

**Immunhistochemische Untersuchung über den
Proliferationserhalt von Pulpazellen wurzelunreifer Zähne des
Menschen in vitro**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung eines Doktors der Zahnheilkunde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Teite Eugenie Kirschner-Lepper, geb. Kirschner
aus Giessen

Giessen 2004

Aus dem Medizinischen Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
Abteilung Oralchirurgie und Zahnärztliche Poliklinik

Prof. em. Dr. Horst Kirschner
des Universitätsklinikums Giessen

Betreuer: Oberarzt Dr. Yango Pohl

Gutachter: Prof. Dr. Horst Kirschner

Gutachter: PD Dr. Ludger Fink

Tag der Disputation: 13. Dezember 2004

Ich widme diese Arbeit meinen lieben Eltern, meinem Mann und unserer
Tochter

Inhaltsverzeichnis

1.0	Einleitung	5
1.1	Epidemiologie	5
1.2	Verletzungsarten	6
1.3	Traumata im Milchgebiss	6
1.4	Zahnrettung, Plantation und Heilung	7
1.5	Experimente zur Entwicklung eines Zahnrettungskonzeptes	9
1.6	Plantationsformen der Zähne	10
1.7	Zahnpulpa	10
1.8	Fragestellung zu durchgeführter Untersuchung	12
2.0	Material und Methode	13
2.1	Untersuchungsmaterial	13
2.2	Entnahmen von Pulpagewebe und Aufbereitung für feingewebliche Untersuchungen	13
2.3	Immunhistochemische Behandlung der Gewebsschnitte	14
2.4	Mikromorphologisches Auswerten und Bestimmen von Markierungsindizes	16
2.5	Statistik	16
3.0	Ergebnisse	17
3.1	Lokalisation markierter Pulpazellen	17
3.2	Markierungsindizes	17
3.3	Foramen apicis dentis	18
4.0	Bewertung der Ergebnisse	25
5.0	Zusammenfassung der Ergebnisse	31
5.1	Summary	32
6.0	Schrifttum	33
	Anhang	

1.0 Einleitung

1.1 Epidemiologie

In Europa erleiden 25 bis 35 Prozent der jungen Bevölkerung unfallbedingte Frontzahnverletzungen (Andreasen 1988; Andreasen & Andreasen 1994; Andreasen & Ravn 1972; Bergink 1972; Bolhuis 1987; Borum & Andreasen 2001; Bossler 1975; Caliskan & Turkun 1995; Delattre et al. 1995; Forsberg & Tedestam 1990; Garcia-Godoy et al. 1986; Gutz 1976; Herforth 1982; Hotz 1990; Järvinen 1979; Kaba & Marechaux 1989; Kaste et al. 1996; O'Mullane 1973; Obijou 1994; Prenosil 1985; Rinderer 1976; Schroeder 1991; Tetsch 1983; York et al. 1978; Zadik 1976; Zadik et al. 1972).

Untersuchungsergebnisse epidemiologischer Studien über Frontzahntraumata hessischer Schulkinder von 1994 haben ergeben, dass 25,2 Prozent der Sechs- bis 16-Jährigen Frontzahntraumata aufweisen (Obijou 1994; Obijou & Kirschner 1996). Jungen sind etwa zwei bis 1,5-fach häufiger betroffen als Mädchen.

Epidemiologische Untersuchungsergebnisse aus skandinavischen Ländern korrelieren mit den Ergebnissen aus Hessen (Andreasen & Andreasen 1994; Forsberg & Tedestam 1990; Kirschner et al. 1992). Höchste Verletzungsraten weisen sieben- bis elfjährige Kinder auf. Demnach fällt die größte Traumarate in einen Altersbereich in der das Kieferwachstum nicht abgeschlossen ist. Schneidezähne des Oberkiefers sind ca. vier Mal häufiger von Verletzungen betroffen, als die des Unterkiefers. Vier bis 30 Prozent der Jungen und Mädchen erleiden Wiederholungsverletzungen (Andreasen 1970; Andreasen 1988; Andreasen & Andreasen 1994; Gutz 1971; Hedegard & Stalhaue 1973; Herforth 1976, 1982; Magnusson & Holm 1969; Magnusson et al. 1969; Obijou 1994; Obijou & Kirschner 1996; Ravn 1974; Schützmannski 1963; Wörle 1976).

Zahnavulsion oder Sensibilitätsverlust der Pulpa (Nekrose) werden in der aktuellen und statistisch repräsentativen Studie in Hessen, bezogen auf 1143 traumatisierte Frontzähne mit sieben Prozent ermittelt (Obijou 1994; Obijou & Kirschner 1996). Von 10673 unfallverletzten Zähnen, die an der Zahn-,

Kieferklinik der Universität Kopenhagen behandelt worden sind geraten 896 vorzeitig in Verlust; das sind 8,4 Prozent (Borum & Andreasen 2001).

1.2 Verletzungsarten

Zahnavulsion bedeutet die vollständige Trennung des Zahnes vom Organismus. Zahnhalteapparat, Gefäße und Nerven sind gequetscht (Kontusion) und zerrissen (Divulsion). Außerdem bestehen Verletzungen des alveolaren Knochens in Form von Kompression, Infraktur oder Fraktur. Verletzungsformen bleibender Frontzähne betreffen in erster Linie -d.h. bis zu 76 Prozent- Schmelz- bzw. Schmelz-Dentinfrakturen der Zahnkronen, eingeschlossen sind Kronen-, Wurzelfrakturen, zum Teil unter Einbeziehen von Endodont (Andreasen & Andreasen 1994; Forsberg & Tedestam 1990; Herforth 1976, 1982; Obijou & Kirschner 1996; Straßburg 1968). Zahnwurzelfrakturen oder -infrakturen können nur sicher durch radiologische Untersuchung ausgeschlossen werden, die in Reihenuntersuchung nicht zur Anwendung kommt. Konkussion und Dislokation der Frontzähne werden bis zu 40 Prozent der Verletzungen berichtet (Andreasen 1970; Andreasen & Ravn 1972; Bossler 1975; Herforth 1982; Hotz 1967; Obijou 1994; Prenosil 1985; Ravn & Rossen 1969; Schroeder 1991; Tetsch 1983).

1.3 Traumata im Milchgebiss

Hohe Verletzungsraten der Frontzähne im Milchgebiss werden berichtet (Andreasen & Andreasen 1994; Borum & Andreasen 2001; Schroeder 1991; von Arx 1991). Bis zu 45 Prozent der zwei- bis vierjährigen Kinder erleiden unfallbedingte Zahntraumata. Frontzahnavulsion im Milchgebiss ist ein häufigeres Vorkommnis als bei bleibenden Zähnen.

Unfallbedingte Zahnverluste und unvollkommen oder nicht versorgte Frontzahnverletzungen der ersten wie auch der zweiten Dentition beeinträchtigen Funktion, Physiognomie, Ästhetik, Psyche und die Sprachentwicklung. Angaben über Behandlungen nach Frontzahntraumata von 286 Mädchen und 472 Jungen weisen aus, dass 76,1 Prozent der Verunfallten keine Praxis oder Klinik aufsuchen. Nur 17,5 Prozent der Patienten begeben

sich sofort und 6,3 Prozent später in Behandlung (Obijou 1994). Als Folgen sind Gesundheitsbeeinträchtigungen und das Ansteigen von Behandlungskosten zu erwarten.

1.4 Zahnrettung, Plantation und Heilung

Ein Schneidezahn ist unfallbedingt aus dem Kiefer herausgeschlagen worden. Der avulsierte Zahn kann grundsätzlich replantiert werden. An die mögliche funktionsgerechte Heilung sind Bedingungen geknüpft: die zellphysiologische Rettung, d.h. der Vitalerhalt von Desmodont- und gegebenenfalls Pulpazellen (bei wurzelunreifen Zähnen) in der in vitro-Phase, korrekte Replantationsmethode nebst Schienung und Nachsorge. Für den Dauererhalt des Zahnes ist funktionelle Heilung Voraussetzung. Die Vorteile des dauerhaften und funktionsgerechten Frontzahnerhalts müssen nicht weiter erklärt werden. Vorzeitiger, im Wachstumsalter stattgefundener Zahnverlust und nichtfunktionelles Einheilen sind dagegen folgenreich. Atrophie und Stagnation des Knochenwachstums der betroffenen Regionen führen zu weiterem Dauerschaden (Abb.1). Es sind kieferorthopädische, prothetische, chirurgische Versorgungen erforderlich, die mit erheblichem Aufwand einhergehen und erst nach jahrelanger Temporärbehandlung abgeschlossen sind. Unversorgte Frontzahnücken führen zu weit reichenden Gebissveränderungen, wie in Abbildung 1 dargestellt und die ästhetischen Einbußen gegebenenfalls zu psychischen Störungen.

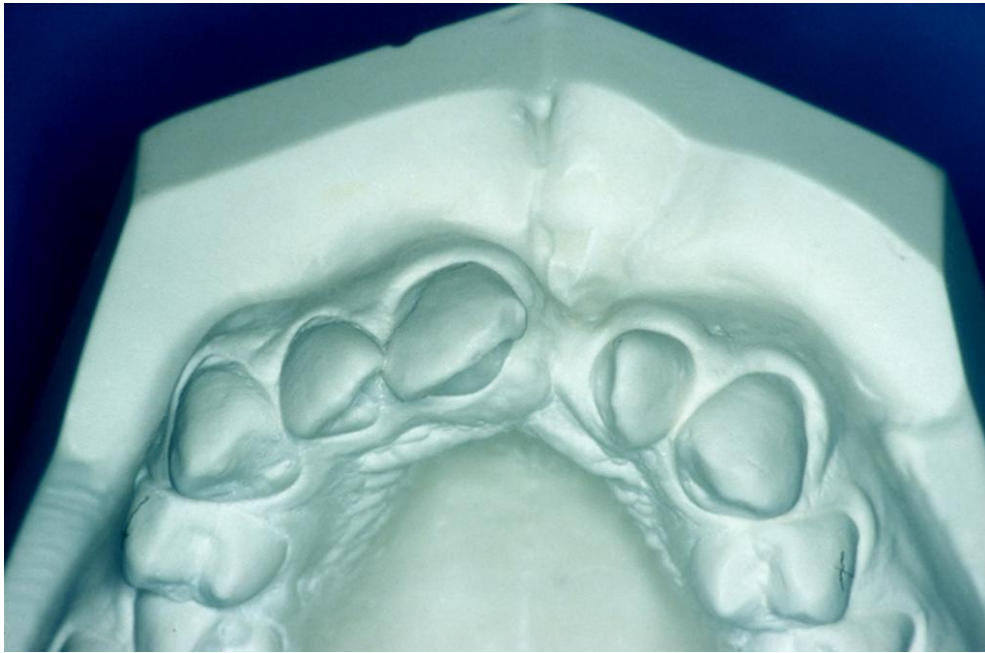


Abb. 1 : Oberkiefermodell eines 18-Jährigen. Zustand mehrere Jahre nach unfallbedingtem Verlust des Zahnes 21. Ausgeprägter Entwicklungsrückstand und Atrophie des Alveolarknochens, Mittellinienverschiebung, Zahndrehungen und -kipnungen

Nach Ergebnissen einer dänischen Studie verringern sich die Aussichten auf funktionelle Heilung des replantierten Zahnes bereits nach fünfminütiger Trockenaufbewahrung. Nach fünf- bis zehnminütiger zellunphysiologischer Aufbewahrung beträgt die Wahrscheinlichkeit für funktionelle Einheilung noch ca. 45 bis 84 Prozent. Nach mehr als 20-minütiger Trockenlagerung und anschließender Aufbewahrung in unphysiologischen Feuchtmedien reduziert sich die Aussicht auf Heilung auf drei bis 41 Prozent (Andreasen et al. 1995). Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Autoren einer britischen Studie, in der festgestellt wird, dass funktionelles Einheilen im 10-Minuten- Intervall um jeweils 29 Prozent abnimmt, wenn der isolierte Zahn zellunphysiologisch gelagert wird (Kinirons et al. 2000). Umgehende Eingabe isolierter Zähne befristet in isotone Salzlösung oder längerfristige Aufbewahrung bis zu 54 Stunden in einem optimierten Zellnährmedium begünstigt nachgewiesen funktionsgerechte Desmodontheilung (Andreasen et al. 1990; Cvek et al. 1974;

Matsson et al. 1982; Pettiette et al. 1997). Dieses Vorgehen soll sich auch vorteilhaft von einer Sofortplantation unterscheiden. Es wird vermutet, dass das Auswaschen von Zellzerfallsprodukten und eventuell auch Mikroorganismen eine Erholungsphase für die traumatisierten Desmodontzellen bedeutet. Nicht funktionell eingehheilte avulsierte und replantierte Zähne zeigen in der Analyse publizierter Daten ein Überleben von nur 33,6 Monaten (median) (Andreasen & Hjørting-Hansen 1966; Pohl et al. 2003).

