

Aus dem Anatomischen Institut
(Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. med. Jobst Sievers)
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**HISTOPATHOLOGISCHE DEGENERATIONSZEICHEN DES DISCUS
ARTICULARIS DES KIEFERGELENKES IN ABHÄNGIGKEIT DES ZAHNSTATUS**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

MALTE MICHAELIS

aus **Kiel**

Kiel **2015**

1. Berichtstatter

2. Berichtstatter

Tag der mündlichen Prüfung

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

gez.

Prof. Dr. Ralph Lucius

Prof. Dr. Dr. Jörg Wiltfang

Freitag, 22. Juli 2016

22. Juli 2016

Prof. Dr. Johann Roider

Für meine Eltern und meine Schwester

Inhaltsverzeichnis:

I. Einleitung	1
1. Anatomische Grundlagen	1
2. Zelluläre Grundlagen	5
3. Fragestellung	9
II. Material und Methoden	10
1. Proben	10
2. Einbettung und Schneiden	11
3. Histologische Färbung der Präparate	12
3.1 Entparaffinieren	12
3.2 Hämatoxylin-Eosin	12
3.3 Durchführung der Färbung mit Hämatoxylin-Eosin	12
3.4 Toluidinblau.....	13
3.5 Durchführung der Färbung mit Toluidinblau	13
4. Immunhistochemische Färbung der Präparate	14
4.1 Die LSAB-Methode	14
4.2 Primäre und sekundäre Antikörper.....	15
4.3 Entparaffinieren	16
4.4.1 Vorbereitung der Präparate Kollagen Typ 1	16
4.4.2 Vorbereitung der Präparate VEGF.....	17
4.4.3 Vorbereitung der Präparate Versican	17
4.5 Durchführung der immunhistochemischen Färbung	17
5. Analyse und Auswertung der Präparate	19
5.1 Histopathologische Zeichen der Degeneration	19
5.2 Grafische Auswertung.....	22
6. Statistische Auswertung	22
III. Ergebnisse	23
1. Ergebnisse histologische Färbungen	23
1.1 Gewebsrisse	23
1.2 Zellzahl Chondrozyten und Fibroblasten.....	25
1.3 Gewebshomogenität (Färbung mit Toluidinblau)	27
2. Ergebnisse immunhistochemische Färbungen	29
2.1 Kollagen Typ 1.....	29
2.2 VEGF	30
2.3 Versican.....	32

3 Ergebnisse U-Tests nach Mann-Whitney	35
3.1 Histologische Färbungen	35
3.1.1 Gruppe Mesiolateral	36
3.1.2 Gruppe Mesiomedial	37
3.1.3 Gruppe Distolateral.....	39
3.1.4 Gruppe Distomedial.....	40
3.1.5 Gruppe Kranial	42
3.1.6 Gruppe Mittig	43
3.1.7 Gruppe Kaudal	45
3.2 Immunhistochemische Färbungen	46
3.2.1 Gruppe Mesiolateral	47
3.2.2 Gruppe Mesiomedial	48
3.2.3 Gruppe Distolateral.....	49
3.2.4 Gruppe Distomedial.....	51
3.2.5 Gruppe Kranial	52
3.2.6 Gruppe Mittig	54
3.2.7 Gruppe Kaudal	55
IV. Diskussion	57
V. Zusammenfassung	64
VI. Literaturverzeichnis	66
VII. Anhang	76
1. Publikationen	76
2. Danksagung	77
3. Lebenslauf	78

I. Einleitung

Die Funktionen des Kiefergelenks (temporomandibular joint, TMJ) umfassen die Artikulation sowie mit Hilfe von Zähnen die Nahrungsaufnahme und –zerkleinerung. Ermöglicht werden sie durch die dazugehörige Kaumuskulatur, den Bandapparat und die umgebenden knöchernen Strukturen. Zwischen 5 % und 33 % der Bevölkerung leiden an Kiefergelenksknacken und –schmerzen (Guarda-Nardini et al. 2012). Zugrunde liegt meist eine Verlagerung des Discus articularis, der knorpeligen Zwischenscheibe, die das Gelenk in zwei Kammern trennt und der Verteilung und Dämpfung der auftretenden Kräfte dient. Bei Fehl- und Überbelastungen kommt es zu Verlagerungen des Discus articularis und Entzündungsprozessen im Gewebe. Häufig werden sie durch eine unphysiologische Okklusion der Zahnreihen oder durch übermäßiges Pressen der Zähne, wie beispielweise beim Bruxismus, hervorgerufen. Die Behandlungsmöglichkeiten sind dabei jedoch meist eingeschränkt und reichen von Gelenklavage und Physiotherapie bis hin zur Entfernung des entzündeten Gewebes. Aufgrund dessen ist der Discus articularis Ziel zahlreicher Studien, die den Zusammenhang zwischen klinischen Krankheitsbildern, wie Kiefergelenksgeräuschen und Schmerzen bei Mundöffnung, und den Entzündungszeichen im Gelenkknorpel untersuchen.

1. Anatomische Grundlagen

Das Kiefergelenk ist ein Scharnier- und Gleitgelenk. Es ist ein bikondyläres, bithalaminäres System, in welchem jedoch die beiden Gelenke nicht unabhängig voneinander artikulieren, da sie über den Unterkiefer miteinander verbunden sind.

Die Gelenke haben grundsätzlich folgende Hauptfunktionen: die Verteilung und Dämpfung der einwirkenden Kräfte zwischen den Knochen, die Ernährung des Gelenkknorpels und die Wahrnehmung der Gelenkstellung und Krafteinwirkung (Kubein-Meesenburg et al. 2007). Das Kiefergelenk besteht aus einer knorpeligen Zwischenscheibe, dem Discus articularis, den korrespondierenden Knochenflächen, einer fibrösen Kapsel, Synovialflüssigkeit und einem Bandapparat. Das Ausmaß der Bewegung wird durch die Knochenform, die umgebenden Bänder und Muskeln sowie die Okklusion der Zahnreihen bestimmt.

Der oval geformte Kondylus der Mandibula sitzt bei habitueller Interkuspitation in der Fossa mandibularis des Os temporale. Die Fossa ist rundum durch knöcherne Vorsprünge begrenzt, wobei anterior das sogenannte Tuberculum articulare am

prominentesten ist. Posterior liegt die Fossa in enger Nachbarschaft zum äußeren Gehörgang (Alomar et al. 2007).

Zwischen der Fossa articularis (Os temporale) und dem Caput mandibulae befindet sich der bikonkave, knorpelige Discus articularis. Der Discus ist dorsal von der gefäßreichen bilaminären Zone umgeben. Das physiologisch gesunde Knorpelgewebe des Discus articularis ist selbst jedoch avaskulär (Dixon 1962). Ventral inseriert der M. pterygoideus lat. in die Zwischenscheibe. Im posterioren Bereich ist der Discus mit 3,0 mm am Dicksten, wohingegen er in der Mitte mit lediglich 1,0 mm die geringste Schichtstärke aufweist. Anterior ist er durchschnittlich 2,0 mm dick. Durch diese physiologischen Gegebenheiten treten Risse und Löcher im Knorpel bei pathologischen Verschleißerscheinungen als Erstes in der Mitte des Discus auf (Alomar et al. 2007). Medial und lateral ist der Discus articularis direkt mit dem Kondylus verwachsen. Nach anterior ist er mit der ihn umgebenden Kapsel verbunden, die das Gelenk und den Kondylus schützend umgibt (Abb. 1).

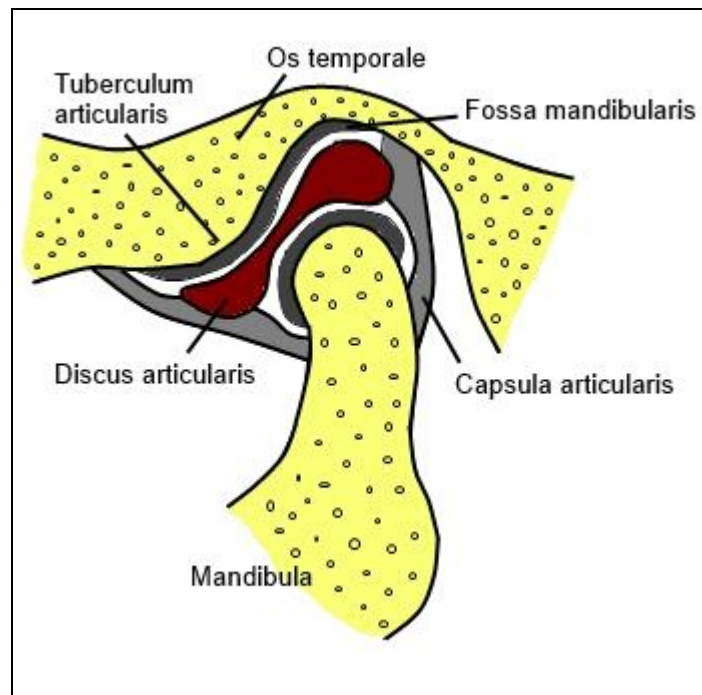


Abb.1 Übersicht über die anatomischen Verhältnisse des Kiefergelenks im Querschnitt.

Die Kapsel ist gefüllt mit der Synovialflüssigkeit, die für die Ernährung des Knorpels mittels Diffusion und Konvektion sorgt und die Gleitbewegungen unterstützt. Entzündungsmediatoren können frühzeitig in der Synovialflüssigkeit bei Gelenkerkrankungen nachgewiesen werden.

Die knorpelige Zwischenscheibe trennt das Gelenk in eine große superiore Kammer und eine kleinere inferiore Kammer. Die große Kammer wird vor allem bei Gleitbewegungen belastet, wohingegen bei Scharnierbewegungen die Kraft auf die kleine Kammer übertragen wird. Scharnierbewegungen finden bei initialer Kieferöffnung bis 20 mm statt, darüber hinaus vergrößert sich der Anteil der Translationsbewegung, wobei immer eine Kombination beider Bewegungen vorliegt (Salaorni und Palla 1994).

Der Discus articularis liegt bei zentrischer Kondylenposition leicht nach anterior verschoben. Bei Kieferöffnung bewegt sich der Kondylus mitsamt des Discuses nach unten und vorne. Um zu verhindern, dass bei extremer Kieferöffnung (z.B. beim Gähnen) der Discus aus seiner Position rutscht, wird dieser von zwei posterioren Bändern stabilisiert. Die Bänder sind durch ein Netzwerk aus elastischen Fibrillen, Nerven- und Gefäßbündeln voneinander getrennt. Dieser Raum wird auch, wie bereits erwähnt, als bilaminäre Zone bezeichnet. Das obere Band besteht größtenteils aus elastischen Fasern. Das untere Band hingegen besteht aus dichten, unelastischen Kollagenfibrillen und ist mit dem Kondylus straff verwachsen. Dadurch wird eine Rotation des Discus auf dem Gelenkkopf verhindert (Alomar et al. 2007).

Die Bedeutung des Discus articularis im Kiefergelenk wird durch die Abweichung seiner physiologischen Lage und den daraus resultierenden Arthropathien deutlich, die ebenfalls Veränderungen in der Morphologie und Zusammensetzung der Zwischenscheibe hervorrufen. Diese äußern sich meist in Gelenkgeräuschen bis hin zu Mundöffnungseinschränkungen und Schmerzen (Haskin et al. 1995). Studien haben gezeigt, dass die Überbelastung des Gelenks (Haskin et al. 1995) und die Dislokation des Discus articularis im Gelenk zur Degeneration des knorpeligen Gewebes führt (Leonardi et al. 2007). Die Diskusverlagerung ist mit einer Prävalenz von 18 % bis 35 % eine sehr häufig auftretende Gelenkerkrankung (Naeije et al. 2013). Dabei kann der Discus nach anterior, als auch nach posterior verlagert sein. Zu unterscheiden ist außerdem, ob er sich bei der Mundöffnung repositioniert, also zurück auf den Kondylus springt oder nicht. Man kann daher von einer anterioren bzw. posterioren Diskusverlagerung mit oder ohne Reposition sprechen. Klinische

Zeichen und Symptome sind bei Diskusverlagerung eher selten. Zudem haben sie häufig die Tendenz nach einigen Monaten sich von alleine zu verbessern oder gar zu verschwinden (Naeije et al. 2013).

Degenerative Gelenkkrankheiten betreffen häufig nur eine Seite (Belmonte-Serrano et al. 1993). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bei einer bereits vorliegenden Diskusverlagerung die auf das ipsilaterale und kontralaterale Gelenk einwirkende Kaukraft signifikant höher ist als bei physiologisch gesunden Gelenken (Iwasaki et al. 2009). Dies kann zu einer Verschlechterung bereits vorhandener Diskusverlagerungen, aber auch zur Ausbildung einer Gelenkerkrankung im vorher gesunden kontralateralen Gelenk beitragen.

Im Kontrast zu dem physiologisch gefäßfreien Knorpelgewebe sind neu eingesprossene Blutgefäße, darunter Venolen, Arteriolen und Kapillaren, regelmäßig bei Verlagerungen des Discus zu finden (Yoshida et al. 1999).

Im Geschlechtervergleich zeigt sich, dass Frauen generell häufiger von Gelenkkrankheiten betroffen sind und diese auch in ihrer Form schwerer auftreten (Haskin et al. 1995; Bagis et al. 2012). Ein Grund dafür kann das Hormon Östrogen sein, welches scheinbar zur Verschlechterung der Gelenkerkrankungen beiträgt. Studien konnten zeigen, dass Östrogen einen negativen Einfluss auf die Steuerung des Extrazellulärmatrixumsatzes im Knorpelgewebe besitzt. Dies konnte im Tierexperiment durch die Anwesenheit von Östrogenrezeptoren im Gewebe des temporomandibulären Gelenkes nachgewiesen werden (Milam 2003).

Es gibt Hinweise darauf, dass schlecht sitzender Zahnersatz, Bruxismus und der Verlust der zweiten Molaren, die das Kauzentrum darstellen, zu einem erhöhten Risiko für Kiefergelenksarthritiden führen (Haskin et al. 1995). Es konnte gezeigt werden, dass vor allem das Alter eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung von Kiefergelenkskrankungen spielt (Luder 2002). Diese Studie konnte ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Verkürzung der Zahnreihe und der resultierenden degenerativen Erkrankung zeigen. Zudem bestätigt sich die Beobachtung, dass eine unphysiologische Diskusposition ebenfalls zu dem Krankheitsbild beiträgt. Im Geschlechtervergleich konnte diese Studie keinen signifikanten Unterschied in Prävalenz und Schwere der Gelenkerkrankung ausmachen.

2. Zelluläre Grundlagen

Im Gegensatz zu dem im menschlichen Körper meist hyalinen Gelenkknorpel besteht der Discus articularis des Kiefergelenks aus Faserknorpel (Haskin et al. 1995). Hauptbestandteil des Discus ist Kollagen Typ 1, welches überwiegend von Fibroblasten synthetisiert wird. Die Fibrillen sind in der Mitte sagittal, transversal und schräg geschichtet. Im posterioren Bereich sind sie hauptsächlich transversal angeordnet, wohingegen sie anterior sagittal und schräg verlaufen. Neben Kollagen Typ 1 tritt in allen drei Regionen außerdem Kollagen Typ 3 auf.

Zellen treten im Faserknorpel eher selten auf und machen nur etwa 2,0 – 5,0 % des Knorpelvolumens aus (Mills et al. 1988; Haskin et al. 1995). Chondrozyten stellen die häufigsten Zellen im Discus articularis dar, wobei sie mit fortschreitendem Alter stetig abnehmen und im Gegensatz zum hyalinen Knorpel meist einzeln vorliegen (Minarelli und Liberti 1997). Fibroblasten sind im physiologisch gesunden Gewebe eher selten (Marchetti et al. 1999; Leonardi et al. 2001).

Symptome bei Verschleiß des Gelenkknorpels sind Schmerzen, Bewegungseinschränkungen und Gelenkgeräusche, wobei letzteres individuell stark unterschiedlich ausgeprägt sein kann und kein obligates Kriterium für Gelenkerkrankungen ist. Der Gewebeumbau ist also ein Resultat von Fehl- und Überbelastung des Kiefergelenks (Haskin et al. 1995).

Histologische Merkmale eines degenerierten Knorpels sind die Neu- und Umbildung von Kollagenfibrillen, der Verlust von Proteoglykanen, eine Umverteilung von Glykosaminoglykanen, Neovaskularisation, kalzifizierte Bereiche oder sogar Perforationen im Knorpel (Flygare et al. 1992; Haskin et al. 1995).

Auf die Neubildung von Kollagenfibrillen folgen bei anhaltender Degeneration Risse an der Oberfläche und im Zentrum des Knorpels. Die Schädigung und der Verlust von Kollagenfasern des Typ 1 ist eine Folge der Degeneration. Zudem wird vermehrt Kollagen des Typ 2 als Reparaturversuch exprimiert (Haskin et al. 1995). Bei voranschreitender Krankheit führt es letztlich zum Verlust des Faserknorpels (de Bont und Stegenga 1993).

Auf zellulärer Ebene ist meist ein Verlust von Chondrozyten in dem betroffenen Areal zu beobachten, wobei es auch vorkommt, dass lokal eine starke Proliferation und Zellnester entstehen können (de Bont und Stegenga 1993; Haskin et al. 1995). Dabei handelt es sich um eine starke Anhäufung von Chondrozyten im Gewebe.

Bei übermäßiger und unphysiologischer Krafteinwirkung kommt es zu einer Mangelernährung der Knorpelzellen im Discus articularis. Aufgrund der geringen Durchblutung des physiologisch gesunden Knorpels ist dieser auf die Nährstoffe in der umgebenden Synovialflüssigkeit angewiesen. Diese ist umso wichtiger bei Reparatur- und Anpassungsprozessen als Antwort auf die mechanische Beanspruchung der Knorpelzellen. Ist die Ernährung des Knorpels durch die Synovialflüssigkeit im Zuge einer Diskusverlagerung oder übermäßig starken Krafteinwirkungen gestört, können Umbauprozesse nicht vollständig stattfinden (Helmy 1993). Die mangelhafte Anpassung des Knorpels auf die mechanischen Kräfte unterliegt verschiedenen molekularen Prozessen, wie beispielsweise Gewebetrauma durch die sogenannte „Hypoxie-Reperfusion“. In der Theorie wird die Durchblutung während muskulärer Krafteinwirkung auf den Knorpel durch Überschreitung des Kapillardrucks gestört. In Folge dessen ist der Katabolismus der Knorpelzellen gestört, es kommt zum Auftreten von freien Radikalen bei Entlastung der Kaumuskulatur und erneuter Durchblutung (McCord 1974; McCord 1985; McCord 1987). Diese freien Radikale schädigen das umliegende Gewebe und können auch durch direktes Gewebstrauma entstehen (Chandra und Symons 1987). Neuropeptide, die von peripheren Nervenenden ausgeschüttet werden, rufen eine inflammatorische Antwort hervor (Pincelli et al. 1993; Smith et al. 1993). Neben der Aktivierung von pro-inflammatorischen Zytokinen kommt es zu einer Proliferation von Fibroblasten (Schmidt et al. 1982), Knochenresorptionen und Knorpelabbau (Pettipher et al. 1986a; Pettipher et al. 1986b; Dewhirst et al. 1987; Lotz et al. 1987; Pettipher et al. 1988; Pettipher et al. 1989; O'Byrne et al. 1990) und der Freisetzung von zusätzlichen Kollagenasen und Prostaglandinen (Arner und Pratta 1989).

