

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Poliklinik für Zahnerhaltung
des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
– Direktor: Univ.- Prof. Dr. K.H.R. Ott –

**Vergleich zwischen ProRoot MTA und Kalziumhydroxid
bei der direkten Überkappung der Rattenpulpa**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Dr. med. dent. Wolff, Philipp

aus Bielefeld

2010

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.- Prof. Dr. med. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. dent. T. Dammaschke
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. dent. C. Lippold

Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2010

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Poliklinik für Zahnerhaltung

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. K.H.R. Ott -

Referent: Priv.-Doz. Dr. T. Dammaschke

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. C. Lippold

ZUSAMMENFASSUNG

Vergleich zwischen ProRoot MTA und Kalziumhydroxid

bei der direkten Überkappung der Rattenpulpa

Dr. med. dent. Wolff, Philipp

Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Wirkung von ProRoot MTA auf die exponierte Pulpa der Ratte bei der direkten Überkappung im Vergleich zu Kalziumhydroxid. Es wurden 136 obere Molaren von 34 Wistarratten verwendet. Die Tierversuche wurden unter dem Aktenzeichen 50.0835.1.0 (G 41/2004) am 28.06.2004 genehmigt. Für die Behandlung wurden die Tiere anästhesiert, eine okklusale Kavität präpariert und die Pulpa schlitzförmig mit einer spitzen Sonde eröffnet. Anschließend wurde die Pulpa direkt mit ProRoot MTA (60 Molaren) bzw. Kalziumhydroxid (60 Molaren) überkappt. Alle Kavitäten wurden mit einem fließfähigen Kompositmaterial verschlossen. Insgesamt sechzehn Zähne dienten als Kontrollgruppe (8 Molaren nur Pulpafreilegung, 8 Molaren ohne Behandlung). Es wurden drei Untersuchungszeiträume unterschieden: Sofort-Reaktion (30 min nach direkter Überkappung/6 Tiere), Kurzzeitreaktion (einen und drei Tage nach direkter Überkappung/14 Tiere) und Langzeitreaktion (sieben und siebenzig Tage nach direkter Überkappung/14 Tiere). Die Tiere wurden dann entsprechend ihrer Überlebensdauer durch CO₂-Inhalation geopfert.

Neben der morphologischen Beschreibung der lichtmikroskopischen Bilder erfolgte eine semiquantitative Auswertung unserer Ergebnisse durch ein histologisches Scoring. Die Gewinnung von Informationen über die Teilungsaktivität der Pulpazellen erfolgte mittels immunhistologischen BrdU-Nachweises. Anschließend wurden die lichtmikroskopisch und immunhistochemisch erhobenen Befunde statistisch ausgewertet. Nach drei Tagen konnte bei den mit ProRoot MTA überkappten Zähnen eine signifikant geringere Nekroseausdehnung festgestellt werden. Der Markierungsindex der mit ProRoot MTA überkappten Zähne zeigte sich gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe statistisch signifikant erhöht. Weitere statistisch signifikante Unterschiede konnten nicht festgestellt werden. Die Überkappung mit ProRoot MTA führte im Vergleich zu Kalziumhydroxid zu einer statistisch nicht signifikant ausgeprägteren Reparaturdentinbildung ohne Anzeichen einer Entzündung des Pulpagewebes. ProRoot MTA zeigt sich somit als gut geeignet für die direkte Überkappung.

Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2010

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Direkte Überkappung	1
1.2	Pulpaheilung nach Überkappung mit Kalziumhydroxid (Ca(OH) ₂)	5
1.3	Mineral Trioxide Aggregate	9
1.4	Immunhistologie	12
2	Fragestellung	16
3	Material und Methoden	17
3.1	Gewinnung der histologischen Proben	17
3.2	Histologische Auswertung	19
3.3	Immunhistologie	20
4	Ergebnisse	23
4.1	Histologische Auswertung	23
4.1.1	Sofortreaktion (30 min) nach direkter Überkappung	23
	<i>Pulpa nach Präparation und mechanischer Eröffnung (mechanische Bearbeitung)</i>	23
	<i>Pulpa nach mechanischer Bearbeitung und Überkappung mit ProRoot MTA</i>	23
	<i>Pulpa nach mechanischer Bearbeitung und Überkappung mit Kalziumhydroxid</i>	24
4.1.2	Kurzzeit-Reaktion (1 Tag und 3 Tage) nach direkter Überkappung	25
	<i>Pulpa einen Tag nach Kontakt mit ProRoot MTA</i>	25
	<i>Pulpa einen Tag nach Kontakt mit Kalziumhydroxid</i>	25
	<i>Pulpa drei Tage nach Kontakt mit ProRoot MTA</i>	26
	<i>Pulpa drei Tage nach Kontakt mit Kalziumhydroxid</i>	27

4.1.3	Langzeit-Reaktion (7 und 70 Tage) nach direkter Überkappung	27
	<i>Pulpa sieben Tage nach Kontakt mit ProRoot MTA</i>	27
	<i>Pulpa sieben Tage nach Kontakt mit Kalziumhydroxid</i>	27
	<i>Pulpa siebenzig Tage nach Kontakt mit ProRoot MTA</i>	28
	<i>Pulpa siebenzig Tage nach Kontakt mit Kalziumhydroxid</i>	28
4.2	Statistische Auswertung des lichtmikroskopischen Scorings	30
4.3	Statistische Auswertung der immunhistologischen Untersuchung	31
5	Diskussion	32
5.1	Diskussion der Methode	32
	5.1.1 Die Ratte als Versuchstier	32
	5.1.2 Praktisches Vorgehen	33
5.2	Bakteriennachweis	34
5.3	Sofortreaktion nach direkter Überkappung	35
5.4	Kurzzeit-Reaktion nach direkter Überkappung	36
5.5	Langzeit-Reaktion nach direkter Überkappung	37
5.6	Immunhistochemie	44
6	Zusammenfassung	48
7	Literaturverzeichnis	50
8	Danksagung	65
9	Lebenslauf	66

1 Einleitung

1.1 Direkte Überkappung

Die direkte Überkappung ist ein medikamentöser Schutz der akzidentell oder traumatisch eröffneten, gesunden oder reversibel geschädigten Pulpa. Sie ist eine vitalerhaltende Therapiemaßnahme.

Bereits vor mehr als 250 Jahren, nämlich 1756, wurden die ersten Versuche einer direkten Überkappung der Pulpa mit Hilfe von Goldfolien von Pfaff beschrieben [116]. Aber lange Zeit galt die Vitalerhaltung eröffneter Pulpen durch direkte Überkappung als eine hoffnungslose Aufgabe. Erst mit der Entdeckung, dass die Wundbehandlung mit Kalziumhydroxid zur Reparatur der exponierten Pulpa führt, konnte gezeigt werden, dass eine Heilung möglich ist [110, 130, 175, 176].

Doch die direkte Überkappung ist immer eine kontroverse Behandlungsmaßnahme geblieben [94, 95, 142, 169]. Dies liegt nicht zuletzt an den zahlreichen Faktoren, die über die Prognose und somit den Erfolg einer Überkappungsmaßnahme entscheiden. An erster Stelle steht die korrekte Indikationsstellung. Zentrale Bedeutung hat in diesem Zusammenhang die Beurteilung des präoperativen Zustands der Pulpa, besonders im Hinblick auf eine mögliche Infektion und das mit der Infektion einhergehende entzündliche Geschehen.

Für eine erfolgreiche Überkappung sollte der Zahn asymptomatisch sein oder nur minimale Symptome zeigen. Günstig ist eine rein akzidentelle Eröffnung im gesunden Dentin [10, 23, 90]. Problematisch ist jedoch die klinisch sichere Diagnose des aktuellen Zustands der eröffneten Pulpa [77]. So ist die Beurteilung des Infektions- und Entzündungsgrades, reversible oder irreversible Entzündung, allein anhand klinischer Parameter oft nicht möglich [42].

Inwieweit die Größe der Pulpaeröffnung und das Alter des Patienten den Erfolg der Therapie beeinflussen, wird in der Literatur diskutiert. Obwohl größere Perforationen

mit einer erhöhten Gefahr der Mikroleakage einhergehen und schwieriger zu versorgen sind, ist die Forderung nach einem maximalen Durchmesser der Perforation von 1mm, nach Meinung einiger Autoren, nicht mehr aufrechtzuerhalten [30]. Hinzu kommt, dass für eine erfolgreiche Überkappung ein Kontakt des Überkappungsmaterials mit dem Pulpagewebe gefordert wird. Dies ist bei einer zu geringen Perforation nicht möglich. Das Alter des Patienten spielte in der Vergangenheit bei der Indikationsstellung eine entscheidende Rolle, als dass ein fortgeschrittenes Alter als Kontraindikation für die direkte Überkappung galt. Jedoch konnte in Langzeitstudien auch bei älteren Patienten eine vollständige Restitution der Pulpa beobachtet werden [6, 66].

Ein weiteres wichtiges Kriterium für den Erfolg einer direkten Überkappung ist die Kontrolle einer auftretenden Blutung vor Applikation des Überkappungsmaterials [7, 64, 97]. Blutstillung kann durch leichten Druck eines mit Wasserstoffperoxid, steriler Kochsalzlösung oder NaOCl getränkten Wattepellets erreicht werden [133].

Die wohl größte Gefahr für ein Scheitern der direkten Überkappung scheint durch eine bakterielle Infektion der Pulpa bedingt zu sein. Eine Infektion kann bereits während der Therapie durch die Verwendung nicht-steriler Arbeitsverfahren erfolgen oder postoperativ durch einen mangelhaften Verschluss der Kavität. Die eröffnete Pulpa verfügt über eine inhärente Eigenschaft zur Heilung durch Zellorganisation und Dentinbrückenbildung, wenn ein entsprechender biologischer Verschluss vor dem Einströmen oraler Mikroorganismen schützt [10, 25, 26, 141]. Entscheidend ist in diesem Zusammenhang der dauerhaft dichte Verschluss der Perforation, da das andauernde Einwandern von Keimen in der postoperativen Phase einen größeren Einfluss auf den Erfolg einer Überkappungsmaßnahme hat als ein kurzzeitiger Zutritt von Bakterien während der Behandlung [98, 119].

Kakehashi et al. konnten zeigen, dass eröffnete Zähne bei keimfreien Ratten auch ohne Versorgung zur Bildung von Dentinbrücken mit gesundem Pulpagewebe führten. In Anwesenheit von Bakterien kam es zur Infektion mit anschließender Nekrose der Pulpa [82]. Dies bedeutet, dass, je bakteriendichter das Überkappungsmaterial bzw. die Füllung ist, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit von unerwünschten Pulpareaktionen. Watts et al. unterstrichen diesen Aspekt, indem sie zeigen konnten, dass mit Überkap-

pungsmaterialien, deren Anwendung unter konventionellen Bedingungen ohne Erfolg blieb, bei keimfrei gehaltenen Tieren regelmäßig eine Hartgewebsbildung ausgelöst werden konnte [171].

Als Indikator für den Erfolg einer direkten Überkappung wird häufig die Reparatur durch Hartgewebsbildung angesehen [111]. Eine erfolgreiche Überkappung soll nach 75 bis 90 Tagen eine gesunde Pulpa und Dentinbrücken zeigen [143]. Sie dienen als physikalische Barriere dem Schutz der Pulpa. Legt man dieses Konzept zugrunde, so ist die Qualität der gebildeten Dentinbrücke ein wichtiger prognostischer Faktor. Bei der direkten Überkappung mit Kalziumhydroxid ist das Pulpagewebe in der Lage, Dentinbrücken zu bilden, die eine physikalische Barriere zum Schutz der Pulpa darstellen [133].

Viele Dentinbrücken verfügen über Hohlräume, so genannte „Tunneldefekte“, die eine Verbindung zwischen Pulpa und Überkappungsmaterial erlauben [29]. Diese Tunneldefekte können einen hermetischen Verschluss verhindern, der die Pulpa vor rezidivierenden Infektionen durch das Einsickern von Bakterien schützt. Cox et al. berichteten in ihrer Studie, dass 89 % der nach Kalziumhydroxid-Applikation gebildeten Dentinbrücken multiple Tunneldefekte aufwiesen, von denen die meisten dauerhaft bestehen blieben. Jeder dieser Tunnel steht durch Blutgefäße mit der Pulpa in Verbindung. Sie berichteten über etliche entzündete und infizierte Pulpen nach einem Zeitraum von 1 - 2 Jahren und sahen den Grund im Verschleiß der Deckfüllung und der nachfolgenden Migration von Mikroorganismen durch Tunneldefekte der Dentinbrücken [29].

So vielfältig die Faktoren sind, die über den Erfolg einer direkten Überkappung entscheiden, so vielfältig sind also auch die Ansprüche, die an ein Überkappungsmaterial gestellt werden. Dazu gehört die Biokompatibilität, der dichte biologische Verschluss, das Verhindern des Einwanderns von Bakterien und die Stimulation einer Dentinbrückenbildung [3, 113, 118]. Zurzeit gibt es kein einziges Medikament, das vorhersagbar und zuverlässig das Ziel der Erhaltung der Vitalität der Pulpa und damit die Funktionalität eines Zahnes gewährleisten kann.

Wie bereits erwähnt, spielte die Einführung von Kalziumhydroxid-Produkten eine wichtige Rolle in der Entwicklung der vitalerhaltenden Pulpathapie. 1920 stellte Hermann eine $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Rezeptur vor, die eine Dentinbrückenbildung bei exponierter Pulpa

induzierte [56, 69, 176]. Kalziumhydroxid ist seither der Goldstandard zur direkten Überkappung einer iatrogen eröffneten Pulpa. Trotz seiner langen Historie ist die Pulpa-therapie mit Kalziumhydroxid weiterhin umstritten. Der hohe pH-Wert führt zu einer lokalen Nekrose und zur Irritation des vitalen Pulpagewebes. Der Hauptkritikpunkt liegt aber vor allem an der Unfähigkeit der Kalziumhydroxid-Präparate, die Pulpa dauerhaft zu verschließen und so auf lange Sicht vor bakterieller Kontamination zu schützen. Des Weiteren tendiert Kalziumhydroxid zur Erweichung, Zersetzung und Auflösung und führt so zur Bildung von Hohlräumen und anderen potentiellen Pfaden, über die Bakterien in die Pulpa einwandern können [109, 114]. Andere Autoren kritisieren, dass die nach Überkappung mit Kalziumhydroxid gebildeten Dentinbrücken so genannte „Tunneldefekte“ aufweisen und somit keinen ausreichenden Schutz der Pulpa bieten [29].

Seit der Einführung von Kalziumhydroxid wurden viele weitere Materialien wie Hydroxylapatit, Trikalziumphosphat, Zinkoxid-Eugenol, Wachstumsfaktoren („bone morphogenic proteins“, BMP), MTA oder Dentinhaftvermittler zur direkten Überkappung vorgeschlagen. Die Theorie hinter der Verwendung von Dentinhaftvermittlern ist, dass einer der wichtigsten Heilungsfaktoren bei der direkten Überkappung die Verhinderung der bakteriellen Kontamination der Pulpa ist. Dentinhaftvermittler bieten ein hohes Abdichtungsvermögen und können so die Pulpa vor dem Einwandern von Bakterien schützen. Bemerkenswerterweise zeigten histologische Untersuchungen an Menschen weniger Erfolg als die Verwendung von Kalziumhydroxid, obwohl tierexperimentelle Studien durchaus vielversprechend waren [21, 39, 44, 67, 115].

1.2 Pulpaheilung nach Überkappung mit Kalziumhydroxid (Ca(OH)₂)

Vitales Pulpagewebe reagiert auf verschiedene Weisen auf eine Schädigung. Die Eröffnung der Pulpa führt immer zu einer vorübergehenden Entzündung. Die stattfindenden Reaktionen der Pulpa werden in die Phasen Hämostase, Entzündung, Proliferation und Neugestaltung eingeteilt. Diese Phasen können während der Wundheilung jedoch nicht eindeutig voneinander getrennt werden und überlappen sich somit [76].

Die initiale Gewebsreaktion vitalen Pulpagewebes auf Kontakt mit Kalziumhydroxid besteht aus einer oberflächlichen dreischichtigen Nekrose. Sie entsteht innerhalb einer Stunde und ist gekennzeichnet durch eine Zone der Koagulationsnekrose, die eine Demarkation gegen das vitale Gewebe darstellt. Der erste Effekt besteht in einer Zerstörung der Pulpazellen. Schröder und Granath [126] erklärten die verschiedenen Zonen der initialen Nekrose auf folgende Weise: Die oberflächliche Schicht entsteht durch den Druck beim Aufbringen des Kalziumhydroxids und den Druck des Ödems in der intermediären Schicht. Bei druckloser Applikation tritt sie nicht auf. Die zweite Schicht, die Zone der Ödembildung und Kolliquationsnekrose, wird durch die chemische Einwirkung der Hydroxidionen des Ca(OH)₂ hervorgerufen. In dieser Schicht wird der größte Teil der Hydroxidionen durch das Gewebe und die Plasmaproteine neutralisiert. Der alkalische Effekt auf das darunterliegende Gewebe verringert sich. In der untersten Schicht bildet sich eine Zone der Koagulationsnekrose, die durch den ödematösen Druck der mittleren Zone und die Einwirkung der nicht vollständig neutralisierten Hydroxidionen hervorgerufen wird. Sie entsteht innerhalb der ersten Stunde und bildet nach drei Stunden eine Demarkationslinie zum Pulpagewebe. Diese Demarkationslinie entsteht aus einer Fällungsreaktion zwischen dem Kalziumhydroxid und Gewebeproteinen zu Proteinkonglomeraten [141]. Diese scharfe Abgrenzung der Nekrose erklärt die erhaltene Funktionstüchtigkeit des angrenzenden Pulpagewebes [139]. Die Konzentration an Hydroxylionen wurde als verantwortlich für diese initialen Gewebsreaktionen angesehen [126].

Der alkalische Effekt ist unmittelbar und kurz. Kalziumhydroxid hat keinen anhaltenden negativen Einfluss auf die Zellproliferation, und der für ein Zellwachstum erforderliche pH-Wert wird nach 24 Stunden wieder erreicht [34, 65]. Innerhalb der ersten Tage nach der Behandlung kommt es in dem der Nekrose benachbarten Gewebe zu einer Reorganisation. Initial ist das Gewebe durch das Vorkommen von Nekrosen, Entzündungszellen und extravasalen Erythrozyten gekennzeichnet. Es kommt zur Exsudation von Fibrinogen und der Bildung eines Blutkoagulums. Die Entzündungszellen wandern nach ca. 6 Stunden in das Wundgebiet ein. Daraus resultiert eine leichte bis moderate Entzündung. Unterhalb der Nekrose migrieren und proliferieren Pulpazellen. Die eingewanderten polymorphkernigen Leukozyten bilden unterhalb der Demarkationslinie eine weitere Zone, die zum Pulpagewebe durch eine fibrilläre Zone abgegrenzt wird. Der Zerfall der Nekrosezone beginnt. Nach 24 Stunden sind die Begrenzungen der Nekrosezone nicht mehr vorhanden. Je nach Ausmaß des Traumas entstehen im angrenzenden Pulpagewebe vasomotorische Funktionsstörungen mit venöser Stauung und Reduzierung der Strömungsgeschwindigkeit. Es treten Thrombozytenaggregationen, Rhexisblutungen und extravasale Erythrozyten auf [55]. Diese frühe Phase der Pulpaheilung ist durch eine kurz dauernde Abwehrphase mit Zelluntergang, Gefäßerweiterung und das Einwandern von Entzündungszellen charakterisiert.

