zellen. Aufgrund der schlechten Sicht konnten keine Aussagen über die Vitalität der dentalen Pulpazellen gemacht werden und das Gel ist für die weiteren Untersuchungen ausschließlich aus destilliertem Wasser hergestellt worden. Wir verdünnten das Vorgemisch (5%) in einer 1:2 Verdünnungsreihe und stellten Gele mit unterschiedlichen Konzentrationen her. Damit wollten wir die Konzentration von LAPONITE[®] herausfinden, mit der ein einfacher Umgang und eine leichte Handhabung im Labor möglich ist (nicht zu fest, spritzbar). Außerdem wollten wir untersuchen, bei welcher maximalen Konzentration das Gel einen toxischen Effekt auf die Zellen hat. Bei einer Konzentration von 5% erschien das Gel sehr fest, was die Applikation durch eine Spritze erschwerte. Außerdem beobachteten wir einen negativen Effekt auf die Vitalität der dentalen Pulpazellen, da durch den hohen Anteil der Tonmineralien die Zellen in ihrer Mobilität eingeschränkt erschienen.

Für die erste Untersuchung der Vitalität von dentalen Pulpazellen auf einem LAPONITE[®]-Hydrogel wurde die Live-Dead-Färbung gewählt. Die Ergebnisse zeigten uns sofort, dass LAPONITE[®] keinen toxischen Effekt auf die Zellen hat. Bei der Gel-Konzentration von 2,5% konnten keine toten Zellen beobachtet werden. Zusätzlich stellten wir fest, dass das Gel mit 2,5% LAPONITE[®] eine ideale Konsistenz aufwies, wobei die Bearbeitbarkeit und Handhabung sich am einfachsten darstellten. Diese positiven Ergebnisse bildeten den Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen.

Für die Beurteilung der Ergebnisse des MTT-Vitalitätstests haben wir Bilder durch das Lichtmikroskop erstellt. Die Messung der Lichtabsorption mit dem Photometer konnte nicht

durchgeführt werden, denn LAPONITE[®] hat das Lösungsmittel DMSO gebunden. Die Formazan-Kristalle konnten daher nicht gelöst werden und somit war die Auswertung der Daten nicht möglich. Dieser Umstand könnte mit der hohen Absorptionsfähigkeit von LAPONITE[®] zusammen hängen, welche bereits in Experimenten von *Dawson et al.* untersucht wurde (69). Der Schichtaufbau der LAPONITE[®]-Kristalle und die Tatsache, dass LAPONITE[®] dazu neigt, bei einer Lösung mit erhöhtem Elektrolytgehalt (Zellmedium, Lösungsmittel DMSO) auszuflocken und Gelkapseln zu bilden, führt zu einer verstärkten Aufnahmekapazität des Hydrogels und wurde bereits in Untersuchungen von *Dawson et al.* erfolgreich bewiesen (68,69). Die Bilder erstellten wir mit der Gel-Konzentration von 2,5%, da bei dieser Konzentration die Zellen eine vitale und fibroblastenartige Morphologie zeigten. *Dawson et al.* (69) arbeiteten ebenfalls mit einer Feststoffkonzentration von 2,5% LAPONITE[®].