Eine wichtige Rolle bei dem Entzündungsvorgang im Gewebe scheint das Proteoglykan Versican einzunehmen. Proteoglykane sind essentiell für die Widerstandsfähigkeit des Gewebes gegenüber einwirkenden Kräften (Halper 2014). Proteoglykane und Glykosaminoglykane, die Polysaccharid-Seitenketten der Proteoglykane, sind vermehrt in den Arealen des Discus articularis eingebaut, in dem die größte Kraftübertragung stattfindet (Blaustein und Scapino 1986). Studien am Kiefergelenk von Rindern konnten zeigen, dass die Verteilung von Proteoglykanen dabei nicht gleichmäßig ist (Nakano und Scott 1989). Sie richtet sich dabei vielmehr nach der Größe der Krafteinwirkung. An der Knorpeloberfläche findet ein ständiger Umbau als Anpassung an die auftretenden Kräfte statt (Morales und Hascall 1989).

Findet keine Krafteinwirkung statt, verliert der Knorpel Proteoglykane und Glykosaminoglykane und nimmt damit auch an Substanz ab (Jurvelin et al. 1990). Bei erneuter Belastung kommt es zu einer Synthese von Glykosaminoglykanen und einer Dickenzunahme des Knorpels (Kiviranta et al. 1987; Carvalho et al. 1995; Juhasz et al. 2014). Ein ausgeglichener Wechsel an Belastungs- und Entlastungsphasen ist somit wichtig für die Lebensdauer des Knorpelgewebes. Ungleichmäßige Kraftverteilung, wie beispielsweise bei einer einseitigen Bisserrhöhung, resultiert in einer Zunahme von Proteoglykanen (Mao et al. 1998; Nakao et al. 2015). Bereits eine einseitige Kaubelastung durch das Fehlen von Zähnen führt zu einer vermehrten Synthese von Glykosaminoglykanen durch Chondrozyten (Huang et al. 2002).

Versican ist ein Chondroitinsulfat (sulfatiertes Glykosaminoglykan) und stellt im gesamten Körper einen wichtigen Bestandteil der Extrazellulärmatrix dar. Es ist an Zelladhäsion, -Proliferation und -Migration beteiligt (Sotoodehnejadmatalahi und Burke 2013). Daher ist es nicht verwunderlich, dass Versican in Wachstums- und Reifungsvorgängen des Körpers sowie bei der Wundheilung und Angiogenese eine wichtige Funktion einnimmt (Toriya et al. 2006; Choocheep et al. 2010).

Die Extrazellulärmatrix ist ein Reservoir an Zytokinen und Wachstumshormonen, welche die Integrität des umliegenden Gewebes beeinflussen und die Proliferation und Migration von Entzündungszellen ermöglicht (Sotoodehnejadmatalahi und Burke 2013). Die Entzündungsantwort wird dabei durch mehrere Mediatoren eingeleitet und verstärkt. Studien konnten zeigen, dass Versican bei der Einleitung und Zunahme der Entzündung eine wichtige Rolle spielt (Zhang et al. 2012).

Die Wirkung von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), einem multifunktionellen Zytokin, auf Knorpelgewebe ist Teil vieler Studien. So konnte gezeigt werden, dass VEGF großen Einfluss auf die Angiogenese im physiologischen Gewebe, aber auch im Rahmen pathologischer Veränderungen besitzt (Dvorak et al. 1995). Dabei ist die Rolle des Zytokins in der Angiogenese in Tumorzellen besonders gut erforscht, darüber hinaus konnte jedoch auch die Anwesenheit von VEGF bei Wundheilungen und rheumatoider Arthritis nachgewiesen werden (Senger et al. 1993; Fava et al. 1994; Senger et al. 1994; Nissen et al. 1998; Pufe et al. 2001).

Es beeinflusst die Angiogenese auf zwei Wegen: zum einen regt es die Proliferation und Migration der Endothelzellen an und wird selbst durch die Wirkung von

Wachstumshormonen, wie beispielsweise den Transforming Growth Factor (TGF)-alpha, verstärkt exprimiert (Detmar et al. 1995). Neben TGF-alpha erhöhen weitere Zytokine, wie Interleukin-6, Interleukin-1-beta und Prostaglandin E die Expression von VEGF (Ben-Av et al. 1995; Yang et al. 2012; Tzeng et al. 2013). Zum anderen steigert VEGF die Permeabilität der Endothelzellen und sorgt damit für einen Ausstrom von Fibrinogen in den extravasalen Raum. Dort steht Fibrinogen als Leitstruktur für das Wachstum neuer Blutgefäße zur Verfügung (Dvorak et al. 1995; Brown et al. 1997).

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Angiogenese und Expression von VEGF scheint die Hypoxie im Gewebe zu sein. Wie bereits erwähnt, findet bei Fehl- bzw. Überbelastung des Gewebes und dem Überschreiten des Kapillardrucks eine verminderte Perfusion statt. Bei vorliegender Hypoxie im Gewebe konnte gezeigt werden, dass die Expression von VEGF erhöht und damit die Angiogenese gesteigert wird (Detmar et al. 1997; Jiang et al. 2013; Ye et al. 2014).

Studien konnten zeigen, dass VEGF nicht allein im Endothel, sondern auch in anderen Geweben, wie vor allem dem Knochen- und Knorpelgewebe und auch dem Discus articularis des Kiefergelenks exprimiert wird (Lingaraj et al. 2010; Berendsen und Olsen 2014). Histologische Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Expression von VEGF mit der Schwere der pathologischen Gewebsdegeneration zunimmt. Die Expression findet vorwiegend in Chondrozyten und den neu eingesprossenen Kapillaren statt (Leonardi et al. 2003).

3. Fragestellung

Das Verständnis um die Pathophysiologie der Gewebsveränderungen des Discus articularis ist heute Ziel vieler Studien. In dieser Arbeit soll mit Hilfe mikroskopischer und immunhistochemischer Methoden die Degeneration des Discus articularis in Abhängigkeit von dem Zahnstatus der Kiefer untersucht werden.

Folgende Fragen sollen geklärt werden:

1. Unterscheiden sich die Disci von voll-, teil- und unbezahnten Körperspendern auf zellulärer Ebene (Zellanzahl und -verteilung, Gewebsrisse, Anordnung der Kollagenfibrillen)?
2. Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Proteoglykans Versican und der Schwere der Gewebsdegeneration?
3. Korreliert eine Degeneration mit dem immunhistochemischen Nachweis des Neoangiogenesefaktors VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)?

II. Material und Methoden

1. Proben

Für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen in dieser Arbeit wurden von 17 Körperspendern (11 x weiblich, 6 x männlich, Durchschnittsalter: 77,5 Jahren) des Anatomischen Institutes zu Kiel die rechten Disci articulares entnommen (Abb. 2). Die Körperspender wurden in Bezug auf ihren Zahnstatus in drei Versuchsgruppen eingeteilt: vollbezahnt (1) mit $n = 6$, teilbezahnt (2) mit $n = 5$ und unbezahnt (3) mit $n = 6$. Die Einteilung erfolgte dabei anhand der Klassifikation der Stützzonen nach Eichner (1955). Dabei ist festgelegt, dass ein vollständiges Gebiss aus vier Stützzonen besteht, welche durch die jeweiligen Zahnkontakte der Antagonisten der Prämolaren und Molaren gekennzeichnet sind. Die Anzahl der noch vorhandenen Stützzonen legt die drei Hauptgruppen fest. Fehlen alle Stützzonen, liegt ein zahnloser Kiefer vor (3). Sind noch ein bis drei Stützzonen vorhanden, handelt es sich um einen teilbezahnten Kiefer (2) oder bei allen vier Stützzonen um einen vollbezahnten Kiefer (1). Die Untergruppen blieben in dieser Arbeit aus Gründen der Übersichtlichkeit unberücksichtigt.

Zur Freilegung der Disci articulares wurden zuerst die Unterkiefer aus den Körperspendern exartikuliert (Abb. 2).

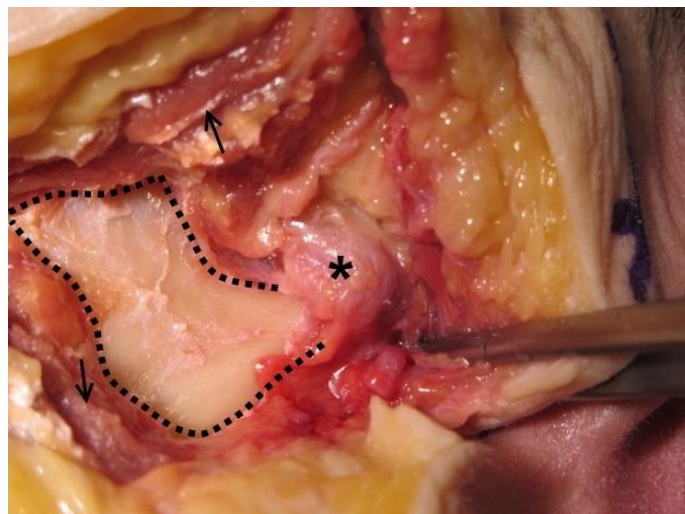


Abb. 2 Zu sehen ist die Entnahme des Unterkiefers (die gestrichelte Linie umrahmt den Unterkiefer). Die Pfeile (\rightarrow) deuten auf den durchtrennten M. masseter hin, der Stern (*) markiert das Kieferköpfchen mit dem Discus articularis.

Bei der Lösung des Discus articularis vom Kondylus wurde darauf geachtet, die Zwischenscheibe nicht zu beschädigen oder zu verformen. Der Discus wurde immer in einem Stück entnommen.

Die rechten Disci wurden in axialer Richtung geviertelt (Abb. 3). Es erfolgte eine Einteilung der Gewebegruppen in Bezug zu ihrer anatomischen Lage: distolateral, distomedial, mesiolateral, mesiomedial. Anschließend wurden diese mit einem Nahtmaterial (3/0 Seralon, SERAG Wiessner KG, Naila, Deutschland) zur Orientierung an den Ecken markiert. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Präparate später korrekt eingebettet wurden und die gewünschte Knorpelseite geschnitten wurde. Die Lagerung der Präparate erfolgte in 4 % Paraformaldehyd (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Insgesamt wurden 68 Präparate hergestellt und untersucht.

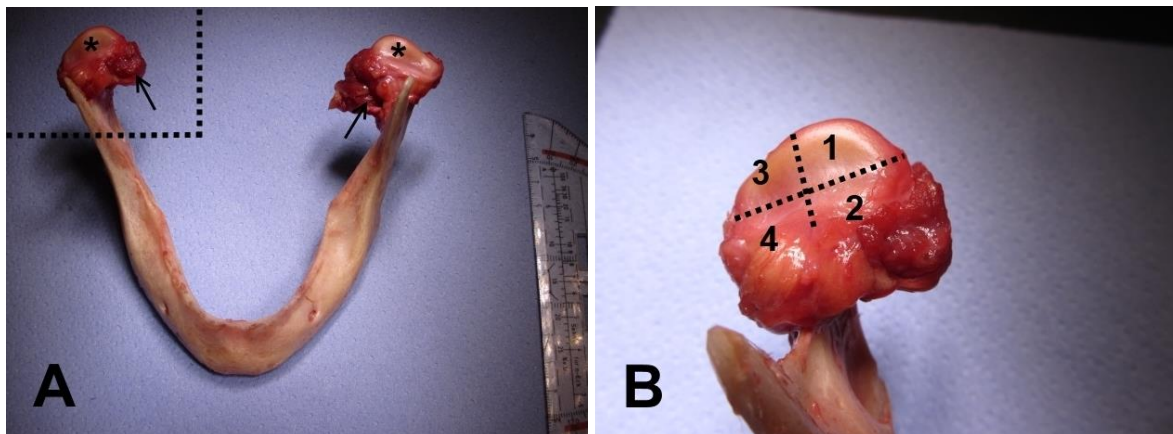


Abb. 3 Zu sehen ist der Unterkiefer mit dazugehörigen Discus articularis nach Entnahme. Links (**A**) ist der Discus articularis (*) mit anterior inserierendem M. pterygoideus lateralis (→) zu erkennen. Rechts (**B**) ist der Bildausschnitt der linken Abbildung vergrößert. Dargestellt ist die nach Lösung des Discus vom Köpfchen dargestellte Schnittrichtung (gestrichelte Linie) und die entstehenden Viertel: distomedial (1), mesiomedial (2), distolateral (3) und mesiolateral (4).

2. Einbettung und Schneiden

Das Paraformaldehyd diente als Nachfixierung für die Präparate. Die Stücke wurden 1 h unter laufendem Wasser gereinigt und anschließend einer aufsteigenden Alkoholreihe (2 x 50 %, 2 x 70 %, 2 x 90 %, 1 x 96 % und 1 x 100 %) unterzogen. Bei dem Alkohol wurde unvergälltes Ethanol (Walter-CMP GmbH & Co. KG, Kiel, Deutschland) verwendet. Die Präparate wurden über Nacht in dem Zwischenmedium Methylbenzoat bzw. Benzoesäure-methylester (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gelagert. Das Gewebe wurde am nächsten Tag 3 x 1 h in Paraffin (Histo Comp, VOGEL med. Technik & Elektronik GmbH & Co. KG,

Fernwald, Deutschland) eingebettet und anschließend in Blockformen gegossen. Sobald der Block erhärtet war, konnten die Schnitte mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica RM2155, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) angefertigt werden. Dabei wurde der Block zuerst in 30 µm Dicke angeschnitten, die histologischen Schnitte erfolgten in 7 µm Dicke.

3. Histologische Färbung der Präparate

Bei der histologischen Färbung bedient man sich der Reaktionsfähigkeit bestimmter Gewebsstrukturen auf Farbstoffe, um diese Gewebsstrukturen für die histologische Mikroskopie sichtbar zu machen. Durch Ionenbindung werden dabei beispielsweise saure Farbstoffe an basische Proteine gebunden. Anhand dieses Verhaltens sind Gewebs- und Zellstrukturen in Basophilie, Azidophilie und Neutrophilie eingeteilt.

3.1 Entparaffinieren

Das Entparaffinieren der Schnitte erfolgte mit Hilfe des Lösungsmittels Xylol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) 3 x 7 Minuten und anschließend einer absteigenden Alkoholreihe mit jeweils 3 Minuten pro Stufe (2 x 100 %, 2 x 96 %, 1 x 90 %, 1 x 80 %, 1 x 70 %, 1 x 50 %). Abschließend wurden die Präparate mit destilliertem Wasser abgespült und zur weiteren Bearbeitung auf einen silanisierten Glasobjektträger (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) übertragen.

3.2 Hämatoxylin-Eosin

Bei der Färbung mit Hämatoxylin-Eosin sorgt das basische Hämalaun für eine bläuliche Färbung von basophilen Strukturen. Dazu gehören beispielsweise der Zellkern mit der darin enthaltenen DNA sowie das raue endoplasmatische Retikulum. Eosin ist ein saurer Farbstoff und färbt azidophile Strukturen, wie Zellplasmaproteine, Kollagen und Keratin rosa bis rot.

3.3 Durchführung der Färbung mit Hämatoxylin-Eosin

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung erfolgte nach Mayer mit 1 % wässrigem Eosin (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Der Anfang geschieht durch die Kernfärbung mit Hämalaun (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) für 5 Minuten. Es wurde anschließend erst mit destilliertem Wasser und darauf für 5 Minuten unter

fließendem Leitungswasser gespült. Nachdem die Präparate 3 Sekunden in ein 0,1 % HCl - Alkohol - Bad getaucht wurden, erfolgte erneut die Wässerung für 15 Minuten und anschließend eine Spülung mit destilliertem Wasser. Nun fand die Färbung für 4 Minuten in 1 % wässrigem Eosin mit 40 µl Eisessig auf 200 ml und eine Spülung mit destilliertem Wasser statt. Abschließend wurden die Präparate einer aufsteigenden Alkoholreihe (beginnend bei 70 %) ausgesetzt und mit Hilfe des Eindeckmediums DePeX (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) eingedeckt.

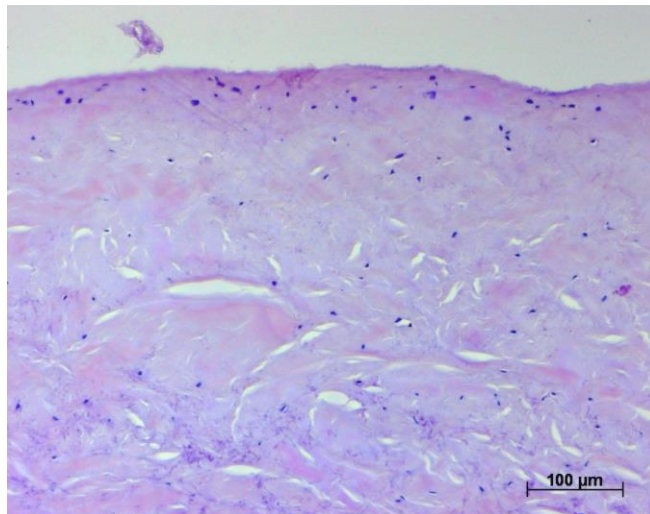


Abb. 4 Histologische Färbung eines Discus articularis mit Hämatoxylin-Eosin.

3.4 Toluidinblau

Der basisch geladene Farbstoff Toluidinblau färbt basophile Strukturen blau. Dazu gehören beispielsweise das Kernchromatin und das raue endoplasmatische Retikulum. Azidophiles Zytoplasma, kollagenes Bindegewebe werden rosa bis rotviolett gefärbt.

3.5 Durchführung der Färbung mit Toluidinblau

Die Stammlösung des Toluidinblau (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) ist ein 1 : 1-Gemisch aus 1 % Pyronin G in 1 % Borax (Di-Natriumtetraborat-10-hydrat) und 1 % Toluidinblau in 1 % Borax. Bei Bedarf wird der Lösung die gleiche Menge an destilliertem Wasser hinzugegeben.

Der erste Schritt für die Färbung mit Toluidinblau erfolgte durch das Entplasten der Präparate. Ist dies geschehen, konnte der Farbstoff für 5 Minuten aufgebracht

werden. Anschließend wurden die Präparate in 96 % Alkohol differenziert, 2 x 5 Minuten in Propanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gelagert und abschließend erneut 5 Minuten in Xylol getaucht. Nun konnten die Präparate in DePeX eingebettet werden.

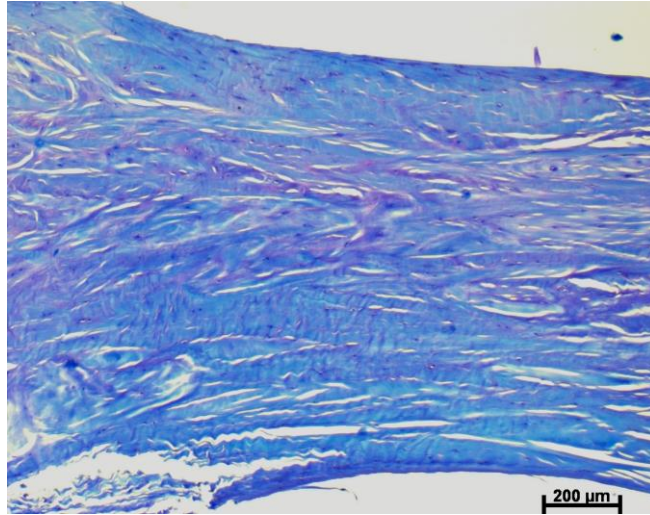


Abb. 5 Histologische Färbung eines Discus articularis mit Toluidinblau.