Bis zum dritten Tag hat sich die Mikrozirkulation normalisiert und das entzündliche Infiltrat wird durch einwanderndes Granulationsgewebe ersetzt, das sich entlang der Nekrosezone anordnet. Es besteht hauptsächlich aus Fibroblasten und Kapillaren und wächst in das geschädigte Gewebe ein. Nach vier Tagen entsteht in Kontakt mit der Nekrosezone neues Kollagen mit zellulären Einschlüssen. Die Zone der eingewanderten Leukozyten zeigt zu diesem Zeitpunkt erste Auflösungserscheinungen. Autoradiographisch und histologisch kann ein Anstieg von Fibroblasten und Endothelzellen beobachtet werden [51]. Nach ca. sieben Tagen können unterhalb der Demarkationslinie randständig angeordnete Fibroblasten und neu gebildetes Kollagen beobachtet werden. Die Leukozyteninfiltrate und die fibrilläre Zone sind nicht mehr vorhanden [126].

Zeigen die Kollagenfasern zunächst eine zufällige Anordnung, so orientieren sie sich später radiär zur Demarkationslinie. Schließlich entsteht, nach einer weiteren Vermehrung der Faseranteile, ein regelmäßig strukturiertes reifes Kollagengeflecht, das so ge-

nannte „Korffsche Geflecht“ [52]. In den oberflächlichen Anteilen imponieren ungeordnete kollagene Faserbündel, während in den tieferen Schichten die radiär zum Überkapungsmaterial ausgerichteten Korff-Fasern bereits tubuläre Kompartimente formieren [168]. Dieser Aufbau entspricht dem späteren zweischichtigen Aufbau des mineralisierten Pulpaverschlusses in Form der pulpafernen so genannten Fibrodentinschicht sowie der pulpanahen Zone regelmäßig strukturierten tubulären Dentins [80].

Bereits in der frühen Phase der Kollagensynthese können Mineralisationsherde in den tiefen Anteilen der Nekrosezone und der späteren oberflächlichen Fibrodentinschicht beobachtet werden [129]. Nach 11 Tagen sind kuboidale Zellen und einige Zellen mit odontoblastenähnlicher Differenzierung zu sehen. Nach 14 Tagen ist eine klare odontoblastenähnliche Anordnung zu erkennen [102]. Die Mineralisierung des Kollagengeflechts schreitet in der Folgezeit fort. Nach etwa vier Wochen ist eine oberflächliche Schicht irregulär strukturierten, mineralisierten Gewebes entstanden, welches Gefäß- und Zelleinschlüsse enthält [131]. Die pulpanahen Anteile bestehen zu diesem Zeitpunkt aus prädentinähnlichem Gewebe mit einer zur Pulpa hin liegenden Schicht odontoblastenähnlicher Zellen [126, 127]. Diese Barriere besteht nach drei Monaten aus einer zur Läsion gerichteten Zone aus irregulärem, mineralisiertem Hartgewebe und einer pulpanahen Zone aus dentinähnlicher Substanz mit Kanälchen und einer Reihe odontoblastenähnlicher Zellen [130]. Diese zweite Phase der Pulpaheilung ist durch die Reparation und Ausheilung der entstandenen Schäden charakterisiert. Pulpazellen aus dem vitalen Pulpagewebe proliferieren, bilden Kollagen, und schließlich kommt es zur Um-differenzierung in odontoblastenähnliche Zellen, die Prädentin synthetisieren und so ein Dentin mit Kanälchen, das sogenannte Reparaturdentin, produzieren. Reparaturdentin ist eine Form des Tertiärdentins, das durch eine neue Generation odontoblastenähnlicher Zellen, als Antwort auf einen entsprechenden Stimulus nach Untergang der postmitotischen, für die Bildung von primärem und physiologischem sekundärem Dentin verantwortlichen Odontoblasten sezerniert wird [133].

Über die Herkunft dieser odontoblastenähnlichen Zellen besteht bis heute Uneinigkeit. Direkt nach Eröffnung der Pulpa sind alle an der Eröffnungsstelle gelegenen primären Odontoblasten irreversibel geschädigt [104]. Diese postmitotischen, differenzierten Zellen können nicht proliferieren, um die geschädigten Odontoblasten zu ersetzen. Die

Odontoblasten müssen durch eine neue Generation odontoblastenähnlicher Zellen ersetzt werden [164, 165]. Autoradiographische Studien lassen vermuten, dass die odontoblastenähnlichen Zellen durch einen Prozess der Differenzierung und Migration zur Eröffnungsstelle proliferieren und dort Reparaturdentin sezernieren [50]. Die Differenzierung neuer Odontoblasten aus primär undifferenzierten Stammzellen oder die Redifferenzierung dieses Zelltyps aus anderen pulpalen Zellarten scheint dem Reparaturmechanismus zugrunde zu liegen [175]. Ob Kalziumhydroxid die Hartgewebsbildung direkt induziert oder indirekt als Bestandteil des Wundheilungsmechanismus der traumatisierten Pulpa beteiligt ist, ist weiterhin unklar. Der der Pulpahheilung dienliche Einfluss des Kalziumhydroxids scheint aber in erster Linie auf den durch die Freisetzung von Hydroxylionen entstandenen chemischen Gewebeschaden zurückzuführen zu sein [31, 130]. Zusätzlich hat der hohe pH-Wert einen bakteriziden Effekt, so dass diese beiden Faktoren und die Begrenzung durch die Nekrosezone über eine Irritation des vitalen Pulpagewebes die Pulpa zur Abwehr und Reparatur stimulieren [130].

1.3 Mineral Trioxide Aggregate

Mineral Trioxide Aggregate ist ein Derivat von Portlandzement, das an der Universität von Loma Linda in Kalifornien als Verschlussmaterial für retrograde Wurzelfüllungen und von Wurzelperforationen entwickelt wurde. Erstmals wurde es von Lee et al. 1993 in der Literatur beschrieben [91]. Es ist als ProRoot MTA (Dentsply/DeTrey, Konstanz, Deutschland) im Handel erhältlich. Dabei handelt es sich um weißen Portlandzement mit einem hohen Anteil an Wismutoxid [101, 150]. Die Hauptbestandteile sind Trikalziumsilikat, Trikalziumaluminat, Kalziumoxid, Siliziumoxid und einige andere mineralische Oxide. Das Wismutoxid wurde zur Erhöhung der Radioopazität beigefügt. MTA hat eine Röntgendichte entsprechend 6,4 mm Aluminium [89]. ProRoot MTA ist ein Pulver, das mit destilliertem Wasser im Mischverhältnis 3:1 (1g MTA: 0,35 g H₂O) angemischt wird. Das Pulver besteht aus feinen hydrophilen Partikeln, die unter Wasseraufnahme innerhalb von 2¹/₂ bis 3 Stunden zu einem kolloidartigen Gel aushärten. [35, 91, 150]. Nach dem Anmischen hat MTA einen pH-Wert von 11. Er steigt innerhalb von drei Stunden auf pH 12,5 und bleibt mindestens während 22 Stunden unverändert [35, 150]. Im Kontakt mit Wasser bzw. Zellflüssigkeit werden Calcium- und Hydroxylionen freigesetzt. Der pH-Wert entspricht demnach dem von Kalziumhydroxid [160]. MTA hat mit durchschnittlich 2 h 45 min eine wesentlich längere Abbindezeit als Amalgam, Super-EBA oder IRM [150]. Von einigen Autoren wird als Nachteil angesehen, dass es ausgewaschen werden oder umliegendes Gewebe irritieren könnte [1]. Die Druckfestigkeit beträgt nach 24 Stunden 40 MPa und ist signifikant kleiner als die von IRM (52 MPa), Amalgam (313 MPa) oder Super-EBA (60 MPa) [150]. Nach 21 Tagen beträgt die durchschnittliche Kompressionsfestigkeit 67 MPa. Somit liegt MTA im Bereich von Zinkoxid-Eugenolzementen und ist für okklusal belastete Füllungen nicht geeignet.

MTA besitzt ein hohes Abdichtungsvermögen und eine sehr gute, wahrscheinlich durch Expansion bedingte, marginale Adaptation [49, 148, 149, 151, 152]. In Leakagesstudien schnitt MTA besser ab als Amalgam oder IRM [91]. Auch bei bakteriellen Leakageversuchen zeigte MTA bessere Ergebnisse als Vergleichsmaterialien [49, 107,

152]. MTA zeigt im frisch angemischtem und im abgebundenen Zustand eine antibakterielle Wirkung auf einige fakultativ anaerobe Bakterien, jedoch keinen Effekt gegenüber obligat anaeroben Bakterien [145, 153].

MTA besitzt eine sehr hohe Biokompatibilität. MTA wies im Ames-Test kein mutagenes Potential auf [83]. Im Agar-Overlay-Test und bei Anwendung der Radiochromium-Methode zeigte MTA eine geringere Zytotoxizität als Super-EBA und IRM [154]. Im Vergleich mit anderen Wurzelkanalzementen und retrograden Wurzelfüllmaterialien hatte MTA als einziges Material keinen zytotoxischen Effekt auf Fibroblasten der Maus und menschliche Gingivafibroblasten [112]. Menschliche Osteoblasten zeigten auf MTA bessere Adhäsion, Zellmorphologie und Teilungsaktivität als auf Amalgam und IRM [178]. Bei der Kultivierung menschlicher Osteosarkomzellen mit MTA adhärten die Zellen in großer Zahl, was ein Zeichen für die gute Biokompatibilität von MTA ist [87]. In einer weiteren Studie wurde die Genotoxizität von MTA und Portlandzement untersucht. Keines dieser beiden Materialien führte zu einer Schädigung der DNA menschlicher Lymphozyten [18]. Moghaddame et al. untersuchten in ihrer In-vitro-Studie den Effekt von MTA auf die Apoptose und Proliferation von Pulpazellen und beobachteten, dass MTA keinen Zelltod induzierte und auch nicht zu einer Hemmung des Zellzyklus von Pulpazellen führte [103].

Nach Implantation in Tibia und Mandibula von Meerschweinchen löste MTA, im Vergleich zu Amalgam, Super-EBA und IRM, die mildeste Entzündungsreaktion aus [157]. Holland et al. implantierten mit MTA gefüllte Wurzelkanalscheiben in das subkutane Bindegewebe von Ratten und beschrieben die Bildung mineralisierten Gewebes in direktem Kontakt zum MTA und Dentin [75]. In Studien über die Verwendung von MTA als retrogrades Wurzelfüllmaterial in vivo konnte eine Zementneubildung sowohl über dem Dentin der resezierten Wurzel als auch über dem MTA gezeigt werden [117, 155, 156].

In den letzten Jahren sind zahlreiche Studien über die Verwendung von MTA als direktes Überkappungsmaterial veröffentlicht worden. Verschiedene tierexperimentelle Studien zeigten überlegene Eigenschaften als direktes Überkappungsmaterial im Vergleich mit Kalziumhydroxid [2, 46, 87, 118]. Die Ergebnisse dokumentieren eine ge-

steigerte Reparaturdentinbildung mit geringerer Entzündungsreaktion bei den mit MTA überkappten Zähnen. In einer histologischen Studie über die Kurzzeitreaktion bei direkter Überkappung von Hundezähnen konnte bereits nach sieben Tagen eine homogene Zone von kristallinen Strukturen an der Grenzfläche zwischen Pulpagewebe und dem MTA gefunden werden [167]. Nach drei Wochen hatte sich eine zweischichtige Hartgewebsbarriere im direkten Kontakt mit vitalem Pulpagewebe gebildet. Die Barriere bestand oberflächlich aus Osteodentin und pulpal aus einer tubulären dentinähnlichen Matrix mit elongierten Zellen, ähnlich der Struktur von Reparaturdentin. Die Ergebnisse können zwar nicht als eine direkte Induktion der Hartgewebsbildung durch MTA gedeutet werden, jedoch weisen sie deutlich auf einen stimulierenden Effekt des MTA auf die biosynthetische Aktivität von Pulpazellen hin [167].

In einer klinischen Studie, in der menschliche Weisheitszähne mit MTA und Kalziumhydroxid überkappt wurden, konnten in einem Beobachtungszeitraum von sechs Monaten eine stärkere Reparaturdentinbildung und geringere Entzündungsreaktion bei den mit MTA überkappten Zähnen gezeigt werden [5].

1.4 Immunhistologie

Grundlage der Zellproliferation ist die Verdopplung der genetischen Information und deren Weitergabe an die Tochterzelle. Auch beim erwachsenen Menschen teilen sich fortwährend Zellen, um abgestorbene zu ersetzen. Die Fibroblasten der menschlichen Zahnpulpa, die den Hauptbestandteil des Pulpagewebes darstellen, sind in der Regel nicht sehr teilungsfreudig. Jedoch steigt ihre Teilungsaktivität bei Schädigung des Gewebes [133]. Auch die hauptsächlich perivaskulär gelegenen undifferenzierten Mesenchymzellen können sich auf einen entsprechenden Reiz hin zu Fibroblasten oder Odontoblasten differenzieren, um irreversibel geschädigtes Gewebe zu ersetzen. So ist die Zellproliferation essentielle Grundlage des Reparaturmechanismus nach Schädigung des Pulpagewebes und die Ermittlung der Zellproliferation wichtiges Hilfsmittel zur Beurteilung verschiedener pathologischer Zustände der Pulpa. Bei der Teilung durchläuft die Zelle eine Folge von physiologisch unterschiedlichen, nicht umkehrbaren Phasen. Diese Phasen werden zusammengefasst als Zellzyklus bezeichnet und in G₁-Phase, S-Phase, G₂-Phase und M-Phase unterteilt. In der G₁-Phase wächst die Zelle und steigert die während der vorhergehenden Zellteilung stark reduzierte Proteinsynthese. In der darauffolgenden S-Phase findet die Replikation der DNA statt. Nach erfolgter Replikation setzt sich in der G₂-Phase das Zellwachstum und die Proteinsynthese bis zur Zellteilung, der so genannten M-Phase, fort. G₁-Phase, S-Phase und G₂-Phase werden auch als Interphase zusammengefasst [19]. Eine Beurteilung der Zellproliferation kann erfolgen, indem man sich die Vorgänge in der Zelle während der DNA-Synthese, der S-Phase, zunutze macht. Diese Vorgänge innerhalb der Zelle können nicht ohne Weiteres im Mikroskop beobachtet werden, wie es zum Beispiel während der M-Phase der Fall ist. Sie müssen durch spezielle Verfahren sichtbar gemacht werden. Die Aufnahme eines Thymidin-Analogen wie 2-Bromo-5-desoxyuridin (BrdU) während der S-Phase des Zellzyklus in die zelluläre DNA ist eine Möglichkeit der Beurteilung der DNA-Synthese [15].

Der erste monoklonale Antikörper gegen BrdU wurde 1982 von Gratzner beschrieben [61]. Die Menge des in vivo aufgenommenen Broms wird mit Hilfe der Antikörper-

Antigen-Reaktion mittels monoklonalem Anti-BrdU-Antikörper immunhistochemisch sichtbar gemacht und bestimmt [37]. Die ermittelten positiv gelabelten Zellen werden in Beziehung zur Gesamtzellzahl gesetzt und der prozentuale Anteil in Form des Markierungsindex (MI) ausgedrückt [43, 60]. Die Immunhistologie dient der Quantifizierung des Anteils der teilungsfähigen Zellen durch Auszählung und Berechnung eines Markierungsindex [15]. Das Prinzip der Immunhistologie beruht darauf, dass sich Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen spezifisch an dieses binden und so Strukturen hochspezifisch nachweisbar gemacht werden können. Antigene sind Substanzen, die im Organismus eine Immunreaktion hervorrufen können. Die molekularen Strukturen eines Antigens, die von einem Antikörper erkannt werden können, werden als antigene Determinanten oder Epitope bezeichnet. Antikörper zählen zur Proteinfamilie der Immunglobuline. Immunglobuline können hinsichtlich Größe, Molekulargewicht, Struktur und Funktion in 5 Klassen eingeteilt werden: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. Die in der Immunhistologie verwendeten Antikörper entstammen vorwiegend der Immunglobulinklasse G. Sie bestehen aus jeweils zwei identischen schweren Ketten und zwei identischen leichten Ketten. Die Ketten sind untereinander durch kovalente Disulfid-Brücken verbunden. Die beiden leichten Ketten sowie die über der Gelenkregion liegenden Anteile der schweren Ketten bilden das Antigen bindende Fab-Fragment. Die unterhalb der Gelenkregion befindlichen Anteile der schweren Ketten werden als Fc-Fragment bezeichnet [99].

Es können zwei Formen von Antikörpern unterschieden werden. Polyklonale Antikörper entstehen im Zuge einer Immunreaktion gegen die verschiedenen Determinanten eines Antigens. Es entsteht ein natürliches Gemisch von Antikörpern, die durch die jeweiligen B-Lymphozyten und Plasmazellen, also durch verschiedene Zellklone, gebildet werden. Im Gegensatz dazu werden monoklonale Antikörper von einem einzigen Zellklon produziert und richten sich auch nur gegen eine Determinante eines Antigens. Jeder Antikörper ist somit identisch aufgebaut und besitzt die gleiche Spezifität für das Antigen. Zur Herstellung monoklonaler Antikörper wird ein B-Lymphozyt, der den gewünschten Antikörper produziert, mit einer Myelomzelle fusioniert. Man erhält eine Hybridom-Zelle, die in der Lage ist, kontinuierlich einen bestimmten Antikörper herzustellen [12].

Das Prinzip der Antigen-Antikörper-Bindung kann sich die Immunhistologie zur Sichtbarmachung von bestimmten Strukturen zunutze machen. Dabei wird die Affinität der Antikörper zu spezifischen Determinanten genutzt. Diese Technik wurde erstmals von Coons und Kaplan 1950 beschrieben [24]. 1970 entwickelte Sternberger den immunhistochemischen Nachweis mittels Peroxidase-Anti-Peroxidase, dessen Methode als Vorbild für die heutigen immunhistochemischen Nachweise dient [144]. Der gegen das zu findende Antigen gerichtete Antikörper wird als Primärantikörper bezeichnet. Hierbei kann es sich um polyklonale oder einen monoklonalen Antikörper handeln. Bei der direkten Methode wird der Antikörper mit einem Enzym gekoppelt. Der Antikörper bindet sich an das Antigen und nach Anbieten eines Substrats reagiert das Enzym unter Bildung eines Farbstoffs mit dem Substrat. Der entstandene Farbstoff ist sichtbar. Diese Methode wird heutzutage jedoch nicht mehr praktiziert. Bei der indirekten Methode wird das entsprechende nachzuweisende Antigen zuerst mit einem unkonjugierten Primärantikörper inkubiert. Dann wird ein enzymgekoppelter, auch Sekundärantikörper genannter Antikörper, der gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist, aufgetragen. Erst dann erfolgt die Substrat-Enzym-Reaktion.