Um unsere Ergebnisse auf Reproduzierbarkeit zu prüfen, untersuchten wir die Vitalität der dentalen Pulpazellen zusätzlich mit dem Resazurin-basierenden Toxizitätstest. Wie die Ergebnisse unserer Versuche zeigten, konnte auch bei diesem Test kein negativer Einfluss von LAPONITE[®] auf DPZ vermerkt werden. Die Ergebnisse des Resazurin-basierenden Toxizitätstest nach einer 4-stündigen Inkubation der Zellen, zeigten einen Anstieg der Vitalität bei abnehmender Konzentration und somit der Viskosität des Gels. Bei einer Gel-Konzentration von 0,3125% stieg die Vitalität der dentalen Pulpazellen signifikant, im Vergleich zur Kontrolle (dentale Pulpazellen ohne LAPONITE[®]-Hydrogel) an. Die höchste Vitalität mit geringster Streuung zeigte sich bei einer Gel-Konzentration von 2,5%. Die niedrigste Vitalität der dentalen Pulpazellen zeigte sich bei einer Gel-Konzentration von 5%. Dieses Ergebnis ist vermutlich auf die erhöhte Viskosität des Gels zurück zu führen, welche die Zellen in ihrer Beweglichkeit einschränkte. Zusätzlich war die Applikation durch die Injektionsnadel kaum durchführbar, was die Handhabung erschwerte. Dadurch lässt sich schlussfolgern, dass das Hydrogel mit einer Konzentration von 2,5%, die geeignetste Mischbarkeit und höchste Vitalität lieferte. Aus diesem Grund sind die folgenden Untersuchungen ausschließlich mit einer Konzentration von 2,5% durchgeführt worden. Obwohl im Protokoll eine Inkubation von 4 Stunden beschrieben ist, verlängerten wir für eine weitere Untersuchung die Inkubationszeit auf 16 Stunden. Dabei wollten wir herausfinden, ob das Gel bei einer längeren Einwirkung auf die Zellen ihre Vitalität verändert. Die Messungen haben ergeben, dass nicht der Faktor Zeit, sondern die Konzentration von LAPONITE[®] die Vitalität der dentalen Pulpazellen beeinflusst (siehe Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. und Abbildung 28).

Die Ergebnisse des BrdU-Proliferationstests fielen falsch-positiv aus. Es konnte eine Steigerung der Proliferation sowohl bei den Zellen als auch bei der Kontrolle von LAPONITE[®] ohne Zellen beobachtet werden. Auch in diesem Fall ist die hohe Absorptionsfähigkeit des LAPONITE[®]-Hydrogels die vermutete Ursache und daher waren valide Aussagen über die Vermehrung der Zellen nicht möglich.

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP) wurde als ein früher Marker für odontogene Mineralisation gemessen. *Gaharwar et al.* untersuchten die Produktion der Alkalischen Phosphatase von mesenchymalen Stammzellen auf einer Polyethylen-LAPONITE[®]-Nanokomposit Matrix (72). Sie konnten bereits einen Anstieg der Alkalischen Phosphatase Aktivität, abhängig von der Konzentration der Silikat-Tonminerale im Hydrogel beweisen. Offen bleibt jedoch, ob die osteogene Differenzierung aufgrund der, in anderen Studien bewiesene erleichterten Zelladhäsion (72), induziert wird, oder ob es an der direkten Interaktion zwischen den ionischen Zerfallsprodukten (SiO₂, MgO, Na₂O, Li₂O) des LAPONITE[®] und den Zellen liegt, die eine Differenzierung auf dem Hydrogel erleichtern. In unseren Untersuchungen zeigten sich einige Alkalische Phosphatase positive Zellen, vor allem bei einer Gel Konzentration von 2,5%. Im Vergleich zur Kontrolle (dentale Pulpazellen ohne LAPONITE[®]) erschienen die Zellen jedoch leichter gefärbt.

Die RNA, sowohl von GAPDH, als auch der Zielgene (VEGF, Alkalische Phosphatase), konnte nicht erfolgreich isoliert werden, um sie zu vergleichen und Aussagen über die Differenzierung von dentalen Pulpazellen auf einem LAPONITE[®]-Hydrogel zu treffen. Die Ergebnisse der qPCR waren in Gegenwart von LAPONITE[®] nicht reproduzierbar weshalb keine weiteren Analysen durchgeführt worden sind. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ergebnisse der qPCR in Gegenwart von LAPONITE[®] nicht reproduzierbar waren und deshalb von weiteren Analysen abgesehen wurde.