4. Immunhistochemische Färbung der Präparate

Die Immunhistochemie befasst sich mit der Wechselwirkung von Antigenen und Antikörpern. Man bedient sich der Reaktivität, um markierte Antikörper mikroskopisch sichtbar zu machen. Dadurch kann ein gewünschtes Protein im Gewebe nachgewiesen werden.

Man unterscheidet zwischen monoklonalen und polyklonalen Antikörpern. Monoklonale Antikörper werden von nur einer Plasmazelle gebildet und reagieren folglich mit nur einem Epitop (Oberflächenabschnitt, mit dem der Antikörper reagiert) des Antigens. Polyklonale Antikörper sind das Produkt verschiedener Plasmazellen und binden an verschiedene Epitope des Antigens.

4.1 Die LSAB-Methode

Die LSAB-Methode (Labelled StreptAvidin-Biotin-Methode) ist eine „Drei-Schritt indirekte“ Immunmarkierung, bei der durch eine Enzym-Substrat-Reaktion farblose Chromogene sichtbar gemacht werden. Sie beruht auf der hohen Affinität des Glykoproteins Avidin bzw. Streptavidin zu dem Vitamin Biotin. Ursprünglich aus Hühnereiweiß gewonnen, isoliert man heutzutage mittels Gentechnik das Glykoprotein Avidin aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii*.

Bei der indirekten Methode wird im ersten Schritt ein spezifischer Primärantikörper mit dem zu untersuchenden Antigen zusammengebracht. Anschließend wird auf den Primärantikörper ein biotinmarkierter („biotinylierter“) Sekundär- bzw. Brückenantikörper aufgebracht. Das Biotin stellt anschließend eine Verbindung zu der folgenden Tertiärreagenz, in diesem Fall das Avidin-Biotin-Enzymkonjugat, her. Das Enzymkonjugat ist mit einer Peroxidase behaftet. Diese dient im letzten Schritt unter Oxidation mit einem aufgetragenen Substrat der farblichen Darstellung. In dieser Versuchsreihe wurde als Substrat das Chromogen DAB (3,3'-Diaminobenzidin) genutzt, welches für einen bräunlichen Farbumschlag verantwortlich ist (Abb. 6).

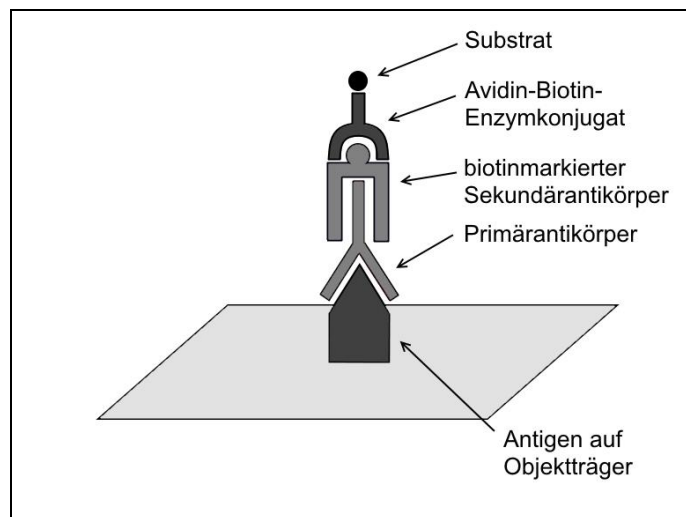


Abb. 6 Dargestellt ist die Funktionsweise und Reihenfolge der LSAB-Methode. Ein Primärantikörper bindet mit dem Antigen. Es folgt der biotinylierte Sekundärantikörper, der eine Bindung des Avidin-Biotin-Enzymkonjugates ermöglicht. Das abschließende Substrat sorgt für den farblichen Umschlag.

Vorteil der indirekten Methode ist die Signalverstärkung, was eine stärkere Farbtintensität zur Folge hat. Nachteil ist die Kreuzreaktion mit der endogenen Peroxidase-Aktivität von beispielsweise Chondrozyten und Erythrozyten. Diese wird im Versuchsablauf durch Inkubation des Untersuchungsmaterials in H_2O_2 (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) unterdrückt.

4.2 Primäre und sekundäre Antikörper

Die verwendeten Antikörper für die immunhistochemische Färbung waren der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), das Proteoglykan Versican und

Kollagen Typ 1. Tabelle 1 zeigt die verwendeten primären Antikörper, deren Klonalität, aus welcher Spezies der Antikörper bezogen wurde und gegen welche Spezies er gerichtet ist sowie den Hersteller.

Antikörper	Wirt	Reaktivität	Hersteller
VEGF monoclonal	Mouse	Human	R&D Systems, Minneapolis, USA
Versican monoclonal	Mouse	Human	US Biological, Massachusetts, USA
Collagen 1 monoclonal IgG1	Mouse	Human	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland

Tab. 1 Auflistung der für die immunhistochemischen Färbungen verwendeten primären Antikörper.

Tabelle 2 zeigt den verwendeten sekundären Antikörper für VEGF, Versican und Kollagen Typ 1.

Antikörper	Wirt	Reaktivität	Hersteller
Biotinylierter IgG	Goat	Mouse	Vector Laboratories Inc., California, USA

Tab. 2 Auflistung des für die immunhistochemischen Färbungen verwendeten sekundären Antikörpers.

4.3 Entparaffinieren

Zum Entparaffinieren sind die Schnitte 3 x 5 Minuten in Xylol geschwenkt und dann in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 100 %, 1 x 90 %, 1 x 80 %, 1 x 70 % und 1 x 50 %) für je 5 Minuten gereinigt und entfettet worden.

4.4.1 Vorbereitung der Präparate Kollagen Typ 1

Die Präparate für den immunhistochemischen Nachweis von Kollagen Typ 1 wurden mit proteolytischen Enzymen zur Demaskierung der Antigene vorbehandelt. Nach Spülung mit destilliertem Wasser für 5 Minuten erfolgte die Inkubation mit 0,1 % Pepsin (in 0,5 M Essigsäure) bei 37°C für 30 Minuten. Nach einer dreimaligen Zwischenspülung mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) wurden die Präparate mit Hyaluronidase ebenfalls bei 37°C für 30 Minuten behandelt. Die Pufferlösung verhindert eine Austrocknung der Präparate. Erneut folgte eine dreimalige Zwischenspülung mit PBS. Abschließend wurden die Präparate für 20 Minuten in 0,6 % H₂O₂ (1 ml 30 % H₂O₂ in 50 ml 100 %

Methanol) belassen. Diese Schritte dienen zur Blockierung der endogenen Peroxidase in Chondrozyten und Erythrozyten und sind besonders wichtig, um einen falsch-positiven Farbumschlag zu verhindern.

4.4.2 Vorbereitung der Präparate VEGF

Die Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgte bei den Präparaten für den immunhistochemischen Nachweis von VEGF mit 3 %igem H_2O_2 für 30 Minuten. Im Anschluss wurde eine dreimalige Spülung in PBS durchgeführt. Nun mussten die Präparate in Citratpuffer für 2 Minuten bei 800 W und für 14 Minuten bei 140 W in der Mikrowelle erhitzt werden. Bei dem Citratpuffer handelt es sich um eine Lösung aus 1,05 g Citronensäure-Monohydrat (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in 500 ml destilliertem Wasser.

4.4.3 Vorbereitung der Präparate Versican

Die Präparate für den immunhistochemischen Nachweis von Versican wurden zur Blockierung der endogenen Peroxidase für 30 Minuten in 3 %igem H_2O_2 inkubiert und anschließend dreimal in PBS gespült.

4.5 Durchführung der immunhistochemischen Färbung

Das Färben erfolgte in Küvetten mit jeweils acht Präparaten. Pro Küvette wurde ein Präparat als Negativkontrolle mitgeführt, bei dem der primäre Antikörper weggelassen wurde (Abb. 7 - 9). Alle Präparate wurden erneut dreimal in PBS gespült. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen des primären Antikörpers mit Proteinen wurden die Präparate für VEGF für 30 Minuten und die Präparate für Kollagen Typ 1 für 10 Minuten in 1 %igem BSA (hoch gereinigtes Rinder Serumalbumin) inkubiert. Die primären Antikörper VEGF (1 : 150) und Versican (1 : 1000) wurden nach Auftragen bei 4°C im Kühlschrank über Nacht gelagert. Kollagen Typ 1 wurde in 1 %igem BSA für 60 Minuten bei Raumtemperatur aufgetragen. Anschließend wurden alle Präparate auf gleiche Weise behandelt. Es wurden drei Spülungen in PBS durchgeführt. Anschließend erfolgte das Auftragen des sekundären Antikörpers (biotinylierter anti-mouse 1 : 300) für 45 Minuten mit einer erneuten dreimaligen Spülung in PBS. Daraufhin wurde der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Vector Laboratories Inc., California, USA) hinzugegeben und erneut dreimal mit PBS gespült. Im Anschluss konnte das DAB-Peroxidase Substrat

(Vector Laboratories Inc., California, USA) hinzugefügt werden, welches für den bräunlichen Farbumschlag verantwortlich ist. Abschließend wurden die Präparate zusätzlich mit Hämalaun gefärbt, um die Zellkerne bläulich darzustellen. Bevor mit Hämalaun gefärbt werden konnte, wurden zweimal drei Spülungen in destilliertem Wasser durchgeführt, dazwischen wurde für 7 Minuten in lauwarmen Wasser gebläut. Abschließend erfolgte eine aufsteigende Alkoholreihe (1 x 70 %, 1 x 90 %, 2 x 96 %, 2 x 100 % Ethanol) für je 3 Minuten. Die Präparate wurden mit Hilfe des Eindeckmediums Isomount 2000 (LaboNORD, Mönchengladbach, Deutschland) eingedeckt.

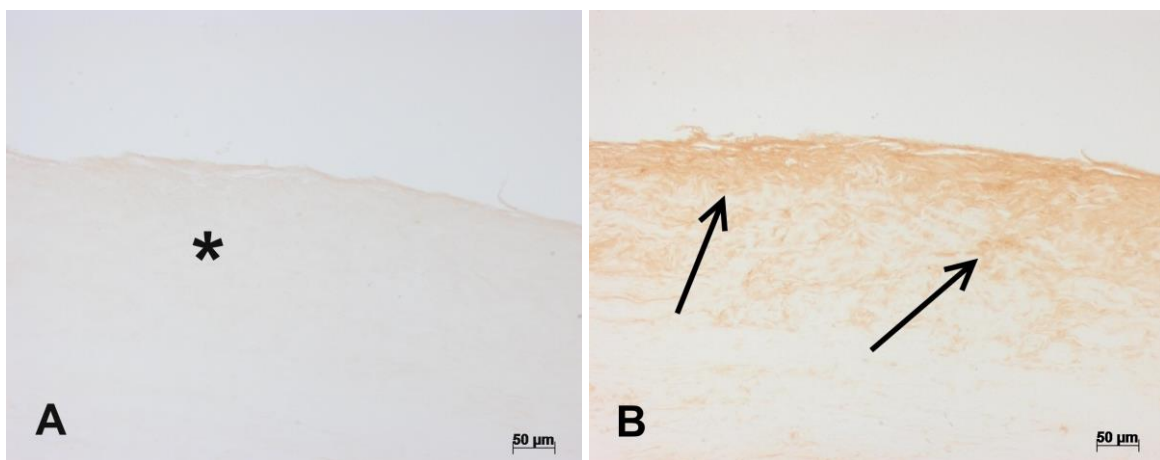


Abb. 7 Links **(A)** ist die Kontrollfärbung für den immunhistochemischen Nachweis von VEGF zu sehen. Der primäre anti-human Antikörper wurde weggelassen, es ist kein Nachweis erfolgt (Stern). Rechts **(B)** erfolgte der immunhistochemische Nachweis von VEGF durch den primären anti-human Antikörper und sekundären anti-mouse Antikörper (durchgezogene Pfeile).

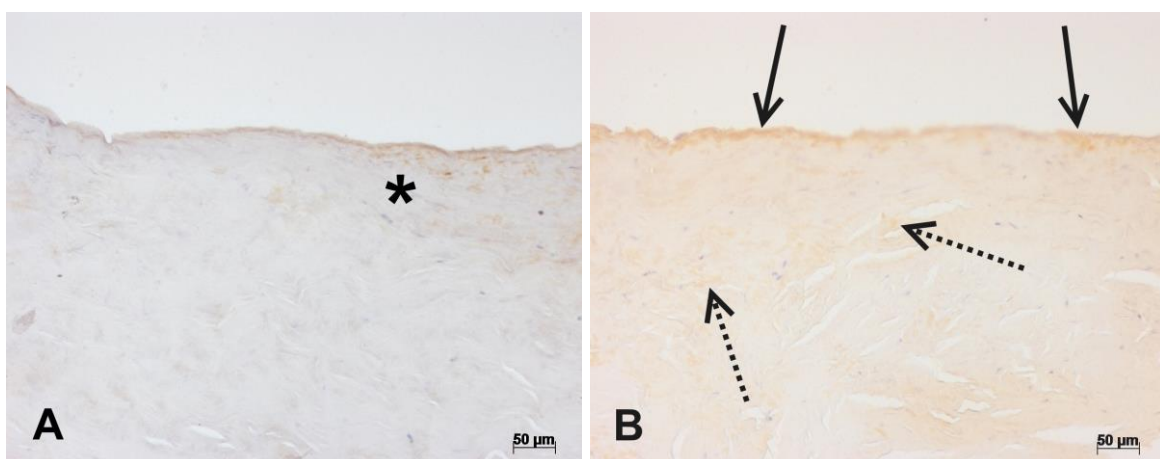


Abb. 8 Links **(A)** ist die Kontrollfärbung für den immunhistochemischen Nachweis von Kollagen Typ 1 zu sehen. Der primäre anti-human Antikörper wurde weggelassen, es ist kein Nachweis erfolgt (Stern). Rechts **(B)** erfolgte der immunhistochemische Nachweis von Kollagen Typ 1 durch den primären anti-human Antikörper und sekundären anti-mouse Antikörper (durchgezogene Pfeile an der Gewebsoberfläche, gestrichelte Pfeile in der Tiefe).

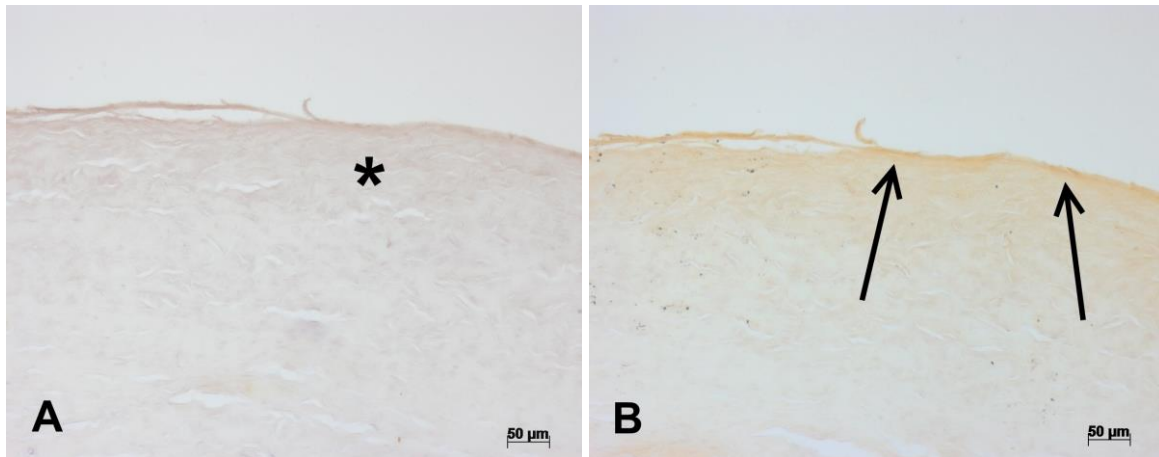


Abb. 9 Links **(A)** ist die Kontrollfärbung für den immunhistochemischen Nachweis von Versican zu sehen. Der primäre anti-human Antikörper wurde weggelassen, es ist kein Nachweis erfolgt (Stern). Rechts **(B)** erfolgte der immunhistochemische Nachweis von Versican durch den primären anti-human Antikörper und sekundären anti-mouse Antikörper (durchgezogene Pfeile).

5. Analyse und Auswertung der Präparate

5.1 Histopathologische Zeichen der Degeneration

Auf histologischer Ebene wurden verschiedene Zeichen der Gewebsdegeneration untersucht. Dabei dienten die unterschiedlichen Färbemethoden als Hilfe bei der Erkennung jener Veränderungen.

Die mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte wurden lichtmikroskopisch (Carl Zeiss Axioskop 20) auf folgende degenerative Zeichen untersucht: Anzahl der Chondrozyten und Fibroblasten, ihre Verteilung sowie die Ausprägtheit der Geweberisse. Dazu wurde bei einer 40-fachen Objektivvergrößerung und einem 10-fachen Okular die Zellzählung durchgeführt (entspricht 400-facher Vergrößerung). Zur besseren Übersicht wurde die Verteilung der Zellen sowie die Risse bei einer 20-fachen Objektivvergrößerung beurteilt (entspricht mit Okular einer 200-fachen Vergrößerung). Die Auswertung erfolgte semiquantitativ durch einen Betrachter.

Die geviertelten Disci articulares wurden zuvor nach ihrer Lage benannt, somit gab es mesiomediale, distomediale, mesiolaterale und distolaterale Präparate. Jedes Viertel wurde systematisch an neun verschiedenen Stellen untersucht. Dabei wurde darauf geachtet, dass lediglich knorpelige Bereiche, die beispielsweise von der bilaminären Zone gut abzugrenzen waren, mikroskopiert wurden. Durch die Untersuchung des Discus articularis in sagittaler und axialer Richtung konnten Auswertungen zwischen den Vierteln, aber auch der degenerative Status des Knorpels an der Oberfläche mit dem in der Tiefe verglichen werden.

Die Unterscheidung zwischen den vorliegenden Zellen geschah auf der Basis histologischer Charakteristiken der jeweiligen Zellarten. So konnten Chondrozyten mit ihrem typischen basophilen Knorpelhof gut von den eher länglichen und schmalen Fibroblasten abgegrenzt werden.

Bei der Verteilung der Zellen wurde auf die Homogenität geachtet. So lagen Chondrozyten meist einzeln vor. Gelegentlich befanden sie sich in Gruppen, dann häufig an der oberflächlichen Knorpelschicht und in Anwesenheit von Fibroblasten (Abb. 10). Die Einteilung erfolgte in „Homogen“ und „Inhomogen“.