Die in dieser Arbeit verwendete APAAP-Methode ist ein Verfahren der löslichen Enzym-Immunkomplexe und besteht aus Alkalischer Phosphatase und Anti-Alkalischer Phosphatase-Antikörper. Diese immunhistochemischen Färbetechniken, auch als unmarkierte Antikörpermethode bezeichnet, verwenden einen bereits gebildeten löslichen Enzym/Anti-Enzym-Immunkomplex. Um diesen löslichen Komplex zu erhalten, mischt man Enzym und einen gegen das Enzym gerichteten Antikörper, wobei das Enzym im Überschuss zugegeben wird und sich eventuell bildende Präzipitate entfernt werden. Das Immunglobulin G (Ig G) hat die Fähigkeit, zwei Antigene gleichzeitig zu binden, und zwar je ein Molekül an jedem monovalenten Fab-Fragment. Die löslichen Enzym-Immunkomplex-Methoden bestehen in der Regel aus folgenden drei (Inkubations-) Schritten: (1) unkonjugierter Primärantikörper, (2) unkonjugierter Sekundärantikörper, (3) löslicher Enzym-Immunkomplex (APAAP), gefolgt von der Substrat-Chromogenlösung (Farbreaktion). Der Primärantikörper und der Antikörper des Enzym-Immunkomplexes müssen aus derselben Spezies stammen. Bei dem in dieser Studie verwendeten Primärantikörper handelt es sich um monoklonales Maus-Anti-BrdU. Er

bindet sich an in die DNA integriertes BrdU. Der Sekundärantikörper muss gegen Immunglobuline derjenigen Spezies gerichtet sein, aus der sowohl der Primärantikörper als auch der Antikörper des Enzym-Immunkomplexes stammen. Es handelt sich um polyclonale Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper. Der Sekundärantikörper wird im Überschuss zugegeben, so dass einer der beiden Fab-Arme an den Primärantikörper bindet, während der andere Fab-Arm für die Bindung an den Antikörper des Enzym-Immunkomplexes verfügbar bleibt. Auf diese Weise fungiert der Sekundärantikörper als Bindeglied zwischen Primärantikörper und Enzym-Immunkomplex und wird daher häufig als „Brücke“ oder „Brückenantikörper“ bezeichnet. APAAP verwendet einen Immunkomplex aus alkalischer Phosphatase (Enzym) und anti-alkalischer-Phosphatase (Anti-Enzym bzw. Antikörper). Er setzt sich aus zwei Molekülen alkalischer Phosphatase und einem dagegen gerichteten Antikörper zusammen. Das Enzym wird dann nachfolgend durch eine Substrat-Chromogenreaktion sichtbar gemacht. Immunenzymatische Färbemethoden nutzen Enzym-Substrat-Reaktionen, um farblose Chromogene in gefärbte Endprodukte umzuwandeln. Für diese Arbeit nutzten wir das Liquid Permanent Red (LPR) Substrat-Chromogen-System (Dako K0640). Es ist für immunhistochemische Färbungsverfahren mit alkalischer Phosphatase bestimmt. LPR bildet am Ort des Zielantigens ein permanentes, mit einem Standard-Lichtmikroskop darstellbares rotes Reaktionsprodukt [138]. Diese Technik ist sensitiver als andere beschriebene immunhistochemische Methoden. Die Nachweisempfindlichkeit der APAAP-Methode lässt sich verstärken, indem man die Inkubationsschritte, wie in unserer Arbeit geschehen, mit dem Brückenantikörper (Schritt 2) und dem Enzym/Anti-Enzym-Immunkomplex (Schritt 3) 1- oder 2-mal wiederholt: Schrittfolge 1-2-3-2-3-2-3 [13, 14].

2 Fragestellung

Ziel dieser tierexperimentellen Studie war die Untersuchung der Wirkung von ProRoot MTA auf die eröffnete Pulpa im Rahmen einer „direkten Überkappung“. Die beobachteten biologischen Reaktionen sollten mit der Wirkung von Kalziumhydroxid, welches klassischerweise für die Wundversorgung von Dentin und Pulpa verwendet wird, verglichen werden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Lichtmikroskopie sowie mit der Quantifizierung des Anteils der teilungsfähigen Zellen durch Auszählung mit Berechnung eines Mitoseindex.

Bisher vorliegende Untersuchungen zeigen, dass sich ProRoot MTA für die direkte Überkappung eignet. So beschrieben mehrere Veröffentlichungen im Vergleich mit einem Kalziumhydroxidpräparat signifikant bessere Ergebnisse [2, 46, 87, 118]. Allerdings besteht weiterhin Forschungsbedarf. So wurde in dieser Studie erstmals die Sofort- und Kurzzeitreaktion (d. h. nach 1 und 3 Tagen) von ProRoot MTA im Vergleich zu Kalziumhydroxid untersucht. Erstmals wurden in dieser Studie auch vergleichende Untersuchungen über die Proliferationsaktivität von Pulpazellen nach direkter Überkappung mit MTA und Kalziumhydroxid durchgeführt. Diese Ergebnisse helfen, die Reaktion der Pulpa auf das Überkappungsmaterial besser zu verstehen und Aufschluss über die initialen Reparaturmechanismen der exponierten Pulpa zu gewinnen. Zur Langzeitevaluation der Wirkungsweise der Überkappungsmaterialien erfolgte zusätzlich eine Beurteilung nach 7 und 70 Tagen.

3 Material und Methoden

3.1 Gewinnung der histologischen Proben

Für diese Studien wurden 34 Wistarratten mit einem Alter von drei Monaten und einem Körpergewicht von 250 g bis 300 g ausgewählt. Bei jeder Ratte wurde der 1. und 2. linke und rechte Molar im Oberkiefer behandelt, also 4 Zähne pro Tier, was eine Zahl von insgesamt 136 behandelten Molaren ergab. Die Zähne waren kariesfrei. Die Tierversuche wurden unter der Nr. G 41/2004 von der Bezirksregierung Münster genehmigt.

Um die Tiere zu anästhesieren, wurden 1 ml Ketamin (10 %) (CEVA, Düsseldorf) und 0,2 ml Xylazin (2 %) (CEVA, Düsseldorf) in 3,8 ml isotoner Kochsalzlösung gelöst und intramuskulär injiziert. Dies ergab eine Dosis von 0,2 ml pro 50 g Körpergewicht. Vor der Präparation wurden die Zähne mechanisch mit einer kleinen Bürste gereinigt. Chemisch erfolgte die Reinigung mit NaOCl (5 %). Anschließend wurden die Zähne mit Chlorhexidindigluconat (0,1 %) (Chlorhexamed-Fluid, Blend-a-med, Schwalbach) desinfiziert. Die Präparation der Zähne erfolgte unter Verwendung einer Lupenbrille mit einer 4,5 fachen Vergrößerung. Es wurde eine okklusale Kavität im ersten und zweiten oberen Molaren der linken und rechten Seite bis kurz vor Erreichen der Pulpakammer präpariert. Die Präparation erfolgte mit einem diamantierten, zylinderförmigen Schleifkörper der ISO-Größe 008 (NTI, Kahla) unter ständiger Wasserkühlung. Anschließend erfolgte die schlitzförmige Eröffnung des Pulpadaches mit einer spitzen Sonde (EXD2H, Hu-Friedy, Leimen). Blutansammlungen aus rupturierten Pulpagefäßen wurden mit sterilen Papierspitzen entfernt. Um an den Kavitätenwänden verbliebene Blutreste zu entfernen, wurde die Kavität mit H₂O₂ (3 %) gereinigt, schonend mit Wasserspray ausgespült und im Luftstrom getrocknet. Es wurden keine Vasokonstriktoren zur Blutstillung verwendet.

Die Überkappung der Pulpen in der Kontrollgruppe erfolgte mit Kalziumhydroxid. Die Ca(OH)₂-Suspension wurde jeweils frisch aus Calciumhydroxid pro analysis (Merck, Darmstadt) und isotoner Kochsalzlösung hergestellt. Die Überkappung der Untersuchungsgruppe erfolgte mit ProRoot MTA. ProRoot MTA (Dentsply DeTrey, Kons-

tanz; Chargen-Nr. 03081235) wurde mit destilliertem Wasser im Mischverhältnis 3:1 (1 g MTA: 0,35 g H₂O) angemischt. Anschließend wurden alle Kavitäten mit einem fließfähigen Kompositmaterial (Tetric Flow, Vivadent, Ellwangen) in Kombination mit einem selbstätzenden Dentinadhäsiv (Resulcin AquaPrime + Monobond) verschlossen. Zur Beurteilung der mechanischen Schädigung bei der Kavitätenpräparation und der Pulpafreilegung blieben insgesamt 8 Molaren als Kontrolle ohne weitere Behandlung (s. Tab. 1).

Tabelle 1: Einteilung der Untersuchungs- und Kontrollgruppen

Anzahl Ratten (Zähne)	Behandlung	Lebensdauer	Einbettung
2 (8)	nur Pulpafreilegung	30 min	Epoxidharz
2 (8)	Pulpafreilegung + MTA	30 min	Epoxidharz
2 (8)	Pulpafreilegung + Ca(OH) ₂	30 min	Epoxidharz
2 (8)	Pulpafreilegung + MTA	1 Tag	Epoxidharz
2 (8)	Pulpafreilegung + Ca(OH) ₂	1 Tag	Epoxidharz
2 (8)	Pulpafreilegung + MTA	3 Tage	Epoxidharz
2 (8)	Pulpafreilegung + Ca(OH) ₂	3 Tage	Epoxidharz
2 (8)	keine	3 Tage	Paraffin
2 (8)	Pulpafreilegung + MTA	3 Tage	Paraffin
2 (8)	Pulpafreilegung + Ca(OH) ₂	3 Tage	Paraffin
4 (16)	Pulpafreilegung + MTA	7 Tage	Epoxidharz
4 (16)	Pulpafreilegung + Ca(OH) ₂	7 Tage	Epoxidharz
3 (12)	Pulpafreilegung + MTA	70 Tage	Epoxidharz
3 (12)	Pulpafreilegung + Ca(OH) ₂	70 Tage	Epoxidharz
Σ 34 (136)			

Die Tiere wurden dann entsprechend ihrer Überlebensdauer durch CO₂-Inhalation geopfert.

3.2 Histologische Auswertung

Die Maxillasegmente wurden dissektiert und für die lichtmikroskopische Auswertung in Glutaraldehyd (2,5 % in Phosphat-puffer, pH: 7,4) immersionsfixiert. Die Fixierung der für die Immunhistologie verwendeten Proben erfolgte mittels 2,5 %iger Formalinlösung. Nach einer achtwöchigen Demineralisationsphase in EDTA wurden die Proben für die histologische lichtmikroskopische Auswertung in Epoxidharz (Epon 812, Serva, Heidelberg) bzw. für die immunhistologische Auswertung in Paraffinwachs eingebettet.

Die Herstellung der Semidünnschnitte erfolgte am Ultramikrotom (Ultracut, Reichert Jung, Wien). Die Proben wurden unter ständiger Kontrolle bis zur Eröffnung des Pulpakavums angetrimmt. Anschließend wurden Serienschnitte aus dem Bereich der Pulpa freilegung hergestellt und mit Toluidin-Blau gefärbt. Basophile und osmiophile Strukturen färben sich blau, metachromatische Substanzen rotviolett [120].

Als Ergänzung zur morphologischen Beschreibung erfolgte eine semiquantitative Auswertung im Sinne eines histologischen Scorings. Die Proben wurden untersucht auf: 1. das Ausmaß der Anwesenheit von Bakterien, 2. das Ausmaß der Anwesenheit von Entzündungszellen, 3. das Ausmaß von Nekrosen und 4. die Formation von Reparaturdentin.

Das Ausmaß der pulpalen Schädigung wurde in vier Intensitätskriterien unterteilt:

1 = nicht vorhanden, 2 = leicht, 3 = moderat, 4 = profund

Diese Intensitätskriterien sind ordinalskalierte Variablen mit folgender Bedeutung:

leicht: bis zu 1/3 des Kronengewebes sind betroffen

moderat: 1/3 – 2/3 des Pulpagewebes sind betroffen

profund: 2/3 – das ganze Pulpagewebe ist betroffen

Anschließend erfolgte die statistische Auswertung der Ergebnisse mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests.

3.3 Immunhistologie

Die Ratten wurden, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, behandelt. Nach 3 Tagen wurde bei zwei Ratten der Kalziumhydroxid- und zwei Ratten der ProRoot-MTA-Gruppe eine intraperitoneale Intravitalinjektion mit 5-Bromo-deoxyuridin (BrdU; Sigma-Aldrich, München) durchgeführt. Als Kontrollgruppe erhielten zwei Ratten ohne Operation ausschließlich eine Intravitalinjektion mit BrdU. Dazu wurde ein Ansatz aus 50 mg Trockensubstanz BrdU, gelöst in 5 ml physiologischer Kochsalzlösung, hergestellt. Die Applikationsmenge beträgt 50 mg pro Kg Körpergewicht bzw. 10 mg BrdU bei einem mittleren Körpergewicht von 200 g/Tier. Dies entspricht 1 ml angesetzter Lösung. Nach einer Stunde wurden die Tiere geopfert. Dies ist der als Verfügungszeit definierte Zeitraum, in dem die BrdU-Basen bereits in die replizierte DNA eingebaut, aber noch nicht auf die post-mitotischen Tochterzellen verteilt sind. Die chemische Fixierung und Einbettung erfolgte wie oben beschrieben.

Aus jedem Paraffinblock wurden an einem Mikrotom 13 Schnitte mit einer Schichtdicke von 8 µm angefertigt. Die hergestellten Schnitte wurden schwimmend in destilliertem Wasser auf einem Objektträger (Superfrost) positioniert und in einem 30 °C – 35 °C warmen Wasserbad gestreckt. Die Objektträger wurden zuvor mit einem Eiweiß-Glycerin-Gemisch beschichtet. Damit wird das Risiko, dass Gewebe bei Anwendung der Immunhistochemie abschwimmt, vermindert. Über Nacht wurden die Schnitte in einem Wärmeschrank bei 37° Celsius getrocknet. In diesem Zustand können die histologischen Schnitte bis zur Weiterverarbeitung gelagert werden.

Um unspezifische Hintergrundfärbungen zu vermeiden, muss der Paraffinschnitt vollständig entparaffiniert und rehydriert werden. Zu diesem Zweck wurden die Paraffinschnitte zweimal für jeweils zehn Minuten in Xylol inkubiert. Anschließend wurde das Xylol abgekippt und der Objektträger für weitere zehn Minuten in 100 % Ethanol inkubiert. Dieser Schritt wiederholte sich mit 96 % und 70 % Ethanol. Dann wurde das Ethanol abgekippt und der Objektträger mit Aqua dest gespült.

Formalinfixiertes und paraffineingebettetes (FFPE) Gewebe ist heute wegen seiner ausgezeichneten Erhaltung der Morphologie immer noch Mittel der Wahl für die meis-

ten klinischen Forschungsstudien. Jedoch bringt der durch die Formalinfixierung verursachte Verlust der Immunreaktivität vieler Antigene auch einige Herausforderungen mit sich. Bei Verlust von Immunreaktivität spricht man auch von einer „Maskierung“ des Antigens (Epitops). Um die Immunreaktivität zu verbessern, wurden die Schnitte sechs Minuten mit 0,05 % Pronase (1 % Pronase 50 µl + 950 µl Tris) proteolytisch angedaut. Dies wirkt der impermeablen Eigenschaft nichtkoagulierender Fixative entgegen. Es kommt zu einem „Aufschluss“ des Gewebes, wodurch versteckte Determinanten freigelegt werden. Anschließend wurden die Objektträger mit TRIS-Tween gespült. Zur weiteren Herstellung der Immunreaktivität erfolgte die Inkubation der Schnitte in einem Wasserbad mit 1 M HCl für acht Minuten bei 60°C.

Nach erneuter Spülung mit Tris-Tween, erfolgte die 60-minütige Inkubation der Schnitte mit monoklonalem Maus Anti-Bromdesoxyuridin (M 0744, DakoCytomation, Hamburg), dem sogenannten Primärantikörper in einer Konzentration von 1:20.

Anschließend wurden die Objektträger gespült und die Schnitte mit dem polyklonalen Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (Z 0259, DakoCytomation, Hamburg), dem sogenannten Brückenantikörper, 30 Minuten inkubiert (40 µl AK + 200 µl Humanserum + 760 µl Tris). Nach einer weiteren Spülung mit Tris-Tween erfolgte die Inkubation der Schnitte mit dem APAAP-Enzym-Immunkomplex (D 0651, DakoCytomation, Hamburg) für 30 Minuten (20 µl + 980 µl Tris).

Die beiden letzten Schritte, die Inkubation mit dem Brückenantikörper und dem Enzym-Immunkomplex, wurden ein zweites Mal durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug jedoch nur jeweils 10 Minuten. Es wurde außerdem bei der zweiten Inkubation mit dem Kaninchen-anti-Maus-Antikörper das Humanserum weggelassen und stattdessen 960 µl Tris zugeführt. Anschließend wurden die Objektträger wiederum mit Tris-Tween gespült.

Nach dem Waschen wurde der überflüssige Puffer abgeklopft und der Objektträger um die Probe herum vorsichtig abgewischt. Dann wurden die Proben mit der zubereiteten LPR-Lösung bedeckt, 9 Minuten inkubiert und anschließend mit Aqua dest gespült.

Daraufhin erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Es dient der farblichen Darstellung der Zellkerne und ist Bestandteil der immunhistologischen Aufarbeitung der Präparate. Es bewirkt einen Kontrasteffekt. Anschließend wurden die Proben gewässert, bei Raumtemperatur getrocknet und mit Xylol inkubiert. Das Eindecken der Schnitte erfolgte mit DEPEX (DPX; BDH Ltd., Pool, UK).

Pro behandeltem Zahn wurden drei Schnitte ausgewählt. Anschließend wurde bei jedem dieser Schnittpräparate die gesamte Ausdehnung der Pulpa mit einem Lichtmikroskop (PhoMi3, Zeiss, Wetzlar) mit Aufsatzkamera (XP900, Sony, München) in Kombination mit einem Bildbearbeitungsprogramm (Lucia Net, Nikon, Kingston Surrey, UK) bei 250-facher Vergrößerung fotografiert. Um die gesamte Kronenpulpaausdehnung zu erfassen, waren in der Regel pro Schnitt 15 - 20 Fotos notwendig. Die markierten und unmarkierten Zellen wurden mit Hilfe eines Bildanalyseprogramms ausgezählt (UTHSCSA ImageTool, University of Texas, Health Science Center, San Antonio, USA). Mit diesen Werten konnte dann der Markierungsindex (MI) mit der Formel, $\text{markierte Zellen/Anzahl aller Zellen} \times 100 = \text{MI}$, berechnet werden.

Ein statistischer Vergleich der Markierungsindices der jeweils untersuchten Materialien Kalziumhydroxid und ProRoot MTA erfolgte mittels nicht-parametrischem Mann-Whitney-U-Test.