Um die Mineralisation von Odontoblasten-ähnlichen Zellen zu beweisen, wendeten wir den Alizarin Rot-Farbstoff an. Das Hydrogel nahm den Farbstoff sofort auf und trotz wiederholter Waschung mit PBS färbte sich das Gel rot, so dass nicht mehr zwischen den Zellen und dem Gel unterschieden werden konnte. *Shi et al.* verwendeten ebenfalls die Alizarin Rot-Färbung. In ihrer Arbeit beschichteten sie Glas und Plastik Oberflächen mit einer LAPONITE[®]-Suspension, welche im Anschluss bei Raumtemperatur luftgetrocknet wurden. Nach dem Setzen der Zellen applizierten sie den Alizarin Rot-Farbstoff. Durch diesen Versuch konnte eine starke Färbung der differenzierten humanen Knochenmark-Stroma Zellen (Kalziumphosphat) nachgewiesen werden. Die Art wie Zellen dem Gel zugeführt werden und in welcher Form das LAPONITE[®] vorliegt, sind zwei elementare

Faktoren, welche die Vitalität und die Zelldifferenzierung beeinflussen können (54). Basierend auf den vorliegenden Daten kann also die Applikationsform einen Einfluss auf die Durchführbarkeit verschiedener zellbiologischer Tests haben.

Zusammenfassend können wir sagen, dass eine Hydrogel-Trägermatrix aus LAPONITE®-Tonmineralien, aufgrund der einfachen Herstellung, ihrer thixotropen Eigenschaft und nicht toxischen Wirkung auf dentale Pulpazellen, ein erfolgsversprechendes Potential für eine mögliche Anwendung in der regenerativen Endodontie hat.

8 Abkürzungsverzeichnis

PRP: Platelet Rich Plasma

PRGF: Platelet Rich in Growth Factors

PRF: Platelet Rich Fibrin

TE: Tissue Engineering

TGF- β 1: Transforming Growth Factor- β 1

BMP: Bone Morphogenic Protein

TNF- α , β : Tumornekrose Faktor- α , - β

Ca(OH)₂: Kalziumhydroxid

MTA: Mineraltrioxid Aggregat

IL-1 α , -1 β : Interleukin-1 α , -1 β

TGF- α , - β : Transforming Growth Factor - α , - β

DPSC Dental Pulp Stemcells

SHED: Stemcells from Human Exfoliated Deciduous Teeth

SCAP: Stemcells from Apical Papilla

PDLSC: Periodontal Ligament Stemcells

GMSC: Gingival Mesenchymal Stemcells

DSPP: Dentinsialophosphoprotein

DPP: Dentin Phosphoprotein

FGF-2: Fibroblast-Growthfactor-2

PLA: Polylactid-Säure

PGA: Polyglykolsäure

PLGA: Poly(lactid-co-glycolid)

FDA: Food and Drug Administration

PLG-Matrix: Poly-D, L-Lactid und Glycolid-Matrix

PDS: Polydioxanon

HNT: Hallyosit- Aluminiumsilikat Nanotubules

MMP: Matrixmetalloproteinase

GP: Glycerol-2-Phosphat

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

FGF: Fibroblast Growth Factor

PDGF: Platelet Derived Growth Factor

NGF: Nerve Growth Factor

PEG: Polyethylenglykol
TCP: Tricalciumphosphat
HA: Hydroxylapatit
PEO: Polyethylenoxid
HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells
DPZ: Dentale Pulpazellen
 α -MEM: α -Minimal Essential Medium
MTT-Test: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid- Test
BrdU: Bromdesoxyuridin
qPCR: quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion
AP: Alkalische Phosphatase
NADH: Nicotinamidadenindinucleotid
NADPH: Nicotinamideadeninedinucleotidephosphatoxidase
DNA: Desoxyribonukleinsäure
RNA: Ribonukleinsäure
cDNA: komplementäre Desoxyribonukleinsäure
GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
DMSO: Dimethylsulfoxid
ARF: Alizarin Rot Färbung