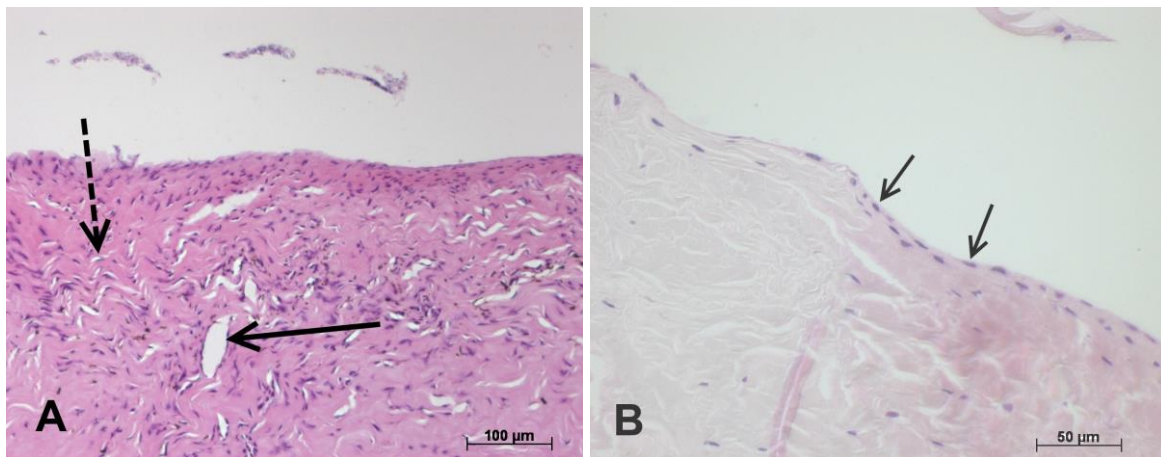


Abb. 10 Hämatoxylin-Eosin gefärbte Präparate eines Discus articularis. **(A)** Das Bild zeigt eine deutliche Proliferation von Zellen und mögliche Einwanderung von Entzündungszellen. Der gestrichelte Pfeil zeigt die Auflockerung der Kollagenstruktur, der gefüllte Pfeil deutet auf einen großen Riss „lining cells“ im Gewebe. **(B)** Die Pfeile deuten auf eine marginale Proliferation von Zellen an der Diskusoberfläche.

Risse im Gewebe durch Überbelastung der Kollagenfasern traten häufig in Verbindung mit vermehrter Zellanwesenheit auf. In den Anfangsstadien kam aufgelockertes Kollagen oder leichten Spalten zwischen den einzelnen Faserbündeln vor und reichte bei starken Zeichen der Degeneration zu großen Rissen im Gewebe.

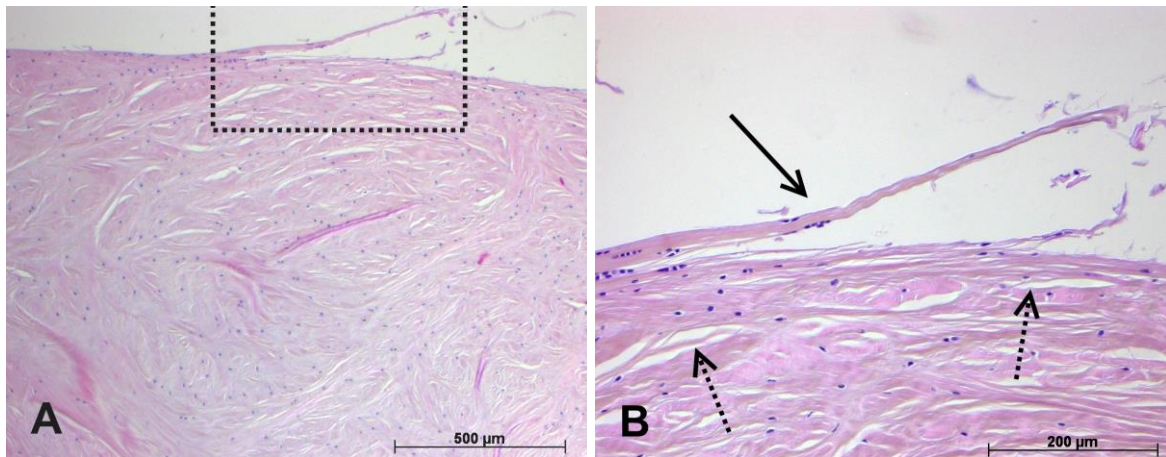


Abb. 11 Hämatoxylin-Eosin gefärbte Präparate eines Discus articularis. Links **(A)** ist das Bild in der Übersicht zu sehen. Der gestrichelte Bildausschnitt ist rechts **(B)** vergrößert. Der durchgezogene Pfeil deutet auf einen großen oberflächlichen Riss hin, welcher vermutlich bei der Fixierung des Präparats entstanden ist und als Artefakt eingestuft wurde. Die beiden gestrichelten Pfeile zeigen das Gewebe durchziehende Risse, deutlich erkennbar die „lining cells“.

Dabei musste zwischen Artefakten, die bei der Gewebsfixierung entstehen können und tatsächlichen Gewebsrissen unterschieden werden, die man durch die Anwesenheit von Zellen am Riss („lining cells“) von Ersterem abgrenzen kann (Abb. 11) (Kurita et al. 1989; Leonardi et al. 2010). Die Einteilung erfolgte in vier Stadien anhand der Intensität der Risse:

- Grad 0 = keine Risse in der Kollagenstruktur
- Grad 1 = schwache Risse in der Kollagenstruktur
- Grad 2 = mittelstarke Risse in der Kollagenstruktur
- Grad 3 = starke Risse in der Kollagenstruktur

Die Färbung der Präparate mit Toluidinblau diente zur besseren Beurteilung der Homogenität und Struktur des Kollagens. Die Auflockerung und Inhomogenität im Kollagen ist als Vorläufer von Gewebsrissen zu sehen, da diese immer in Richtung der verlaufenden Kollagenfasern auftreten (Leonardi et al. 2010). Anhand der Inhomogenität konnten Rückschlüsse auf den Gewebsumbau und deren Zerstörung gezogen werden. Es wurde dabei auf gleiche Weise wie zuvor bei den Schnitten mit HE-Färbung vorgegangen, das heißt die Präparate wurden systematisch an neun verschiedenen Stellen und ebenfalls in sagittaler und axialer Richtung untersucht. Die Einteilung erfolgte hier ebenfalls in „Homogen“ und „Inhomogen“.

Die Vorgehensweise war identisch bei der Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate. Wie bei der histologischen Färbung wurde der Discus articularis ebenfalls in koronaler Ebene in drei Gruppen (kranial, mittig und kaudal) und in

axialer Ebene in Vierteln (mesiomedial, mesiolateral, distomedial und distolateral) untersucht. Es wurden insgesamt 68 Präparate untersucht. Ausschlaggebend war die semiquantitative Farbintensität der Zellen und des umliegenden Gewebes.

Die Einteilung erfolgte in vier Stadien anhand des Nachweises der Immunreaktivität des jeweiligen Antikörpers im Gewebe:

- Grad 0 = kein immunhistochemischer Nachweis
- Grad 1 = schwacher immunhistochemischer Nachweis
- Grad 2 = mittelstarker immunhistochemischer Nachweis
- Grad 3 = starker immunhistochemischer Nachweis

5.2 Grafische Auswertung

Die Anfertigung von mikroskopisch-grafischen Aufnahmen der histologischen und immunhistochemischen Färbungen erfolgte mit dem Zeiss Axiophot (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland) und der dazugehörigen Kamera AxioCam als digitalem Mikoskopaufsatz. Die verwendete Software am angeschlossenen PC war AxioVision Vers. 4.7 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland). Die Software besaß eine automatische Einstellung für Belichtung und Weißabgleich. Die Schärfeeinstellung der Aufnahme wurde unterstützt. Es wurde anschließend ein Größenmaßstab in die Aufnahme eingefügt. Die angefertigten Bilder wurden im Format JPEG gespeichert. Anschließend wurden Beschriftungen und Pfeile im Bild mit der Software Paint.NET Version 4.0.5 (dotPDN LLC, Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA) eingefügt.

Grafische Darstellungen und Tabellen wurden mit Microsoft Excel und Word angefertigt (Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA).

6. Statistische Auswertung

Mit Hilfe der Add-In WinStat Software (R. Fitch Software, Bad Krozingen, Deutschland) bei Microsoft Excel wurde die statistische Auswertung durchgeführt.

Die Ergebnisse der histologischen und immunhistochemischen Färbungen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test auf eine Normalverteilung getestet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt.

Da keine Normalverteilung vorlag, wurde im Anschluss der nicht-parametrische U-Test für Paarvergleiche nach Mann-Whitney durchgeführt.

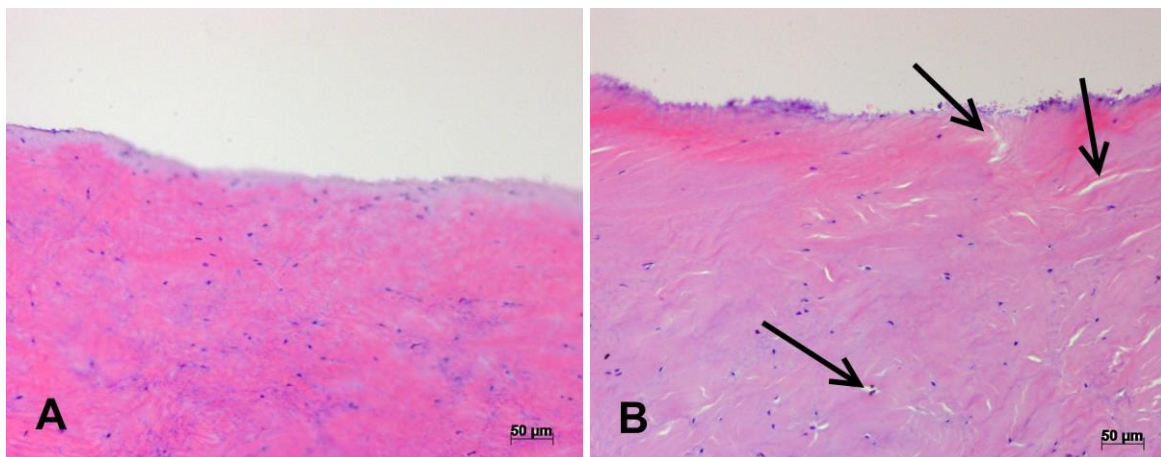
III. Ergebnisse

Die drei Versuchsgruppen wurden in vollbezahnt (1), teilbezahnt (2) und unbezahnt (3) eingeteilt. Es wurden histologische Färbungen mit Hämatoxylin-Eosin und Toluidinblau sowie immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Kollagen Typ 1, VEGF und Versican durchgeführt. Zusätzlich wurden die Disci articulares in axialer Richtung in kranial, mittig und kaudal sowie in koronaler Richtung in mesiolateral, mesiomedial, distolateral und distomedial unterschieden.

1. Ergebnisse histologische Färbungen

1.1 Gewebsrisse

In Abbildung 12 erfolgte die Färbung der Präparate mit HE. Die Abbildung zeigt beispielhaft die Einteilung der Risse in der Kollagenstruktur in den vier unterschiedlichen Graden. **(A)** Das Bild zeigt einen Ausschnitt eines Präparats, in dem keine Gewebsrisse zu erkennen sind. Schwache, über den gesamten Bildausschnitt verteilte Gewebsrisse zeigt **(B)**, die durchgezogenen Pfeile deuten auf Risse hin. Abbildung **(C)** zeigt größere Risse an der Oberfläche (durchgezogene Pfeile) sowie in der Tiefe (gestrichelte Pfeile) des Präparats. In Präparat **(D)** durchziehen große Risse (durchgezogene Pfeile) das gesamte Präparat, umgeben von kleinen Rissen (gestrichelte Pfeile).



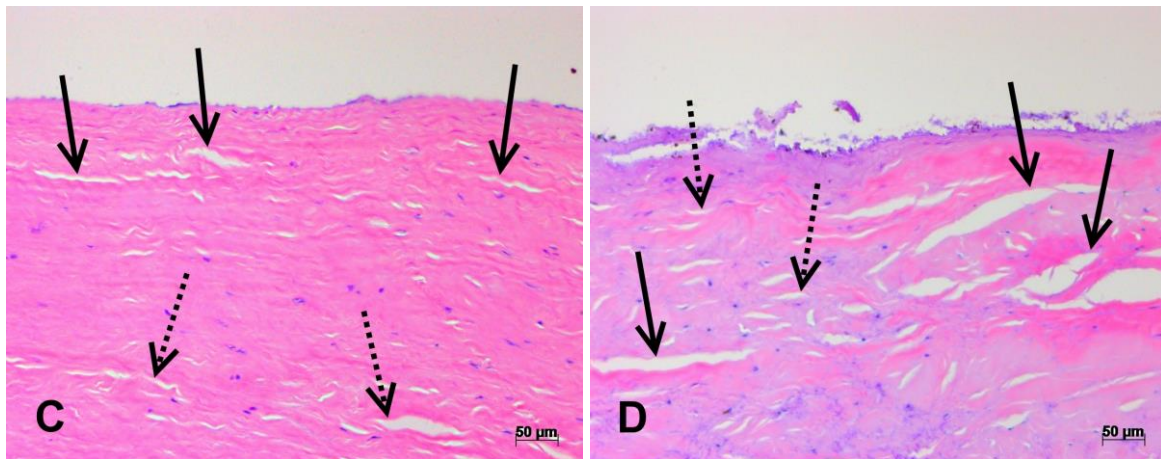


Abb. 12 Mit HE gefärbte Präparate, welche die Einteilung der vier Intensitäten von Rissen in der Kollagenstruktur darstellen: Grad 0 (**A**), Grad 1 (**B**), Grad 2 (**C**) und Grad 3 (**D**).

Das Histogramm in Abbildung 13 zeigt den prozentualen Anteil der vier Intensitäten bei Gewebsrissen im Vergleich zwischen den drei Versuchsgruppen (Vollbezahnt, Teilbezahnt, Unbezahnt). Bei der Intensität der Gewebsrisse besitzt die vollbezahnte (1) Versuchsgruppe mit 24 % den höchsten Anteil an rissfreien Präparaten. Die anderen beiden Versuchsgruppen (Teilbezahnt, Unbezahnt) zeigen in ihrer Verteilung ähnliche Ergebnisse. Den größten prozentualen Anteil an schwachen Gewebsrisse Grad 1 bildete die teilbezahnte (2) Gruppe mit 54,8 %, gefolgt von der vollbezahnten (1) Gruppe mit 44,4 % und der unbezahnten (3) Gruppe mit 42,4 %. Bei mittelstarken Gewebsrissen (Grad 2) liegt die unbezahnte (3) Gruppe mit 41,4 % über den 28,8 % der teilbezahnten (2) Gruppe und den 24 % der vollbezahnten (1) Gruppe.

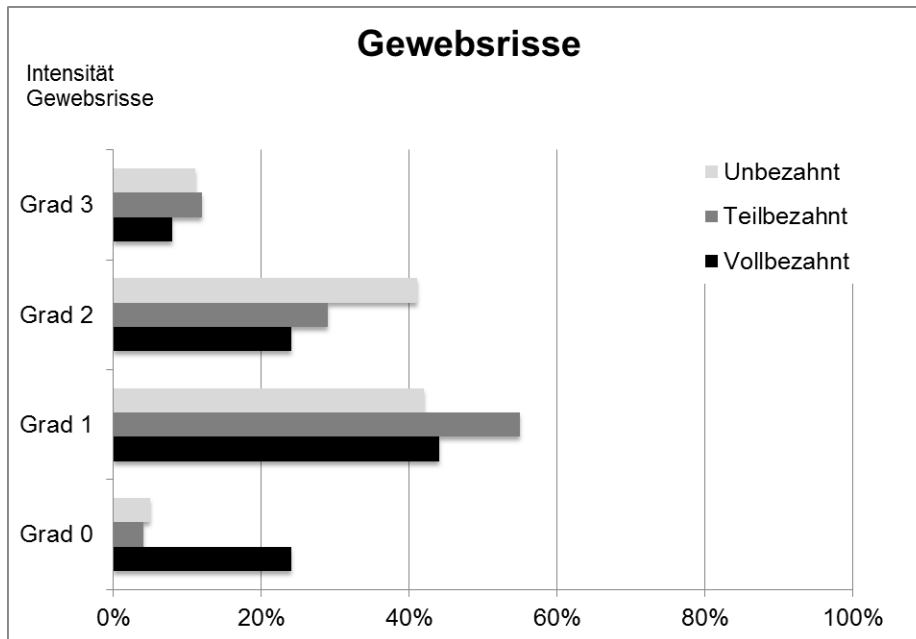


Abb. 13 Prozentualer Anteil der Einteilung der Gewebsrisse im Vergleich zwischen den drei Versuchsgruppen.

1.2 Zellzahl Chondrozyten und Fibroblasten

Mit durchschnittlich 27,3 Zellen pro Präparat ist die Zellanzahl von Chondrozyten bei der teilbezahnten (2) Versuchsgruppe am höchsten, bei Fibroblasten sind es \emptyset 3,1. Bei der vollbezahnten (1) Versuchsgruppe sind es \emptyset 24,2 Chondrozyten und \emptyset 2,3 Fibroblasten, bei der unbezahnten (3) Versuchsgruppe \emptyset 25,5 Chondrozyten und \emptyset 3,3 Fibroblasten. Diese Ergebnisse spiegeln die Summe der Präparate wieder.

Abbildung 14 zeigt die Zellanzahl der Fibroblasten und Chondrozyten in einem Boxplot-Diagramm. Für das Diagramm wurden die Zellzahlen der drei Versuchsgruppen (Vollbezahnt, Teilbezahnt, Unbezahnt) in den Untergruppierungen zusammengelegt. Es dient zur Veranschaulichung der Zellzahlen in koronaler Richtung (Untergruppierungen „Kranial“, „Mittig“ und „Kaudal“) und in axialer Richtung (Untergruppierungen „Mesiolateral“, „Mesiomedial“, „Distolateral“ und „Distomedial“). Angegeben ist der Median, die zwei Quartile und die beiden Extremwerte als „Whisker“, die nach Turkey das 1,5-Fache des Interquartilsabstands betragen. Die roten Kreuze stellen den Wert für den maximalen Ausreißer dar. Der Medianwert betrug in **(A)** für die Anzahl der Fibroblasten kranial und kaudal 2, mittig 0. Bei der Anzahl der Chondrozyten betrug der Wert kranial 25, mittig und kaudal 24. Der Medianwert in **(B)** lag bei den Fibroblasten in allen Schichten konstant bei 1. Für die Chondrozyten lag er für die mesiolateralen Präparate bei 24, für die

mesiomedialen Präparate bei 29,5, für die distolateralen Präparate bei 23,5 und für die distomedialen Präparate bei 23.