4 Ergebnisse

4.1 Histologische Auswertung

4.1.1 Sofortreaktion (30 min) nach direkter Überkappung

Pulpa nach Präparation und mechanischer Eröffnung (mechanische Bearbeitung)

Auf lichtmikroskopischer Ebene waren im Bereich der Pulpafreilegung versprengte Dentinpartikel mit meist ausgerissenen Odontoblasten und eine massive Akkumulation von freien bzw. interstitiellen Erythrozyten auffällig (Abb. 1). Die mechanische Schädigungszone hatte eine Breite zwischen 200 μm - 400 μm bei einer Tiefenausdehnung von etwa 100 μm . Durch die Auswertung der Schnittserien konnte gezeigt werden, dass die Längenausdehnung der Schädigungszone auf ca. 80 μm beschränkt blieb.



Abb. 1: Lichtmikroskopische Aufnahme nach mechanischer Pulpafreilegung (30 min) ohne weitere Behandlung. Markierung = 500 μm , Originalvergrößerung 40x (Toluidin-Blau-Färbung).

Pulpa nach mechanischer Bearbeitung und Überkappung mit ProRoot MTA

Direkt nach Kontakt von ProRoot MTA mit dem vitalen Gewebe waren an der Pulpaoberfläche lichtmikroskopisch Zeichen einer Nekrose erkennbar (Abb 2a). Diese Nekrosezone war von unterschiedlicher Breite und setzte sich aus geschädigten Pulpazellen, geschädigten Blutzellen, Überkappungsmaterial und Dentinfragmenten zusammen. Direkt unterhalb der Nekrosezone war das Pulpagewebe intakt. Im Bereich der Sonden-

perforation kam es durch mechanische Traumatisierung zur Desintegration der Odontoblastenschicht und zur Versprengung von Dentinpartikeln in die Pulpa. Zum Teil konnte Odontoblastenzellkernaspiration beobachtet werden. Im Bereich der Pulpafreilegung waren zahlreiche dilatierte, prall mit Erythrozyten gefüllte Blutgefäße sichtbar. Vereinzelt waren freiliegende Erythrozyten im Interzellularraum auffällig.

Pulpa nach mechanischer Bearbeitung und Überkappung mit Kalziumhydroxid

In dieser Gruppe war lichtmikroskopisch erkennbar, dass das starke alkalische Milieu des Kalziumhydroxids zu einer Nekrose des Pulpagewebes mit einer Tiefenausdehnung von 200 μm – 300 μm geführt hatte (Abb. 2b). Auch in der Längenausdehnung reichte diese Nekrosezone über die Eröffnungsfläche hinaus. Innerhalb der Nekrosezone waren frühere Zellformationen nicht mehr erkennbar und durch ein strukturloses Detritusmaterial ersetzt. Die Abbildung stammt aus einem Bereich unterhalb der Nekrosezone mit intaktem histologischem Erscheinungsbild der Pulpa und der Odontoblasten.



Abb. 2a: Lichtmikroskopische Aufnahme nach Überkappung (30 min) mit ProRoot MTA. Markierung = 500 μm , Originalvergrößerung 40x (Toluidin-Blau-Färbung).

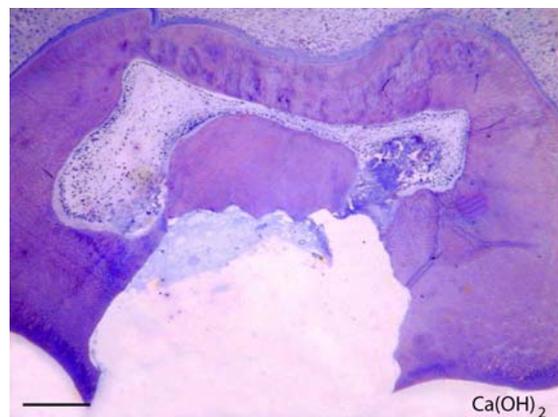


Abb. 2b: Lichtmikroskopische Aufnahme nach Überkappung (30 min) mit Kalziumhydroxid. Markierung = 500 μm , Originalvergrößerung 40x (Toluidin-Blau-Färbung).

4.1.2 Kurzzeit-Reaktion (1 Tag und 3 Tage) nach direkter Überkappung

Pulpa einen Tag nach Kontakt mit ProRoot MTA

Lichtmikroskopisch konnten einen Tag nach Kontakt von ProRoot MTA mit dem vitalen Gewebe - neben den Zeichen eines mechanischen Traumas bedingt durch die Pulpaerilegung - das typische Bild einer durch das alkalische Milieu bedingten Kolliquationsnekrose mit einer Tiefenausdehnung von 200 μm – 300 μm und einer über den Bereich der Pulpaeröffnung hinausgehenden Breitenausdehnung beobachtet werden (Abb. 3a). Sichtbar war eine Zone der Pulpadestruktion mit versprengten Dentinpartikeln sowie anhängenden Odontoblasten und einer Zone mit Pulpagewebsschäden mit Hämorrhagien (interstitielle Blutzellen), welche auf den Bereich der Sondenperforation beschränkt blieb.

Innerhalb der superfiziellen Zone der Nekrose konnten keine zellulären Komponenten (z. B. Fibroblasten und Odontoblasten) oder extrazelluläre Matrixsubstanzen mehr identifiziert werden. An dieser Stelle war ein unstrukturiertes Detritusmaterial auffällig. Dieses war durch Leerräume separiert, wie sie für eine durch ein alkalisches Milieu induzierte Kolliquationsnekrose charakteristisch sind. In einem Abstand von ca. 300 μm von der Region der Gewebsdestruktion zeigten sowohl das Pulpagewebe als auch das Prädentin und das Dentin strukturelle Integrität und normale Anfärbbarkeit.

Pulpa einen Tag nach Kontakt mit Kalziumhydroxid

Einen Tag nach direkter Überkappung mit Kalziumhydroxid konnten lichtmikroskopisch Unterschiede zu der ProRoot MTA-Gruppe nicht festgestellt werden (Abb. 3b).

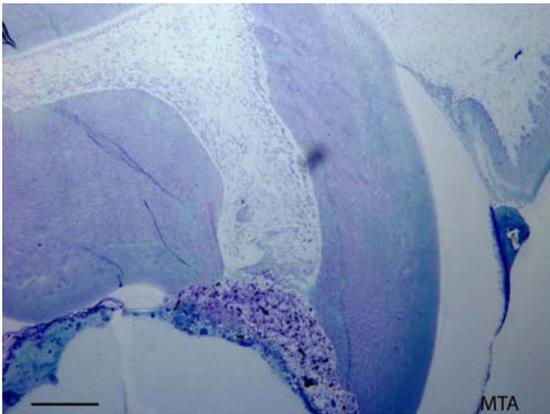


Abb. 3a: Lichtmikroskopische Aufnahme eines oberen Molaren 1 d nach Überkappung mit ProRoot MTA. Markierung = 500 μm , Originalvergrößerung 40x (Toluidin-Blau-Färbung)



Abb. 3b: Lichtmikroskopische Aufnahme eines oberen Molaren 1 d nach Überkappung mit Kalziumhydroxid. Markierung = 500 μm , Originalvergrößerung 40x (Toluidin-Blau-Färbung)

Pulpa drei Tage nach Kontakt mit ProRoot MTA

Drei Tage nach direkter Überkappung der Pulpa mit ProRoot MTA war eine Einwanderung von Entzündungszellen vor allem im Bereich der Dentinpartikel sichtbar (Abb. 4a). Diese Immunzellen wurden morphologisch als neutrophile Granulozyten identifiziert. Auch in den Lumina der stark dilatierten Blutkapillaren konnten marginalisierte neutrophile Granulozyten beobachtet werden.

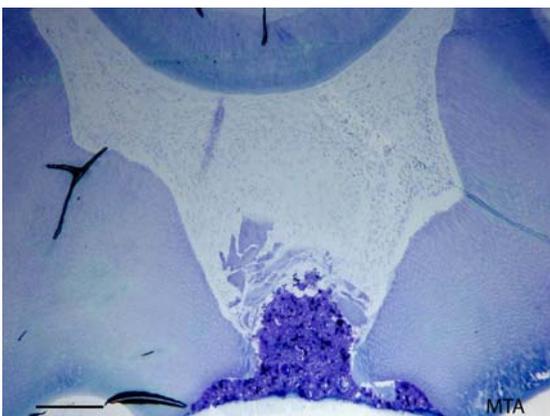


Abb. 4a: Lichtmikroskopische Aufnahme eines oberen Molaren 3 d nach Überkappung mit ProRoot MTA. Markierung = 500 μm , Originalvergrößerung 40x (Toluidin-Blau-Färbung)



Abb. 4b: Lichtmikroskopische Aufnahme eines oberen Molaren 3 d nach Überkappung mit Kalziumhydroxid. Markierung = 500 μm , Originalvergrößerung 40x (Toluidin-Blau-Färbung)

Pulpa drei Tage nach Kontakt mit Kalziumhydroxid

Die Vergleiche der lichtmikroskopischen und elektronenmikroskopischen Ergebnisse zeigten keine strukturellen Unterschiede zu der Ein-Tages-Gruppe (Abb. 4b).

4.1.3 Langzeit-Reaktion (7 und 70 Tage) nach direkter Überkappung

Pulpa sieben Tage nach Kontakt mit ProRoot MTA

Sieben Tage nach direkter Überkappung mit ProRoot MTA war der Nekrosebereich im Bereich der Kronenpulpa mit Granulationsgewebe durchwachsen (Abb. 5a). Der mikroskopische Zustand dieses Stadiums der Wundheilung war durch eine erhöhte Kapillardichte und zahlreiche metabolisch aktive Fibroblasten bei noch geringer Faserdichte der Interzellulärsubstanz gekennzeichnet.

Pulpa sieben Tage nach Kontakt mit Kalziumhydroxid

Die Kalziumhydroxidgruppe zeigte nach sieben Tagen im Allgemeinen das gleiche morphologische Erscheinungsbild wie die oben beschriebenen Kurzzeitreaktionen, abgesehen von vereinzelt Anzeichen einer Reparaturdentinbildung (Abb. 5b). Diese war als schmale inselförmige Hartgewebsformation an der Wand der Kronenpulpa sichtbar. Außerdem konnten zahlreiche Resorptionszellen, z.B. neutrophile Granulozyten innerhalb des Randbereiches der Nekrosezone identifiziert werden.

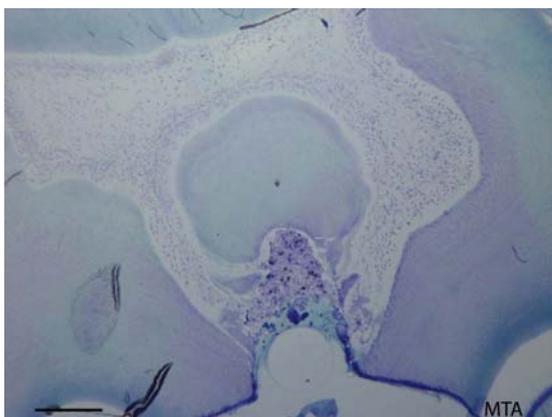


Abb. 5a: Lichtmikroskopische Aufnahme eines oberen Molaren 7 d nach Überkappung mit ProRoot MTA. Markierung = 500 µm, Originalvergrößerung 40x (Toluidin-Blau-Färbung)

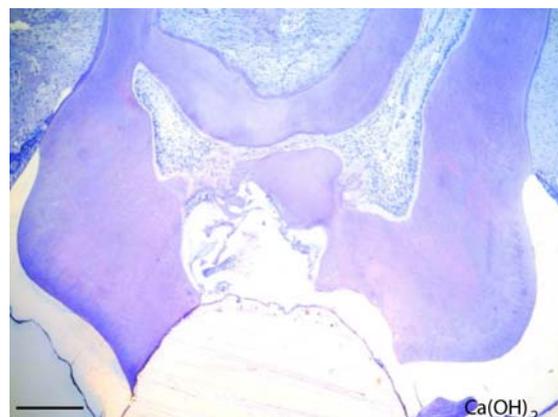


Abb. 5b: Lichtmikroskopische Aufnahme eines oberen Molaren 7 d nach Überkappung mit Kalziumhydroxid. Markierung = 500 µm, Originalvergrößerung 40x (Toluidin-Blau-Färbung)

Pulpa siebzig Tage nach Kontakt mit ProRoot MTA

Siebzig Tage nach direkter Überkappung mit ProRoot MTA war das morphologische Bild durch die starke Formation von Reparaturdentin gekennzeichnet (Abb. 6a). Die mikroskopisch sichtbare Fläche des Reparaturdentins nahm einen großen Teil der vorherigen Kronenpulpa ein. In einigen Fällen war fast das gesamte Kronenpulpagewebe durch Reparaturdentin ersetzt worden. Oberflächlich resultierte aus der unvollständigen Resorption von nekrotischem Gewebe ein Persistieren der Nekrosezone. In dem darunterliegenden Reparaturdentin waren Einschlüsse von versprengten Dentinpartikeln und Pulpagewebe zu beobachten. Das restliche Wurzelpulpagewebe war gesund mit intakter Odontoblastenschicht und frei von Entzündungszellen.

Pulpa siebzig Tage nach Kontakt mit Kalziumhydroxid

Siebzig Tagen nach Kontakt von Kalziumhydroxid mit dem freigelegten Pulpagewebe waren Zeichen der Pulpaheilung sichtbar (Abb. 6b). Trotzdem konnte ein *restitutio ad integrum* nicht beobachtet werden, da aus einer unvollständigen Resorption von nekrotischem Gewebe ein Persistieren der Nekrosezone resultierte. Unterhalb der persistierenden Nekrose konnte eine ausgeprägte Formation von Reparaturdentin, die sich bis zu 500 µm ins benachbarte Kronenpulpahorn und die Wurzelpulpa ausdehnte, beobachtet werden. Ein großer Bereich der ehemaligen Kronenpulpa war somit durch Reparaturdentin ausgefüllt. Folglich war die Nekrosezone in der Kronenpulpa durch eine Hartgewebsbildung vom restlichen Gewebe der Wurzelpulpa separiert. Die histologische Struktur des Reparaturdentins wurde als Zusammensetzung aus Dentin mit regulär angeordneten Tubuli und - zum überwiegenden Teil - aus faserhaltigem Dentin mit inkorporierten Pulpozyten klassifiziert. Das restliche Wurzelpulpagewebe war gesund mit intakter Odontoblastenschicht und frei von Entzündungszellen.

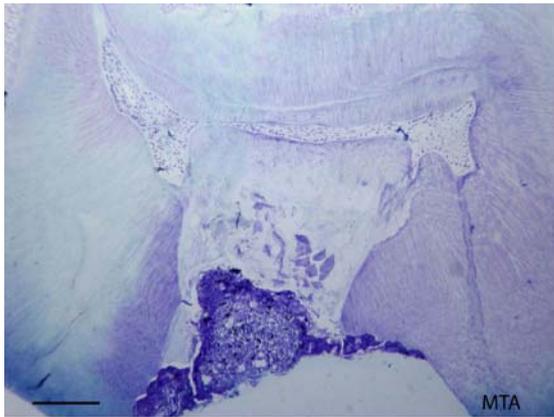


Abb. 6a: Lichtmikroskopische Aufnahme eines oberen Molaren 70 d nach Überkappung mit ProRoot MTA. Originalvergrößerung Markierung = 500 μm , 40x (Toluidin-Blau-Färbung)

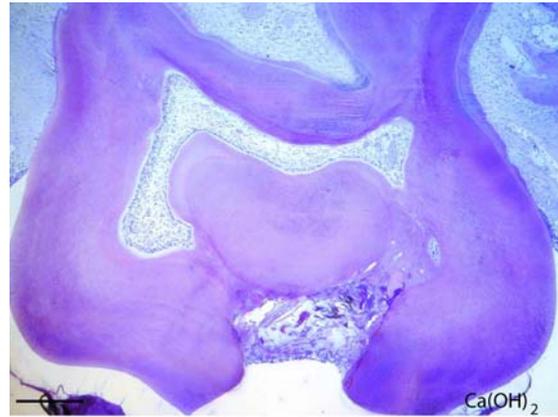


Abb. 6b: Lichtmikroskopische Aufnahme eines oberen Molaren 70 d nach Überkappung mit Kalziumhydroxid. Originalvergrößerung Markierung = 500 μm , 40x (Toluidin-Blau-Färbung)

4.2 Statistische Auswertung des lichtmikroskopischen Scorings**Tabelle 2:** Histologische Scorings mit Mittelwert und Standardabweichung

	Bakterielle Infektion $\xi \pm s$	Entzündungszellen $\xi \pm s$	Nekrose $\xi \pm s$	Reparaturdentin $\xi \pm s$
KH 0 d	1,0 ± 0	1,0 ± 0	2,0 ± 0	1,0 ± 0
MTA 0 d	1,0 ± 0	1,0 ± 0	1,33 ± 0,57	1,0 ± 0
KH 1 d	1,0 ± 0	1,25 ± 0,5	2,0 ± 0	1,0 ± 0
MTA 1 d	1,0 ± 0	1,5 ± 0,7	1,5 ± 0,7	1,0 ± 0
KH 3 d	1,0 ± 0	1,5 ± 0,57	2,0 ± 0 *	1,0 ± 0
MTA 3 d	1,0 ± 0	1,66 ± 0,57	1,0 ± 0 *	1,0 ± 0
KH 7 d	1,0 ± 0	1,0 ± 0	2,0 ± 0	1,33 ± 0,57
MTA 7 d	1,0 ± 0	1,33 ± 0,51	2,66 ± 0,81	1,0 ± 0
KH 70 d	1,5 ± 0,57	1,0 ± 0	2,0 ± 0	2,75 ± 0,5
MTA 70 d	1,0 ± 0	1,0 ± 0	1,0 ± 0	3,5 ± 0,57

Die mit * markierten Werte unterscheiden sich statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Ergebnis der statistischen Auswertung

Am dritten postoperativen Tag konnte bei den mit ProRoot MTA überkappten Zähnen eine signifikant geringere Nekroseausdehnung in der Kronenpulpa im Vergleich zu Kalziumhydroxid festgestellt werden ($p < 0,05$). Alle anderen Werte unterschieden sich nicht signifikant ($p > 0,05$) (Kruskal-Wallis-Test).

4.3 Statistische Auswertung der immunhistologischen Untersuchung

Tabelle 3: Markierungsindex mit Mittelwert und Standardabweichung

ohne OP	KH	MTA
$\xi \pm s$	$\xi \pm s$	$\xi \pm s$
0,60 ± 0,24 *	1,34 ± 0,93	1,72 ± 0,65 *

Die mit * markierten Werte unterscheiden sich statistisch signifikant ($p < 0,025$).

Ergebnis der statistischen Auswertung

Da die Daten der nicht-operierten Tiere zweimal für einen Paartest herangezogen wurden, wird die Bonferroni-Korrektur angewandt und das Testniveau für diese zwei Vergleiche auf $\alpha/2 = 0,025$ abgesenkt.

Nach direkter Überkappung mit Kalziumhydroxid gab es keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ohne OP ($p > 0,025$). Anders bei den mit ProRoot MTA behandelten Zähnen; hier waren nach drei Tagen signifikant mehr Zellen der Pulpa gefärbt als in der Kontrollgruppe ohne OP ($p < 0,025$). Im direkten Vergleich zwischen den mit Kalziumhydroxid und ProRoot MTA überkappten Pulpen gab es hinsichtlich der immunhistologischen Untersuchung keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,025$) (Mann-Whitney-U-Test).