1.5 Experimente zur Entwicklung eines Zahnrettungskonzeptes

Nach klinischen Erfahrungen erfolgt oder erfolgte der Transport verunfallter avulsierter oder extrem extrusiv dislozierter Zähne vom Unfallort zur Erstbehandlung fast ausnahmslos zellunphysiologisch (Andreasen et al. 1995; Ebeleseder et al. 1997), d.h. überwiegend im Trockenzustand, gegebenenfalls im Speichel der Mundhöhle oder in Wasser, in Ausnahmefällen in Milch. Auch in Unfallrettungswagen werden avulsierte Zähne in Gaze oder Zellstoff verwahrt. Zeitverzögerungen bis zur zahnärztlichen Erstbehandlung betragen durchschnittlich 4,9 Stunden, die bei Vorliegen von Mehrfachverletzungen und deren unfallchirurgischen Versorgungen noch erheblich größer sein können (Weber 2001). Zahnreplantationen zelltoter Zähne führen zu absehbaren Zahnverlusten.

Avulsierte Zähne können aber mit Aussicht auf Dauererfolg replantiert werden. Voraussetzung ist die zellphysiologische Rettung des verunfallten Zahnes, d.h. der Vitalerhalt von Desmodont- und gegebenenfalls auch Pulpazellen bei wurzelunreifen Zähnen. Diese Möglichkeit besteht seit 1995 mit der Entwicklung einer Zahnrettungsvorrichtung (Kirschner 1996; Kirschner et al. 2002). Bei der genannten Rettungsbox (Dentosafe, Fa. Medice, Iserlohn), handelt es sich um ein PET-Gefäß von ca. 5cm in der Höhe sowie 3 cm im Durchmesser. Die Öffnung ist mit einem Originalitätsverschluß versehen. Das Gefäß beinhaltet ca. 16 ml hellrotes Flüssigmedium, dessen Zusammensetzung im Anhang der Arbeit angegeben ist (Anhang1). Für den Dauererhalt avulsierter

Zähne nach Replantation ist das Vorhandensein vitaler Desmodont- und Pulpazellen am isolierten Zahn Voraussetzung.

1.6 Plantationsformen der Zähne

Unter autoplastischer Replantation versteht man die Reintegration wurzelunreifer zellphysiologisch geretteter Zähne. Die Behandlungsmethode geschieht unter der Annahme des Vitalerhalts von Pulpa- und Desmodontzellen am isolierten Zahn, dessen Foramen apicale 1,3 Millimeter nicht unterschritten haben darf (Andreasen & Andreasen 1994; Kirschner 1996; Kirschner et al. 2002). Die Weite der foraminalen Öffnung steht zunächst in der Verbindung mit der Möglichkeit der Diffusion von Zellnährlösung in der Rettungsphase und die Replantation mit der Revaskularisation und -innervation des Pulpagewebes. Ein verengtes Foramen apicale, wie bei wurzelreifen Zähnen, gewährt in der Rettungsphase des isolierten Zahnes unzureichenden Flüssigkeitsaustausch und führt zu schnell einsetzender Nekrose von Pulpazellen; aber auch nach umgehender Replantation wäre das Einsprießen von Gefäßen unmöglich. Zellnekrose im größeren Ausmaß nach Plantation bedeutet Parodontitis apicales (Kirschner 1996). Unfallbedingt avulsierte wurzelreife Zähne bedürfen im Zuge zellphysiologischer Rettung und Replantation endodontischer Begleitbehandlung, die vor Plantation außerhalb des Mundes durchgeführt werden kann (Kirschner et al. 1978; Kirschner 1981) oder spätestens ca. 10 Tage nach Plantation erfolgen muss. Das Pulpagewebe wird in beiden Fällen entfernt und durch gewebskompatible Fremdstoffe (Wurzelkanalfüllung) ersetzt (Kirschner et al. 1978, 1996, 2002). Das Behandlungsziel besteht in dem Vitalerhalt von Desmodontzellen als Ausgang für die Regeneration eines funktionsgerechten Zahnhalteapparates.

1.7 Zahnpulpa

In einschlägigem Schrifttum wird das feingewebliche Bild der Pulpa in drei Abschnitte unterteilt: die periphere, an das Dentin angrenzende Schicht der Odontoblasten (1), eine relativ schmale und zellarme Zone, die auch als subodontoblastische Schicht bezeichnet wird (2) und die zentrale Pulpa (3)

(Frank & Nalbandian 1989; Bloom & Fawcett 1975). Die Odontoblasten sind spezialisierte postmitotische Zellen, die direkt an das Dentin bzw. Prädentin angelagert sind. Sie sind mit langen zytoplasmatischen Fortsätzen versehen, die in die Dentinkanälchen einziehen. Die Zellform der Odontoblasten stellt sich in der Kronenpulpa ausgeprägt zylindrisch da, hingegen in der Wurzelpulpa etwas gedrunken und kuboidal. Den Odontoblasten folgt die Subodontoblastenschicht, eine zellarme Zone, die sich besonders ausgeprägt in der Kronenpulpa manifestiert. Diese Zone wurde bereits von Weil 1887 als zellfreie Zone bezeichnet. Der Region folgt zentralwärts eine dichtere Zellbesiedlung, die überwiegend in Bereichen der Wurzelpulpa direkt an die Odontoblasten angrenzt. Die in der Kronenpulpa ausgeprägte Subodontoblastenzone enthält kollagene Matrix und ein reiches Geflecht von Nervenfasern. Dabei handelt es sich überwiegend um nicht myelinisierte Nerven. Außerdem finden sich Fibroblasten und undifferenzierte Mesenchymzellen wie auch Lymphozyten. Nach Angaben von Frank & Nalbandian haben Zach et al. 1969 in Experimenten mit H_3 -Thymidin nachgewiesen, dass zerstörte Odontoblasten aus der Zone der Subodontoblasten durch undifferenzierte Mesenchymzellen ersetzt werden können. Diese neu gebildeten Odontoblasten sollen in der Lage sein innerhalb der Pulpa Dentin bzw. Dentinbrücken zu produzieren.

Die genannte zentralwärts folgende zellreiche Schicht enthält zahlreiche Blutgefäße und myelinisierte Nerven so wie Lymphspalten (Oehmke & Hager 1983). Das zentrale Pulpagewebe besteht aus lockerem Bindegewebe; es ist im Zahnkronenbereich durch die Subodontoblastenzone von den Odontoblasten getrennt, grenzt aber in der Wurzelpulpa - wie berichtet - direkt an die Odontoblastenreihe an. Die Zellen der zentralen Pulpa bestehen in Fibroblasten mit langen Zellfortsätzen und sind voneinander durch größere Interzellularräume getrennt. Das Gewebe ist durchzogen von Blut- und Lymphgefäßen sowie Nerven.

Wie beschrieben, sind die peripheren Zellen der Pulpa die Odontoblasten, die sich im Zuge der Zahnkronen- und Wurzelbildung aus differenzierten Mesenchymalzellen bilden. Die Differenzierung erfolgt in Kontakt mit Zellen des epithelialen Diaphragmas der Hertwig'schen Epithelscheide und wird als

epithelio-mesenchymale Interaktion gesehen. Bei extrahiertem noch wurzelunreifem Zahn mit weit offenem Foramen apicale laufen die mineralisierten Anteile von Dentin und Wurzelzement apikal dünn aus. Das zentral liegende Weich- bzw. Pulpagewebe ragt leicht pilzförmig über den Apex hinaus.

1.8 Fragestellung zu durchgeführter Untersuchung

Wie einleitend dargelegt, zentrieren sich die Unfallhäufigkeiten von Verletzungen der Frontzähne auf die Altersgruppe sieben- bis elfjähriger Kinder mit der höchsten nachgewiesenen Rate bei Neunjährigen (Andreasen & Ravn 1972; Herforth 1982; Obijou 1994; Prenosil 1985; Ravn 1974). Bei sieben- bis neunjährigen Kindern ist — mit individuellen Unterschieden — das Wurzelwachstum der Frontzähne nicht abgeschlossen. Zeitgerechtes zellphysiologisches Retten avulsierter Zähne in besagtem Altersabschnitt eröffnet die Möglichkeit autoplastischer Replantation. Das Überleben von Desmodontzellen auf den Wurzeloberflächen isolierter Zähne des Menschen ist eingehend untersucht worden (Kirschner et al. 1978; Kirschner et al. 1992; Kirschner 1996; Kirschner 1981; Pohl et al. 2001; Pohl et al. 2000; Pohl & Kirschner 1994; Pohl & Kirschner 1997; Pohl et al. 1999; Filippi & Kirschner 1992; Filippi & Kirschner 1997; Filippi et al. 1998; Filippi et al. 2001; Filippi 2000). Dagegen besteht weitgehend Unkenntnis über den Vitalerhalt von Pulpazellen avulsierter wurzelunreifer Zähne in vitro. Erfahrungen stützen sich auf empirische klinische Daten. Zellphysiologische Untersuchungen über den Proliferationserhalt von Pulpazellen wurzelunreifer Zähne in einem optimierten Zellnährmedium fehlen im Schrifttum. Die Fragestellung in vorliegender Untersuchung bezieht sich daher auf den Erhalt der Proliferationsfähigkeit von Pulpazellen isolierter wurzelunreifer Zähne in einem Zellrettungsmedium bei Raumtemperatur in Zeitabhängigkeit.