Literaturverzeichnis

1. Tatullo M, Marrelli M, Paduano F. The regenerative medicine in oral and maxillofacial surgery: the most important innovations in the clinical application of mesenchymal stem cells. *Int J Med Sci* (2015) **12**:72–7. doi:10.7150/ijms.10706
2. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* (1997) **55**:1294–1299. doi:10.1016/S0278-2391(97)90187-7
3. Weibrich G, Kleis WKG, Hitzler WE, Hafner G. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. *Int J Oral Maxillofac Implants* **20**:118–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15747683> [Accessed August 10, 2017]
4. Shah R, M G T, Thomas R, Mehta DS. An Update on the Protocols and Biologic Actions of Platelet Rich Fibrin in Dentistry. *Eur J Prosthodont Restor Dent* (2017) **25**:64–72. doi:10.1922/EJPRD_01690Shah09
5. Marrello M TM. Influence of PRF in the healing of bone and gingival tissues. Clinical and histological evaluations. *Eur Rev Med Pharmacological Sci* (2013) Available at: <http://www.europeanreview.org/wp/wp-content/uploads/1958-1962.pdf> [Accessed August 10, 2017]
6. Rodríguez-Lozano FJ, Bueno C, Insausti CL, Meseguer L, Ramírez MC, Blanquer M, Marín N, Martínez S, Moraleta JM. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *Int Endod J* (2011) **44**:800–806. doi:10.1111/j.1365-2591.2011.01877.x
7. Kamath MS, Ahmed SSSJ, Dhanasekaran M, Santosh SW. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions – A 21st Century Perspective. *Int J Nanomedicine* (2014)183–95. doi:10.2147/IJN.S49460
8. Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med* (2008) **3**:1–5. doi:10.2217/17460751.3.1.1
9. Abdulqader ST, Rahman IA, Thirumulu KP, Ismail H, Mahmood Z. Effect of biphasic calcium phosphate scaffold porosities on odontogenic differentiation of human dental pulp cells. doi:10.1177/0885328215625759
10. Xiao L, Nasu M. From regenerative dentistry to regenerative medicine: progress,

- challenges, and potential applications of oral stem cells. doi:10.2147/SCCAA.S51009
11. Goldberg M. *The dental pulp : biology, pathology, and regenerative therapies.* , ed. M. Goldberg Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2014). doi:10.1007/978-3-642-55160-4
 12. Graziano A, d'Aquino R, Cusella-De Angelis MG, De Francesco F, Giordano A, Laino G, Piattelli A, Traini T, De Rosa A, Papaccio G. Scaffold's surface geometry significantly affects human stem cell bone tissue engineering. *J Cell Physiol* (2008) **214**:166–72. doi:10.1002/jcp.21175
 13. Yang X, van der Kraan PM, Bian Z, Fan M, Walboomers XF, Jansen JA. Mineralized Tissue Formation by BMP2-transfected Pulp Stem Cells. *J Dent Res* (2009) **88**:1020–1025. doi:10.1177/0022034509346258
 14. Yang X, Han G, Pang X, Fan M. Chitosan/collagen scaffold containing bone morphogenetic protein-7 DNA supports dental pulp stem cell differentiation in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A* (2012)n/a-n/a. doi:10.1002/jbm.a.34064
 15. Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M NA, and Akamine A. Dentin Regeneration by Dental Pulp Stem Cell Therapy with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2. *J Dent Res* (2004) **83**:590–595. doi:https://doi-org.ez.srv.meduniwien.ac.at/10.1177/154405910408300802
 16. Eramo S, Natali A, Pinna R, Milia E. Dental pulp regeneration via cell homing. *Int Endod J* (2017) doi:10.1111/iej.12868
 17. Goldberg M, Farges J-C, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup F, Septier D, Carrouel F, Durand S, Chaussain-Miller C, et al. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. doi:10.1016/j.phrs.2008.05.013
 18. Thieme: Checklisten der Zahnmedizin - Endodontie. Available at: https://www.thieme.de/medias/sys_master/8804743741470/9783131565815_musterseite_20_24.pdf?mime=application%2Fpdf&realname=9783131565815_musterseite_20_24.pdf [Accessed February 12, 2018]
 19. D Heidemann. *Endodontie Elsevier GmbH*. 4th ed. Urban & Fischer (2005). Available at: <https://shop.elsevier.de/endodontie-9783437313813.html> [Accessed January 14, 2018]
 20. Cipolleschi MG, Sbarba P Dello, Olivotto M. The Role of Hypoxia in the Maintenance of Hematopoietic Stem Cells. Available at: <http://www.bloodjournal.org.ez.srv.meduniwien.ac.at/content/bloodjournal/82/7/2031.full.pdf> [Accessed February 10, 2018]
 21. Standring S. *Gray's anatomy : the anatomical basis of clinical practice*. Available at:

<https://books.google.at/books?hl=en&lr=&id=b7FVCgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Standring+S.+Gray's+anatomy.+40.+ed.+Churchill+Livingstone%3B+2008.&ots=4OeVI3gCpq&sig=2Y9ZvJv20qVFeXbKHKhnktCQMq8#v=snippet&q=oral&f=false>
[Accessed August 8, 2017]

22. Heidemann D. *Kariologie*. Elsevier (2005).
23. A.C.R. Tanner^{1 2}, C.A. Kressirer^{1 2}, S. Rothmiller³, I. Johansson⁴, and N.I. Chalmers⁵. The Caries Microbiome: Implications for Reversing Dysbiosis. *Adv Dent Res* (2018) **29**:78–85. doi:10.1177/0022034517736496
24. Bourgeois D, David A, Inquimbert C, Tramini P, Molinari N, Carrouel F. Quantification of carious pathogens in the interdental microbiota of young caries-free adults. doi:10.1371/journal.pone.0185804
25. Cai S, Zhang W, Tribble G, Chen W. Reactions of human dental pulp cells to capping agents in the presence or absence of bacterial exposure. *J Oral Sci* (2017) **59**:621–627. doi:10.2334/josnusd.16-0625
26. Goldberg M SA. Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* (2004) **15**:13–27. Available at:
<http://journals.sagepub.com.ez.srv.meduniwien.ac.at/doi/pdf/10.1177/154411130401500103> [Accessed February 12, 2018]
27. Simon SRJ, Tomson PL, Berdal A. Regenerative Endodontics: Regeneration or Repair? *J Endod* (2014) **40**:S70–S75. doi:10.1016/J.JOEN.2014.01.024
28. Klara Janjić, Barbara Cvikl AM& HA. Dental pulp regeneration. *Int J Stomatol Occlusion Med* (2016)271–280. doi:10.1002/9781119067757.ch11
29. Jalan AL, Warhadpande MM, Dakshindas DM. A comparison of human dental pulp response to calcium hydroxide and Biodentine as direct pulp-capping agents. *J Conserv Dent* (2017) **20**:129–133. doi:10.4103/0972-0707.212247
30. Simon S, Cooper P, Smith A, Picard B, Naulin Ifi C, Berdal A. Evaluation of a new laboratory model for pulp healing: Preliminary study. *Int Endod J* (2008) **41**:781–790. doi:10.1111/j.1365-2591.2008.01433.x
31. Schmalz G, Smith AJ. Pulp development, repair, and regeneration: Challenges of the transition from traditional dentistry to biologically based therapies. *J Endod* (2014) **40**:S2–S5. doi:10.1016/j.joen.2014.01.018
32. Lin LM, Kahler B. A REVIEW OF REGENERATIVE ENDODONTICS: CURRENT PROTOCOLS AND FUTURE DIRECTIONS Rejeneratif Endodonti Üzerine Bir