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methode

5.1.1 Die Ratte als Versuchstier

In vielen Studien wurden bereits Rattenmolaren zur Untersuchung der direkten Überkappung bzw. der Reaktion des Pulpagewebes nach Exposition verwendet [36, 55, 72, 80, 81, 82, 108, 132, 134, 136, 161, 170]. Ratten haben als Versuchsobjekt große Vorteile. Sie sind aufgrund ihrer Größe vergleichsweise kostengünstig und leicht, auch in großer Zahl, zu halten. Dies bietet zugleich die Möglichkeit eines großen Probenumfangs. Die Ratte ist jedoch auch aus ethischen Gesichtspunkten als Versuchstier zu bevorzugen [177]. Da die Datenlage zu ProRoot MTA noch uneinheitlich und zudem als unvollständig zu bewerten ist, sollten Versuche zunächst an Ratten durchgeführt werden, bevor höhere Tiere, wie Schweine, Hunde oder Primaten, geopfert werden. Rattenzähne zeigen gegenüber menschlichen Zähnen morphologische Gemeinsamkeiten und werden sowohl histologisch, physiologisch als auch im biologischen Verhalten als vergleichbar beschrieben [11, 84, 88, 124, 125]. So bilden odontoblastenähnliche Zellen der Ratte nach Eröffnung der Pulpa charakteristisches Reparaturdentin, und auch die orale Keimflora von Ratten ist mit denen von Menschen vergleichbar [32, 172].

Bei der Verwendung von Ratten als Versuchstier müssen jedoch einige spezifische Besonderheiten in Betracht gezogen werden. Die geringe Größe der Rattenmolaren stellt den Untersucher vor technische Schwierigkeiten. So gestaltet sich der operative Zugang aufgrund der anatomischen Lage der Molaren als schwierig. Zudem zeigt die Rattenpulpa eine außergewöhnliche Belastbarkeit und die ausgeprägte Fähigkeit zur Selbstheilung [58]. Insgesamt bietet die Ratte jedoch ein geeignetes Untersuchungsmodell.

5.1.2 Praktisches Vorgehen

Bei der Beurteilung direkter Überkappungen sind bestimmte verfahrensimmanente Besonderheiten zu beachten, die in die Bewertung der histologischen Ergebnisse einbezogen werden müssen [133].

Das wohl wichtigste Kriterium für eine erfolgreiche Überkappung ist die Vermeidung einer bakteriellen Kontamination der Pulpa während der Überkappung. Schon früh wurde die wichtige pathologische Rolle der bakteriellen Kontamination der Pulpa bei der direkten Überkappung hervorgehoben [82]. Es wurde nachgewiesen, dass Verletzungen der Pulpa heilen können, solange Wundinfektionen kontrolliert werden. Zur erfolgreichen Vitalerhaltung der Pulpa müssen daher Materialien und Methoden eingesetzt werden, die den wichtigen ätiologischen Faktor der bakteriellen Infektion reduzieren oder eliminieren. Aus diesen Gründen wurde die Behandlung der Ratten unter weitgehend aseptischen Kautelen durchgeführt. Bei den Versuchen wurde auf eine vorherige gründliche Desinfektion der Zähne und die Verwendung steriler Instrumente geachtet. Die Verwendung von Kofferdam ist im Rattenmodell nicht möglich. Dies spiegelt jedoch den klinischen Alltag wider, da die Verwendung von Kofferdam am Patienten aufgrund tief zerstörter oder frakturierter Zähne ebenfalls schwierig bis unmöglich sein kann. In unserer Arbeit waren weder direkt nach der Überkappung noch nach 70 Tagen Bakterien in der Pulpa zu beobachten. Dies bedeutet jedoch nicht, dass eine bakterielle Kontamination tatsächlich nicht stattgefunden hat, wie in Kapitel 5.3 ausgeführt wird.

Ein weiteres zu beachtendes Merkmal ist die Anwesenheit von Dentinchips. Diese entstehen bei der Verwendung rotierender Instrumente während der Kavitätenpräparation und können bei der Sondenperforation in die Pulpa verschleppt werden. Die Eröffnung des Pulpakavums erfolgte mittels einer zahnärztlichen Sonde von okklusal. Dies führt zu einer geringeren Gewebeschädigung als die Verwendung rotierender Instrumente, die eine Zerrung oder Torsion des Gewebes bewirken [36, 59]. Begrenzen sie sich auf die oberen Anteile der Pulpa, so können sie die Heilung durch Hartgewebsbildung fördern [106, 137, 163]. Sind die Dentinteile in den tieferen Schichten der Pulpa lokalisiert, so können sie einen schädlichen Effekt haben [40].

Das Auftreten von Blutungen und die Entstehung von Blutkoageln bei der Eröffnung der Pulpa haben großen Einfluss auf den Erfolg einer direkten Überkappung [96]. Überkappungsmaterialien sollten niemals auf eine blutende Pulpa oder ein bestehendes Blutkoagel aufgebracht werden. Das Blutkoagel führt zu einer Migration von Makrophagen, die eine Abwehrreaktion mit Bildung einer chronischen Entzündung und Untergang des Pulpagewebes in Gang setzt [128]. Die Notwendigkeit einer entsprechenden Blutstillung wurde in vielen Studien bestätigt [68, 70, 102]. In unserer Arbeit erfolgte die Blutstillung mittels steriler Papierspitzen, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch andere Materialien außer den getesteten zu vermeiden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass sich unterhalb des Überkappungsmaterials keine Blutkoagel gebildet haben, die sich nachteilig auf die Wundheilung ausgewirkt haben könnten. Es wurden nur leichte, durch das mechanische Trauma verursachte, Hämorrhagien in unmittelbarer Nähe der Pulpaeröffnung beobachtet.

Ähnlich der Einsprengung von Dentinchips in das Pulpakavum können auch Splitter des Überkappungsmaterials in die Pulpa versprengt werden und ähnliche Effekte hervorrufen. Es ist darum während der Überkappung darauf zu achten, das Material mit leichtem Druck auf das exponierte Gewebe aufzutragen.

5.2 Bakteriennachweis

Der Bakteriennachweis erfolgte in unserer Studie mittels Toluidin-Blau-Färbung von in Epon eingebetteten Semidünnschnitten. Eine Kontamination der Pulpa mit Mikroorganismen kann auf zwei Arten erfolgen: 1. Primär können Keime während der Behandlung durch unsteriles Arbeiten in die Pulpa verschleppt werden, oder 2. sekundär wandern Keime durch einen undichten Verschluss in der postoperativen Phase in die Pulpa ein. Ein fehlender Bakteriennachweis bedeutet jedoch nicht, dass keine bakterielle Kontamination stattgefunden hat. Verfahrensbedingt besteht die Gefahr bei einer geringen Zahl von Mikroorganismen ein falsch-negatives Ergebnis zu erhalten [173]. Bakterien können während der histologischen Aufarbeitung verloren gehen, und die Anfärbemöglichkeit kann durch Fixierung und Demineralisierung reduziert werden [4, 174]. Zudem können Mikroorganismen an Füllungsmaterialien haften, die während der Schnittherstellung entfernt werden [17]. Hinzu kommt die den Überkappungsmaterialien eigene antibakterielle Wirkung, die noch näher erläutert wird.

5.3 Sofortreaktion nach direkter Überkappung

Die Beurteilung der Sofortreaktion eines Überkappungsmaterials 30 Minuten nach seiner Applikation dient der exakteren Interpretation einerseits der Gewebesofortreaktion auf das Material und andererseits des späteren Wundheilungsverlaufs.

Die mechanische Eröffnung der Pulpa führt auch unter den besten Bedingungen immer zu einer Traumatisierung des unterhalb der Eröffnungsstelle gelegenen Pulpagewebes mit nachfolgender Entzündungsreaktion. Das Aufbringen eines Überkappungsmaterials führt neben der mechanischen auch zu einer chemischen Schädigung des Pulpagewebes. In dem betroffenen Gewebe bilden sich Nekrosen aus.

Nach ausschließlich mechanischer Pulpafreilegung ohne weitere Behandlung kam es durch das Operationstrauma zu einer Zerstörung der Odontoblastenschicht und des oberflächlichen Pulpagewebes. Zudem zeigten sich Blutungen, einzelne Leukozyten und versprengte Dentinpartikel. Die Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen, die an Affen gemacht wurden [28]. Die Nekroseentstehung bei der Verwendung von Kalziumhydroxid erfolgt einerseits, materialunspezifisch, durch den Druck beim Auftragen des Medikaments, andererseits, materialspezifisch, durch die chemische Einwirkung der freigesetzten Hydroxidionen. Wässrige Kalziumhydroxidsuspensionen setzen unmittelbar und in großer Menge Hydroxidionen frei, die die entstandene Nekrose unterhalten und dazu führen, dass das intakte Pulpagewebe im Zuge des Reparaturprozesses von der Nekrosezone „abgekapselt“ wird [126, 139].

Bezüglich der Sofortreaktion sind in der Literatur noch keine Daten für ProRoot MTA bekannt. Auch bei der Überkappung mit ProRoot MTA kam es nach 30 min zur Ausbildung einer oberflächlichen Nekrose. Diese ist, wie weiter oben ausgeführt, bereits durch die traumatische Schädigung bei der Eröffnung der Pulpa bedingt. ProRoot MTA verfügt über einen ähnlich hohen pH-Wert wie Kalziumhydroxid. Direkt nach dem Anmischen liegt der pH-Wert von ProRoot MTA bei 11 und steigt innerhalb der nächsten drei Stunden auf 12,5 an [35, 150]. Kommt ProRoot MTA in Kontakt mit Gewebeflüssigkeit oder Wasser, bildet sich aus dem im Material befindlichen Kalziumoxid Kalziumhydroxid. Kalziumhydroxid dissoziiert dann in Kalzium und Hydroxidionen, was zur Erhöhung des pH-Wertes und zur Freisetzung von Kalziumionen führt. Insofern

kann man für ProRoot MTA einen ähnlichen kaustischen Effekt auf vitales Pulpagewebe erwarten, wie er bei der Verwendung von Kalziumhydroxidsuspensionen beobachtet wurde. So zeigte die statistische Auswertung initial keine signifikanten Unterschiede zwischen Kalziumhydroxid und ProRoot MTA.

Bei den ausschließlich mechanisch eröffneten Zähnen ohne weitere Behandlung konnte eine bakterielle Kontamination der Pulpa festgestellt werden. In keiner der Proben, die mit Kalziumhydroxid oder ProRoot MTA überkappt wurden, konnten Mikroorganismen nachgewiesen werden. Die Abwesenheit von Mikroorganismen bei den mit Kalziumhydroxid und ProRoot MTA überkappten Zähnen bedeutet allerdings nicht zwangsläufig, dass Mikroorganismen nicht vorhanden waren, da auch das Überkappungsmaterial die Bakterienzahl so weit reduziert haben könnte, dass ein Bakteriennachweis nicht mehr möglich war. Zudem kann es verfahrensbedingt zu einem falsch-negativen Ergebnis gekommen sein (siehe Kapitel 5.2). ProRoot MTA zeigt im frisch angemischtem und im abgebundenen Zustand eine antibakterielle Wirkung auf einige fakultativ anaerobe Bakterien, jedoch keinen Effekt gegenüber obligat anaeroben Bakterien [145, 153]. Zudem verfügt ProRoot MTA, wie bereits weiter oben ausgeführt, über einen ähnlich hohen pH-Wert wie Kalziumhydroxid, der einen bakteriziden Effekt hat. Bei einem Vergleich mit einer wässrigen Kalziumhydroxid-Suspension und Dycal zeigte ProRoot MTA jedoch eine geringere antibakterielle Wirksamkeit als die Kalziumhydroxid-Suspension [45]. Hinzu kommt, dass ProRoot MTA über ein hohes Abdichtungsvermögen verfügt und in bakteriellen Leakagestudien gute Ergebnisse zeigte [49, 107, 148, 149, 151, 152].

5.4 Kurzzeit-Reaktion nach direkter Überkappung

Einen Tag bzw. drei Tage nach direkter Überkappung konnte in beiden Gruppen das Einwandern von Entzündungszellen beobachtet werden. Hierbei handelte es sich v.a. um neutrophile Granulozyten und Makrophagen sowie vereinzelt eosinophile und basophile Granulozyten. Diese Reaktion wird durch das initiale Präparationstrauma sowie durch die mechanische und chemische Schädigung des Pulpagewebes durch die Überkappungsmaterialien selbst verursacht. Hier zeigten sich nach Überkappung mit ProRoot MTA signifikant weniger Zeichen einer Nekrose als bei den mit Kalziumhydroxid

behandelten Zähnen. Grund hierfür könnte eine geringere Ionenfreisetzung mit nachfolgend weniger ausgeprägtem Gewebeschaden sein. Die Messung der Kalziumionenabgabe kann zur Charakterisierung der spezifischen alkalisierenden Wirkung eines Materials verwendet werden. In Studien konnte gezeigt werden, dass die Kalziumionenfreigabe, und folglich auch die Freisetzung von Hydroxidionen, durch ProRoot MTA in geringer und gleichmäßiger Weise, gleichsam den Kalziumsalizylatzementen, erfolgt [41, 122]. Im Gegensatz zu den Kalziumhydroxid-Suspensionen erfolgt bei den Zementen eine kontinuierliche und geringere Ionenfreisetzung. Dadurch verringert sich die alkalisierende Wirkung auf das Pulpagewebe. Dies könnte ein Grund für die von uns beobachtete geringere Nekroseentstehung bei der Verwendung von ProRoot MTA im Vergleich zu Kalziumhydroxid sein und ist gleichzeitig ein entscheidender Vorteil gegenüber Kalziumhydroxid: Stimulierung der Reparaturmechanismen der Pulpa ohne ausgeprägte Gewebeschädigung.

Allerdings ist die Irritation des Pulpagewebes durch ein Überkappungsmaterial durchaus kontrovers zu betrachten. Einerseits wird von Überkappungsmaterialien ein Höchstmaß an Gewebeverträglichkeit verlangt, andererseits gilt der kaustische Effekt von Kalziumhydroxid als entscheidender Stimulus, der die Pulpa zur Reparatur und Hartgewebsbildung anregt [31, 130]. Es besteht somit die Frage, ob, und wenn ja, welche Mechanismen bzw. Materialeigenschaften des ProRoot MTA die Differenzierung von Pulpazellen mit anschließender Hartgewebsbildung induzieren.

Im Übrigen entsprechen die beobachteten Reaktionen des freigelegten Pulpagewebes den in der Literatur beschriebenen Vorgängen nach Überkappung mit Kalziumhydroxid (s. Kapitel 1.2). Daten sind für diesen Zeitraum für ProRoot MTA in der Literatur nicht zu finden.

Auch nach 1 bzw. 3 Tagen konnten keine Mikroorganismen beobachtet werden. Da die lichtmikroskopischen Bilder bei allen Proben einen dichten Füllungsrand zeigten, wurde das sekundäre Einwandern von Keimen durch Mikroleakage vermutlich verhindert.

5.5 Langzeit-Reaktion nach direkter Überkappung

In dieser Gruppe sollten der langfristige Wundheilungsverlauf und, im Speziellen, die Bildung von Reparaturdentin beurteilt werden. Die von uns beobachtete Entzündungs-

reaktion in Form des Einwanderns von Entzündungszellen und Fibroblasten und der beginnenden Reparatur durch Bildung von Granulationsgewebe innerhalb der ersten sieben Tage entspricht dem natürlichen Wundheilungsverlauf verletzten Bindegewebes. Jedoch gab es nach Überkappung mit ProRoot MTA, im Gegensatz zu Kalziumhydroxid, nach 7 Tagen keine Anzeichen einer Hartgewebsbildung. Der Grund könnte in der weiter oben beschriebenen geringeren Gewebsschädigung nach drei Tagen zu finden sein, die gleichwohl einen geringeren Reiz auf das Pulpagewebe darstellte.

Die Reparaturdentinbildung durch Differenzierung von Pulpazellen ist ein intrinsischer Abwehrmechanismus der Pulpa [167]. Das dentinogene Potential der Pulpazellen ist somit Teil des natürlichen Heilungsprozesses. So konnte nach Eröffnung der Pulpa auch ohne entsprechende exogene Applikation eine Hartgewebsbildung erreicht werden [25, 78, 82, 162,]. Eine Induktion des dentinogenen Potentials der Pulpazellen kann auf zwei Wegen erfolgen: direkt, als spezifischer biologischer Effekt des Überkappungsmaterials auf die Pulpazellen, oder indirekt, als Teil des stereotypen Wundheilungsmechanismus in der traumatisierten Pulpa [9, 92]. Für Kalziumhydroxid scheint der nutzbringende Effekt bei der Wundheilung aus der leichten oberflächlichen Nekrose und der chemischen Irritation durch OH⁻-Ionen zu bestehen [31, 130]. So führen Überkappungen mit inerten Materialien wie Teflon, die keine Pulpanekrosen verursachen, nicht zur Reparaturdentinbildung [31, 71]. Die Initiierung der Wundheilung setzt also ein Mindestmaß an traumatisiertem Pulpagewebe voraus. Schröder untersuchte 1985 den Reparatursprozess menschlicher Zähne, die mit Kalziumhydroxid direkt überkappt wurden [130]. Dieser entspricht dem durch Fitzgerald [51] beschriebenen Wundheilungsprozess: 1. Migration und Proliferation von Endothel- und Entzündungszellen zur Eliminierung des irritierenden Agens, 2. die Migration und Proliferation von mesenchymalen und endothelialen Zellen mit Bildung von Kollagen im Sinne einer Narbenbildung und 3. die Differenzierung von Odontoblasten aus Pulpazellen mit Bildung von Dentin. Vermutlich führte die geringere Nekrose bei der Verwendung von ProRoot MTA zu einer verzögerten Reparaturdentinbildung im Vergleich zu Kalziumhydroxid. Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen eine Woche nach direkter Überkappung mit ProRoot MTA decken sich mit den in der Literatur beschriebenen [5, 167].

Nach 70 Tagen zeigte sich in allen Proben, sowohl bei den mit Kalziumhydroxid als auch bei den mit ProRoot MTA überkappten, eine kompakte Dentinbrücke mit regulär angeordneten Tubuli. Das verbliebene Pulpagewebe war intakt mit normaler Odontoblastenschicht und ohne Zeichen einer Entzündung. Die Überkappung mit ProRoot MTA führte in allen Fällen zu einer Vitalerhaltung der Pulpa mit der Bildung von Reparaturdentin. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen ProRoot MTA und Kalziumhydroxid.