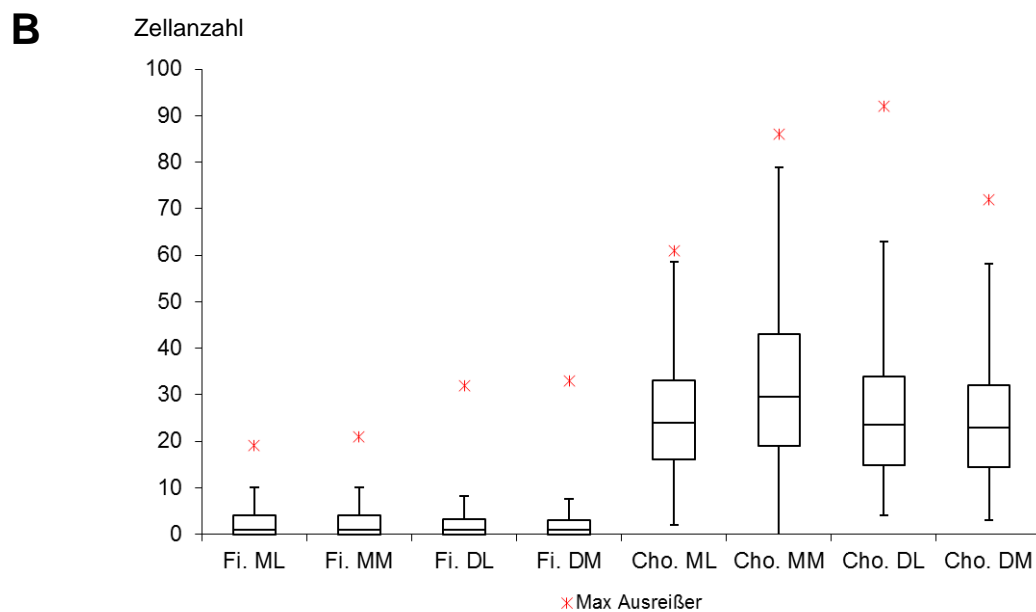
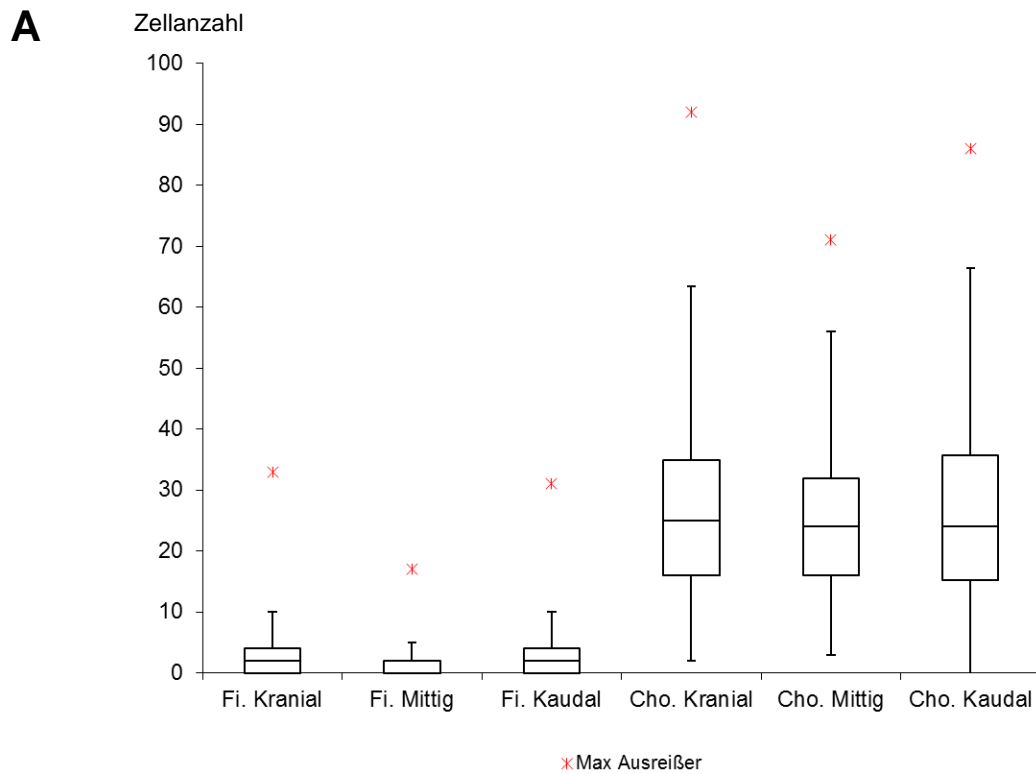


Abb. 14 Dargestellt ist die Zellanzahl der Fibroblasten (Fi.) und Chondrozyten (Cho.) in einem Boxplot-Diagramm. **(A)** zeigt die Zellanzahl in koronaler Richtung; **(B)** zeigt die Zellanzahl in axialer Richtung.

1.3 Gewebshomogenität (Färbung mit Toluidinblau)

Abbildung 15 zeigt mit Toluidinblau gefärbte Ausschnitte von Disci articulares als Beispiele der Einteilung „Inhomogen“ **(A)** und „Homogen“ **(B)** in Abhängigkeit der Homogenität und Struktur des Kollagens. **(A)** Die deutlich inhomogene Färbung des Gewebes und zusätzliche Kollagenauflockerungen und Risse (durchgezogene Pfeile) sind gut zu erkennen. **(B)** Das Präparat zeigt eine homogene Färbung (Stern) und Kollagenstruktur.

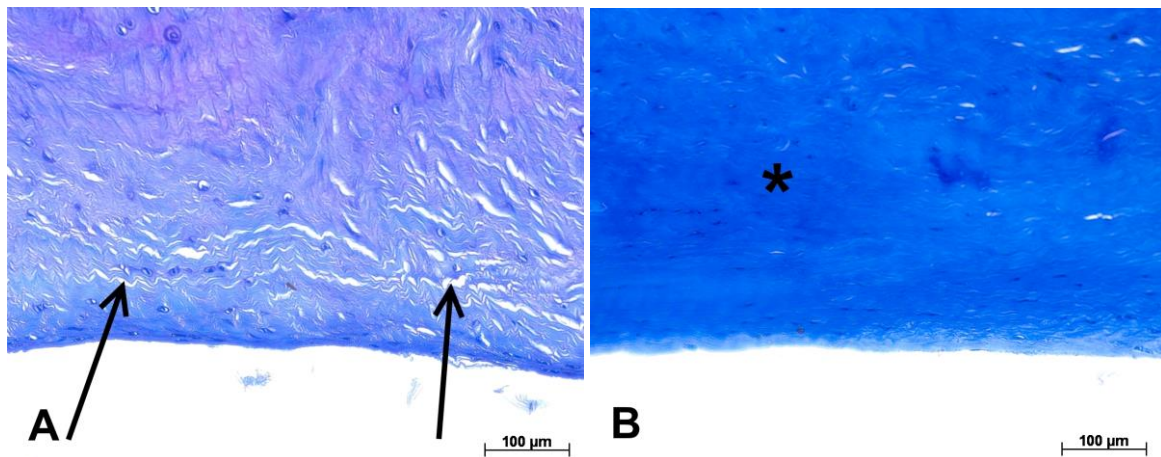


Abb. 15 Mit Toluidinblau gefärbte Präparate, welche die Einteilung der Kollagenstruktur „Inhomogen“ **(A)** und „Homogen“ **(B)** darstellen.

Das Histogramm in Abbildung 16 zeigt den prozentualen Anteil der Homogenität der Kollagenstruktur im Vergleich zwischen den drei Versuchsgruppen (Vollbezahnt, Teilbezahnt, Unbezahnt). Bei 60 % der Präparate der vollbezahnten (1) Gruppe lag eine homogene Verteilung der Kollagenfibrillen vor, bei der teilbezahnten (2) Gruppe waren es 41 % und bei der unbezahnten (3) Gruppe 40,5 %.

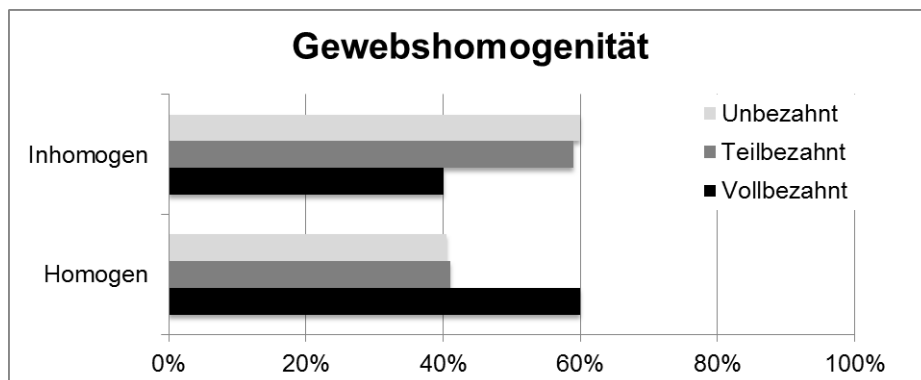


Abb. 16 Prozentualer Anteil der Einteilung der Kollagenstruktur im Vergleich zwischen den drei Versuchsgruppen.

1.4 Zellverteilung

Abbildung 17 zeigt beispielhaft mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte Präparate eines Discus articularis. **(A)** Das Bild zeigt eine homogene Verteilung von Chondrozyten in Abwesenheit von Fibroblasten. Die durchgezogenen Pfeile weisen auf kleinere Zellgruppchen hin. **(B)** Zu sehen ist eine deutlich inhomogenere Verteilung von Chondrozyten in Abwesenheit von Fibroblasten. Die durchgezogenen Pfeile weisen auf eine unregelmäßige Ansammlung von Chondrozyten hin, wohingegen im rechten Bildbereich (Stern) kaum Zellen zu erkennen sind.

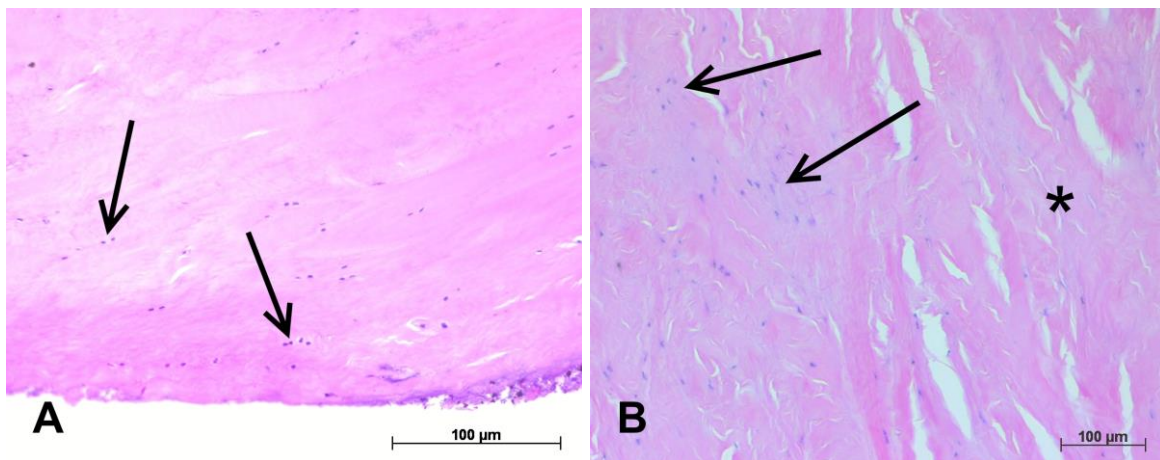


Abb. 17 Mit HE gefärbte Präparate, welche die Einteilung der Zellverteilung „Homogen“ **(A)** und „Inhomogen“ **(B)** darstellen.

Das Histogramm in Abbildung 18 zeigt den prozentualen Anteil der Zellverteilung im Vergleich zwischen den drei Versuchsgruppen (Vollbezahnt, Teilbezahnt, Unbezahnt). Es ist zu sehen, dass die Inhomogenität der Zellverteilung mit 75 % in der unbezahnten (3) Gruppe am höchsten ist. Die geringste Inhomogenität hat die vollbezahnte (1) Gruppe mit 53 %, dazwischen liegt mit 67 % die teilbezahnte (2) Gruppe.

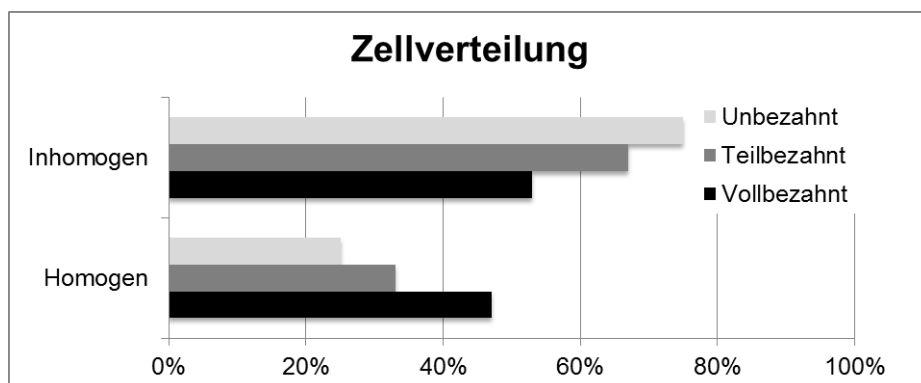


Abb. 18 Prozentualer Anteil der Einteilung der Zellverteilung im Vergleich zwischen den drei Versuchsgruppen.

2. Ergebnisse immunhistochemische Färbungen

2.1 Kollagen Typ 1

Abbildung 19 zeigt beispielhaft den Nachweis der Kollagen Typ 1-Immunreaktivität. Die durchgezogenen Pfeile deuten in allen Bildern auf die Zellanfärbung mit Hämalaun. **(A)** Das Bild zeigt einen Ausschnitt eines Präparats in dem weder Zellen noch umliegendes Gewebe mit Kollagen Typ 1 angefärbt wurden. Es wurde daher als Grad 0 eingeteilt. Eine schwache Anfärbung des Gewebes (Stern) ist in Abbildung **(B, Grad 1)** zu erkennen. In Abbildung **(C)** zeigt sich deutlicher die Anfärbung des umliegenden Gewebes (Stern), somit Grad 2. Eine starke Färbung des Gewebes (Sterne) zeigt sich in Abbildung **(D)**, Grad 3.

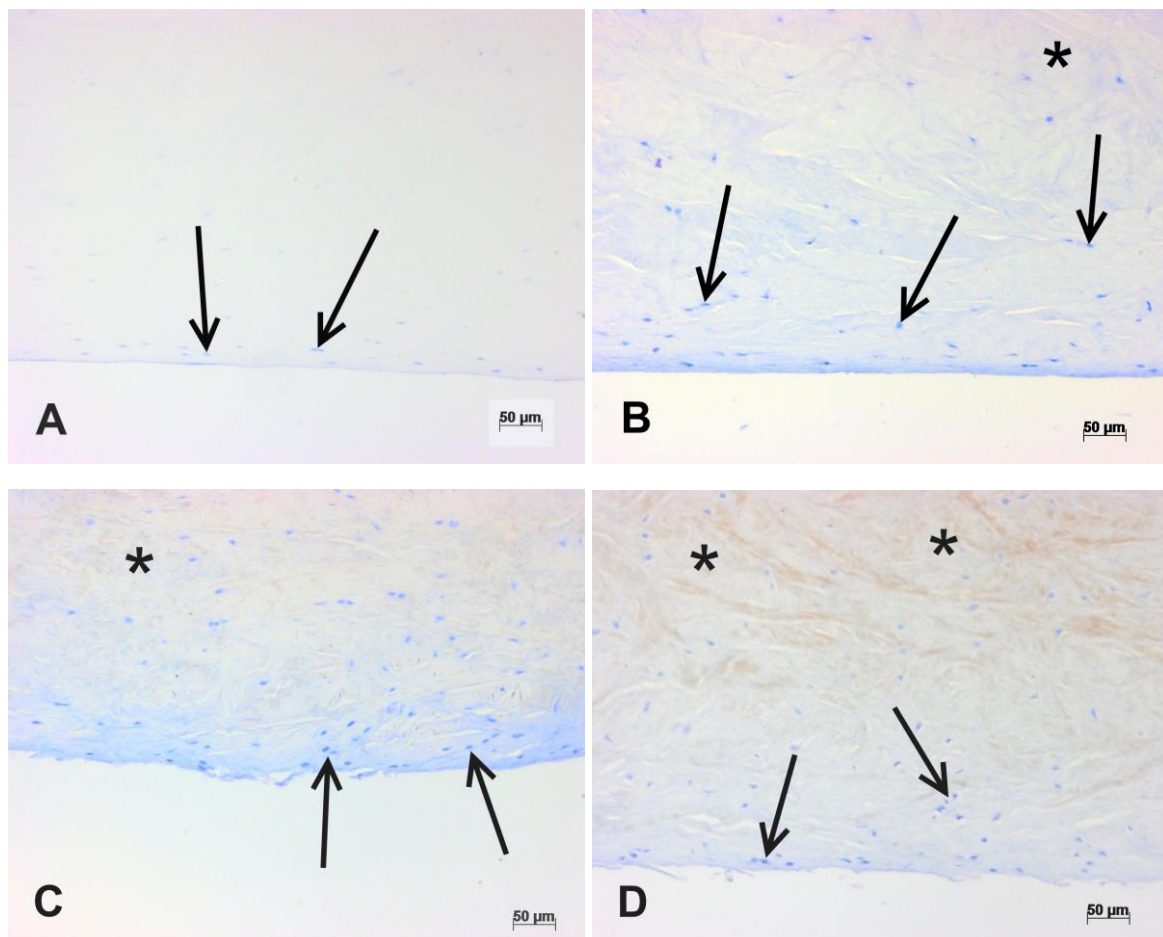


Abb. 19 Nachweis der Kollagen Typ 1-Immunreaktivität an Präparaten, welche die Einteilung in die vier Intensitäten Grad 0 **(A)**, Grad 1 **(B)**, Grad 2 **(C)** und Grad 3 **(D)** darstellen.

Das Histogramm in Abbildung 20 zeigt den prozentualen Anteil der vier Intensitäten bei der Expression von Kollagen Typ 1 im Vergleich zwischen den drei Versuchsgruppen (Vollbezahnt, Teilbezahnt, Unbezahnt). Die vollbezahnte (1)

Gruppe beinhaltete keine Präparate ohne immunhistochemischen Nachweis von Kollagen Typ 1. In der unbezahnten (3) Gruppe sind es 17 % und in der teilbezahnten (2) Gruppe 7 %. Den prozentual größten Anteil von Präparaten in Grad 1 besaß die teilbezahnte (2) Gruppe mit 62 %, gefolgt von der unbezahnten (3) Gruppe mit 48 % und der vollbezahnten (1) Gruppe mit 8 %. Bei dem mittelstarken immunhistochemischen Nachweis von Kollagen Typ 1 war der Anteil in der vollbezahnten (1) Gruppe mit 79 % am Größten, in der unbezahnten (3) Gruppe lag er bei 31 % und in der teilbezahnten (2) Gruppe bei 26 %. Der Anteil von Präparaten mit starkem immunhistochemischen Nachweis lag in der vollbezahnten (1) Gruppe bei 13 %, in der teilbezahnten (2) Gruppe bei 5 % und in der unbezahnten (3) Gruppe bei 4 %.

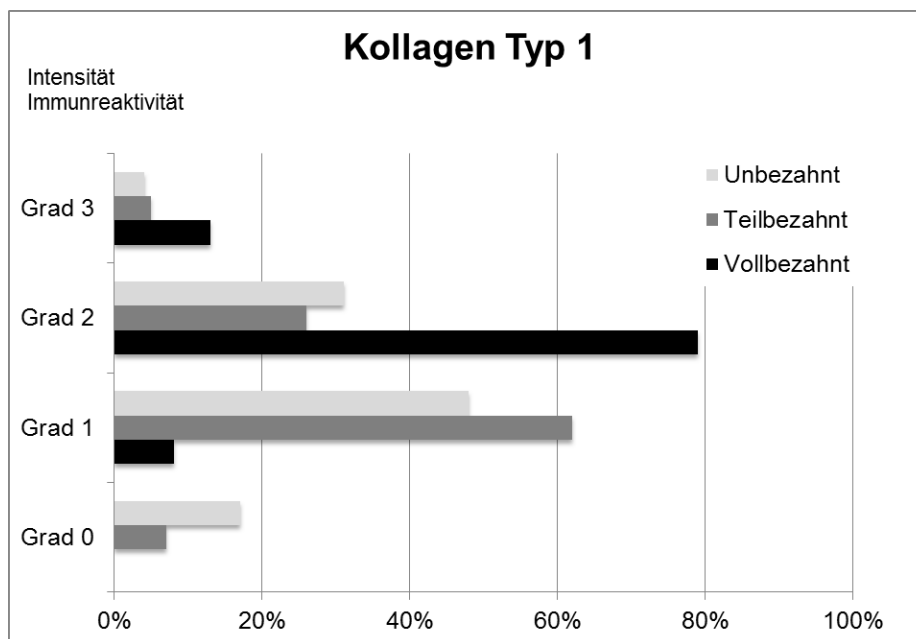


Abb. 20 Prozentualer Anteil der Einteilung für den Nachweis der Immunreaktivität von Kollagen Typ 1 im Vergleich zwischen den drei Versuchsgruppen.