2.0 Material und Methode

2.1 Untersuchungsmaterial

Nicht in Funktion stehende gesunde wurzelunreife dritte Molaren des Menschen werden für die Experimente ausgewählt. Insgesamt sind es 28 Molaren, deren Wurzeln mindestens bis zu ca. 70 Prozent der natürlichen Wurzellängen aufweisen und die in Leitungs- und Infiltrationsanästhesie unter Einsatz innengekühlter chirurgischer Knochenfräsen (Kirschner & Meier 1975; Kirschner & Bolz 1978; Kirschner et al. 1984; Kirschner 1986) mittels Osteotomie sorgfältig entfernt werden. Die Zeiten für die ambulanten chirurgischen Behandlungen liegen an Vormittagen zwischen 8.30 Uhr und 12 Uhr. Das Alter der Patienten beträgt 15 bis 18,5 Jahre. Die Zähne gelangen einzeln in jeweils 16 ml Zellnährmedium und werden bei Raumtemperatur 6, 12, 24 und 36 Stunden darin aufbewahrt.

Gemäß genannter Zeiteinteilung sind die Gruppen 2 bis 5 gebildet worden, denen jeweils fünf bis sieben Zähne zugeordnet sind. In Gruppe 1 werden Pulpagewebe dritter Molaren unmittelbar nach dem operativen Eingriff, ohne vorherige Eingabe in das Zellnährmedium, untersucht. Die Eingaben der Zähne in das Zellnährmedium in den Gruppen 2 bis 5 erfolgen bis spätestens 10 Minuten nach Osteotomie.

2.2 Entnahmen von Pulpagewebe und Aufbereitung für feingewebliche Untersuchungen

Pulpagewebe von fünf Zähnen in Gruppe 1 werden bis zu 10 Minuten nach Osteotomie ohne vorherige Eingabe in das Rettungsmedium für die mikromorphologische Sofortuntersuchung vorgesehen. Die Kronen der Zähne sind in einer diamantierten Extraktionszange fixiert. Von der Kaufläche bis zur Wurzelspitze erfolgt ein entsprechend tiefer spaltförmiger Anschliff von Kronen- und Wurzelhartsubstanzen mit einer Diamantscheibe unter Intensivkühlung mit steriler isotoner NaCl-Lösung. Die Hartsubstanz wird anschließend mit einem geraden Hebel nach BEIN gesprengt. Unter vorsichtigem Einsatz eines Exkavators kann die Pulpa in toto entnommen

werden. Auf gleiche Weise sind die Zähne in den Zeitgruppen 2 bis 5 nach Lagerungszeiten von 6, 12, 24 und 36 Stunden in dem Zellnährmedium bei Raumtemperatur präpariert worden. Die Entnahmen der Pulpagewebe erfolgen danach wie beschrieben.

Die Pulpagewebe werden in vierprozentiges gepuffertes Formalin überführt und nach Fixieren, Wässern, Dehydrieren in Paraffin eingebettet. Es erfolgt das Herstellen sagittaler Serienschnitte (Biocut, Fa. Leica) von ca. 5µm die, auf Objektträger aufgezogen, entparaffiniert werden. Färbungen von Gewebsschnitten sind mit Hämalaun bzw. Hämatoxilin-Eosin vorgenommen worden.

2.3 Immunhistochemische Behandlung der Gewebsschnitte

Die Entwicklung monoklonaler Antikörper in Beziehung zu zellzyklusverwandten Molekülen bildet die Voraussetzung für immunhistochemisches Erkennen proliferationsfähiger Zellen.

Für die immunhistochemische Behandlung der Gewebsschnitte ist eine vom Hersteller (Fa. Dianova, Hamburg) erhältliche Anleitung wegweisend.

(Tabelle 1).

Kurzanleitung zur Immunhistochemie mit PCNA

Vorgang
1. 20 min Xylol
2. 20 min Xylol
3. 10 min 100% Alkohol
4. 10 min 96% Alkohol
5. 5 min 80% Alkohol
6. 5 min 70 % Alkohol
7. 2-3 min Aqua dest.
8. 1 min Tris-Puffer
9. 10 min F, 2x5 min E Mikrowelle kochen mit Zitratpuffer
10. 45 min Präparate kühlen lassen in kaltem Wasser
11. 2x5 min Aqua dest. spülen
12. 2x5 min mit Tris-Puffer spülen
13. Über Nacht Inkubation mit Primärantikörper PCNA 1:40
14. 3x5 min Schnitte Tris-Puffer spülen
15. 30 min Inkubation mit Dualsystem Brückenantikörper 1:100

16. 2x5 min in Tris-Puffer spülen
17. 30 min Inkubation mit Dualsystem APAAP-Komplex 1:75
18. 2x5 min in Tris-Puffer spülen
19. 10 min Inkubation mit Dualsystem Brückenantikörper 1:100
20. 2x5 min in Tri-Puffer spülen
21. 10 min Inkubation mit Dualsystem APAAP-Komplex 1:75
22. 2x5 min in Tris-Puffer spülen
23. 10 min Inkubation mit Dualsystem Brückenantikörper 1:100
24. 2x5 min in Tris-Puffer spülen
25. 10 min Inkubation mit Dualsystem APAAP-Komplex 1:75
26. 2x5 min in Tris-Puffer spülen
27. Stammlösung A2 ansetzen
28. Stammlösung A2 zu A1 mischen
29. Stammlösung B ansetzen
30. Stammlösung C1 ansetzen
31. Stammlösung C2 zu C1 mischen und 1 min reagieren lassen
32. Stammlösung C zu Stammlösung A dazumischen
33. Stammlösung B zu Stammlösung A+C dazumischen
34. pH-Wert 8,7 einstellen
35. 2 min reagieren lassen, dann filtrieren
36. 30 min Präparate in Entwicklerlösung stellen und rütteln lassen
37. 1x5 min mit Tris-Puffer spülen
38. 10 sek Gegenfärbung mit Häkalaun nach Mayer
39. 5-10 min mit Leitungswasser bläuen
40. Eindecken in Kaisers Glyceringelantine

Tabelle 1: Kurzanleitung für die immunhistochemische Behandlung von Gewebsschnitten mit PCNA zum Nachweis von in Proliferation befindlicher Zellen

Die Bestellnummer des primären Antikörpers ist CBL 407 Anti-Human PCNA; Lot. 407253K. Die Bezeichnungen von Ph-Meter ist WTW 530 und des Rüttlers ROTAMAX 120, Frequenz 200-300 min. Die Häkalaun-Lösg. Kat. Nr. 1.09249 wurde von der Fa. Merck bezogen; die Glyceringelantine von gleicher Firma mit der Bestellnummer 1.09242.0100. Die Inkubationstemperatur der Antikörper entsprach Raumtemperatur.

2.4 Mikromorphologisches Auswerten und Bestimmen von Markierungsindizes

Die Durchsicht der Pulpa-Gewebsschnitte erfolgt zunächst bei kleinen Vergrößerungen am Durchlichtmikroskop (Aristoplan, Leica). Das zytologische Auswerten (Zellzählungen) vollzieht sich unter Einsatz von Periplan-Okular GW 10fach und integrierter Strichplatte mit einer Netzeinteilung von 100 x 1mm² und einem Objektiv 40fach.

Für die fotografische Dokumentation wird die Orthomat-E-Kamera eingesetzt mit dem Fotookular 12,5fach.

Das Auswerten betrifft Zählungen von Pulpazellen zum Bestimmen der Gesamtzellzahl sowie anschließender Zählung markierter Zellen in gleichen Regionen. Errechnete Markierungsindizes ergeben sich aus dem Verhältnis markierter Zellen zu der Gesamtzellzahl.

Pro Zahn und Untersuchungszeit sollen minimal 1000 Zellen gezählt werden-
folglich bei fünf bis sieben Zähnen pro Untersuchungszeit fünf- bis
siebentausend Zellen. Für jede Untersuchungszeit werden aber weit mehr Zellen
gezählt und davon die Mittelwerte erhoben.

Um Abhängigkeiten zwischen Markierungshäufigkeiten und Weiten von
Foramina der Zahnwurzeln zu erfahren, werden die Innendurchmesser von
Foramina apicalia mittels Feinschieblehre, aber auch auflichtmikroskopisch
vermessen.

2.5 Statistik

Die varianzanalytischen Untersuchungen berücksichtigen Zählungen von
Pulpazellen sowie Messwerte von Foramina apicalia der Versuchszeiten null bis
36 Stunden(Versuchsgruppen 1 bis 5). Die Untersuchungen werden am Institut
für Medizinische Informatik der Universität Giessen (Direktor: Professor Dr.
Dudeck) von Herrn W. Pabst durchgeführt mit Hilfe von SPSS für Windows,
Version 6.1.3, graphisch mit Excel.

3.0 Ergebnisse

3.1 Lokalisation markierter Pulpazellen

Nach Durch- und Übersicht der feingeweblichen Pulpapräparate der fünf Versuchszeiten ergibt sich eine eindeutige Zone für das Vorkommen markierter Zellen in der Wurzelpulpa, unabhängig von der Dauer der Imbibition mit dem Rettungsmedium (Abb. 2).

Es ist zu beobachten, dass in zahlreichen Sagittalschnitten der Pulpa die Zellreihe der Odontoblasten — bedingt durch Entnahmetechnik des Gewebes und der Verankerung der Zellreihe im Dentin — unvollständig ist. Folglich können Odontoblasten bei den Zellzählungen nicht berücksichtigt werden.

Feingewebliche Strukturen der Pulpa der Versuchsreihe entsprechen denen, wie in Kapitel 1.7 beschrieben.

3.2 Markierungsindizes

Zellzählungen finden in vorgenanntem Bereich statt. Exakte Begrenzungen der Zählbereiche beziehen sich apikal und koronal auf das Vorliegen erster markierter Zellen. Auf diese Weise erfolgt das Festlegen der Zählgrenzen für jedes Präparat (Abb. 3 u. 4).

Die für die jeweils fünf Untersuchungszeiten gezählten Gesamt-Zellzahlen, sowie die der zugehörigen markierten Zellen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Markierungsindizes sind pro Versuchszeit für jede Zahnpulpa bestimmt worden sowie die Mittelwerte der erhaltenen Indizes (Tab.3). Höchster mittlerer Indexwert von 0,56 besteht für die Zeitgruppe 1, gleich nach Zahnextraktion ohne vorherige Eingabe der Zähne in das Rettungsmedium. Nach sechsstündiger Aufbewahrung der Zähne im Rettungsmedium bei

Raumtemperatur sinkt der Index auf den Wert von 0,12 ab. Von sechs bis zu 36 Stunden nimmt die Anzahl markierter (proliferationsfähiger) Pulpazellen wieder zu und erreicht einen Endwert von 0,195 in der Versuchsgruppe 5. Das Ergebnis wird in einem Balkendiagramm und Diagramm mit Standardabweichungen veranschaulicht (Abb. 5 u. 6).

Es kann ein Einfluss der in vitro-Imbibitionsdauer auf den Anteil proliferationsfähiger (markierter) Zellen derart nachgewiesen werden, dass sich die 36 Stundengruppe 5 durch Zunahme markierter Zellen von den vorangegangenen Versuchszeiten deutlich abhebt ($p=0,0002$) (s. Abb. 5 u. 6).

3.3 Foramen apicis dentis

Von 28 Zähnen sind die Weiten von Foramina mittels Schieblehre vermessen worden. Die realen Messwerte sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Die Ergebnisse der statistischen Vergleichsuntersuchung verdeutlichen für die durchgeführte Versuchsreihe "fehlenden Zusammenhang" zwischen proliferationsfähigen Zellen und Weiten von Foramina apicalia über die Versuchszeiten in den Gruppen 1 bis 5 ($p=0,17$) (Abb. 7 u. 8).