Es ist offensichtlich, dass die Hauptaufgabe eines Überkappungsmaterials, neben der Vitalerhaltung der Pulpa und einem dichten Verschluss der Eröffnungsstelle, in der Induktion einer Dentinbrückenbildung durch Pulpazellen bestehen sollte [3, 102, 130]. Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Überkappung mit ProRoot MTA zu einer ausgeprägten Reparaturdentinbildung führt [2, 5, 46, 47, 105, 118]. Pitt-Ford et al. glauben, dass die Hartgewebsbildung nach Überkappung mit ProRoot MTA auf das Abdichtungsvermögen, die Biokompatibilität, die Alkalität und andere material-spezifische Eigenschaften zurückzuführen ist [118]. Sie überkappten Affenzähne mit ProRoot MTA und Kalziumhydroxid und zeigten, dass die mit ProRoot MTA behandelten Zähne in allen Fällen, im Gegensatz zu den mit Kalziumhydroxid, nach 5 Monaten Dentinbrücken gebildet hatten [118]. Die gebildeten Dentinbrücken schlossen durchgängig mit dem benachbarten Dentin ab. Nur eine Pulpa hatte sich entzündet, kein Zahn war bakteriell kontaminiert. Pulpanah wurden Dentinkanälchen beobachtet, wohingegen das dem ProRoot MTA nahe gelegene Dentin Unregelmäßigkeiten zeigte. Diese Beobachtungen konnten durch andere Studien bestätigt werden. Faraco und Holland beschrieben die Bildung tubulärer Dentinbrücken in allen Proben nach 60 Tagen [47]. Auch sie machten die Beobachtung, dass direkt unterhalb des ProRoot MTA Unregelmäßigkeiten innerhalb des gebildeten Dentins auftraten. Sie beschrieben einige Tunneldefekte, die jedoch auf den Bereich nahe dem ProRoot MTA beschränkt waren und so keine Eintrittspforte für Mikroorganismen darstellten. Manche Dentinbrücken enthielten Freiräume unterschiedlicher Form und Größe, die nicht miteinander kommunizierten. Auch hier wurden keine entzündlichen Infiltrate oder Mikroorganismen beschrieben. In einer anderen Studie der oben genannten Autoren schilderten sie nekrotisches Pulpagewebe, Tunneldefekte und leichte Irregularitäten unterschiedlicher Morphologie in den oberflächlichen Anteilen der Dentinbrücken [46]. In allen Zähnen fand sich eine Odon-

toblastenschicht, deren Zellzahl nahe der Dentinbrücke am niedrigsten war. Auch in einer weiteren kürzlich veröffentlichten Studie zeigte sich eine Überlegenheit bei der Verwendung von MTA im Vergleich zu Kalziumhydroxid. Die mit MTA überkappten Zähne zeigten mehrheitlich nach 3 Monaten eine komplette Dentinbrückenbildung ohne Anzeichen einer Entzündung. Das Dentin war pulpanah regulär strukturiert, wohingegen sich bei den mit Kalziumhydroxid überkappten Zähnen inkomplette irregulär strukturierte Dentinbrücken mit zahlreichen „Tunneldefekten“ zeigten [105].

Diese Ergebnisse korrespondieren nur teilweise mit den von uns gemachten Beobachtungen. Die Reparaturdentinbildung bei der Überkappung mit MTA war noch ausgeprägter als in den oben beschriebenen Studien. Jedoch zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen ProRoot MTA und Kalziumhydroxid. Das gebildete Reparaturdentin zeigte in allen Proben regulär strukturiertes Dentin mit Dentinkanälchen. In den oberflächlichen Anteilen fanden sich zudem nekrotisches Pulpagewebe und Dentinchips. Faraco und Holland vermuten die Ursache für die oberflächliche Nekrosezone in den kalziumhydroxidähnlichen Materialeigenschaften des ProRoot MTA [46]. Die hohe Alkalität führt zu einer Koagulationsnekrose des vitalen Pulpagewebes. Eine weitere Ursache könnte sein, dass der parallele Verlauf von oberflächlichen Reparaturmechanismen mit Abbau von Pulpagewebe und die pulpanahe Bildung von Fibrodentin zu einer Abkapselung des Pulpagewebes mit Verbleib des oberflächlichen abgebauten Gewebes geführt hat.

Der Grund, dass einige Studien bessere Ergebnisse bei der Verwendung von ProRoot MTA zeigten, könnte auf die Verwendung erhärtender Kalziumhydroxid-Salizylatester-Zemente zurückgeführt werden [2, 5, 40, 46, 105, 118]. Wie bereits ausgeführt, zeigen Kalziumhydroxid-Salizylatester-Zemente eine geringere Hydroxyl- und Kalzium-Ionen-Freisetzung [41, 122]. Dadurch verringert sich die antibakterielle Wirkung der Zemente [45, 139]. Es kommt häufiger zu Entzündungen und seltener zur Reparaturdentinbildung [85, 94, 130, 140]. Ob die Verwendung wässriger Kalziumhydroxid-Suspensionen zu besseren Ergebnissen geführt hätte, bleibt spekulativ. Queiroz et al. verwendeten in ihrer Studie eine wässrige Kalziumhydroxid-Suspension. Nach 90 Tagen zeigten sowohl die mit Kalziumhydroxid als auch die mit MTA überkappten Zähne eine dicke Dentinbrücke ohne Anzeichen einer Entzündung des Pulpagewebes [38].

Wie bereits erwähnt, konnte eine primäre Kontamination der Pulpa mit Mikroorganismen nicht vollständig vermieden werden. Zur Verhinderung einer sekundären Kontamination der Pulpa muss das Überkappungsmaterial einen dichten Verschluss gewährleisten und, im besten Falle, eine antibakterielle Wirkung aufweisen. ProRoot MTA verfügt über ein hohes Abdichtungsvermögen und zeigte in bakteriellen Leakagestudien gute Ergebnisse [49, 107, 148, 149, 151, 152]. In Farbstoffpenetrationstests konnte schon früh gezeigt werden, dass ProRoot MTA an der Wurzel eine höhere Dichtigkeit als Amalgam und Super-EBA besitzt [49]. In der Anwesenheit von Blut zeigte ProRoot MTA ebenfalls bessere Ergebnisse als Amalgam, Super EBA und IRM [107]. Verglichen mit anderen gebräuchlichen retrograden Wurzelkanal-Füllmaterialien zeigte ProRoot MTA eine bessere marginale Adaptation [151]. In bakteriellen Leakage-Studien wies ProRoot MTA gleichfalls bessere Ergebnisse auf als Amalgam, Super EBA und IRM [49, 152]. Des Weiteren wurde in der Grenzfläche zwischen ProRoot MTA und Dentin die Bildung von Hydroxylapatit beobachtet, das Hohlräume im ProRoot MTA in der Form von Luftblasen oder Poren verschließen und so zur Erhöhung des Abdichtungsvermögens beitragen könnte [123]. Im Gegensatz dazu tendiert Kalziumhydroxid zur Erweichung, Zersetzung und Auflösung und führt so zur Bildung von Hohlräumen und anderen potentiellen Pfaden, über die Bakterien in die Pulpa einwandern können [109, 114]. Genau dieser Aspekt, die Fähigkeit, die Pulpa dauerhaft zu verschließen und so auf lange Sicht vor bakterieller Kontamination zu schützen, wird in Bezug auf Kalziumhydroxidpräparate immer wieder kritisch betrachtet und stellt einen wichtigen Vorteil von ProRoot MTA dar. In unserer Arbeit konnte auch nach 70 Tagen keine Kontamination durch Mikroorganismen festgestellt werden. Die Füllungsrän­der zeigten sich lichtmikroskopisch dicht. Somit konnte auch das sekundäre Einwandern von Mikroorganismen vermieden werden.

Es sind jedoch weitere Informationen notwendig, um die Frage nach der exakten Rolle von ProRoot MTA im Wundheilungsverlauf abschließend beurteilen zu können. Deshalb sollen hier abschließend einige materialimmanente Eigenschaften diskutiert werden.

In einer kürzlich erschienenen Studie berichten die Autoren, dass ProRoot MTA in Kontakt mit einer synthetischen hergestellten Gewebsflüssigkeit auf der Oberfläche eine

Hydroxylapatit-Schicht ausbildet. Das Hydroxylapatit soll sich auch zwischen ProRoot MTA und benachbartem Dentin bilden und so zu einer chemischen Verbindung dieser beiden Strukturen führen [123]. Die Autoren erklären dieses Phänomen durch die Freisetzung von Kalziumionen aus ProRoot MTA. Da Kalziumionen schwer löslich sind, würden sie zur Präzipitation von Hydroxylapatit führen. Bozeman et al. untersuchten Kristallpräzipitate auf der Oberfläche von weißem und grauem ProRoot MTA und bestätigten die chemische und strukturelle Ähnlichkeit mit Hydroxylapatit [16]. Diese chemische Reaktion könnte ein Grund für drei wichtige Eigenschaften von ProRoot MTA sein: das Abdichtungsvermögen, die gute Biokompatibilität und die Induktion von Reparaturmechanismen.

Bereits in einer früheren Studie entdeckten Tziafas et al. in einer Überkappungsstudie nach 7 Tagen kristalline Strukturen auf der pulpalen Oberfläche des ProRoot MTA [167]. Die kristallinen Strukturen enthielten Kalzium und Phosphor, was Sarkar et al. zu der Vermutung führte, dass es sich um Hydroxylapatit handeln könnte [123]. In der von Tziafas et al. im Jahre 2002 durchgeführten Studie zeigten Pulpazellen, die sich entlang der Zone kristalliner Strukturen anordneten, Veränderungen ihrer funktionellen und zytologischen Beschaffenheit [167]. Nach 2 Wochen bildete sich eine fibrodentinähnliche Matrix in direktem Kontakt mit der oberflächlichen kristallinen Schicht. Nach 3 Wochen konnte eine Reparaturdentinbildung in Form von Prädentin nachgewiesen werden. Dieser Mechanismus, die Bildung von Reparaturdentin in Verbindung mit der Fibrodentinbildung, entspricht dem natürlichen Wundheilungsmechanismus der Pulpa [9, 121]. Die Initiierung der Reparaturdentinbildung durch ProRoot MTA stimmt also auch mit der von Kalziumhydroxid überein und unterstreicht somit die ähnlichen Wirkungsweisen beider Materialien: Bei direkter Überkappung mit diesen Präparaten geht der Expression odontoblastenähnlicher Zellen die Bildung von Fibrodentin voraus [50, 130, 167]. Laut Tziafas et al. [167] ist dieser Mechanismus anscheinend nicht einer spezifischen, die Dentinbildung induzierenden Eigenschaft des Überkappungsmaterials zu verdanken.

Die Bildung kristalliner Strukturen konnte auch nach Überkappung mit Kalziumhydroxid beobachtet werden. Holland et al. beschrieben diese Kristalle als Kalzit [74]. Tziafas et al. implantierten kalziumhydroxidhaltigen Zement in die Pulpa von Hunden

und beobachteten Fibronectin in der Umgebung der auf dem Zement gebildeten Kristalle und Pulpazellen in direktem Kontakt mit diesen Kristallen [166]. Fibronectin, welches für die Zelladhäsion und –differenzierung verantwortlich ist, könnte eine wichtige Rolle in der Differenzierung von Odontoblasten spielen und somit den einleitenden Schritt für die Hartgewebsbildung darstellen [135]. Holland et al. beschrieben bei der Implantation von mit ProRoot MTA gefüllten Dentinscheiben in das Bindegewebe von Ratten ebenfalls die Bildung von Kalzit, der thermodynamisch stabilen Form des Kalziumkarbonats [75]. Diese Beobachtungen unterstreichen wiederum die vermutete ähnliche Wirkungsweise von ProRoot MTA und Kalziumhydroxid.

Des Weiteren könnte der Einfluss von ProRoot MTA auf die Produktion von Osteocalcin, alkalischer Phosphatase oder Zytokinen eine Rolle bei der Stimulierung der Reparaturdentinbildung spielen. Koh et al. untersuchten die Zytomorphologie von Osteoblasten und die Zytokinproduktion in der Gegenwart von ProRoot MTA und berichteten über die Stimulierung der Interleukinproduktion von Osteoblasten [86]. Da Interleukine auch in den Knochenmetabolismus einbezogen sind, könnte ProRoot MTA über die Freisetzung von Zytokinen die Wundheilung fördern [147]. Mitchell et al. beobachteten die Expression der Interleukine 6 und 8 in der Gegenwart von ProRoot MTA [101]. Dies ließe eine hohe Biokompatibilität vermuten, könnte aber außerdem die Heilung durch Stimulierung des Knochenumsatzes fördern.

5.6 Immunhistochemie

Ein wichtiger Aspekt zum Verständnis pulpaler Reaktionen auf exogene Stimuli ist die Gewinnung von Informationen über die Proliferationsrate von Pulpazellen. Bakterielle, chemische und mechanische Noxen führen zu einer Differenzierung und Proliferation von Pulpazellen mit Bildung von Tertiärdentin [48, 50, 51, 100, 146].

Es gibt verschiedene Möglichkeiten zur Messung der Zellproliferation *in vivo*. Die Markierung der sich in der Zellteilung befindenden Zellen erfolgte in unserer Arbeit mittels BrdU. Dies ist ein Thymidinanalogon, das während der S-Phase in die DNA eingebaut und immunhistologisch in alkohol- oder formalinfixiertem Material mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden kann. BrdU bietet gegenüber den früher üblicherweise verwendeten ³H-Thymidinen den Vorteil der fehlenden Radioaktivität und des geringeren Zeit- und Kostenaufwandes [53, 60].

Die statistische Auswertung der immunhistologischen Untersuchung zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Kalziumhydroxid und den unbehandelten Zähnen sowie zwischen Kalziumhydroxid und ProRoot MTA. Allerdings waren bei den mit ProRoot MTA behandelten Zähnen signifikant mehr Zellen gefärbt als bei den Zähnen ohne OP. Die gesunde Pulpa, deren Hauptbestandteil Fibroblasten darstellen, zeigt eine nur geringe Zellteilung, die bei Schädigung des Gewebes, aufgrund des eintretenden Reparaturmechanismus, ansteigt. Fitzgerald beschrieb in seiner Arbeit die zelluläre Antwort mechanisch eröffneter Pulpen von Rhesusaffen mittels ³H-Thymidin Autoradiographie folgendermaßen [51]:

1. Auflösung des Blutgerinnsels durch Makrophagen
2. Einwanderung von markierten Endothelzellen und Fibroblasten
3. Organisation und Differenzierung dieser Zellen in funktionelle Odontoblasten

Diese Beschreibung des pulpalen Wundheilungsprozesses spiegelt eine seit Jahren bestehende Diskussion über die Herkunft sekundärer Odontoblasten wider. Bei pathologischen Zuständen wie einer milden kariösen Läsion werden Odontoblasten zur Bildung von Reaktionsdentin stimuliert. Bei schweren Traumen, wie der mechanischen Eröff-

nung der Pulpa, kommt es zu einem Untergang der Odontoblasten an der Eröffnungsstelle [104]. Die post-mitotischen, bereits differenzierten Odontoblasten sind nicht in der Lage, zu proliferieren und die zerstörten Odontoblasten zu ersetzen. Eine neue Generation von odontoblastenähnlichen Zellen kann aus Pulpazellen durch einen Prozess der Differenzierung und Migration proliferieren und durch die Bildung von Reparaturdentin vor weiteren schädigenden Noxen schützen. Dieser Prozess setzt voraus, dass die Pulpazellen einen oder mehrere Replikationszyklen und folglich auch Zellteilungen durchlaufen, bevor sie letztlich zu funktionierenden odontoblastenähnlichen Zellen differenzieren. Lange Zeit wurde vermutet, dass der Ersatz irreversibel geschädigter Odontoblasten durch prädeterminierte odontoblastenähnliche Zellen erfolgt, die nach der Induktion ihre DNA nicht mehr replizieren [159]. Dass DNA-Replikationen beim Ersatz von Odontoblasten nach einem Trauma vorkommen, wurde bereits in Studien gezeigt [48, 175]. So bewiesen Feit et al., dass sich undifferenzierte Vorläuferzellen des Pulpaparenchyms teilen und dann zur Pulpaeröffnungsstelle migrieren [48]. Fitzgerald et al. vermuteten, dass odontoblastenähnliche Zellen mindestens zwei Zellzyklen durchlaufen haben müssen [50]. Die erste Replikation findet vor der Zellmigration statt, die zweite an der Stelle, an der die Expression des odontoblastenähnlichen Phänotyps erfolgt. Die Replikation der DNA von Pulpazellen ist folglich ein zentraler Vorgang bei der Wundheilung der eröffneten Pulpa. Die Herkunft möglicher Vorläuferzellen der neuen odontoblastenähnlichen Zellen ist weiterhin unklar. Es könnte sich um Pulpafibroblasten [48, 51], undifferenzierte mesenchymale Zellen [175], Perizyten [20] oder Myofibroblasten handeln [8]. In den letzten Jahren wurde in vielen Untersuchungen die Existenz von adulten Stammzellen in der menschlichen Pulpa, den so genannten „dental pulp stem cells“ (DPSC), diskutiert [62, 63]. Ihre Rolle im Rahmen des Ersatzes untergegangenen Pulpagewebes ist jedoch weiterhin unklar.

Die Steigerung der Proliferationsrate von Endothelzellen und Fibroblasten drei Tage nach direkter Überkappung mit ProRoot MTA und Kalziumhydroxid kann als Ausdruck der einsetzenden Reparatur des verletzten Pulpagewebes mit Bildung von Granulationsgewebe gewertet werden. Dabei konnte, aufgrund der vergleichbaren chemischen Wirkung, kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen ProRoot MTA und Kalziumhydroxid beobachtet werden. Moghaddame-Jafari et al. konnten *in vitro* beweisen, dass weißer ProRoot MTA zu einem leichten Anstieg der Proliferation odontoblastenähnli-

cher Zellen und undifferenzierter Pulpazellen führt [103]. Sie liefern somit eine mögliche Erklärung für die in anderen Arbeiten beschriebene Induktion der Dentinbrückenbildung durch ProRoot MTA [5, 46, 73, 118, 167]. Sie konnten in der gleichen Studie zeigen, dass ProRoot MTA nicht zur Apoptose von Pulpazellen führt und somit insgesamt einen positiven Effekt auf die Regeneration des pulpo-dentalen Komplexes in vitro hat.

In einer weiteren Studie zeigten Osteoblasten, die in Anwesenheit von ProRoot MTA kultiviert wurden, gutes Zellwachstum [86]. Osteoblasten produzieren in Anwesenheit von ProRoot MTA vermehrt Zytokine [87]. Die hauptsächlich produzierten Interleukine führen zu einer Proliferation von T- und B-Zellen und stimulieren die Proliferation und Differenzierung anderer Entzündungszellen. ProRoot MTA steigerte in vitro die Expression der Interleukine 6 und 8 [101]. ProRoot MTA besitzt somit Eigenschaften, die dieser Substanz erlauben, die proliferative Aktivität der Pulpazellen und daher die Wundheilung in der exponierten Pulpa positiv zu beeinflussen. Dieser positive Effekt von ProRoot MTA auf die Teilungsfähigkeit von Pulpazellen zeigte sich auch in unserer Arbeit, wenngleich kein signifikanter Unterschied zu Kalziumhydroxid nachgewiesen werden konnte.

Gleichwohl konnten wir mit unserer Arbeit zeigen, dass ProRoot MTA eine echte Alternative zu Kalziumhydroxid bei der direkten Überkappung traumatisch eröffneter Pulpen darstellt. Es verbindet die positiven Eigenschaften des Kalziumhydroxid mit überlegenen Materialeigenschaften, die sich auch in den Ergebnissen unserer Arbeit widerspiegeln: signifikant weniger Pulpanekrosen bei vergleichbar milder Entzündungsreaktion und ausgeprägter Tertiärdentinbildung bei ausbleibender bakterieller Kontamination. Zudem ist ProRoot MTA aufgrund seiner Materialeigenschaften mechanisch stabiler und dichter als Kalziumhydroxid.