2.2 VEGF

Abbildung 21 zeigt beispielhaft den Nachweis der VEGF-Immunreaktivität. **(A)** Das Bild zeigt einen Ausschnitt eines Präparats, in dem weder Zellen noch umliegendes Gewebe mit VEGF angefärbt wurden. Es wurde daher in Grad 0 eingeteilt. Eine schwache Anfärbung des Gewebes und teilweise der Zellen (durchgezogene Pfeile) ist in Abbildung **(B, Grad 1)** zu erkennen. In Abbildung **(C)** zeigt sich deutlich die

Anfärbung der Zellen (durchgezogene Pfeile) und teilweise des umliegenden Gewebes (Stern, Grad 2). Eine starke Färbung von Zellen (durchgezogene Pfeile) und Gewebe (Stern) zeigt sich in Abbildung (D, Grad 3).

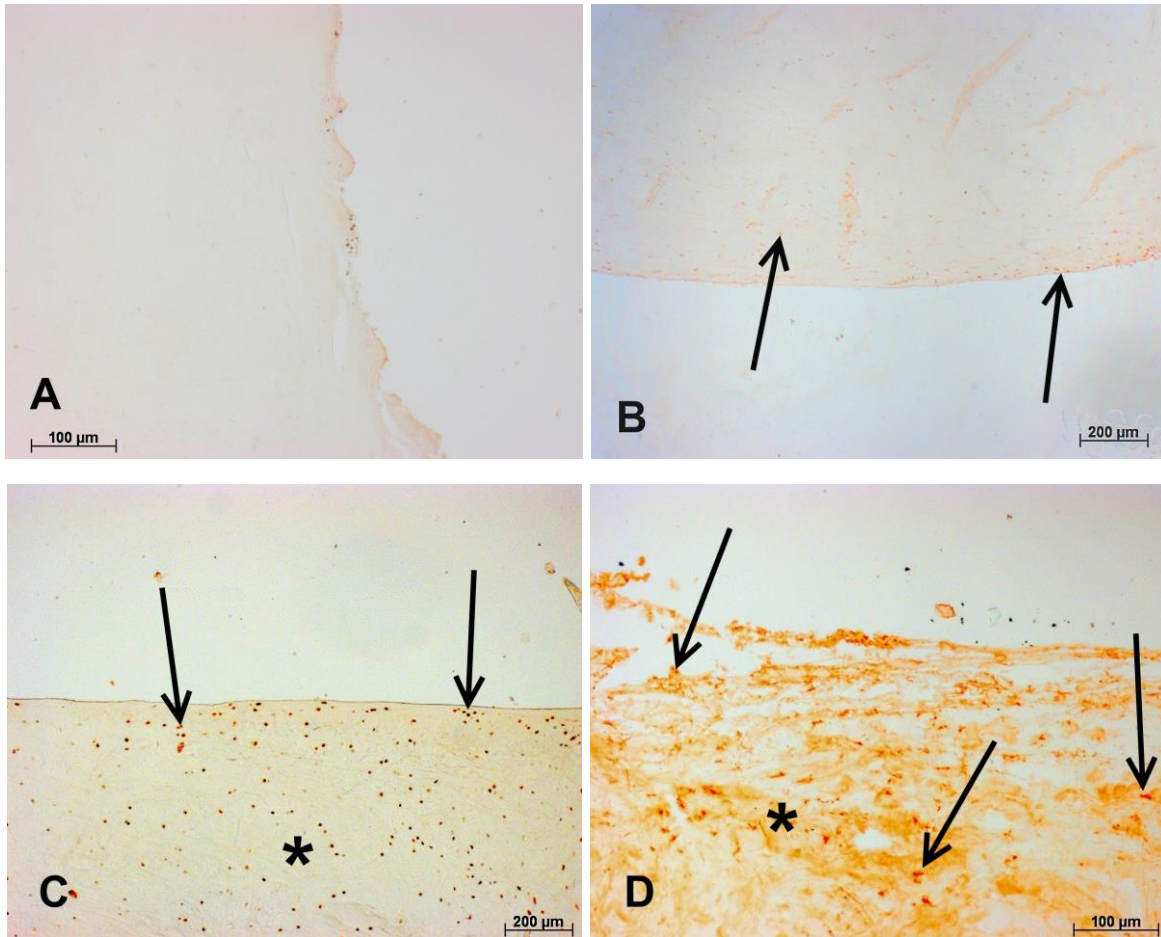


Abb. 21 Nachweis der VEGF-Immunreaktivität an Präparaten, welche die Einteilung in die vier Intensitäten Grad 0 (A), Grad 1 (B), Grad 2 (C) und Grad 3 (D) darstellen.

Das Histogramm in Abbildung 22 zeigt den prozentualen Anteil der vier Intensitäten bei dem Nachweis der Immunreaktivität von VEGF im Vergleich zwischen den drei Versuchsgruppen (Vollbezahnt, Teilbezahnt, Unbezahnt). Die vollbezahnte (1) Gruppe beinhaltet mit 90 % den höchsten Anteil an Präparaten ohne immunhistochemischen Nachweis von VEGF, gefolgt von der teilbezahnten (2) Gruppe mit 42 % und der unbezahnten (3) Gruppe mit 16 %. Für den immunhistochemischen Nachweis Grad 2 und Grad 3 zeigte die vollbezahnte (1) Gruppe keine Präparate. Den prozentual größten Anteil in Grad 1 besaß die unbezahnte (3) Gruppe mit 51 %, gefolgt von der teilbezahnten (2) Gruppe mit 39 % und der vollbezahnten (1) Gruppe mit 10 %. Etwas niedriger lag der Anteil in Grad 2 mit 27 % in der unbezahnten (3) Gruppe und 17 % in der teilbezahnten (2) Gruppe. Am niedrigsten war der Anteil von Präparaten mit starkem immunhistochemischen

Nachweis mit 6 % in der unbezahnten (3) Gruppe und 2 % in der teilbezahnten (2) Gruppe.

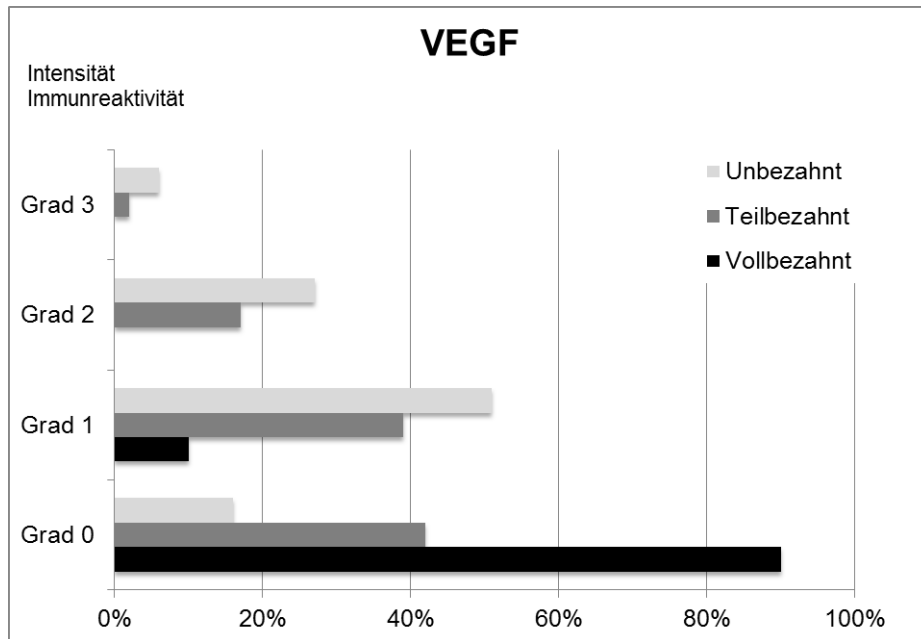


Abb. 22 Prozentualer Anteil der Einteilung für den Nachweis der Immunreaktivität von VEGF im Vergleich zwischen den drei Versuchsgruppen.

2.3 Versican

Abbildung 23 zeigt beispielhaft den Nachweis der Versican-Immunreaktivität. **(A)** Das Bild zeigt einen Ausschnitt eines Präparats, in dem weder Zellen noch umliegendes Gewebe mit Versican angefärbt wurden. Es wurde daher Grad 0 eingeteilt. Eine schwache Anfärbung des Gewebes und teilweise der Zellen (durchgezogene Pfeile) ist in Abbildung **(B, Grad 1)** zu erkennen. In Abbildung **(C)** zeigt sich deutlich die Anfärbung der Zellen an der Oberfläche (gestrichelte Pfeile) und in der Tiefe (durchgezogene Pfeile) sowie teilweise des umliegenden Gewebes (Stern). Es wurde somit in Grad 2 eingeteilt. Eine starke Färbung von Zellen (durchgezogene Pfeile) und Gewebe (Stern) zeigt sich in Abbildung **(D, Grad 3)**.

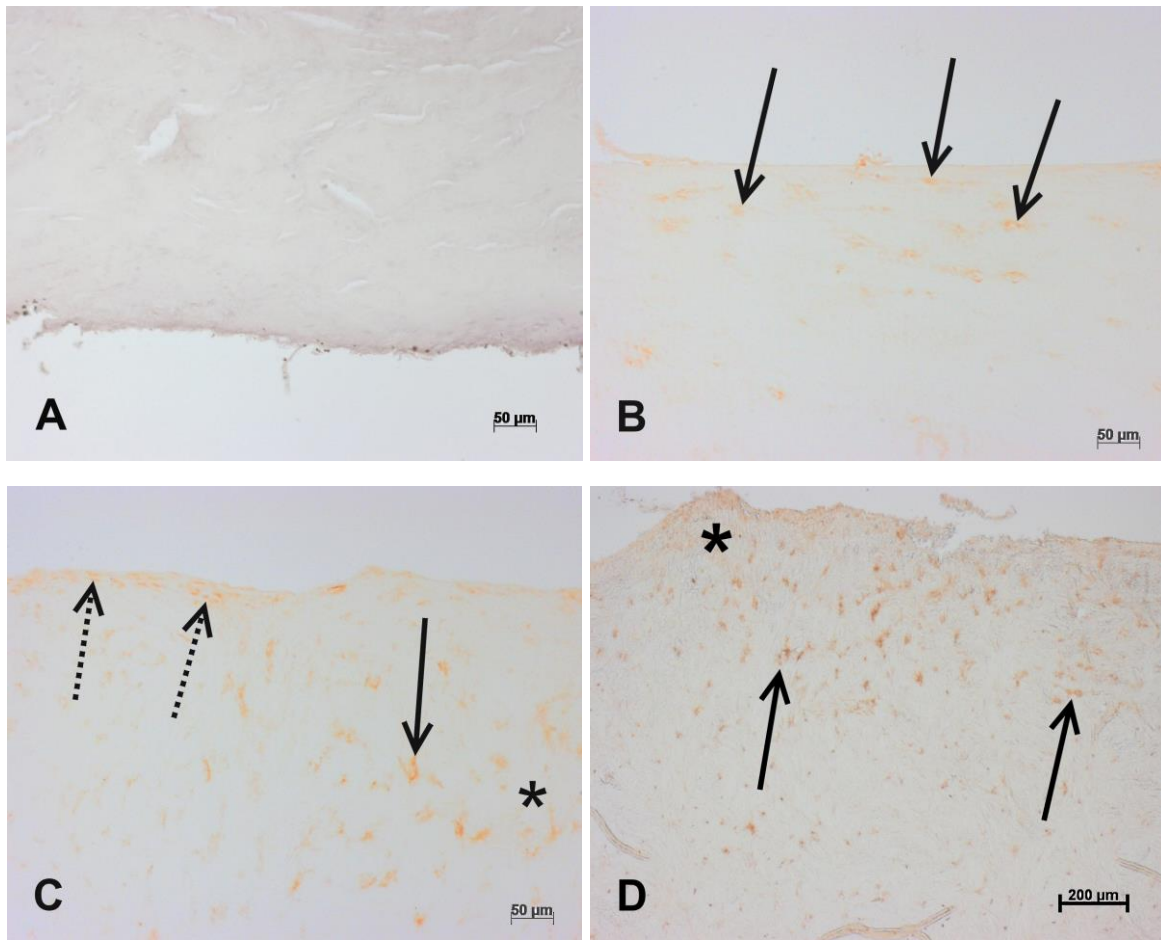


Abb. 23 Nachweis der Versican-Immunreaktivität an Präparaten, welche die Einteilung in die vier Intensitäten Grad 0 (**A**), Grad 1 (**B**), Grad 2 (**C**) und Grad 3 (**D**) darstellen.

Das Histogramm in Abbildung 24 zeigt den prozentualen Anteil der vier Intensitäten bei dem Nachweis der Immunreaktivität von Versican im Vergleich zwischen den drei Versuchsgruppen (Vollbezahnt, Teilbezahnt, Unbezahnt). Die vollbezahnte (1) Gruppe beinhaltet mit 94 % den höchsten Anteil an Präparaten ohne immunhistochemischen Nachweis von VEGF, gefolgt von der teilbezahnten (2) Gruppe mit 28 % und der unbezahnten (3) Gruppe mit 2 %. Für den immunhistochemischen Nachweis Grad 2 und Grad 3 zeigte die vollbezahnte (1) Gruppe keine Präparate. Den prozentual größten Anteil in Grad 1 besaß die unbezahnte (3) Gruppe mit 65 %, gefolgt von der teilbezahnten (2) Gruppe mit 52 % und der vollbezahnten (1) Gruppe mit 6 %. Etwas niedriger lag der Anteil in Grad 2 mit 27 % in der unbezahnten (3) Gruppe und 15 % in der teilbezahnten (2) Gruppe. Am niedrigsten war der Anteil von Präparaten mit starkem immunhistochemischen Nachweis mit 6 % in der unbezahnten (3) Gruppe und 5 % in der teilbezahnten (2) Gruppe.

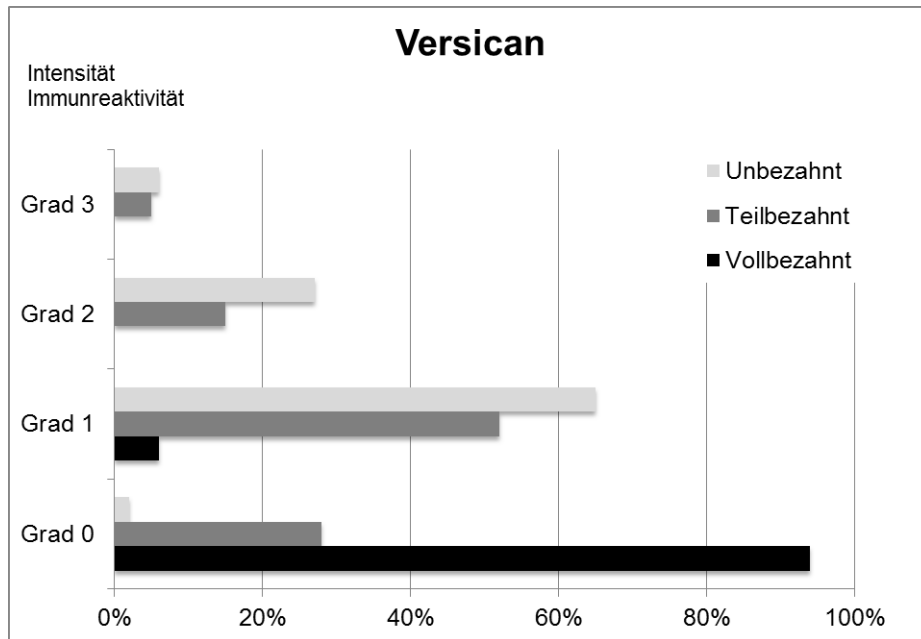


Abb. 24 Prozentualer Anteil der Einteilung für den Nachweis der Immunreaktivität von Versican im Vergleich zwischen den drei Versuchsgruppen.

3 Ergebnisse U-Tests nach Mann-Whitney

3.1 Histologische Färbungen

Bei dem Vergleich zwischen der Zellzahl der Chondrozyten und Fibroblasten, der Zellverteilung, der Intensität der Gewebsrisse und der Gewebshomogenität in der Summe der Gewebsschnitte (koronale und axiale Richtung) kam es zu folgenden Ergebnissen:

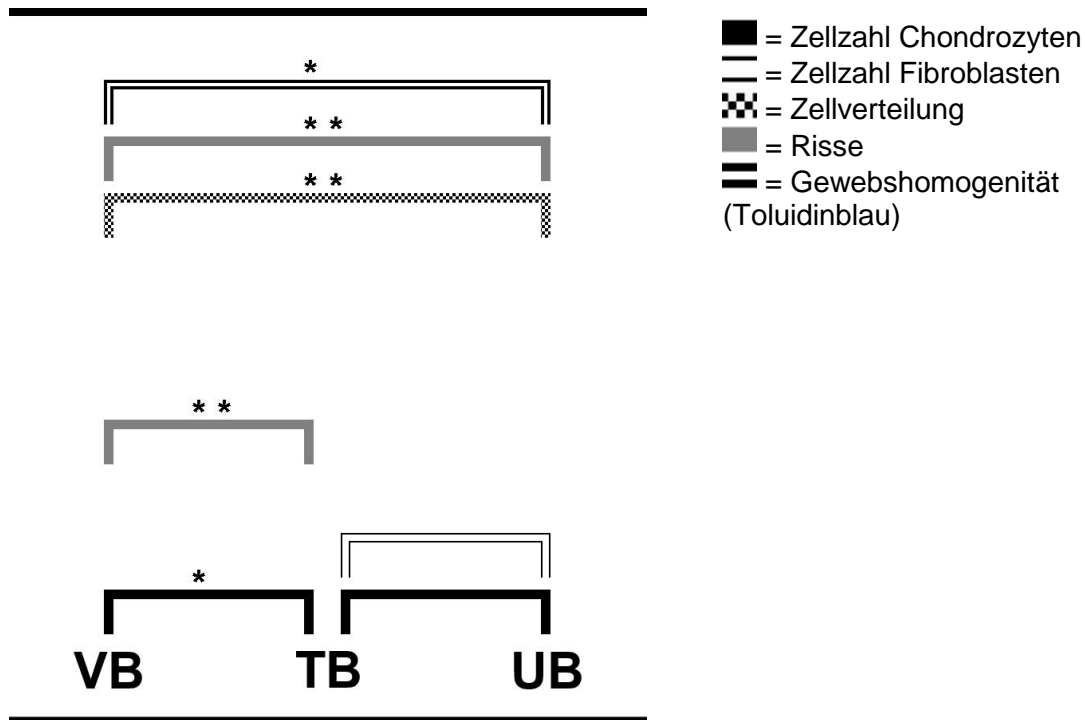


Abb. 25 Mann-Whitney-Test der drei Versuchsgruppen (VB: vollbezahnt; TB: teilbezahnt; UB: unbezahnt). Die jeweiligen Balken zwischen den Gruppen zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$). hoch signifikant ($p \leq 0,01$): *; höchst signifikant ($p \leq 0,001$): **.