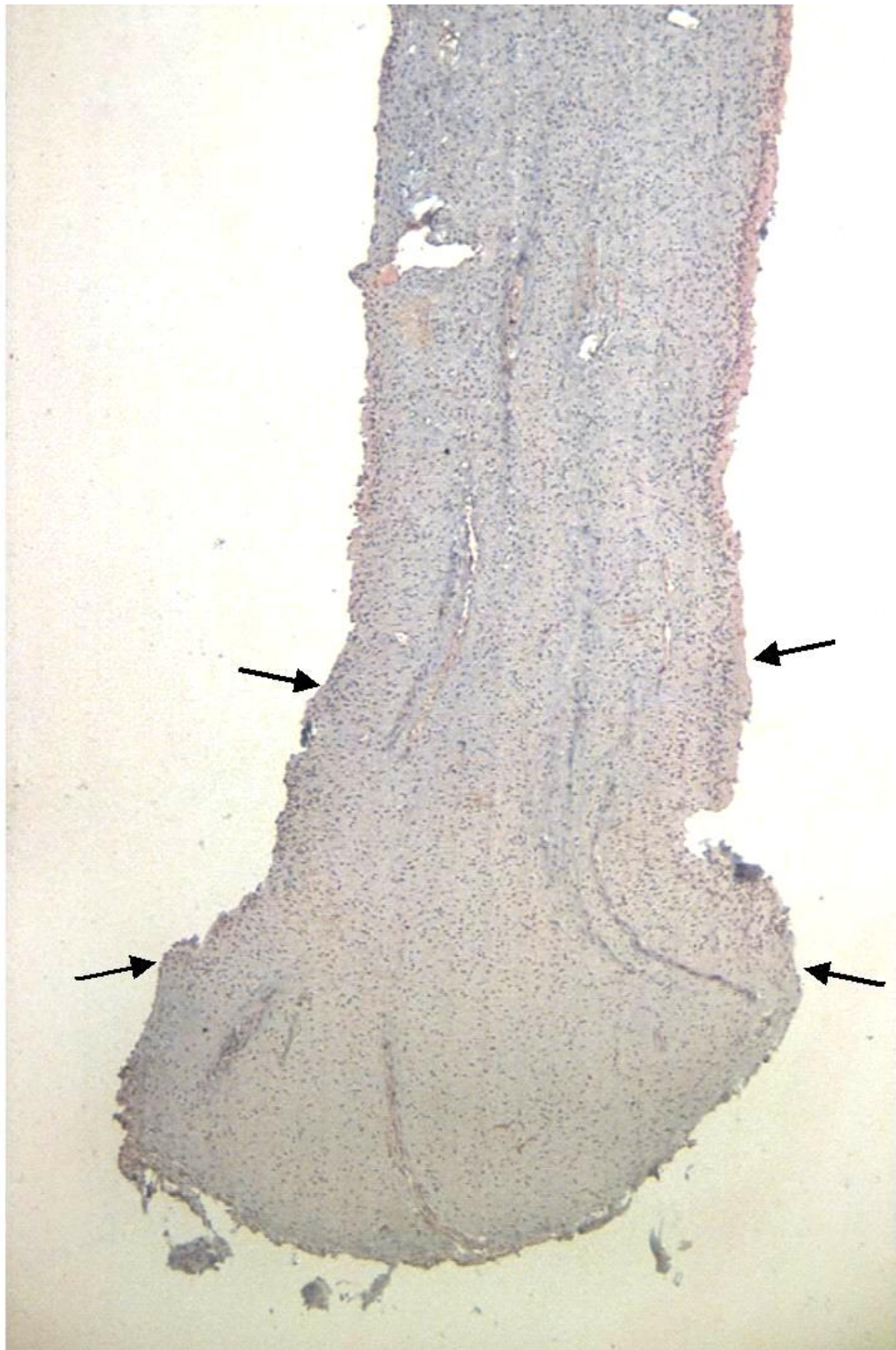


Abb. 2: Zahnpulpa des Menschen (Sagittalschnitt). Eingezeichnete Zell-Zählbegrenzungen



Abb. 3: Individuell festzulegende Zell-Zählbegrenzungen (s.Text) im apikalen Viertel der Wurzelpulpa (100fach)

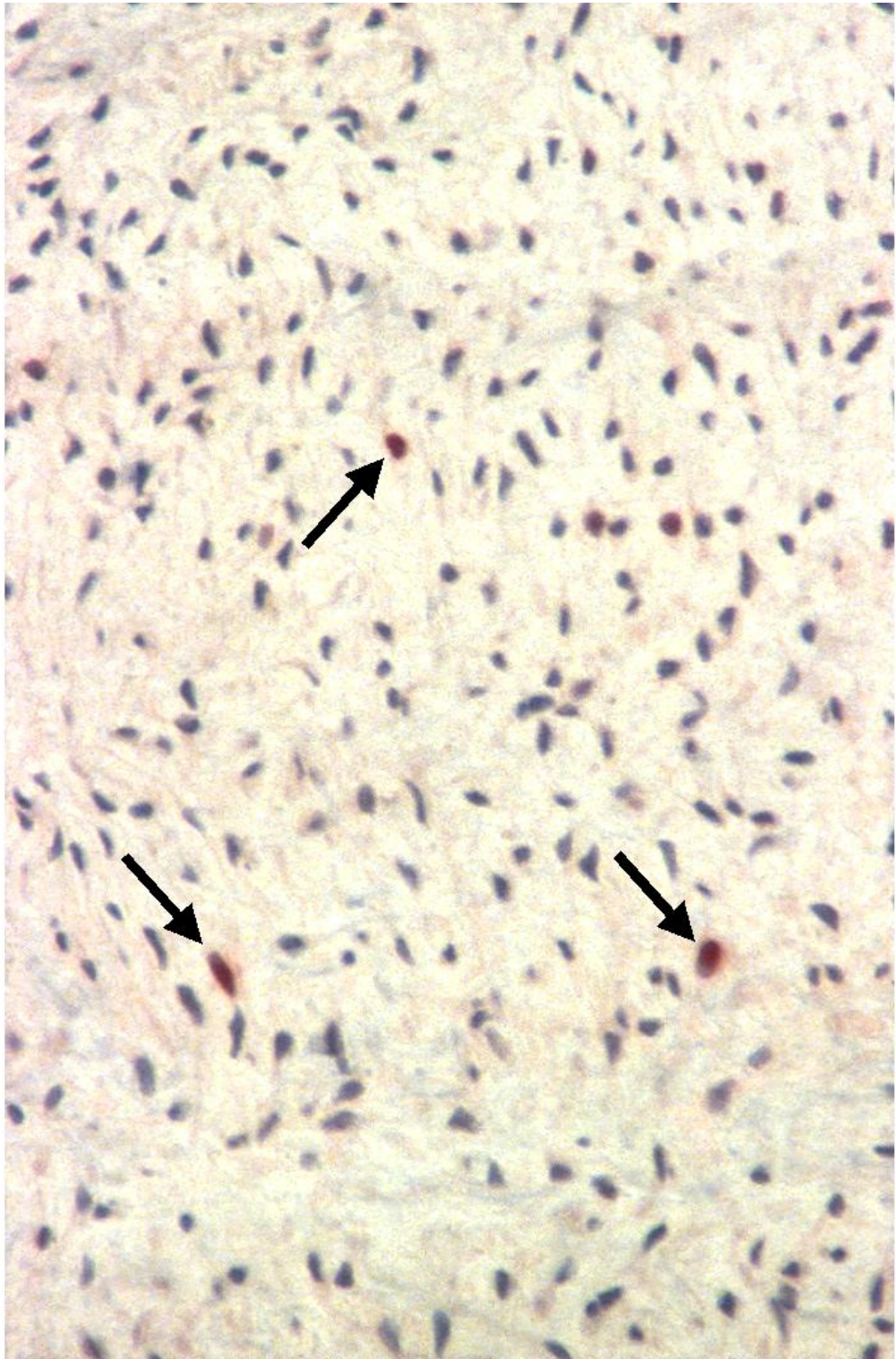


Abb. 4: Markierte in Proliferation befindliche Zellen der Wurzelpulpa nach immunhistochemischer Behandlung (800fach)

Zeitgruppen (h)	0	6	12	24	36
Gesamtzellzahl	105.000	68.610	66.909	82.313	63.398
Markierte Zellen	581	83	81	110	124

Tab. 2: Gesamtzellzahlen und gezählte markierte Zellen der Zahnwurzelpulpa

	Stunden	Foramenöffnung in mm	Anteil der proliferierenden Pulpazellen in %
1	0	1,10	0,431
2	0	1,45	0,580
3	0	1,38	0,632
4	0	1,55	0,560
5	0	1,08	0,561
6	6	1,55	0,142
7	6	1,95	0,110
8	6	1,45	0,124
9	6	1,10	0,101
10	6	1,90	0,110
11	12	1,20	0,103
12	12	1,35	0,117
13	12	1,95	0,166
14	12	1,80	0,119
15	12	1,05	0,133
16	12	1,75	0,107
17	24	1,95	0,145
18	24	1,25	0,140
19	24	0,95	0,130
20	24	1,85	0,133
21	24	1,65	0,122
22	36	1,70	0,179
23	36	1,85	0,203
24	36	2,05	0,261
25	36	1,65	0,244
26	36	2,10	0,167
27	36	1,85	0,161
28	36	1,40	0,153

Tab. 3: Markierungsindizes von Pulpazellen und gemessene Weiten von Foramina apicalia nebst Mittelwerten in den Versuchsgruppen 1 bis 5

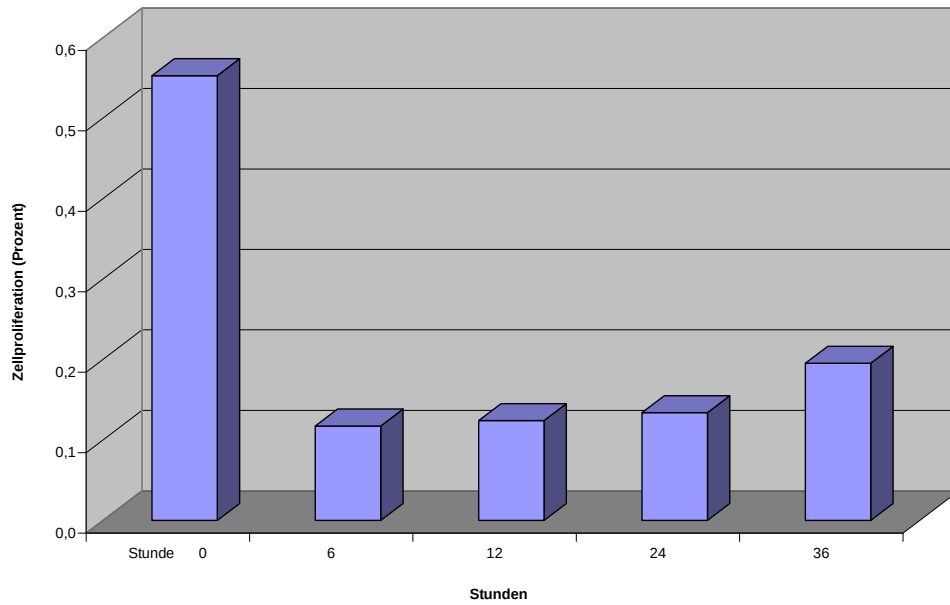


Abb. 5: Indizes nachgewiesener in Proliferation befindlicher Pulpazellen wurzelunreifer Zähne im Rettungsmedium bei Raumtemperatur (Werte mittels Varianzanalyse bestimmt im Institut für Medizinische Informatik in Giessen)