Die immunhistologischen Ergebnisse lassen darüber hinaus einen positiven Effekt auf die proliferative Aktivität des Pulpagewebes vermuten. Somit bleibt festzuhalten, dass die unterschiedlichen Materialeigenschaften von ProRoot MTA in ihrer Gesamtheit die Voraussetzungen bieten, die es der Pulpa ermöglichen, auszuheilen und durch die Bildung von Reparaturdentin vor weiteren Noxen zu schützen, um so die Vitalerhaltung

des Zahnes zu gewährleisten. Signifikante Unterschiede zu Kalziumhydroxid gab es allerdings nicht.

Es fehlen jedoch weiterhin klinische Langzeitstudien über das Verhalten direkt überkappter Zähne, so dass keine abschließende Aussage über das Langzeitverhalten des Werkstoffs getroffen werden kann. Außerdem wird es weiterer Studien bedürfen, um die exakte Rolle von ProRoot MTA bei der Reparatur exponierten Pulpagewebes klar zu definieren. Hinzu kommt der sehr hohe Preis des Materials. Demgegenüber zeigt Kalziumhydroxid seit seiner Einführung gute klinische und histologische Ergebnisse und ist zudem äußerst preisgünstig.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit diente der Beurteilung von ProRoot MTA als Alternativpräparat zu Kalziumhydroxid. In einem tierexperimentellen Modell sollten die Eigenschaften von MTA und Kalziumhydroxid bei der direkten Überkappung verglichen werden. Die Tierversuche wurden unter dem Aktenzeichen 50.0835.1.0 (G 41/2004) am 28.06.2004 von der Bezirksregierung Münster genehmigt. Erstmals erfolgte eine Beurteilung der Sofort- (nach 30 Minuten) und Kurzzeitreaktion (nach 1 und 3 Tagen) von Rattenpulpen; zur Langzeitevaluation der Wirkungsweise der Überkappungsmaterialien erfolgte zusätzlich eine Beurteilung nach 7 und 70 Tagen. Erstmals wurden in dieser Studie auch vergleichende Untersuchungen über die Proliferationsaktivität von Pulpazellen nach direkter Überkappung mit MTA und Kalziumhydroxid durchgeführt. Bei 34 Wistarratten (entsprechend 136 Zähnen) wurde unter Anästhesie der jeweils erste und zweite rechte und linke Molar im Oberkiefer mit ProRoot MTA oder einer wässrigen Kalziumhydroxid-Suspension überkappt. Bei zwei Ratten wurden die Zähne lediglich trepaniert und nicht weiter behandelt. Zwei weitere Ratten blieben für die immunhistologische Aufarbeitung ohne jegliche Behandlung. Der Verschluss der Kavitäten erfolgte mit einem fließfähigen Kompositmaterial (Tetric flow, Vivadent, Ellwangen).

Neben der morphologischen Beschreibung der lichtmikroskopischen Bilder erfolgte eine semiquantitative Auswertung unserer Ergebnisse durch ein histologisches Scoring. Hierfür wurden Semidünnschnitte angefertigt und mit Toluidin-Blau gefärbt. Die Proben wurden dabei auf Bakterien, Entzündungszellen, Nekrosen und die Bildung von Reparaturdentin untersucht. Die Gewinnung von Informationen über die Teilungsaktivität der Pulpazellen erfolgte mittels immunhistologischem BrdU-Nachweis. Anschließend wurden die lichtmikroskopisch und immunhistochemisch erhobenen Befunde statistisch mit Hilfe des Wilcoxon- bzw. Mann-Whitney-U-Tests ausgewertet. Drei Tage nach direkter Überkappung mit MTA wurden histologisch signifikant weniger Nekrosen als bei der Verwendung von Kalziumhydroxid beobachtet. Bei der immunhistologischen Auswertung zeigte sich bei den mit MTA überkappten Zähnen eine signifikant höhere Proliferationsrate des Pulpagewebes im Vergleich zur Kontrollgruppe. ProRoot zeigt sich als gut geeignet für die direkte Überkappung. Obwohl insgesamt keine statistisch signifikanten Unterschiede zu Kalziumhydroxid bestanden, führte die Überkap-

pung zu geringeren Gewebeschäden und einer ausgeprägteren Reparaturdentinbildung ohne Anzeichen einer Entzündung.

7 Literaturverzeichnis

- 1) Abdullah D, Pitt Ford TR, Papaioannou S, Nicholson J, McDonald F (2002) An evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material. *Biomaterials* 23: 4001-4010.
- 2) Abedi HR, Torabinejad M, Pitt Ford TR, Bakland LK (1996) The use of mineral trioxide aggregate cement (MTA) as a direct pulp capping agent. *J Endod* 22: 199-209.
- 3) Abedi HR, Ingle JI (1995) Mineral trioxide aggregate: a review of a new cement. *J Calif Dent Assoc*; 23: 36-39.
- 4) Accorinte MLR, Loguercio AD, Reis A, Muench A, Araújo VC (2005) Response of human pulp capped with a bonding agent after bleeding control with hemostatic agents. *Oper Dent* 30: 147-155.
- 5) Aeinehchi M, Eslami B, Ghanbariha M, Saffar AS (2003) Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: report. *Int Endod J* 36: 225-231.
- 6) Ahrens G, Reuver J (1973) Eine Nachuntersuchung von direkten Pulpaüberkappungen aus der täglichen Praxis. *Dtsch Zahnärztl Z* 28, 862-865.
- 7) Akimoto N, Momoi Y, Kohno A, Otsuki M, Cox CF (1998) Biocompatibility of Clearfil Liner Bond and Clearfil AP-X system on nonexposed and exposed primate teeth. *Quintessence Int* 29: 177-188.
- 8) Alliot-Licht B, Hurtrel D, Gregoire M (2001) Characterization of a smooth muscle actin positive cells in mineralized human dental pulp cultures. *Arch Oral Biol* 46:221-228.
- 9) Baume LJ (1980) The biology of pulp and dentin. In: Meyers HM, ed. *Monoographs in Oral Science*, vol. 8, Krager, Basel, 67-82.
- 10) Baume U, Holz J (1981) Long term clinical assessment of direct pulp capping. *Int Dent J* 31: 251-260.
- 11) Berman DS, Massler M (1958) Experimental pulpotomies in rat molars. *J Dent Res* 37: 229-242.
- 12) Boenisch T (2003) Antikörper. In: Boenisch T (Hrsg.) *Immunchemische Färbemethoden*. 3. Aufl. DakoCytomation, Hamburg, S. 5-13.

- 13) Boenisch T (2003) Färbemethoden – Detektionssysteme. In: Boenisch T (Hrsg.) Immunchemische Färbemethoden. 3. Aufl. DakoCytomation, Hamburg, S. 34-42.
- 14) Boenisch T (2003) Grundlagen der Enzymatik. In: Boenisch T (Hrsg.) Immunchemische Färbemethoden. 3. Aufl. DakoCytomation, Hamburg, S. 18-22.
- 15) Bosq J, Bourhis J (1997) La bromodéxyuridine (BrdU). Analyse des proliférations cellulaires. *Ann Pathol* 17: 171-178.
- 16) Bozeman TB, Lemon RR, Eleazer PD (2006) Elemental analysis of crystal precipitate from gray and white MTA. *J Endod* 32, 5: 425-428.
- 17) Brännström M, Nordenvald KJ (1977) The effect of acid etching on enamel, dentin, and the inner surface of the restoration: a scanning electron microscopic investigation. *J Dent Res* 56: 917-923.
- 18) Braz MG, Camargo EA, Salvadori DMF, Marques MEA, Ribeiro DA (2006) Evaluation of genetic damage in human peripheral lymphocytes exposed to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *J Oral Rehabil* 33: 234-239.
- 19) Buselmaier W (1994) Zellvermehrung und Keimzellbildung. In: Buselmaier W *Biologie für Mediziner*. 7. Aufl. Springer, Heidelberg, S. 215-242.
- 20) Carlile MJ, Sturrock MG, Chisholm DM, Ogden GR, Schor AM (2000) The presence of pericytes and transitional cells in the vasculature of the human dental pulp: an ultrastructural study. *Histochem J* 32: 239-245.
- 21) Cehreli ZC, Turgut M, Olmez S, Dagdeviren A (2000) Short term human primary pulpal response after direct pulp capping with fourth-generation dentin adhesives. *J Clin Pediatr Dent* 25: 65-77.
- 22) Cevk M, Cleaton-Jones PE, Austin JC, Andreasen JO (1982) Pulp reactions to exposure after experimental tooth grinding in adult monkeys. *J Endod* 8: 391-397.
- 23) Clarke NG (1970) The morphology of the reparative dentine bridge. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 29, 746-752.
- 24) Coons AH, Kaplan MH (1950) Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for or the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exper Med* 91: 1-13.

- 25) Cox CF (1987) Biocompatibility of dental materials in the absence of bacterial infection. *Oper Dent* 12: 146-152.
- 26) Cox CF (1992) Microleakage related to restorative procedures. *Proc Finn Dent Soc* 88 (Suppl. 1): 83-93.
- 27) Cox CF, Bergenholtz G, Heys DR, Syed SA, Fitzgerald M, Heys RJ (1985) Pulp capping of the dental pulp mechanically exposed to the oral microflora - a 1 - 2 year observation of wound healing in the monkey. *J Oral Pathol* 14:156-168.
- 28) Cox CF, Bergenholtz G, Fitzgerald M, Heys DR, Heys RJ, Avery JK, Baker JA (1982) Capping of the dental pulp mechanically exposed to the oral microflora – a 5 week observation of wound healing in the monkey. *J Oral Pathol* 11: 327-339.
- 29) Cox CF, Sübay RK, Ostro E, Suzuki S, Suzuki SH (1996) Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping. *Oper Dent*: 21: 4-11.
- 30) Cvek M (1978) A clinical report on partial pulpotomy and capping with calcium hydroxide in permanent incisors with complicated crown fracture. *J Endod* 4: 232-237.
- 31) Cvek M, Granath L, Cleaton-Jones P, Austin J (1987) Hard tissue barrier formation in pulpotomized monkey teeth capped with cyanoacrylate or calcium hydroxide for 10 and 60 minutes. *J Dent Res* 66, 1166-1174.
- 32) D'Souza RN, Bachman T, Baumgardner KR, Butler WT, Litz M (1995) Characterization of cellular responses involved in reparative dentinogenesis in rat molars. *J Dent Res* 74: 702-709.
- 33) Dammaschke T, Stratmann U, Kaup M, Ott KHR (2004) Histozytologische Untersuchung zur Reaktion der Rattenpulpa auf Carisov 2. *Stomatologie* 101, 2: 31-36.
- 34) Das S (1981) Effect of certain dental materials on human pulp in tissue culture. *Oral Surg* 52: 76-84.
- 35) Deal BF, Wenckus BR, Johnson BR, Fayad MI (2002) Chemical and physical properties of MTA, Portland cement, and a new experimental Material, Fast-set MTA [abstract]. *J Endod* 28: 252.

- 36) Decup F, Six N, Palmier B, Buch D, Lasfargues JJ, Salih E, Goldberg M (2000) Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. *Clin Oral Investig* 4: 110-119.
- 37) De Fazio A, Leary JA, Hedley DW, Tattersall MH (1987) Immunohistochemical detection of proliferating cells in vivo. *J Histochem Cytochem* 35: 571-577.
- 38) De Queiroz AM, Assed S, Leonardo MR, Nelson-Filho P, da Silva LAB (2005) MTA and calcium hydroxide for pulp capping. *J Appl Oral Sci* 13: 126-130.
- 39) De Souza Costa CA, Lopes do Nascimento AB, Teixeira HM, Fontana UF (2001) Response of human pulps capped with a self-etching adhesive system. *Dent Mat*, 17: 230-240.
- 40) Dominguez MS, Witherspoon DE, Gutmann JC, Opperman LA (2003) Histological and scanning electron microscopy assessment of various vital pulp-therapy materials. *J Endod* 29: 329-333.
- 41) Duarte MA, Demarchi AC, Yamashita JC, Kuga MC, Fraga Sde C (2003) pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol and Endod* 95, 345-347.
- 42) Dummer PMH, Hicks R, Huws D (1980) Clinical signs and symptoms in pulp disease. *Int Endod J* 13, 27-35.
- 43) Eldridge SR, Tilbury LF, Goldsworthy TL, Butterworth BE (1990) Measurement of chemically induced cell proliferation in rodent liver and kidney: a comparison of 5-bromo-2'-deoxyuridine and [³H]-thymidine administered by injection or osmotic pump. *Carcinogenesis* 11: 2245-2251
- 44) Ersin NK, Fronat N (2005) The comparison of a dentin adhesive with calcium hydroxide as a pulp-capping agent on the exposed pulps of human and sheep teeth. *Quintessence Int* 36, 4: 271-280.
- 45) Estrela C, Bammann LL, Estrela CRA, Silva RS, Pécora JD (2000) Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J* 11: 3-9.
- 46) Faraco IM, Holland R (2001) Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dent Traumatol* 17: 163-166.

- 47) Faraco IM, Holland R (2004) Histomorphological response of dogs' dental pulp capped with white Mineral Trioxide Aggregate. *Braz Dent J* 15: 104-108.
- 48) Feit J, Metelova M, Sindelka Z (1970) Incorporation of [³H]-thymidine into damaged pulp of rat incisors. *J Dent Res* 49: 783-786.
- 49) Fischer EJ, Arens DE, Miller CH (1998) Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as compared with zinc-free amalgam, intermediate restorative material, and super-EBA as a root-end filling material. *J Endod* 24: 176-179.
- 50) Fitzgerald M, Chiego DJ Jr, Heys DR (1990) Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Arch Oral Biol* 35: 707-715.
- 51) Fitzgerald M (1979) Cellular mechanism of dentinal bridge repair using ³H-Thymidine. *J Dent Res* 58 (spec. Issue D): 2198-2206.
- 52) Folwaczny M, Mehl A, Haffner C, Hickel R (1998) Möglichkeiten und Perspektiven bei der direkten Überkappung der Pulpa. *Dtsch Zahnärztl Z* 53, 5: 307-321.
- 53) Foster JR (1997) The role of cell proliferation in chemically induced carcinogenesis. *J Comp Pathol* 116: 113-144.
- 54) Gängler P (1977) Vergleichende vitalmikroskopische und histologische Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der Pulpaüberkappungsmittel Kalziumhydroxid und Zinkoxid-Eugenol. *Zahn Mund Kieferheilk* 65: 376-391.
- 55) Gängler P, Hoyer I, Krehan F (1977) Biologische Prüfung von Pulpaschutzmitteln an der Molarenpulpa der Ratte. *Zahn Mund Kieferheilk* 65: 851-858.
- 56) Glass RL, Zander HA (1949) Pulp healing. *J Dent Res* 28: 97-107.
- 57) Goldberg F, Massone EJ, Spielberg C (1984) Evaluation of the dentinal bridge after pulpotomy and calcium hydroxide dressing. *J Endod* 10: 318-320.
- 58) Goldberg M, Smith AJ (2004) Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* 15: 13-27.
- 59) Goldberg M, Six N, Decup F, Buch D, Soheili Majd E, Lasfargues J-J, Salih E, Stanislawski L (2001) Application of bioactive molecules in pulp-capping situations. *Adv Dent Res* 15: 91-95.
- 60) Goldsworthy TL, Morgan KT, Popp JA, Butterworth BE (1991) Guidelines for measuring chemically-induced cell proliferation in specific rodent target organs.

- In: Butterworth BE, Slaga TJ (eds.) Chemically induced cell proliferation: Implications for risk assessment. Wiley-Liss, Inc., New York: 253-284.
- 61) Gratzner HG (1982) Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218, 4571: 474-475.
 - 62) Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Gehron Robey P, Shi S (2002) Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 81: 531-535.
 - 63) Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Gehron Robey P, Shi S (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13625-13650.
 - 64) Hafez AA, Cox CF, Tarim B, Otsuki M, Akimoto N (2002) An in vivo evaluation of hemorrhage control using sodium hypochlorite and direct capping with a one- or two-component adhesive system in exposed nonhuman primate pulps. *Quintessence Int* 33: 261-272.
 - 65) Hanks CT, Bergenholtz G, Kim JS (1983) Protein synthesis in vitro, in the presence of Ca(OH)₂-containing pulp-capping medicaments. *J Oral Pathol* 12: 356-365.
 - 66) Haskell EW, Stanley HR, Chellimi J, Stringfellow H (1978) Direct pulp capping treatment: a long-term follow-up. *J Am Dent Assoc* 97: 607-612.
 - 67) Hebling J, Giro EMA, de Souza Costa CA (1999) Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. *J Endod* 25: 676-682.
 - 68) Heilig J, Yates J, Siskin M, Mc Knight J, Turner J (1984) Calcium hydroxide pulpotomy for primary teeth: A clinical study. *J Am Dent Assoc* 108: 775-778.
 - 69) Hermann BW (1920) Calciumhydroxid als Mittel zum Behandeln und Füllen von Wurzelkanälen. Dissertation, Universität Würzburg.
 - 70) Heys DR, Heys RJ, Cox CF, Avery JK (1980) The response of four calcium hydroxides on monkey pulps. *J Oral Pathol* 9: 372-379.
 - 71) Heys DR, Fitzgerald M, Heys RJ, Chiego DJ jr (1990) Healing of primate dental pulps capped with Teflon. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 69: 227-237.
 - 72) Hirschfeld Z, Bab I, Tamari I, Sela J (1982) Primary mineralization of dentin in rats after pulp capping with calcium-hydroxide. *J Oral Pathol* 11: 426-433.

- 73) Holland R, de Souza V, Murata SS (2001) Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or Portland cement. *Braz Dent J* 12: 109-113.
- 74) Holland R, Pinheiro CE, de Mello W, Nery MJ, de Souza V (1982) Histochemical analysis of the dogs dental pulp after pulp capping with calcium, barium and strontium hydroxides. *J Endod* 8: 444-447.
- 75) Holland R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PFE, Dezan E Jr (2002) Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod* 25: 161-166.
- 76) Hørsted-Bindslev P, Løvschall H. (2002) Treatment outcome of vital pulp treatment. *Endod Topics* 2: 24-34.
- 77) Hyman J, Cohen M (1984) The predictive value of endodontic diagnostic tests. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 58, 343.
- 78) Inoue T, Shimono M (1992) Repair dentinogenesis following transplantation into normal and germ-free animals. *Proc Finn Dent Soc* 88 (Suppl 1): 183-194.
- 79) Isermann GT, Kaminski EJ (1979) Pulpal response to minimal exposure in presence of bacteria and Dycal. *J Endod* 5: 322-327.
- 80) Jaber L, Mascrès C, Donohue WB (1991) Electron microscope characteristics of dentin repair after hydroxylapatite direct pulp capping in rats. *J Oral Pathol Med* 20: 502-508.
- 81) Jean AH, Pouezat JA, Daculsi G (1993) Pulpal response to calcium phosphate materials. In vivo study of calcium phosphate materials in endodontics. *Cell Mater* 3: 193-200.
- 82) Kakeshi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ (1965) The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 20: 340-343.
- 83) Kettering JD, Torabinejad M (1995) Investigation of mutagenicity of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod* 21: 537-542.
- 84) Kindlova M (1963) Blood circulation in pulp and periodontium of rat incisors and molars. *Dent Abst* 8: 106.