- Derleme: Güncel Protokoller ve Geleceğe Yönelik Öneriler. *J Istanbul Univ Fac Dent* (2017)41–51. doi:10.17096/jiufd.53911
33. Huang T-J, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine. *J Dent Res* (2009) **88**:792–806. doi:10.1177/0022034509340867
 34. Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, Sugito T, Ito K, Ueda M. Stem Cell Proliferation Pathways Comparison between Human Exfoliated Deciduous Teeth and Dental Pulp Stem Cells by Gene Expression Profile from Promising Dental Pulp. *J Endod* **35**:1536–1542. doi:10.1016/j.joen.2009.07.024
 35. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S, Mahowald AP. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ez.srv.meduniwien.ac.at/pmc/articles/PMC156282/pdf/pq1003005807.pdf> [Accessed February 10, 2018]
 36. Byoung-Moo Seo, Masako Miura, Stan Gronthos, Peter Mark Bartold, Sara Batouli, Jaime Brahim, Marian Young PGR, Cun-Yu Wang SS. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* (2004) **364**:149–155. doi:10.1016/S0140-6736(04)16627-0
 37. Gronthos S, Mankani M, Brahim 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**:13625–30. doi:10.1073/pnas.240309797
 38. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, Smith AJ, Nör JE. Dental Pulp Tissue Engineering with Stem Cells from Exfoliated Deciduous Teeth. doi:10.1016/j.joen.2008.04.009
 39. Gong T, Heng BC, Lo ECM, Zhang C. Current Advance and Future Prospects of Tissue Engineering Approach to Dentin/Pulp Regenerative Therapy. *Stem Cells Int* (2016) **2016**:9204574. doi:10.1155/2016/9204574
 40. Sadler T. W. *Medizinische Embryologie: die normale menschliche Entwicklung und ihre ...* - Thomas W. Sadler - Google Books. 10th ed. Thomas W. Sadler, Ph. D (2003). Available at: <https://books.google.at/books?hl=en&lr=&id=6ioTJJKAXcC&oi=fnd&pg=PA2&dq=medizinische+embryologie+&ots=ROIqxY0GvF&sig=4plpruOUMEJUbvyGdl49yDMtrTI#v=onepage&q=medizinische+embryologie&f=false> [Accessed February 25, 2018]

41. Nosrat A, Homayounfar N, Oloomi K. Drawbacks and Unfavorable Outcomes of Regenerative Endodontic Treatments of Necrotic Immature Teeth: A Literature Review and Report of a Case. (2012) doi:10.1016/j.joen.2012.06.025
42. Nikita B. Ruparel, DDS, MS, PhD,* Fabricio B. Teixeira, DDS, MS, PhD *, Caio C.R. Ferraz, DDS, MS, PhD,† and Anibal Diogenes, DDS, MS P. Direct Effect of Intracanal Medicaments on Survival of Stem Cells of the Apical Papilla. *J Endod* (2012) **38**:1372–1375. Available at: https://ac-els-cdn-com.ez.srv.meduniwien.ac.at/S0099239912005997/1-s2.0-S0099239912005997-main.pdf?_tid=bf995836-0feb-401a-af22-ac420b53b205&acdnat=1520099947_64789696cd0ef122ca1d9082e409281e [Accessed March 3, 2018]
43. Albuquerque MTP, Valera MC, Nakashima M, Nör JE, Bottino MC. Tissue-engineering-based Strategies for Regenerative Endodontics. *J Dent Res* (2014) **93**:1222–1231. doi:10.1177/0022034514549809
44. Huang GT-J, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, Shi S. Stem/Progenitor Cell–Mediated De Novo Regeneration of Dental Pulp with Newly Deposited Continuous Layer of Dentin in an In Vivo Model. *Tissue Eng Part A* (2010) **16**: doi:10.1089=ten.tea.2009.0518
45. Bottino MC1, Yassen GH1, Platt JA1, Labban N2, 3, Windsor LJ2, Spolnik KJ4 BA. A novel three-dimensional scaffold for regenerative endodontics: materials and biological characterizations. *J Tissue Eng Regen Med* (2015) **9**:116–123. doi:10.1002/term.1712
46. Chang B, Ahuja N, Ma C, Liu X. Injectable scaffolds: Preparation and application in dental and craniofacial regeneration. (2017) doi:10.1016/j.mser.2016.11.001
47. Coyac BR, Chicatun F, Hoac B, Nelea V, Chaussain C, Nazhat SN, Mckee MD. Mineralization of Dense Collagen Hydrogel Scaffolds by Human Pulp Cells. *J Dent Res* (2013) **92**:648–654. doi:10.1177/0022034513488599
48. Kim NR, Lee DH, Chung PH, Yang HC. Distinct differentiation properties of human dental pulp cells on collagen, gelatin, and chitosan scaffolds. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* (2009) **108**:e94–e100. doi:10.1016/j.tripleo.2009.07.031
49. Leong DJX, Setzer FC, Trope M, Karabucak B. Biocompatibility of two experimental scaffolds for regenerative endodontics. *Restor Dent Endod* (2016) **41**:98–105. doi:10.5395/rde.2016.41.2.98
50. Kim JY, Xin X, Moioli EK, Chung J, Lee CH, Chen M, Fu SY, Koch PD, Mao JJ.