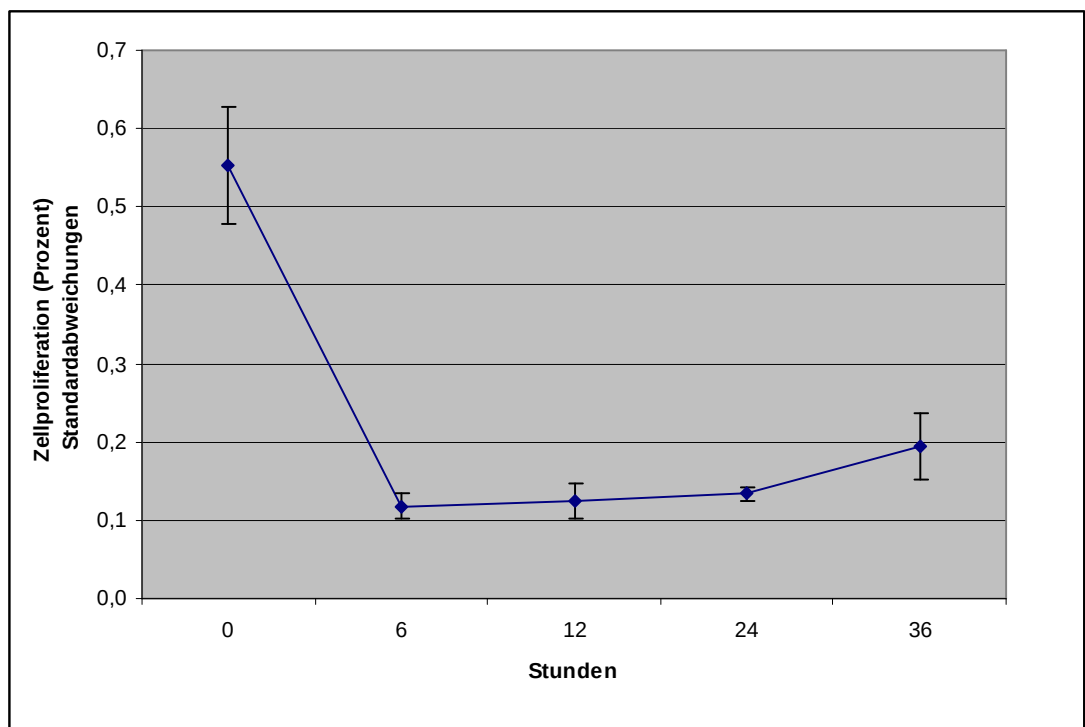


Abb. 6: Standardabweichungen zu Diagramm Abbildung 5 (Proliferations-Indizes, s. Balkengraphik Abb.5)



Abb. 7 : Wurzelspitzen eines 3. Molaren mit offenen Foramina

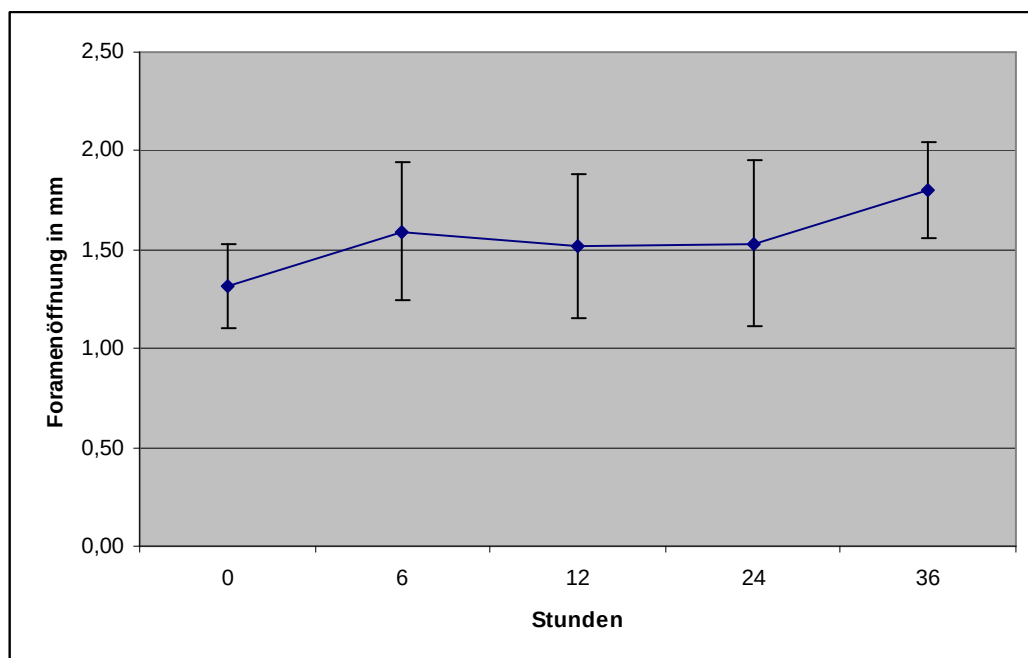


Abb. 8: Gemessene Weiten von Foramina apicalia mit Standardabweichungen der Versuchsgruppen 1 bis 5

4.0 Bewertung der Ergebnisse

Die erlangten Experimentalergebnisse als Grundlage zur autoplastischen Implantation wurzelunreifer Zähne des Menschen haben ergeben, dass der Erhalt von in Proliferation befindlichen Pulpazellen isolierter Zähne in einem optimierten Rettungsmedium bei Raumtemperatur mindestens über 36 Stunden möglich ist. Erkannte Voraussetzungen für die in Proliferation befindlichen Pulpazellen sind die Eingabe der Zähne innerhalb von 10 Minuten nach Extraktion oder auch unfallbedingter Avulsion in das Rettungsmedium wie auch das Stadium des Wurzelwachstums, das eine lichte Weite der foraminalen Öffnung von ca. 1,3mm nicht unterschritten haben darf. (Kirschner TE 2003; Pohl & Kirschner 1994; Pohl et al. 1999; Pohl et al.2003; Kirschner 1996). Für die im Wachstumsalter von Zahnavulsion betroffene Bevölkerungsgruppe der Kinder und Jugendlichen bedeutet der durch Rettung und Plantation erreichte funktionsgerechte Zahnerhalt zusätzlich den Entwicklungsfortgang des alveolären Knochens in betroffenen Regionen. Das gilt auch für die erste Dentition mit zwei- bis vierjährigen Kindern, die bis zu 45 Prozent Zahntraumata erleiden (Andreasen & Andreasen 1994; Borum & Andreasen 2001; Schroeder 1991; von Arx 1990,1991).

Unfallbedingte Zahnverluste und unvollkommen oder nicht versorgte Frontzahnverletzungen beeinträchtigen Funktion, Physiognomie, Ästhetik, Psyche und die Sprachentwicklung. Außerdem findet das Kieferwachstum wesentlich durch Stimulation über Zungen- Zahnkontakt statt. Bis zum fünften Lebensjahr werden etwa 45 Prozent des postnatalen Oberkieferwachstums erreicht. Sehr früher Milchzahnverlust kann zu einer ungünstigen Entwicklung des Zahnbogens führen. Die Folgen können die Entwicklung und den Durchbruch bleibender Zähne negativ beeinflussen.

Zahlreiche Experimentalergebnisse aus der ehemaligen Abteilung Oralchirurgie und Zahnärztliche Poliklinik des Medizinischen Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universität Giessen sowie klinische und experimentelle Beobachtungen anderer Autoren belegen schlüssig funktionelles Einheilen und den Dauererhalt zellphysiologisch geretteter und replantierter Zähne des

Menschen (Andreasen & Andreasen 1994; Andreasen et al. 2000; Andreasen et al. 1995; Andreasen et al. 1990; Hupp et al. 1997,1998; Kirschner et al. 1998; Kirschner et al. 2002; u. a.). Dabei handelt es sich überwiegend um experimentelle Nachweise des Vitalerhalts von Desmodontzellen in vitro aber auch um klinische Beobachtungen zellphysiologisch oder -unphysiologisch geretteter und replantierter Zähne (Andreasen & Hjørting-Hansen 1966 a,1966 b; Hiltz & Trope 1991; Krasner & Person 1992; Krasner & Rankow 1995; Matsson et al. 1982; Pohl 1994; Pohl et al. 2003; Pohl et al. 1999; Trope & Friedman 1992; Kirschner et al. 1998, Boll 1994). Die über den Vitalitätserhalt von Desmodontzellen publizierten Ergebnisse stellen unter Beweis, dass die Proliferationsfähigkeit genannter Zellen mindestens bis zu 48 Stunden in vitro in einem Rettungsmedium und bei Raumtemperatur erhalten werden kann. Dazu bedarf es einer langzeitstabilen, auch bei Raumtemperatur bevorratbaren Zellnährlösung mit Zusatz eines Konservierungsmittels (Kirschner et al. 1992,1998).

Ergebnisse über Langzeitaufbewahren wurzelunreifer Zähne verbunden mit den in Proliferation befindlichen Pulpazellen liegen im zugänglich gewordenem Schrifttum nicht vor. Lediglich **eine** Experimentalluntersuchung italienischer Autoren beinhaltet Ergebnisse mit dem Proliferationsnachweis von Pulpazellen wurzelunreifer Zähne unmittelbar nach deren Extraktion (Casasco et al. 1996). Genannte Autoren haben die Anzahl in Proliferation befindlicher Pulpazellen unmittelbar nach Extraktion der Zähne mittels immunhistochemischer Methode (PCNA) untersucht. Angaben über das Proliferationsverhalten von Pulpazellen über Aufbewahrungszeiten in vitro fehlen bzw. Untersuchungen dieser Art sind nicht durchgeführt worden.

Die Langzeitbevorratung von Zellnährmedien bei Raumtemperatur war auch in der Vergangenheit nicht gegeben, so dass ein Bereitstellen an unfallträchtigen Orten nicht stattfinden konnte. Das von der pharmazeutischen Industrie hergestellte Rettungsmedium ist mit Puffer, Protektmedium und Konservierungszusatz versehen, so dass Oxidationsvorgänge und/oder Verkeimungen verhindert werden und die Haltbarkeit bei Raumtemperatur (bis zu 37°C) über drei Jahre gewährleistet ist (Fa. Biochrom, Berlin). Die

vorgenannten zellphysiologischen Untersuchungen führten zur Optimierung des Rettungsmediums und dessen Langzeitstabilität. Dagegen sind die im Schrifttum angegebenen Medien bzw. Salzlösungen für Bevorratung und Langzeitaufbewahrung avulsierter Zähne bei Raumtemperatur ungeeignet (Hiltz et al. 1991, Krasner 1990; Krasner & Person 1992; Trope & Friedman 1992). Innerhalb weniger Stunden der Aufbewahrung eines Zahnes bei Raumtemperatur ergeben sich massive Verkeimungen und beginnendes Pilzwachstum im Restdesmodont des isolierten Zahnes mit Folgen von Zellnekrosen (Burkard 1991; Kirschner et al. 1992).