In Abbildung 25 liegt zwischen den Versuchsgruppen Teilbezahnt (2) und Vollbezahnt (1) bei der Zellanzahl von Chondrozyten mit $p=0,002$ ein hoch signifikanter und bei der Intensität der Gewebsrisse mit $p \leq 0,001$ ein höchst signifikanter Unterschied vor. Zwischen der unbezahnten (3) und der teilbezahnten (2) Gruppe ist bei der Zellzahl von Chondrozyten mit $p=0,017$ und von Fibroblasten mit $p=0,031$ ein signifikanter Unterschied vorhanden. Der Unterschied zwischen der unbezahnten (3) und vollbezahnten (1) Versuchsgruppe ist mit $p \leq 0,001$ bei der Zellverteilung und den Gewebsrissen höchst signifikant und bei der Gewebshomogenität mit $p=0,007$ hoch signifikant.

Bei dem Vergleich zwischen der Zellzahl der Chondrozyten und Fibroblasten, der Zellverteilung, der Intensität der Gewebsrisse und der Gewebshomogenität zwischen den einzelnen Vierteln (mesiolateral, mesiomedial, distolateral und distomedial) kam es zu folgenden Ergebnissen:

3.1.1 Gruppe Mesiolateral

In Abbildung 26 liegt zwischen den Versuchsgruppen Teilbezahnt (2) und Vollbezahnt (1) bei der Zellanzahl von Chondrozyten mit $p=0,049$ ein signifikanter und bei der Intensität der Gewebsrisse mit $p=0,008$ ein hoch signifikanter Unterschied vor. Zwischen der unbezahnten (3) und der teilbezahnten (2) Gruppe ist bei der Zellzahl von Fibroblasten mit $p\leq 0,001$ ein höchst signifikanter Unterschied vorhanden. Der Unterschied zwischen der unbezahnten (3) und vollbezahnten (1) Versuchsgruppe ist mit $p=0,031$ bei der Zellanzahl von Chondrozyten signifikant.

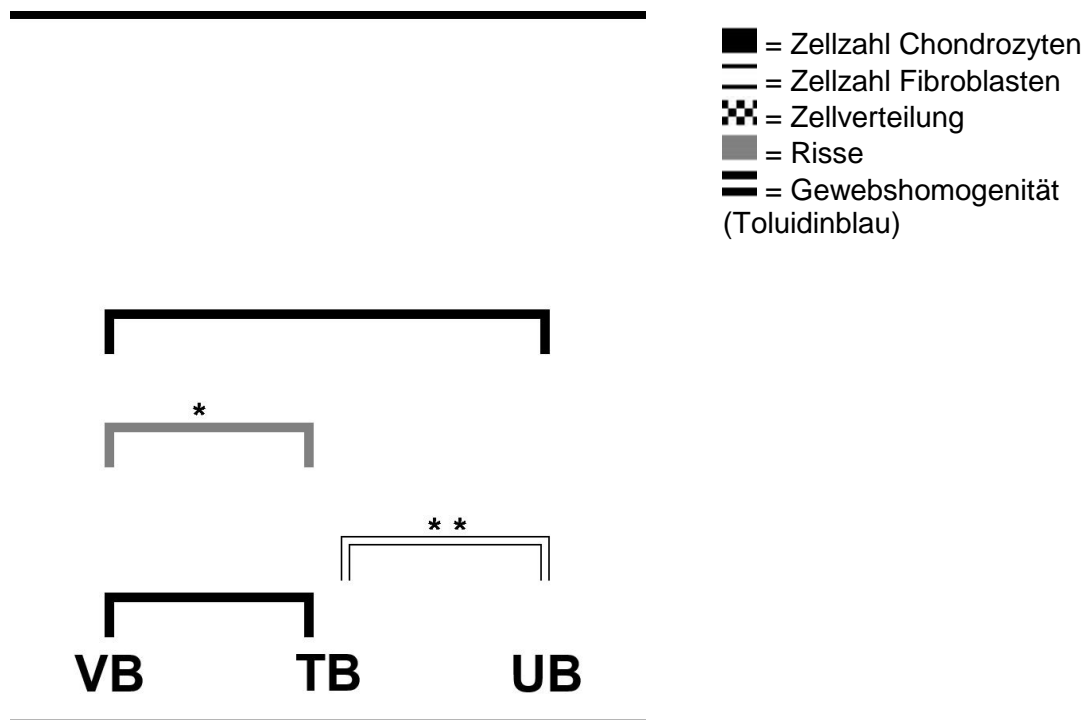


Abb. 26 Mann-Whitney-Test der drei Versuchsgruppen (VB: vollbezahnt; TB: teilbezahnt; UB: unbezahnt). Die jeweiligen Balken zwischen den Gruppen zeigen einen signifikanten Unterschied ($p\leq 0,05$). hoch signifikant ($p\leq 0,01$): *; höchst signifikant ($p\leq 0,001$): **.

In Abbildung 27 ist beispielhaft ein mit Hämatoxylin-Eosin gefärbtes mesiolaterales Präparat zu erkennen. Es ist eine marginale Proliferation von Zellen (Stern) zu erkennen, vorwiegend Chondrozyten. Zudem durchziehen kleine Risse das Präparat in der Tiefe (durchgezogene Pfeile).

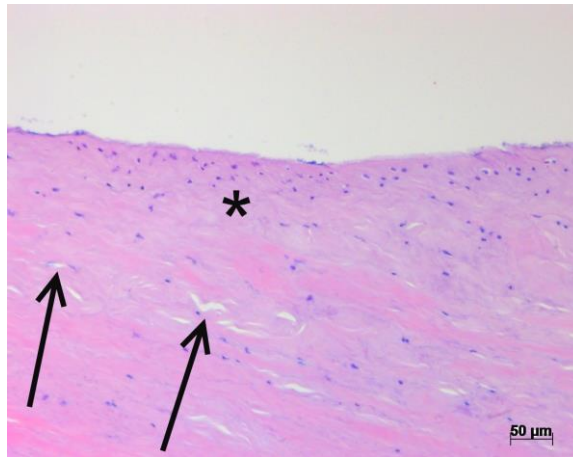


Abb. 27 Beispiel für eine histologische Färbung eines mesiolateralen Präparats mit HE.

3.1.2 Gruppe Mesiomedial

In Abbildung 28 liegt zwischen den Versuchsgruppen Teilbezahnt (2) und Vollbezahnt (1) bei der Zellanzahl von Chondrozyten mit $p \leq 0,001$ ein höchst signifikanter Unterschied vor. Zwischen der unbezahnten (3) und der teilbezahnten (2) Gruppe ist bei der Zellzahl von Fibroblasten mit $p = 0,050$ ein signifikanter und bei der Zellverteilung mit $p \leq 0,001$ ein höchst signifikanter Unterschied vorhanden. Der Unterschied zwischen der unbezahnten (3) und vollbezahnten (1) Versuchsgruppe ist mit $p \leq 0,001$ bei der Zellanzahl von Chondrozyten höchst signifikant und bei der Zellverteilung mit $p = 0,004$ hoch signifikant.

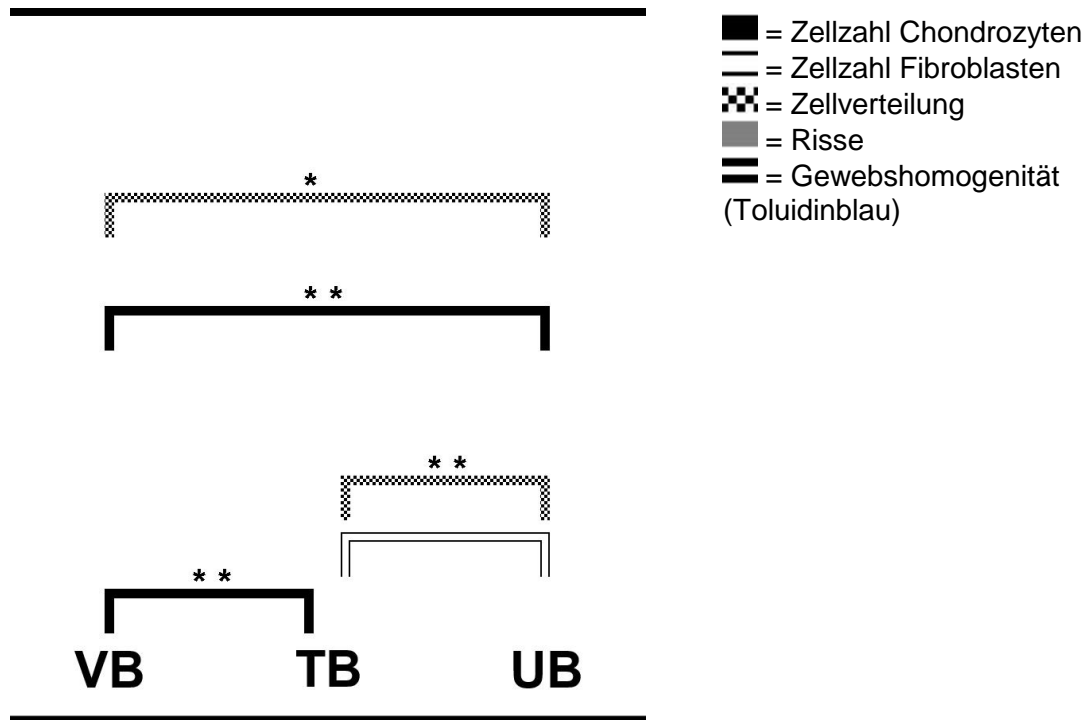


Abb. 28 Mann-Whitney-Test der drei Versuchsgruppen (VB: vollbezahnt; TB: teilbezahnt; UB: unbezahnt). Die jeweiligen Balken zwischen den Gruppen zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$). hoch signifikant ($p \leq 0,01$): *; höchst signifikant ($p \leq 0,001$): **.

In Abbildung 29 ist beispielhaft ein mit Hämatoxylin-Eosin gefärbtes mesiomediales Präparat zu erkennen. Das Präparat ist durchzogen von Rissen in der Tiefe (gestrichelte Pfeile) sowie an der Oberfläche (durchgezogene Pfeile).

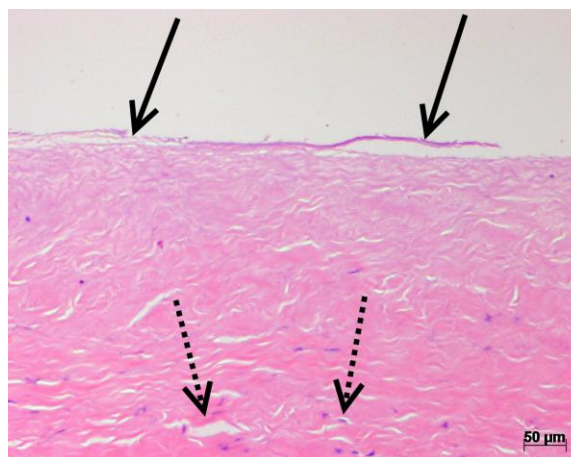


Abb. 29 Beispiel für eine histologische Färbung eines mesiomedialen Präparats mit HE.

3.1.3 Gruppe Distolateral

In Abbildung 30 liegt zwischen den Versuchsgruppen Teilbezahnt (2) und Vollbezahnt (1) bei der Intensität der Gewebsrisse mit $p \leq 0,001$ ein höchst signifikanter Unterschied vor. Zwischen der unbezahnten (3) und der teilbezahnten (2) Gruppe ist bei der Zellverteilung mit $p \leq 0,001$ ein höchst signifikanter Unterschied vorhanden. Der Unterschied zwischen der unbezahnten (3) und vollbezahnten (1) Versuchsgruppe ist mit $p \leq 0,001$ bei der Zellverteilung und der Intensität der Gewebsrisse höchst signifikant.

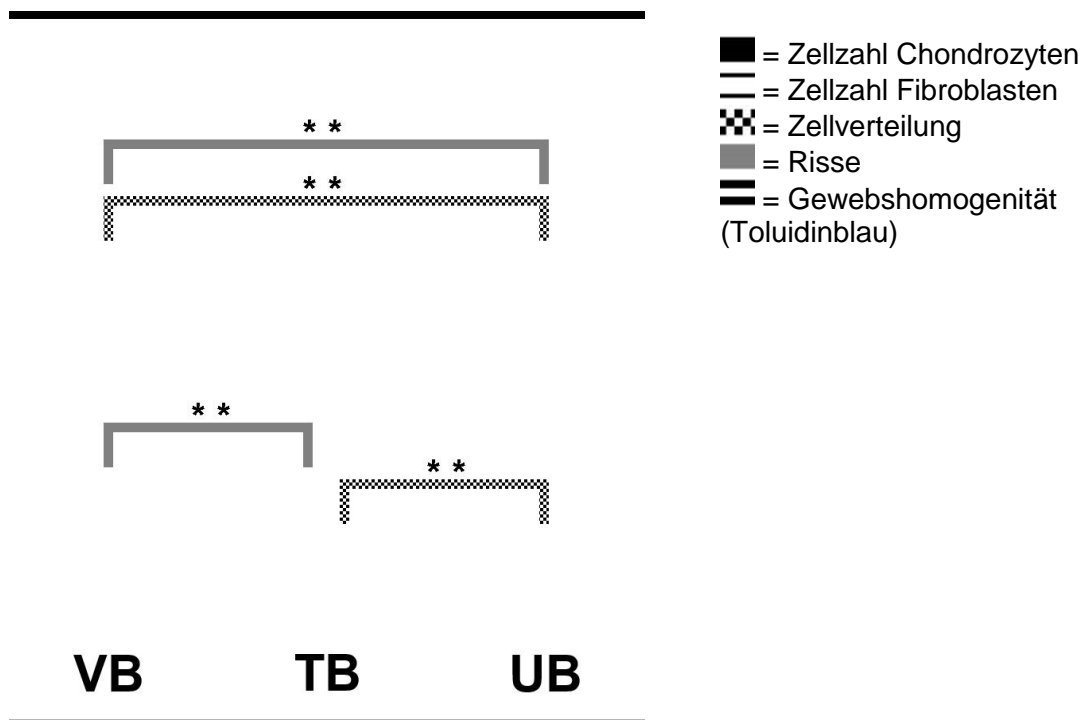


Abb. 30 Mann-Whitney-Test der drei Versuchsgruppen (VB: vollbezahnt; TB: teilbezahnt; UB: unbezahnt). Die jeweiligen Balken zwischen den Gruppen zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$). hoch signifikant ($p \leq 0,01$): *; höchst signifikant ($p \leq 0,001$): **.

In Abbildung 31 ist beispielhaft ein mit Hämatoxylin-Eosin gefärbtes distolaterales Präparat zu erkennen. Die Zellverteilung ist homogen (Sterne) und es sind überwiegend Chondrozyten vorhanden. Es zeigen sich lediglich kleine Gewebsrisse (durchgezogene Pfeile).

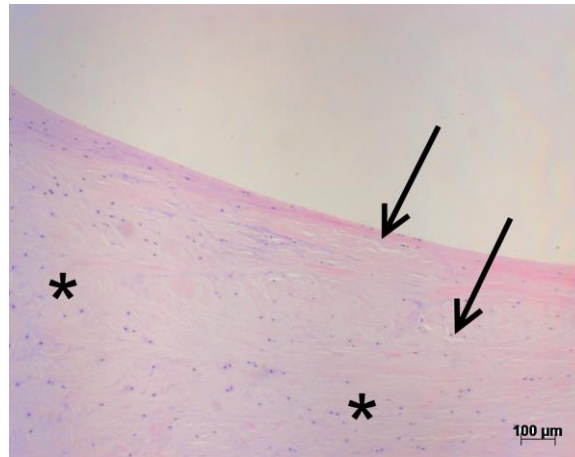


Abb. 31 Beispiel für eine histologische Färbung eines distolateralen Präparats mit HE.

3.1.4 Gruppe Distomedial

In Abbildung 32 liegt zwischen den Versuchsgruppen Teilbezahnt (2) und Vollbezahnt (1) bei der Zellzahl von Chondrozyten mit $p=0,003$ ein hoch signifikanter, bei der Zellzahl von Fibroblasten mit $p\leq 0,001$ ein höchst signifikanter und bei der Gewebshomogenität mit $p=0,020$ ein signifikanter Unterschied vor. Zwischen der unbezahnten (3) und der teilbezahnten (2) Gruppe ist bei der Zellverteilung mit $p=0,007$ ein hoch signifikanter und bei der Intensität der Gewebssrisse mit $p=0,007$ ebenfalls ein hoch signifikanter Unterschied vorhanden. Der Unterschied zwischen der unbezahnten (3) und vollbezahnten (1) Versuchsgruppe ist bei der Zellzahl von Fibroblasten mit $p=0,029$ signifikant.

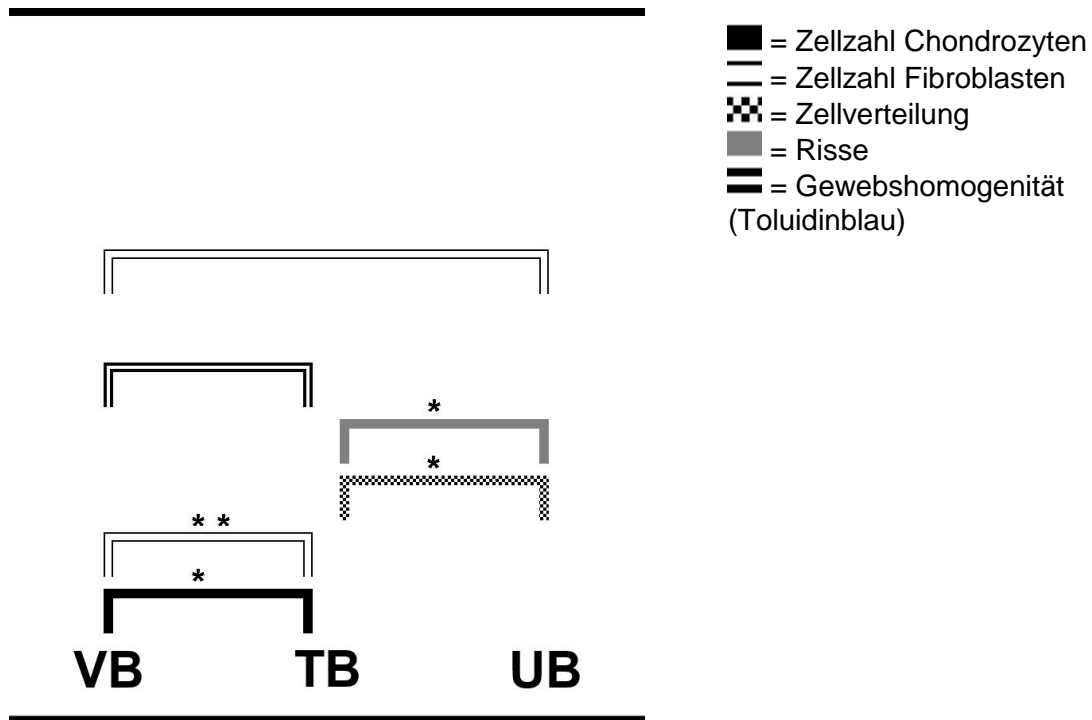


Abb. 32 Mann-Whitney-Test der drei Versuchsgruppen (VB: vollbezahnt; TB: teilbezahnt; UB: unbezahnt). Die jeweiligen Balken zwischen den Gruppen zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$). hoch signifikant ($p \leq 0,01$): *; höchst signifikant ($p \leq 0,001$): **.