- Regeneration of Dental-Pulp-like Tissue by Chemotaxis-Induced Cell Homing.
doi:10.1089/ten.tea.2010.0181
51. Rutherford RB, Gu K. Treatment of inflamed ferret dental pulps with recombinant bone morphogenetic protein-7. *Eur J Oral Sci* (2000) **108**:202–206.
doi:10.1034/j.1600-0722.2000.108003202.x
 52. Yang J, Yuan G, Chen Z. Pulp regeneration: Current approaches and future challenges. *Front Physiol* (2016) **7**:1–8. doi:10.3389/fphys.2016.00058
 53. Ma PX. Biomimetic Materials for Tissue Engineering. doi:10.1016/j.addr.2007.08.041
 54. Shi P, Kim Y-H, Mousa M, Sanchez RR, Oreffo ROC, Dawson JI. Self-Assembling Nanoclay Diffusion Gels for Bioactive Osteogenic Microenvironments. *Adv Healthc Mater* (2018) **1800331**:1800331. doi:10.1002/adhm.201800331
 55. Holzapfel BM, Reichert JC, Schantz JT, Gbureck U, Rackwitz L, Nöth U, Jakob F, Rudert M, Groll J, Hutmacher DW. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Adv Drug Deliv Rev* (2013) **65**:581–603. doi:10.1016/j.addr.2012.07.009
 56. Feng B, Jinkang Z, Zhen W, Jianxi L, Jiang C, Jian L, Guolin M, Xin D. The effect of pore size on tissue ingrowth and neovascularization in porous bioceramics of controlled architecture in vivo. *Biomed Mater* (2011) **6**:015007. doi:10.1088/1748-6041/6/1/015007
 57. Holzapfel BM, Rudert M, Hutmacher DW. Gerüstträgerbasiertes Knochen- Tissue-Engineering. *Orthopade* (2017) **46**:701–710. doi:10.1007/s00132-017-3444-0
 58. Sheridan MH, Shea LD, Peters MC, Mooney DJ. Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery. *J Control Release* (2000) **64**:91–102. Available at: www.elsevier.com [Accessed April 21, 2018]
 59. Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem* (2016) **31**:177–183.
doi:10.3109/14756366.2016.1161620
 60. Park J-B. The use of hydrogels in bone-tissue engineering. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal Jan Med Oral Patol Oral Cir Bucal Jan Med Oral S L CIF B* (2011) **11616**:115–8. doi:10.4317/medoral.16.e115
 61. Kim HK, Shim WS, Kim SE, Lee K-H, Kang E, Kim J-H, Kim K, Kwon IC, Lee DS. Injectable in situ-forming pH/thermo-sensitive hydrogel for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A* (2009) **15**:923–933. doi:10.1089/ten.tea.2007.0407