Ergebnisse einer ersten möglichen klinischen Langzeitstudie avulsierter Zähne, die in optimiertem Zellnährmedium gerettet wurden lassen nach Replantation eindeutig erkennen, dass deren umgehende und zellphysiologische Rettung die Voraussetzung für funktionelle Einheilung und Dauerhalt bildet. Auf diese Weise werden die Ergebnisse der Experimentalserien mit Desmodontzellen durch klinische Befunde bestätigt (Pohl et al. 2003 a; Pohl et al. 2003b; Pohl et al. 2003c). Die Aufbewahrungszeiten der in den klinischen Studien beobachteten replantierten Zähne betrugen bis zu 53 Stunden im Zellnährmedium der Zahnrettungsbox bei Raumtemperatur, die nicht zu Beeinträchtigung von funktioneller Einheilung und Zahndauererhalt geführt haben. Damit eröffnet sich erstmalig die Möglichkeit erfolgreicher Replantation zellphysiologisch geretteter und aufbewahrter Zähne auch nach unfallchirurgischer Versorgung polytraumatisierter Patienten.

Die vorgelegten Untersuchungen über die in Proliferation befindlichen Pulpazellen in vitro bestätigen und ergänzen die erfolgreichen experimentellen und klinischen Erfahrungen mit Desmodontzellen. Das Ergebnis bildet die Voraussetzung für autoplastische Replantation avulsierter wurzelunreifer Zähne dann, wenn umgehende Rettung des Zahnes bis zu ca. 10 Minuten nach Avulsion in dem Rettungsmedium erfolgt. Dabei darf zunächst eine in vitro-Phase von 36 Stunden bis zur Erstbehandlung (Replantation) wahrgenommen werden.

Avulsion bedeutet nicht nur den Abriss des Zahnhalteapparates (Desmodont), sondern auch den der Pulpa zuführenden und ableitenden Blutgefäße.

Grundsätzlich kann eine Revaskularisation des Pulpagewebes nach Replantation eintreten. Es kommt aber nicht zu einem vorstellbaren Wiederanschluss von Gefäßen sondern bei entsprechend weiter foraminaler Öffnung — nicht unter 1,3 Millimetern — zum Einwachsen neuer Gefäße in die Pulpa. Das bedingt zu hohem Prozentsatz eine Umwandlung des Originärgewebes in Granulationsgewebe, also eine Metaplasie (Schroeder 1982; Kirschner 1996; Kirschner et al. 2002).

Für das Überleben bzw. die Proliferationsfähigkeit von Pulpazellen (avulsierter) wurzelunreifer Zähne über 36 Stunden in vitro ist das eingesetzte Rettungsmedium von ausschlaggebender Bedeutung (Anhang 1). Umgehende Eingabe des isolierten Zahnes in das Medium — wie in vorliegender Untersuchung innerhalb von 10 Minuten geschehen — ist eine weitere wesentliche Voraussetzung für den Vitalerhalt von Pulpazellen. Unberührt davon geschieht die oben angeführte Umwandlung des Pulpagewebes nach erfolgreicher Replantation in Granulationsgewebe, Bindegewebe und schließlich in der Endstufe in mineralisiertes Gewebe (Faserknochen, Osteodentin). Geschilderter Verlauf ist radiologisch, aber auch mikromorphologisch sehr gut nachweisbar. Ein implantierter Zahn mit Obliteration des Pulpakavum und funktionsfähigem Desmodont gilt als vital und dauerhaft erhaltbar.

Untersuchungen von Desmodont in vitro haben ergeben, dass Trockenlagerung isolierter Zähne über 30 Minuten hinaus Zellnekrosen größeren Ausmaßes bewirkt. Danach erfolgte Zahnplantationen führen zu hohem Prozentsatz zu Misserfolgen z.B. im Sinne von Ersatzresorption (Andreasen & Kristerson 1981; Matsson et al. 1982; Andreasen 1981; Zimmermann & Nentwig 1989).

Aufbewahren isolierter Zähne in Wasser oder Speichel ist obsolet. Schon nach Kurzzeitaufbewahren bis zu zwei Stunden kommt es insgesamt zu Zelluntergang (Blomlöf 1981a, 1981b; Oikarinen & Seppä 1987; Zimmermann & Willershausen-Zönnchen 1990). Längerfristiges Aufbewahren in physiologischer NaCl-Lösung ist ebenfalls zellunverträglich. Dagegen wäre Sterilmilch eine Behelfsmöglichkeit (Blomlöf 1981a, 1981b; Andreasen & Schwartz 1986; Lauer et al. 1987; Pongsiri et al. 1990; Boll 1994). Optimal ist das an hiesiger Klinik in Zusammenarbeit mit der Berliner Firma Biochrom entwickelte

Rettungsmedium in dem die Rate proliferierender Desmodontzellen bis zu 54 Stunden bei Raumtemperatur signifikant ansteigt. Die Ergebnisse sind durch Untersuchungen in der Zellkultur sowie mit Hilfe von autoradiographischen und immunhistochemischen Techniken erlangt worden (Kirschner 1996; Kirschner et al. 1998; Kirschner et al. 2002; Pohl 1994; Pohl et al. 2003; Pohl et al. 2000; Pohl & Kirschner 1994; Pohl & Kirschner 1997; Pohl et al. 1999; Boll 1994).

Die umgehende Eingabe isolierter Zähne befristet in isotone Salzlösung oder bis zu 54 Stunden in ein optimiertes Zellnährmedium begünstigt nachgewiesen funktionsgerechtes Einheilen plantierter Zähne (Andreasen et al. 1990; Cvek et al. 1974; Matsson et al. 1982; Pettiette et al. 1997). Dieses Vorgehen unterscheidet sich auch vorteilhaft von einer Sofortplantation.

Es wird vermutet — wie bereits berichtet —, dass das Auswaschen von Zellzerfallsprodukten und eventuell auch Mikroorganismen eine Erholungsphase für die traumatisierten Desmodont- und Pulpazellen bedeutet.

In einer Studie zur Beobachtung der Funktion geretteter und replantierter Zähne werden sämtliche bei Kindern und Jugendlichen avulsierten und replantierten Zähne im Medizinischen Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universität Giessen prospektiv erfasst. Es interessieren die besonderen Umstände der Zahnrettung und des Transportes zur Behandlung: Dauer der Trockenexposition, Art des Lagerungsmediums und Dauer der Lagerung. Seit 1998 wird eine spezifische medikamentöse Begleittherapie (Antiresorptiv-Regenerative-Therapie = ART) zur Verminderung von Einheilkomplikationen und zum Unterstützen parodontalen Einheilens eingesetzt. Der Einheiltypus wird nach bekannten klinischen und radiologischen Kriterien definiert als funktionell oder nicht funktionell. In genannter Studie sind sämtliche Patienten berücksichtigt, die mindestens über sechs Monate nachkontrollierbar waren oder vor dieser Zeitgrenze Komplikationen aufwiesen. Sieben Zähne sind innerhalb von zehn Minuten nach Avulsion in das Medium der Rettungsbox gelangt. Die Rettung wird als physiologisch klassifiziert. Zwanzig Zähne sind länger als 15 Minuten trocken und/oder länger als 30 Minuten in unphysiologischen Feuchtmedien aufbewahrt und als zellunphysiologisch gerettet definiert worden. Sämtliche sieben Zähne, die in der Rettungsbox seit 1995 physiologisch gerettet

werden konnten weisen bis heute funktionelle Heilung bzw. physiologische Funktion auf, obwohl deren Aufbewahrung im Einzelfall bis 53 Stunden im Rettungsmedium bei Raumtemperatur betragen hat. Es können bisher weder Ankylose noch Zahnverlust verzeichnet werden. Dagegen heilen von zwanzig unphysiologisch geretteten und replantierten Zähnen nur drei funktionell ein; siebzehn Zähne ankylosieren. Das statistisch abgesicherte Ergebnis (Stand März 2004) stellt unter Beweis, dass Heilung und Dauererhalt unfallbedingt avulsierter Zähne durch umgehende zellphysiologische Rettung bestimmt werden (Chi Quadrat, $p < 0,001$). Weitere Faktoren mit signifikantem Einfluss können in dieser Studie nicht festgestellt werden (Pohl et al. 2003; Kirschner, Weber, Pohl 2003).

Das Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchungen stellt unter Beweis, dass die Eingabe avulsierter wurzelunreifer Zähne innerhalb von zehn Minuten nach Unfall in das Rettungsmedium nicht nur funktionelles Einheilen von Desmodont garantiert, sondern auch in Proliferation befindliche Pulpazellen bewahrt, als Voraussetzung für die autoplastische Replantation und den dauerhaften Erhalt von Zahn und Alveolarknochen.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Proliferationsfähigkeit von Pulpazellen extrahierter wurzelunreifer Zähne des Menschen ist einer in vitro-Untersuchung unterzogen worden. Für die Aufnahme der Zähne dient ein bei Raumtemperatur langzeitbevorratbares Rettungsmedium.

Achtundzwanzig operativ entfernte wurzelunreife dritte Molaren des Menschen werden innerhalb von 10 Minuten nach OP in das Medium eingegeben und in Gruppen unterschiedlich lange bei Raumtemperatur darin aufbewahrt.

Mikromorphologische und immunhistochemische Untersuchungen der Pulpagewebe erfolgen nach Aufbewahrungszeiten von 0, 6, 12, 24 und 36 Stunden. Mikromorphologische Betrachtung des Pulpagewebes über das Vorkommen immunhistochemisch markierter Zellen führen zu einer Begrenzung von Pulpaarealen zur Zellzählung und deren quantitative und varianzanalytische Auswertung.

Es kann ein Einfluss der Imbibitions- bzw. Aufbewahrungsdauer der wurzelunreifen Zähne im Zellnährmedium auf die Proliferation von Pulpazellen in vitro statistisch erhoben werden ($p=0,0002$). Speziell nach 36 Stunden im Rettungsmedium bei Raumtemperatur ist der Wert des mittleren Markierungsindex — verglichen mit Gruppen 2, 3 und 4 — in Gruppe 5 deutlich angestiegen. Das statistische Ergebnis beweist die Zunahme proliferierender Pulpazellen wurzelunreifer Zähne in vitro bis zu einer Aufbewahrungszeit von 36 Stunden nach Extraktion in einem Rettungsmedium bei Raumtemperatur.

In angenommener Abhängigkeit der Zellproliferation stehen Weiten foraminaler Öffnungen, die vermessen, und deren Mittelwerte festgestellt und ebenfalls statistisch ausgewertet werden. Zusammenhänge zwischen Zellproliferationen und Weiten der Foramina lassen sich in vorliegender Experimentalserie nicht erheben ($p=0,17$). Die mittleren Messwerte liegen für sämtliche untersuchte Gruppen über 1,3 Millimetern.

5.1 Summary

The proliferative ability of pulp cells of extracted immature teeth of humans was studied in an in vitro investigation. For the storage of the teeth a rescue medium is used which can be stored at room temperature for longer periods.

Twenty-eight surgically removed immature third molars of humans are put into the medium within ten minutes after removal and stored for different periods at room temperature.