- 85) Kirk EEJ, Lim KC, Khan MOG (1989) A comparison of dentinogenesis on pulp capping with calcium hydroxide in paste and cement form. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 68: 210-219.
- 86) Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford TR, Brady K, McDonald F (1997) Mineral Trioxide Aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 37, 432-439.
- 87) Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M (1998) Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 24: 543-547.
- 88) Kozlov M, Massler M (1960) Histologic effects of various drugs on amputated pulps of rat molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 13: 455-469.
- 89) Laghios CD, Benson BW, Gutman JL, Cutler CW (2000) Comparative radiopacity of tetracalcium phosphate and other root-end filling materials. *Int Endod J* 33: 311-315.
- 90) Langeland K, Dowden WE, Tronstad L, Langeland LK (1971) Human pulp changes of iatrogenic origin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 32, 943-980.
- 91) Lee S J, Monsef M, Torabinejad M (1993) Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod* 19: 541-544.
- 92) Lesot H, Smith AJ, Tziafas D, Begue-Kirn C, Cassidy N, Ruch JV (1994) Biologically active molecules and dental tissue repair: a comparative review of reactionary and reparative dentinogenesis with the induction of differentiation in vitro. *Cell Mater* 4, 199-218.
- 93) Liard-Dumtschin D, Holz J, Baume LJ (1984) Le coiffage pulpaire direct – essai biologique sur 8 produits. *Schweiz Mschr Zahnheilk* 94: 4-22.
- 94) Lim KC, Kirk EEJ (1987) Direct pulp capping: a review. *Endod Dent Traumatol* 3: 213-219.
- 95) Maryniuk GA, Haywood VB (1990) Placement of cast restorations over direct pulp capping procedures: a decision analytic approach. *J Am Dent Assoc* 120: 183-187.
- 96) Marzoud MA, Van Huysen G (1966) Pulp exposure without hemorrhage. *J Dent Res* 45: 405.
- 97) Matsuo T, Nakanishi T, Shimizu H, Ebisu S (1996) A clinical study of direct pulp capping applied to cariously exposed pulps. *J Endod* 22: 551-556.

- 98) McWalter GM, El-Kafrawy AH, Mitchell DF (1973) Pulp capping in monkeys with a calcium hydroxide compound, an antibiotic, and a polycarboxylate cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 36, 90-100.
- 99) Merz M, Feller AC (2001) Grundlagen der Immunreaktion In: Böcker W, Denk H, Heitz PU (Hrsg.) *Pathologie*. 2. Aufl. Urban & Fischer, München, Jena: 101-120.
- 100) Messier B, Leblond CP (1960) Cell proliferation and migration as revealed by radioautography after injection of [³H]-thymidine into male rats and mice. *Am J Anat* 106: 247-285
- 101) Mitchell PJC, Pitt-Ford TR, Torabinejad M, McDonald F (1999) Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. *Biomater* 20: 167-173.
- 102) Mjör IA, Dahl E, Cox CF (1991) Healing of pulp exposures: An ultrastructural study. *J Oral Pathol Med* 20: 496-501.
- 103) Moghaddame-Jafari S, Mantellini MG, Botero TM, McDonald MJ, Nör JE (2005) Effect of ProRoot MTA on pulp cell apoptosis and proliferation in vitro. *J Endod* 31: 387-391.
- 104) Murray PE, About I, Franquin J-C, Remusat M, Smith AJ (2001) Restorative pulpal and repair responses. *J Am Dent Assoc* 132: 482-491.
- 105) Nair PNR, Duncan HF, Pitt Ford TR, Luder HU (2008) Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial. *Int Endod J* 41: 128-150.
- 106) Nakashima M. (1990) An ultrastructural study of the differentiation of mesenchymal cells in implants of allogeneic dentine matrix on the amputated dental pulp of the dog. *Archs Oral Biol* 35: 277-281.
- 107) Nakata TT, Bae KS, Baumgartner JC (1998) Perforation repair comparing mineral trioxide aggregate and amalgam using an anaerobical bacterial leakage model. *J Endod* 24: 184-186.
- 108) Negm MM, Combe EC, Grant AA (1981) Reaction of the exposed pulps to new cements containing calcium hydroxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 51: 190-204.

- 109) Novickas D, Fiocca VL, Grajower R (1989) Linings and caries in retrieved permanent teeth with amalgam restorations. *Oper Dent*: 14: 33-39.
- 110) Nyborg H (1955) Healing processes in the pulp on capping. *Acta Odontol Scand* 13 (Suppl 16):1-130.
- 111) Nyborg H (1958) Capping of the pulp. The processes involved and their outcome. A report of the follow-ups of a clinical series. *Odontol Tidskr* 64: 296-364.
- 112) Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL (1998) Cytotoxicity of endodontic materials. *J Endod* 24: 91-96.
- 113) Pameijer CH, Stanley HR (1998) The disastrous effects of the "Total Etch" technique in vital pulp capping in primates. *Am J Dent* 11: 45-54.
- 114) Pereira JC, Manfio AP, Franco EB, Lopes ES (1990) Clinical evaluation of Dycal under amalgam restorations. *Am J Dent* 3: 67-70.
- 115) Pereira JC, Segala AD, Costa CAS (2000) Human pulpal response to direct pulp capping with an adhesive system. *Am J Dent* 13: 139-147.
- 116) Pfaff P (1756) *Abhandlung von den Zähnen des menschlichen Körpers und deren Krankheiten*. Haude & Spener, Berlin.
- 117) Pitt Ford TR, Torabinejad M, McKendry DJ, Hong CU, Kariyawasam SP (1995) Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 79: 756-763.
- 118) Pitt Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP (1996) Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. *J Am Dent Assoc* 127: 1491-4.
- 119) Pitt Ford TR (1979) Pulpal response to Procal for capping exposures in dogs teeth. *J Brit Endod Soc* 12: 67-72.
- 120) Romeis B (1989) *Mikroskopische Technik*. 17. Aufl. Hrsg.: P. Böck. Urban & Schwarzenberg München.
- 121) Ruch JV (1985) Odontoblast differentiation and the formation of the odontoblast layer. *J Dent Res* 64: 489-498.
- 122) Santos AD, Moraes JC, Araujo EB, Yukimitu K, Valerio Filho WV (2005) Physico-chemical properties of MTA and a novel experimental cement. *Int Endod J* 38: 443-447.

- 123) Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I (2005) Physico-chemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 31: 97-100.
- 124) Schour I, Van Dyke DB (1934) Changes of the teeth following hypophysectomy II. Changes in the molar of the white rat. *J Dent Res* 14: 69-84.
- 125) Schour I, Massler M (1949) The teeth. In: Farris EJ, Griffith JQ (eds.) *The rat in laboratory investigation*. 2nd ed. Hafner, New York.
- 126) Schröder U, Granath LE (1971) Early reaction of intact human teeth to Calcium Hydroxide following experimental pulpotomy and its significance to the development of hard tissue barrier. *Odont Revy* 22: 379-395.
- 127) Schröder U (1973) Reaction of human dental pulp to experimental pulpotomy and capping with calcium hydroxide. *Odont Revy* 24 (Suppl 25): 1-33.
- 128) Schröder U (1973) Effect of an extra-pulpal blood clot on healing following experimental pulpotomy and capping with calcium hydroxide. *Odontol Rev* 24: 257-269.
- 129) Schröder U, Sundström B (1974) Transmission electron microscopy of tissue changes following experimental pulpotomy of intact human teeth and capping with calcium hydroxide. *Odont Revy* 25: 57-67.
- 130) Schröder U (1985) Effects of calcium-hydroxide-containing pulpcapping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *J Dent Res* 64 (Spec Iss): 541-547.
- 131) Schroeder HE (1983) *Pathobiologie oraler Strukturen*. Karger, Basel.
- 132) Sela J, Tamari I, Hirschfeld Z, Bab I (1981) Transmission electron microscopy of reparative dentin in rat molar pulps. *Acta Anat* 109: 247-251.
- 133) Seltzer S, Bender IB (1984) *The dental pulp*. 3rd ed. Lippincott, Philadelphia.
- 134) Sena M, Yamashita Y, Nakano Y, Ohgaki M, Nakamura S, Yamashita K, Takagi Y (2004) Osteocalcium phosphate-based cement as a pulp-capping agent in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 97: 749-755.
- 135) Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, Gauthier JP, Magloire H (1991) Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulps *in vitro* in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. *Arch Oral Biol* 36: 117-128.

- 136) Six N, Lasfargues JJ, Goldberg M (2002) Differential repair responses in the coronal and radicular areas of the exposed rat molar pulp induced by recombinant human bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1). *Arch Oral Biol* 47: 177-187.
- 137) Smith AJ, Tobias RS, Cassidy N, Plant CG, Browne RM, Bègue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H (1994) Odontoblast stimulation in ferrets by dentine matrix components. *Archs Oral Biol.* 39: 13-22.
- 138) Speel EJM, Schutte B, Wiegant J, Ramaekers FC, Hopman AH (1992) A novel fluorescence detection method for in situ hybridization, based on the alkaline phosphatase-Fast Red reaction. *J Histochem Cytochem* 40, 9: 1299-1308.
- 139) Staehle HJ (1990) Calciumhydroxid in der Zahnheilkunde. Carl Hanser, München.
- 140) Stanley HR, Lundy T (1972) Dycal therapy for pulp exposure. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 34: 818-825.
- 141) Stanley HR (1989) Pulp capping: conserving the dental pulp, can it be done? Is it worth it? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 68: 628-639.
- 142) Stanley HR (1998) Criteria for standardizing and increasing credibility of direct pulp capping studies. *Am J Dent* 11: 17-34.
- 143) Stanley HR, Pameijer CH (1997) Dentistry's friend: calcium hydroxide [editorial]. *Oper Dent* 22: 1-3.
- 144) Sternberger LA, Hardy JrPH, Cuculis JJ, Meyer HG (1970) The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18: 315-333.
- 145) Sundqvist G (1994) Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 78: 522-530.
- 146) Sveen OB, Hawes RR (1968) Differentiation of new odontoblasts and dentine bridge formation in rat molar teeth after tooth grinding. *Arch Oral Biol* 13: 1399-1409.

- 147) Thomson BM, Saklatvala J, Chambers TJ (1986) Osteoblasts mediate interleukin 1 stimulation of bone resorption by rat osteoclasts. *J Exp Med* 164: 104-112.
- 148) Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR (1993) Sealing ability of a Mineral Trioxide Aggregate when used as a root end filling material. *J Endod* 19: 591-595.
- 149) Torabinejad M, Higa RK, McKendry D, Pitt Ford TR (1994) Dye leakage of four root end filling materials: effects of blood contamination. *J Endod* 20: 159-163.
- 150) Torabinejad M, Hong C U, McDonald F, Pitt Ford T R (1995) Physical and chemical properties of a new root-end filling. *J Endod* 21: 349-353
- 151) Torabinejad M, Wilder Smith P, Kettering JD, Pitt Ford TR (1995) Comparative investigation of marginal adaption of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod* 21: 295-299.
- 152) Torabinejad M, Rastegar AF, Kettering JD, Pitt Ford TR (1995) Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *J Endod* 21: 109-112.
- 153) Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD (1995) Antibacterial effects of some root end filling materials. *J Endod* 21: 403-406.
- 154) Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD (1995) Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod* 21: 489-492.
- 155) Torabinejad M, Hong CU, Lee SJ, Monsef M, Pitt Ford TR (1995) Investigation of root-end filling in dogs. *J Endod* 21: 603-608.
- 156) Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasam SP (1997) Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *J Endod* 23: 225-228.
- 157) Torabinejad M, Ford TR, Abedi HR, Kariyawasam SP, Tang HM (1998) Tissue reaction to implanted root-end filling materials in the tibia and mandible of guinea pigs. *J Endod* 24: 468-471.
- 158) Torneck CD, Moe M, Howley TP (1983) The effect of calcium hydroxide on porcine pulp fibroblasts in vitro. *J Endod* 9: 131-136.

- 159) Torneck CD, Wagner D (1980) The effect of calcium hydroxide cavity liner on early cell division in the pulp subsequent to early cavity preparation and restoration. *J Endod* 6: 719-723.
- 160) Tronstad L, Andreasen J O, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I (1980) pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod* 7: 17-21
- 161) Tsuneda Y, Hayakawa T, Yamamoto H, Ikemi T, Nemoto K (1995) A histopathological study of direct pulp capping with adhesive resins. *Oper Dent* 20: 223-229.
- 162) Tsuji T, Takei K, Inoue T, Shimono M, Yamamura T (1987) An experimental study on wound healing of surgically exposed dental pulps in germ-free rats. *Bull Tokyo Dent Coll* 28:35-38.
- 163) Tziafas D, Kolokuris I, Alvanou A, Kaidoglou K (1992) Short-term dentinogenic response of dog dental pulp tissue after its induction by demineralized or native dentine, or predentine. *Archs Oral Biol* 37: 119-128.
- 164) Tziafas D (1994) Mechanisms controlling secondary initiation of dentinogenesis: a review. *Int Endod J* 27: 407-411.
- 165) Tziafas D (1995) Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp tissue repair. *Int J Dev Biol* 39: 281-290.
- 166) Tziafas D, Panagiotakopoulos N, Komnenou A (1995) Immunolocalization of fibronectin during the early response of dog dental pulp to demineralized dentin or calcium hydroxide-containing cement. *Archs Oral Biol* 40, 1: 23-31.
- 167) Tziafas D, Pantelidou O, Alvanou A, Belibasakis G, Papadimitriou S (2002) The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. *Int Endod J* 35: 245-254.
- 168) Ulmansky M, Sela J, Sela M (1972) Scanning electron microscopy of calcium hydroxide induced bridges. *J Oral Pathol* 1: 244-248.
- 169) Ward J (2002) Vital pulp therapy in cariously exposed permanent teeth and its limitations. *Aust Endod J* 28: 29-37.
- 170) Watts A, Paterson RC (1981) A comparison of pulp responses to two different materials in the dog and the rat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 52: 648-652.

- 171) Watts A, Patterson RC (1987) Bacterial contamination as a factor influencing the toxicity of materials to the exposed dental pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 64: 466-476.
- 172) Watts A, Paterson RC, Cohen BD, Combe EC (1994) Pulp response to a novel adhesive calcium hydroxide based cement. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 3: 27-32.
- 173) Wijnbergen M, van Mullem PJ (1987) Effect of histological decalcifying agents on number and stainability of Gram-positive bacteria. *J Dent Res* 66: 1029-1031.
- 174) Wijnbergen M, van Mullem PJ (1991) The cumulative effect of disinfection, storage, histological fixation and demineralization on number and staining ability of Gram-positive bacteria. *Int Endod J* 24: 243-248.
- 175) Yamamura T (1985) Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. *J Dent Res* 64 (Spec Iss): 530-540.
- 176) Zander HA (1939) Reaction of the pulp to calcium hydroxide. *J Dent Res* 12: 373-379.
- 177) Zbinden G (1993) The concept of multispecies testing in industrial toxicology. *Regul Toxicol Pharmacol* 17: 85-94.
- 178) Zhu Q, Haglund R, Safavi KE, Spangberg LSW (2000) Adhesion of human osteoblasts on root-end filling materials. *J Endod* 26: 404-406.

8 Danksagung

Ich danke allen Damen und Herren, die mich bei der Planung und Erstellung der Arbeit beraten und begleitet haben. Mein besonderer Dank gilt Priv. Doz. Dr. T. Damaschke, der mir während des gesamten Entstehungsprozesses jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Des Weiteren danke ich Prof. Dr. U. Stratmann und Mitarbeitern für die Unterstützung im Rahmen der praktischen Versuchsdurchführung. Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern für ihre Hilfe und Begleitung.

9 Lebenslauf

Name: Dr. med. dent. Philipp Wolff

Geburtsdatum: 26.04.1976

Geburtsort: Bielefeld

Schulische Ausbildung:

1982 – 1986 Stapenhorst Grundschule, Bielefeld

1986 – 1995 Bavink-Gymnasium, Bielefeld

Hochschulstudium:

SS 1997 – SS 2002 Studium der Zahnheilkunde, Westfälische Wilhelms - Universität Münster

25.06.2002 Zahnärztliche Prüfung

14.05.2004 Promotion zum Dr. med. dent.

WS 2002 – WS 2007 Studium der Humanmedizin, Ruhr - Universität Bochum

25.10.2007 Ärztliche Prüfung

Beruflicher Werdegang:

Seit 01.12.2007: Weiterbildungsassistent in der Abteilung für Mund-, Kiefer-
Gesichtschirurgie und plastische Operationen, Prof. Dr. Dr. H.
Eufinger, Klinikum Vest, Recklinghausen



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Gegen Empfangsbekanntnis

Herr
Prof. Dr. Udo Stratmann
Institut für Anatomie
Vesaliusweg 2-4

48149 Münster

Dienstgebäude:
Domplatz 1-3
Telefon: (0251) 411-0
Durchwahl: 411-2104
Telefax: 411-2115
Raum: 431
Auskunft erteilt:
Herr Skoff
E-Mail:
Dez50@bezreg-muenster.nrw.de
Aktenzeichen:
50.0835.1.0 (G 41/2004)

28 Juni 2004

Tierschutz; Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Ihr Antrag vom 14.05.2004

G e n e h m i g u n g s b e s c h e i d

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Stratmann,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der zur Zeit gültigen Fassung (BGBl. I S. 1105, 1818) wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung des nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

"Lokale biologische Reaktionen der Zahnpulpa der Ratte auf Pro Root MTA bei direktem Kontakt"

Leiter des Versuchsvorhabens und sein Stellvertreter sind:

Herr
Prof. Dr. Udo Stratmann
Institut für Anatomie
Vesaliusweg 2-4

48149 Münster

Herr
Dr. Till Dammaschke
Poliklinik für Zahnerhaltung
Waldeyerstr. 30

48149 Münster

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300
E-Mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de • Internet: www.bezreg-muenster.nrw.de
zentrale Telefaxnummer: (0251) 411-2525
Konten der Landeskasse Münster:
Deutsche Bundesbank - Filiale Münster - BLZ: 400 000 00 Konto: 40001 520
WestLB AG Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61820
ÖPNV ab Hbf: Linien 14 • 20 bis Haltestelle Domplatz, Linien 2 • 10 • 11 • 12 bis
Haltestelle Windthorststraße (Haus K), Linie 7 bis Haltestelle Wiener Str. (Haus W).

1/2



Diese Genehmigung gilt bis zum 30.06.2005.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

12 Ratten

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig vor Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

Ich weise darauf hin, dass diese Genehmigung eine evtl. erforderliche Zustimmung nach dem Gentechnikgesetz für Arbeiten mit transgenen Tieren nicht einschließt.

Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

Rechtsbehelfsbelehrung

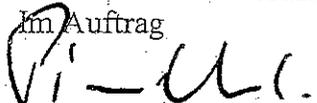
Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Ich bitte um umgehende Rückgabe des beiliegenden Empfangsbekanntnisses.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag



Dr. Piontkowski