62. Tang Y, Du Y, Li Y, Wang X, Hu X. A thermosensitive chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogel containing hydroxyapatite for protein delivery. *J Biomed Mater Res - Part A* (2009) **91**:953–963. doi:10.1002/jbm.a.32240
63. Jay SM, Saltzman WM. Controlled delivery of VEGF via modulation of alginate microparticle ionic crosslinking. doi:10.1016/j.jconrel.2008.10.019
64. Kisiel M, Martino MM, Ventura M, Hubbell JA, Hilborn J, Ossipov DA. Improving the osteogenic potential of BMP-2 with hyaluronic acid hydrogel modified with integrin-specific fibronectin fragment. *Biomaterials* (2013) **34**:704–712. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.10.015
65. Lakmal Dissanayaka W, Hargreaves KM, Jin L, Samaranayake LP, Zhang C. The Interplay of Dental Pulp Stem Cells and Endothelial Cells in an Injectable Peptide Hydrogel on Angiogenesis and Pulp Regeneration In Vivo. doi:10.1089/ten.tea.2014.0154
66. Cavalcanti BN, Zeitlin BD, Nör JE, Nör Dds JE. A Hydrogel Scaffold That Maintains Viability and Supports Differentiation of Dental Pulp Stem Cells. *Dent Mater* (2013) **29**:97–102. doi:10.1016/j.dental.2012.08.002
67. Huang GT. Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. doi:10.2217/rme.09.45
68. Dawson JI, Oreffo ROC. Clay: New opportunities for tissue regeneration and biomaterial design. *Adv Mater* (2013) **25**:4069–4086. doi:10.1002/adma.201301034
69. Dawson JI, Kanczler JM, Yang XB, Attard GS, Oreffo ROC. Clay gels for the delivery of regenerative microenvironments. *Adv Mater* (2011) **23**:3304–3308. doi:10.1002/adma.201100968
70. Müller AS, Artner M, Janjić K, Edelmayr M, Kurzmann C, Moritz A, Agis H. Synthetic Clay-based Hypoxia Mimetic Hydrogel for Pulp Regeneration: The Impact on Cell Activity and Release Kinetics Based on Dental Pulp-derived Cells In Vitro. *J Endod* (2018)1–7. doi:10.1016/j.joen.2018.04.010
71. BYK Additives & Instruments. Laponite : performance additives. *LAPONITE Perform Addit* (2014)22. doi:10.1016/S0958-1669(97)80008-0
72. Gaharwar AK, Schexnailder PJ, Kline BP, Schmidt G. Assessment of using Laponite cross-linked poly(ethylene oxide) for controlled cell adhesion and mineralization. *Acta Biomater* (2011) **7**:568–577. doi:10.1016/j.actbio.2010.09.015
73. Colodney, Daniel and Cordon M. Toothpaste-Colgate-Palmolive Co. Available at: <https://patentimages.storage.googleapis.com/a9/a7/f4/161588acb5155c/US3929987.pdf>

[Accessed June 24, 2018]

74. Enzo® Life Sciences. Product Manual-Live-Dead Cell Satining Kit. (2015) Available at: <https://images-na.ssl-images-amazon.com/images/I/A1S5Por8CFS.pdf>
75. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. *Cell Viability Assays*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences (2004). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433> [Accessed January 3, 2018]
76. Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J Immunol Methods* (1997) **204**:205–208. doi:10.1016/S0022-1759(97)00043-4
77. Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric). (2012)1–21.
78. Heid C a C., Stevens J, Livak K. KJ, Williams P. M. Real Time Quantitative PCR. *Genome Res* (1996) **6**:986–994. doi:10.1101/gr.6.10.986
79. Huang GT-J. Dental pulp and dentin tissue engineering and regeneration: advancement and challenge. *Front Biosci (Elite Ed)* (2011) **3**:788–800. doi:10.2741/e286
80. Wang J, Lin L, Cheng Q, Jiang L. A strong bio-inspired layered PNIPAM-clay nanocomposite hydrogel. *Angew Chemie - Int Ed* (2012) **51**:4676–4680. doi:10.1002/anie.201200267
81. Gibbs DMR, Black CRM, Hulsart-Billstrom G, Shi P, Scarpa E, Oreffo ROC, Dawson JI. Bone induction at physiological doses of BMP through localization by clay nanoparticle gels. *Biomaterials* (2016) **99**:16–23. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.05.010
82. Zahn | Medizin-Lexikon.de. Available at: <http://www.medizin-lexikon.de/Zahn> [Accessed November 14, 2017]