Micromorphologic and immunohistochemic investigations of the pulp tissues are performed after storage for 0, 6, 12, 24 and 36 hours. Micromorphologic observations of immunohistochemically marked cells result in defined pulp areas in which cells are counted. Quantitative and variance analytic statistics are performed.

An influence of the storage duration in the tissue culture medium on the proliferation of pulp cells in vitro can be documented ($p=0,0002$). Especially after 36 hours in the rescue medium at room temperature the mean index of marked cells in group 5 is clearly increased compared to groups 2, 3 and 4. The statistic results demonstrates the increase of proliferating pulp cells of immature teeth for a storage in a rescue medium for up to 36 hours at room temperature.

The cell proliferation is supposedly dependent on the diameter of the apical foramen. These are measured, mean values are calculated. By statistics no correlations between diameter of apical foramen and cell proliferation cannot be established ($p=0,17$). The mean values for all groups are more than 1,3 millimeters.

6.0 Schrifttum

Andreasen JO:

Traumatologie der Zähne.

Schlütersche Verlagsanstalt und Druckerei, Hannover 1988

Andreasen JO & Andreasen FM:

Epidemiology. In: JO Andreasen & FM Andreasen: Textbook and Coloratlas of traumatic injuries to the teeth.

Munksgaard, Copenhagen 1994

Andreasen JO & Ravn JJ:

Epidemiology of traumatic dental injuries to primary and permanent teeth in a Danish population sample.

Int J oral Surg 1, 235 (1972)

Andreasen JO:

Etiologie and pathogenesis of traumatic dental injuries. Clinical Study of 1298 cases.

Scand J Dent Res 78, 329 (1970)

Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM:

Replantation of 400 avulsed permanent incisors. I. Diagnosis of healing complications.

Endod Dent Traumatol 11, 51 (1995)

Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM:

Replantation of 400 avulsed permanent incisors. IV. Factors related to periodontal ligament healing.

Endod Dent Traumatol 11, 76 (1995)

Andreasen JO & Kristerson L:

The effect of limited drying or removal of the periodontal ligament. Periodontal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys.

Acta Odontol Scand 39, 1 (1981)

Andreasen JO:

Effect of extra-alveolar period and storage media upon periodontal and pulpal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys.

Int J Oral Surg 10, 43 (1981)

Andreasen JO, Paulsen HU, Zhijie Y, Schwartz O:

A long-term study of 370 autotransplanted premolars. Part III. Periodontal healing subsequent to transplantation.

Eur J Orthod 12, 25 (1990)

Andreasen JO & Hjørting-Hansen E:

Replantation of teeth. I. Radiographic and clinical study of 110 human teeth replanted after accidental loss.

Acta Odontol Scand 24, 263 (1966 a)

Andreasen JO & Hjørting-Hansen E:

Replantation of teeth. II. Histological study of 22 replanted anterior teeth in humans.

Acta Odontol Scand 24, 287 (1966)

Andreasen JO & Schwartz O:

The effect of saline storage before replantation upon dry damage upon the periodontal ligament.

Endod Dent Traumatol 2, 67 (1986)

Andreasen JO, Andreasen FM, Bakland LK, Flores MT:

Traumatic dental injuries. A manual. 1. ed.

Munksgaard, Copenhagen 2000

Bergink AH:

Tooth injuries.

Maandschr Kindergeneeskde 40, 278 (1972)

Blomlöf L:

Milk and saliva as possible storage media for traumatically exarticulated teeth prior to replantation.

Swed Dent J Suppl 8, 1 (1981 a)

Blomlöf L:

Storage of human periodontal ligament cells in a combination of different media.

Acta Odontol Scand 60, 1904 (1981 b)

Bloom W & Fawcett DW:

The Teeth. In: A Textbook of Histology. 10. ed.

Saunders, Philadelphia 1975

Boll M:

Eine Methode zur Beobachtung von Zellneubildung an Restdesmodont isolierter Zähne des Menschen.

Med Diss, Giessen 1994

Bolhuis JHA:

Tandletsels in de Hockeysport. Incidentie en Preventie.

Med Diss, Rijksuniversiteit Utrecht 1987

Borum MK & Andreasen JO:

Therapeutic and economic implications of traumatic dental injuries in Denmark:
An estimate based on 7549 patients treated at a major trauma centre.
Int J Paediatric Dent 11, 249 (2001)

Bosler B:

Frontzahnverletzungen bei Kindern und Jugendlichen untersucht an 3731
Giessener Vorschul- und Schulkindern.
Med Diss, Gießen 1975

Burkard W:

Keimbestimmung in einem Zellnährmedium nach temporärer Aufbewahrung
extrahierter Zähne des Menschen.
Med Diss, Giessen 1991

Calikan MK & Turkun M:

Clinical investigation of traumatic injuries of permanent incisors in Izmir,
Turkey.
Endod Dent Traumatol 11, 210 (1995)

Casasco A, Casasco M, Caligaro A, Reguzzoni M, Marrone G, Romeo E:

Localisation of proliferating cell nuclear antigen-immunoreactivity in human
dental pulp and gingiva.
Bull Group Int Rech Sci Stomatol et Odontol 39, 81 (1996)

Cvek M, Granath LE, Hollender L:

Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxid. III. Variation
of occurrence of ankylosis of reimplanted teeth with duration of extra alveolar
period and storage environment.
Odontol Rev 25, 43 (1974)

Delattre JP, Resmondrichard F, Allanche C, Perrin M, Michel JF,

Laberre A:

Dental injuries among schoolchildren aged from 6 to 15, in Rennes (France).

Endod Dent Traumatol 11, 186 (1995)

Ebeleseder KA, Friehs S, Ruder C, Hulla H, Glockner K, Pertl C:

Replantation totalluxierter unreifer bleibender Zähne. Durchschnittliche 2,5-Jahres Ergebnisse in 39 Fällen.

Mund Kiefer GesichtsChir 1, 340 (1997)

Filippi A & Kirschner H:

Nachuntersuchung auto-alloplastisch replantierter Zähne.

Z Zahnärztl Implantol 8, 117 (1992)

Filippi A & Kirschner H:

Replantation of avulsed primary anterior teeth- method of treatment and limitations.

J Dent Child 64, 272 (1997)

Filippi A, Pohl Y, Tekin U:

Transplantation of displaced and dilacerated anterior teeth.

Endod Dent Traumatol 14, 93 (1998)

Filippi A, Pohl Y, von Arx T:

Das Verhalten der Pulpa nach Zahntrauma.

Schweiz Monatsschr Zahnmed 111, 38 (2001)

Forsberg CM & Tedestam G:

Traumatic injuries to teeth in Swedish children living in an urban area.

Swed Dent J 14, 115 (1990)

Frank RM & Nalbandian J:

The Cellular Organization of the Pulp. In: Teeth, Berkovitz BKB, Boyde A, Frank RM, Höhling HJ, Moxham BJ, Nalbandian J, Tonge CH.
Springer, Berlin, Heidelberg 1989

Garcia-Godoy F, Dipres FM, Lora IM, Vidal ED:

Traumatic dental injuries in children from private and public schools.
Community Dent Oral Epidemiol 14, 287 (1986)

Gutz DP:

Fractured permanent incisors in a clinic population.
ASDC J Dent Child 38, 94 (1971)

Hedegard B & Stalhaue J:

Study of traumatically injured permanent teeth in children 7-15 years.
Sven Tandlak Tidskr 66, 431 (1973)

Herforth A:

Zur Frage der Pulpavitalität nach Frontzahntrauma bei Jugendlichen — Eine Longitudinalstudie.
Dtsch Zahnärztl Z 31, 938 (1976)

Herforth A:

Traumatische Schädigungen der Frontzähne bei Kindern und Jugendlichen im Alter von 7 bis 15 Jahren.
Quintessenz, Berlin 1982

Hiltz J & Trope M:

Vitality of human lip fibroblasts in milk, Hanks balanced salt solution and Viaspan storage media.
Endod Dent Traumatol 7, 69 (1991)

Hotz PR:

Zahnunfälle.

Schweiz Monatsschr Zahnmed 100, 848 (1990)

Hupp JG, Mesaros SV, Aukhil I, Trope M:

Periodontal ligament vitality and histological healing of teeth stored for extended periods before transplantation.

Endod Dent Traumatol 14, 79 (1998)

Hupp JG, Trope M, Mesaros SV, Aukhil I:

Tritiated thymidine uptake in periodontal ligament cells of dogs'teeth stored in various media for extended time periods.

Endod Dent Traumatol 13, 223 (1997)

Järvinen S:

Fractured and avulsed permanent incisors in Finish children. A retrospective study.

Acta Odontol Scand 37, 417 (1989)

Kaba AD & Marchaux SC:

Fourteen year follow-up study of traumatic injuries to the permanent dentition.

ASDC J Dent Child 56, 417 (1989)

Kaste LM, Gift HC, Baht M, Swango PA:

Prevalence of incisor trauma in persons 6 to 50 years of age: United States, 1988-1991.

J Dent Res 75, 696 (1996)

Kinirons MJ, Gregg TA, Welbury RR, Cole BO:

Variations in the presenting and treatment features in reimplanted permanent incisors in children and their effect on the prevalence of root resorption.

Br Dent J 189, 263 (2000)

Kirschner H, Burkard W, Pfütz E, Pohl Y, Obijou C:

Frontzahntrauma. Aufbewahrung und Behandlung des verunfallten Zahnes.
Schweiz Monatschr Zahnmed 102, 209 (1992)

Kirschner H:

Atlas der chirurgischen Zahnerhaltung. 2. ed.
Hanser, München 1996

Kirschner H, Pohl Y, Filippi A, Ebeleseder K:

Unfallverletzungen der Zähne. Vorbeugen-Retten-Behandeln. I. ed.
Schlütersche, Hannover 2002

Kirschner H:

Regeneration und Reparation. In: Kirschner H, Atlas der chirurgischen
Zahnerhaltung. II. ed.
Hanser, München 1996

Kirschner H, Bolz U, Enomoto S, Hüttemann RW, Meinel W, Sturm J:

Eine neue Methode kombinierter auto-alloplastischer Zahnreplantation mit
partieller Al₂O₃-Keramikwurzel.
Dtsch Zahnärztl Z 33, 594 (1978)

Kirschner H:

Chirurgische Zahnerhaltung. Experimente mit Aluminiumoxidkeramik.
Dtsch Zahnärztl Z 36, 274 (1981)

Kirschner H & Meier W:

Entwicklung einer Innenkühlung für chirurgische Bohrer.
Dtsch Zahnärztl Z 30, 436 (1975)

Kirschner H & Bolz U:

Experimentelle und klinische Erfahrungen mit einer automatischen Kühlmethode bei zahnärztlich-chirurgischen Eingriffen (I u. II).

Quintessenz 29, 13 (1978)

Kirschner H, Bolz U, Michel G:

Thermometrische Untersuchungen mit innen- und ungekühlten Bohrern an Kieferknochen und Zähnen.

Dtsch Zahnärztl Z 39, 30 (1984)

Kirschner H:

Thermometric investigation of internally cooled burrs and cutters in animal experiments and in oral and implantation surgery. In: Tissue Integration in Oral and Maxillo-Facial Reconstruction (Van Steenberghe).

Excerpta Medica, Elsevier 1986

Kirschner TE:

Proliferationserhalt von Pulpazellen wurzelunreifer Zähne im Rettungsmedium. In: Kirschner H, Weber C, Pohl Y: Unfallverletzungen der Zähne. Entwicklung und Bewährung eines Rettungskonzeptes.

Giessen 2004 (in preparation)

Kirschner H, Boll M, Filippi A, Foerster W, Kraus U, Obijou C, Pohl Y, Robert F, Tekin U:

Frontzahnverletzungen. Vorbeugen und Retten.

Oralprophylaxe 20, 101 (1998)

Kirschner H, Weber C, Pohl Y:

Unfallverletzungen der Zähne. Entwicklung und Bewährung eines Rettungskonzeptes.

2004 in preparation

Krasner P:

Treatment of tooth avulsion in the emergency department: Appropriate storage and transport media.

Am J Emerg Med 8, 351 (1990)

Krasner P & Person P:

Preserving avulsed teeth for replantation.

J Am Dent Assoc 123, 80 (1992)

Krasner P & Rankow HJ:

New philosophy for the treatment of avulsed teeth.

Oral Surg Oral Med Oral Pathol 79, 616 (1995)

Lauer HC, Müller J, Gross J:

The effect of storage media on the proliferation of periodontal ligament fibroblasts.

J Periodont 58, 481 (1987)

Magnusson B & Holm AK:

Traumatized permanent teeth in children -a follow-up. I. Pulpal complications and root resorption.

Sven Tandlak Tidskr 62, 61 (1969)

Magnusson B, Holm AK, Berg H:

Traumatized permanent teeth in children -a follow-up. II. The crown fractures.

Sven Tandlak Tidskr 62, 71 (1969)

Matsson L, Andreasen JO, Cvek M, Granath L:

Ankyloses of experimentally reimplanted teeth related to extra-alveolar period and storage environment.

Pediatr Dent 4, 327 (1982)

O'Mullane DM:

Some factors predisposing to injuries of permanent incisors in schoolchildren.
Br Dent J 134, 328 (1973)

Obijou C:

Frontzahntrauma. Eine epidemiologische Studie in Giessen.
Med Diss, Giessen 1994

Obijou C & Kirschner H:

Epidemiologie der Frontzahnverletzungen. In: H Kirschner: Atlas der chirurgischen Zahnerhaltung, 2. ed.
Hanser, München 1996

Oehmke HJ & Hager C:

Zum Problem des Lymphabflusses in der Zahnpulpa.
Dtsch Zahnärztl Z 38, 959 (1983)

Oikarinen KS & Seppä ST:

Effect of preservation media on proliferation and collagen biosynthesis of periodontal ligament fibroblasts.
Endod Dent Traumatol 3, 95 (1987)

Pettiette M, Hupp J, Mesaros S, Trope M:

Periodontal healing of extracted dogs'teeth air-dried for extended periods soaked in various media.
Endod Dent Traumatol 13, 113 (1997)

Pohl Y, Filippi A, Kirschner H:

Extra oral endodontic treatment by retrograde insertion posts. A long-term study on re- and transplanted teeth.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol 95, 355 (2003)

Pohl Y:

Autoradiographische Untersuchungen zur Erfassung von Zellneubildung im Restdesmodont isolierter Zähne des Menschen.

Med Diss, Giessen 1994

Pohl Y, Filippi A, Kirschner H:

Results after replantation of avulsed permanent teeth. I. Periodontal healing and the role of physiologic storage and antiresorptive-regenerative therapy (ART).

Dent Traumatol 2003a (in preparation)

Pohl Y, Filippi A, Kirschner H:

Results after replantation of avulsed permanent teeth. II. Endodontic consideration.

Dent Traumatol 2003b (in preparation)

Pohl Y, Filippi A, Kirschner H:

Results after replantation of avulsed permanent teeth. III. Tooth loss and survival analysis.

Dent Traumatol 2003c (in preparation)

Pohl Y, Filippi A, Tekin U, Kirschner H:

Periodontal healing after intentional auto-alloplastic reimplantation of injured immature upper front teeth.

J Clin Periodontol 27, 198 (2000)

Pohl Y & Kirschner H:

Autoradiographische Untersuchungen zur Erfassung von Zellneubildung im Restdesmodont isolierter Zähne des Menschen.

Dtsch Z Mund Kiefer GesichtsChir 18, 224 (1994)

Pohl Y & Kirschner H:

Nachuntersuchungen zur intentionalen auto-alloplastischen Replantation pulpatoter wurzelunreifer Frontzähne.

Dtsch Zahnärztl Z 52, 180 (1997)

Pohl Y, Tekin U, Boll M, Filippi A, Kirschner H:

Investigation on a cell culture medium for storage and transportation of avulsed teeth.

Aust Endod J 25, 70 (1999)

Pongsiri S, Schlegel D, Zimmermann M:

Überlebensrate desmodontaler Zellen nach extraoraler Lagerung in verschiedenen Medien. Dtsch Z Mund Kiefer GesichtsChir 14, 364 (1990)

Prenosil A:

Die Bedeutung des Frontzahntraumas im kindlichen und jugendlichen Gebiss unter besonderer Berücksichtigung des Frontzahnverlustes. Eine Untersuchung von 11126 Frankfurter Schulkindern mit 113 Schulunfällen mit Verlust bleibender Frontzähne.

Med Diss, Frankfurt 1985

Ravn JJ:

Dental injuries in Copenhagen schoolchildren, school years 1967-1972.

Community Dent Oral Epidemiol 2, 231 (1974)

Ravn JJ & Rossen I:

Prevalence and distribution of traumatic injuries to the teeth of Copenhagen schoolchildren 1967-68.

Tandlaegebladet 73, 1 (1969)

Rinderer L:

Zahnunfälle im Milch- und Wechselgebiss. In: P Hotz: Zahnmedizin bei Kindern und Jugendlichen.

Thieme, Stuttgart 1976

Schroeder HE:

Pathobiologie oraler Strukturen. 2. ed..

Karger, Basel 1991

Schroeder HE:

Orale Strukturbiologie.

Thieme, Stuttgart 1982

Schützmannsky G:

Unfallverletzungen an jugendlichen Zähnen.

Dtsch Stomat 13, 919 (1963)

Straßburg M:

Zahnerhaltung nach Trauma im kindlichen Gebiss.

Dtsch Zahnärztl Z 23, 1235 (1968)

Tetsch P:

Statistische Auswertung von 1588 traumatisierten Zähnen.

Dtsch Zahnärztl Z 38, 474 (1983)

Trope M & Friedman S:

Periodontal healing of replanted dog teeth stored in Viaspan, milk and Hank's balanced salt solution.

Endod Dent Traumatol 8, 183 (1992)

von Arx T:

Traumatologie im Milchgebiss (I). Klinische und therapeutische Aspekte.
Schweiz Monatsschr Zahnmed 100, 1194 (1990)

von Arx T:

Traumatologie im Milchgebiss (II). Langzeitergebnisse sowie Auswirkungen auf
das Milchgebiss und die bleibende Dentition.
Schweiz Monatsschr Zahnmed 101, 56 (1991)

Weber C:

Zahnrettung nach Unfall.
Med Diss, Giessen 2001

Wörle M:

Katamanestische Erhebung zur Prognose des Frontzahntraumas.
Dtsch Zahnärztl Z 31, 635 (1976)

York AH, Hunter RM, Morton JG, Wels GM, Newton BM:

Dental injuries in 11-to 13-year-old children.
N Z Dent J 74, 218 (1978)

Zach L, Topal R, Cohen G:

Pulpal repair following operative procedures:
autoradiographic demonstration with tritiated thymidine.
Oral Surg 28, 587 (1969)

Zadik D, Chosack A, Eidelman E:

Survey of traumatically injured incisors in Jerusalem schoolchildren.
ASDC J Dent Child 39, 185 (1972)

Zadik D:

A survey of traumatically injured primary and anterior teeth in Jerusalem preschool children.

Community Dent Oral Epidemiol 4, 149 (1976)

Zimmermann M & Nentwig GH:

Überlebensrate desmodontaler Zellen in Abhängigkeit von der extraoralen Austrocknung.

Schweiz Mschr Zahnmed 99, 1007 (1989)

Zimmermann M & Willershausen-Zönnchen B:

In-vitro-Studie zur Überlebensquote humaner Desmodontalfibroblasten in verschiedenen Medien.

Z Zahnärztl Implantol 4, 201 (1990)

Anhang I: Rettungsmedium

Inhaltsstoffe

HEPES	L-Asparaginsäure
NaCl	L-Valin
NaHCO ₃	L-Threonin
D-Glucose	L-Prolin
Na ₂ HPO ₄	L-Histidin
N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin	L-Methionin
KCl	L-Phenylalanin
L-Arginin	Glycin
MgSO ₄ *7H ₂ O	Glutathion
NaNO ₃	Phenolrot-Na
CaCl ₂ *2H ₂ O	L(+)-Ascorbinsäure
L-Asparagin	L-Tryptophan
L-Cystin	Cholinchlorid
L-Isoleucin	Thiamin*HCl
L-Leucin	Nicotinamid
L-Lysin*HCl	p-Aminobenzoesäure
i-Inosit	Pyridoxin*HCl
Natriumacid	Folsäure
L-Serin	Riboflavin
L-Glutaminsäure	Biotin
L-Hydroxyprolin	D-Ca-Pantothenat
L-Tyrosin	Vitamin B ₁₂



Lebenslauf

Teite Eugenie Kirschner-Lepper, geboren am 21.Sept.1970 in Giessen
verheiratet mit dem Kunsthistoriker Markus Lepper
Tochter Mattea, geboren am 12. Aug. 2001

Schulbildung:

Grundschule von 1977 bis 1983 (inkl. Förderstufe)
Gymnasium von 1983 bis 1990
Abitur 1990

Von 1990 bis 1993:

Drei Monate in Südfrankreich (Peau); freiwilliges soziales Jahr (Chirurgische Station im Hochwaldkrankenhaus, Bad Nauheim); drei Monate zahntechnisches Praktikum; zwei Monate Intensivstation (Chirurgie, Universitätsklinikum Giessen); Pflegetätigkeit (Altenpflegeheim St. Anna, Giessen)

Studium:

Beginn im So.-Semester 1993 (vorläufiger Studienplatz Humanmedizin an der JLU-Giessen)
Winter-Semester 1993/94 und So.-Semester 1994 Studium der Humanmedizin an der Universität in Rostock
Ab Winter-Semester 1994/95 Studium der Zahnheilkunde an der Justus-Liebig-Universität Giessen

Staatsexamen und Approbation als Zahnärztin im Dezember 2000

Assistenz-Zahnärztin in der Denti Med-Praxisgemeinschaft ab Februar 2001 bis Juli 2004 in Bad Homburg. Ab 1. Juli 2004 niedergelassene Zahnärztin in Bad Homburg

Danksagung

Für das Überlassen des Themas der Arbeit danke ich meinem Vater, Herrn Professor Dr. Horst Kirschner.

Herrn Oberarzt Dr. Yango Pohl möchte ich herzlich für die engagierte Unterstützung und multiple Anregungen danken. Ebenso herzlich danke ich Herrn Ulrich Heun für die aktive Mithilfe bei den histologischen und immunhistochemischen Arbeiten.

Herrn W. Pabst danke ich für Hilfen bei der statistischen Auswertung.

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die hier vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.