In Abbildung 33 ist beispielhaft ein mit Hämatoxylin-Eosin gefärbtes distomediales Präparat zu erkennen. Es ist ein Riss an der Oberfläche (durchgezogener Pfeil) sowie viele kleine unterhalb zu erkennen. Das Präparat ist auch in der Tiefe von kleinen Rissen durchzogen (Stern).

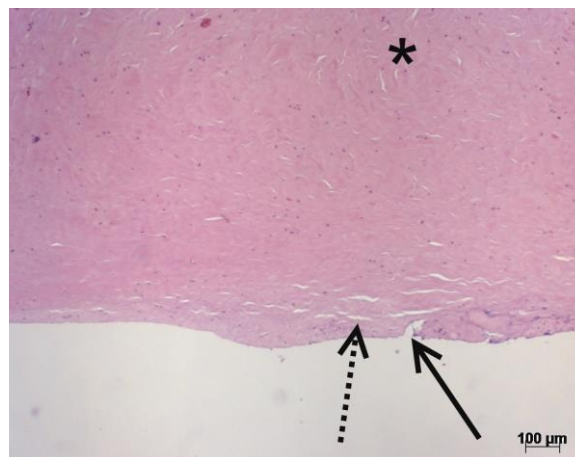


Abb. 33 Beispiel für eine histologische Färbung eines distomedialen Präparats mit HE.

3.1.5 Gruppe Kranial

In Abbildung 34 liegt zwischen den Versuchsgruppen Teilbezahnt (2) und Vollbezahnt (1) bei der Zellzahl von Chondrozyten mit $p=0,002$ ein hoch signifikanter, bei der Zellzahl von Fibroblasten mit $p=0,038$ ein signifikanter, bei der Zellverteilung mit $p=0,018$ ebenfalls ein signifikanter, bei der Intensität der Gewebsrisse mit $p\leq 0,001$ ein höchst signifikanter und bei der Gewebshomogenität mit $p=0,008$ ein hoch signifikanter Unterschied vor. Zwischen der unbezahnten (3) und der teilbezahnten (2) Gruppe ist bei der Zellverteilung mit $p=0,036$ ein signifikanter Unterschied vorhanden. Der Unterschied zwischen der unbezahnten (3) und vollbezahnten (1) Versuchsgruppe ist bei der Zellverteilung mit $p=0,004$ hoch signifikant, bei der Intensität der Gewebsrisse mit $p=0,009$ ebenfalls hoch signifikant und bei der Gewebshomogenität mit $p=0,030$ signifikant.

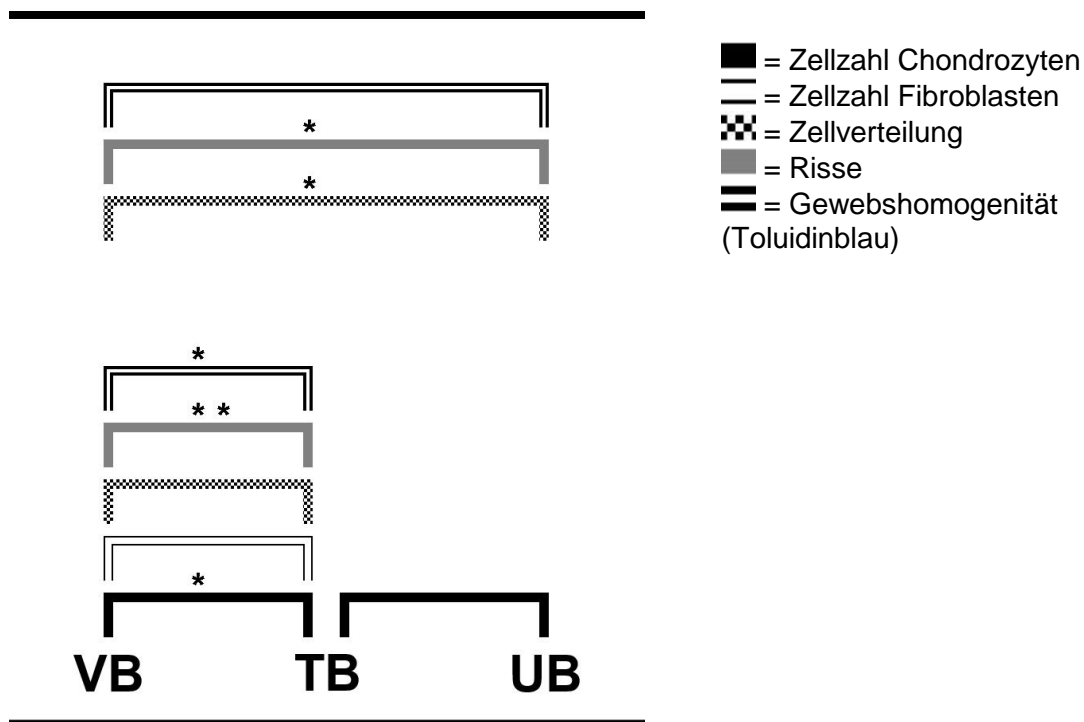


Abb. 34 Mann-Whitney-Test der drei Versuchsgruppen (VB: vollbezahnt; TB: teilbezahnt; UB: unbezahnt). Die jeweiligen Balken zwischen den Gruppen zeigen einen signifikanten Unterschied ($p\leq 0,05$). hoch signifikant ($p\leq 0,01$): *; höchst signifikant ($p\leq 0,001$): **.

In Abbildung 35 ist beispielhaft ein mit Hämatoxylin-Eosin gefärbtes kraniales Präparat zu erkennen. Es zeigt sich eine marginale Proliferation von Zellen (Stern). Zudem durchziehen kleine Risse das Präparat in der Tiefe (durchgezogene Pfeile).

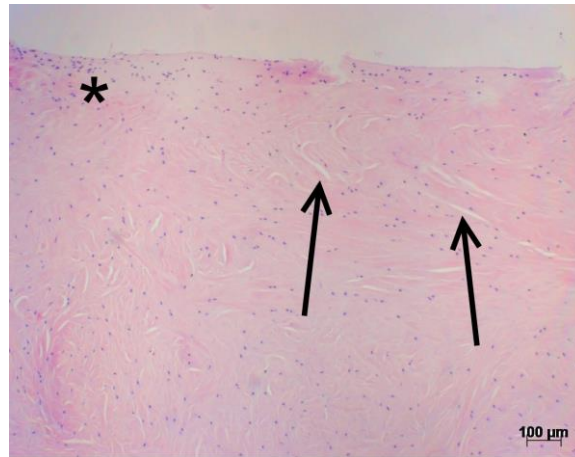


Abb. 35 Beispiel für eine histologische Färbung eines kranialen Präparatausschnitts mit HE.

3.1.6 Gruppe Mittig

In Abbildung 36 liegt zwischen den Versuchsgruppen Teilbezahnt (2) und Vollbezahnt (1) bei der Zellzahl von Fibroblasten mit $p=0,034$ ein signifikanter Unterschied vor. Zwischen der unbezahnten (3) und der teilbezahnten (2) Gruppe ist bei der Intensität der Gewebsrisse mit $p\leq 0,001$ ein höchst signifikanter Unterschied vorhanden. Der Unterschied zwischen der unbezahnten (3) und vollbezahnten (1) Versuchsgruppe ist bei der Zellzahl von Fibroblasten mit $p\leq 0,001$ höchst signifikant, bei der Intensität der Gewebsrisse mit $p=0,004$ hoch signifikant.

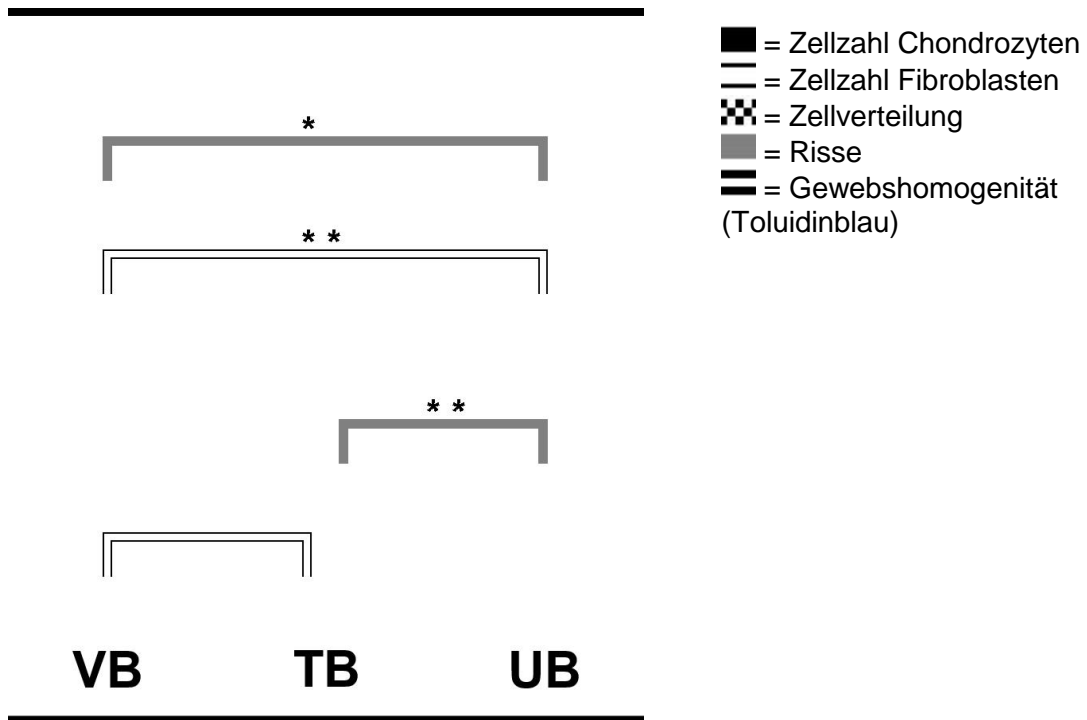


Abb. 36 Mann-Whitney-Test der drei Versuchsgruppen (VB: vollbezahnt; TB: teilbezahnt; UB: unbezahnt). Die jeweiligen Balken zwischen den Gruppen zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$). hoch signifikant ($p \leq 0,01$): *; höchst signifikant ($p \leq 0,001$): **.

In Abbildung 37 ist beispielhaft ein mit Hämatoxylin-Eosin gefärbtes mittiges Präparat zu erkennen. Kleine (Stern) sowie mehrere größere Risse sind im Präparat zu finden. Die Zellverteilung ist homogen.

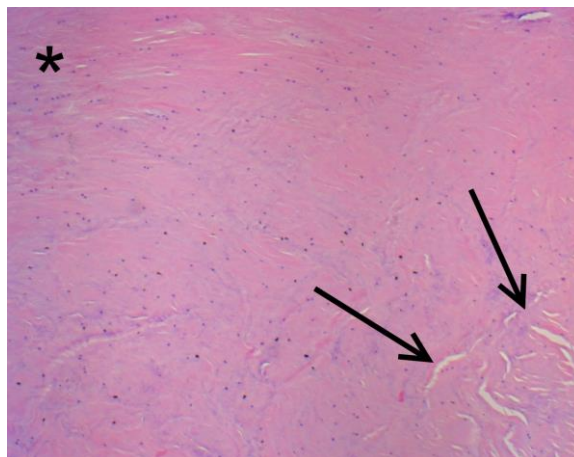


Abb. 37 Beispiel für eine histologische Färbung eines mittigen Präparatausschnitts mit HE.

3.1.7 Gruppe Kaudal

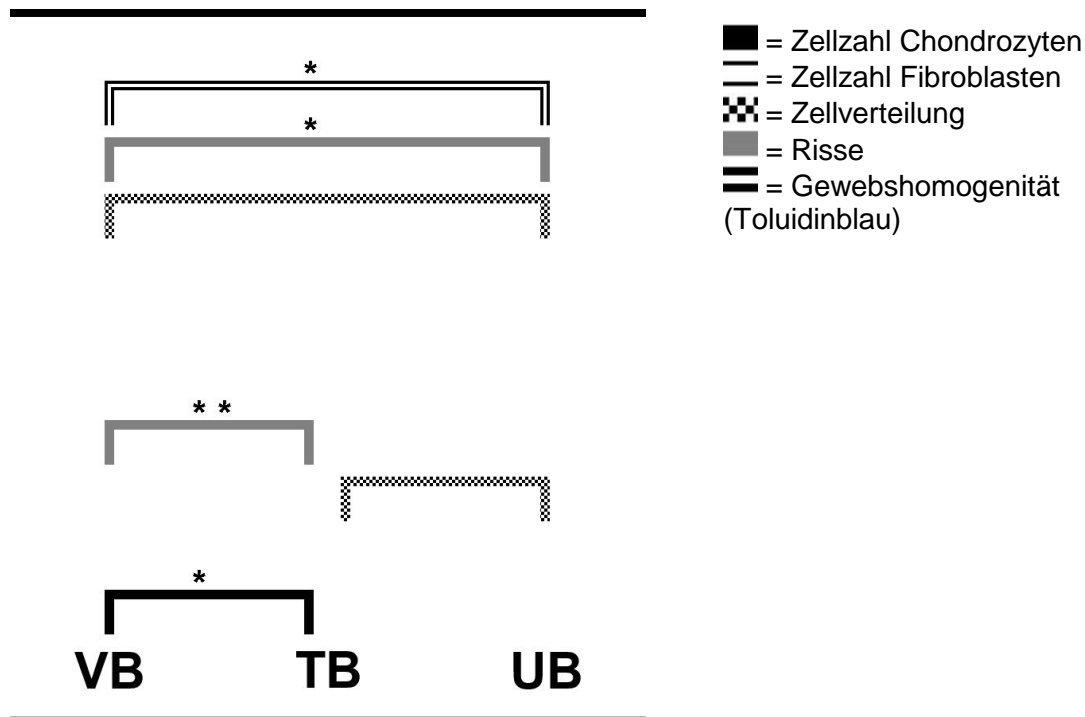


Abb. 38 Mann-Whitney-Test der drei Versuchsgruppen (VB: vollbezahnt; TB: teilbezahnt; UB: unbezahnt). Die jeweiligen Balken zwischen den Gruppen zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$). hoch signifikant ($p \leq 0,01$): *; höchst signifikant ($p \leq 0,001$): **.

In Abbildung 38 liegt zwischen den Versuchsgruppen Teilbezahnt (2) und Vollbezahnt (1) bei der Zellzahl von Chondrozyten mit $p=0,005$ ein hoch signifikanter und bei der Intensität der Gewebsrisse mit $p \leq 0,001$ ein höchst signifikanter Unterschied vor. Zwischen der unbezahnten (3) und der teilbezahnten (2) Gruppe ist bei der Zellverteilung mit $p=0,032$ ein signifikanter Unterschied vorhanden. Der Unterschied zwischen der unbezahnten (3) und vollbezahnten (1) Versuchsgruppe ist bei der Zellverteilung mit $p=0,019$ signifikant, bei der Intensität der Gewebsrisse mit $p=0,006$ hoch signifikant und bei der Gewebshomogenität mit $p=0,010$ ebenfalls hoch signifikant.

In Abbildung 39 ist beispielhaft ein mit Hämatoxylin-Eosin gefärbtes kaudales Präparat zu erkennen. Es liegt eine inhomogene Verteilung der Zellen (Stern) vor. Außerdem gibt es großflächige Einrisse an der Oberfläche des Präparats (durchgezogene Pfeile).

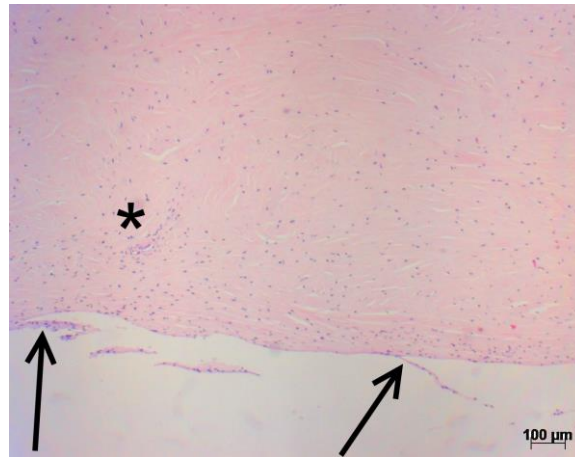


Abb. 39 Beispiel für eine histologische Färbung eines kaudalen Präparatausschnitts mit HE.

3.2 Immunhistochemische Färbungen

Bei dem Vergleich zwischen dem Nachweis von VEGF, Kollagen Typ 1 und Versican in der Summe der Gewebsschnitte (koronale und axiale Richtung) kam es zu folgenden Ergebnissen:

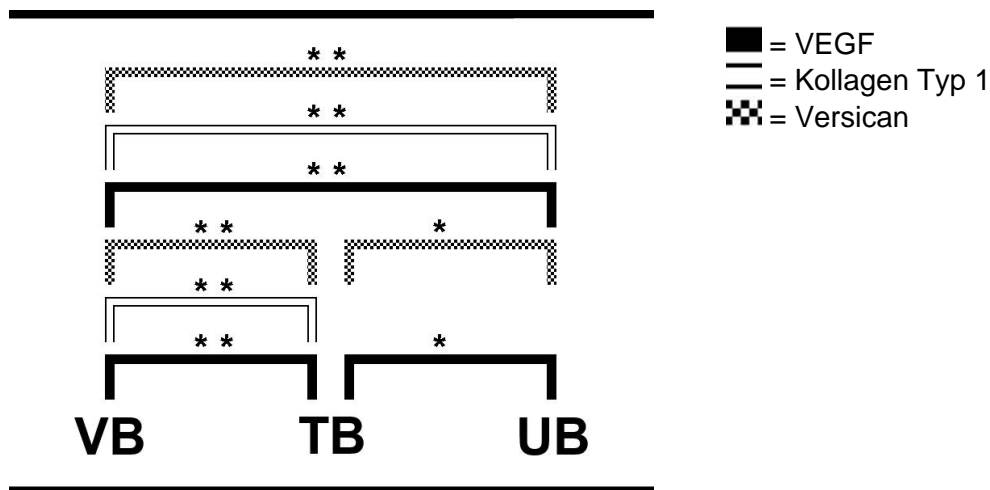


Abb. 40 Mann-Whitney-Test der drei Versuchsgruppen (VB: vollbezahnt; TB: teilbezahnt; UB: unbezahnt). Die jeweiligen Balken zwischen den Gruppen zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$). hoch signifikant ($p \leq 0,01$): *; höchst signifikant ($p \leq 0,001$): **.

In Abbildung 40 liegt zwischen den Versuchsgruppen Teilbezahnt (2) und Vollbezahnt (1) bei dem Nachweis von VEGF, Kollagen Typ 1 und Versican mit $p \leq 0,001$ ein höchst signifikanter Unterschied vor. Zwischen der unbezahnten (3) und der teilbezahnten (2) Gruppe ist der Nachweis von VEGF mit $p = 0,005$ und Versican mit $p = 0,007$ hoch signifikant. Der Unterschied zwischen der unbezahnten (3) und vollbezahnten (1) Versuchsgruppe ist mit $p \leq 0,001$ bei dem Nachweis von VEGF, Kollagen Typ 1 und Versican höchst signifikant.

Bei dem Vergleich zwischen dem Vorkommen von VEGF, Kollagen Typ 1 und Versican zwischen den einzelnen Vierteln (mesiolateral, mesiomedial, distolateral und distomedial) kam es zu folgenden Ergebnissen:

3.2.1 Gruppe Mesiolateral

In Abbildung 41 liegt zwischen den Versuchsgruppen Teilbezahnt (2) und Vollbezahnt (1) bei dem Nachweis von VEGF und Versican mit $p \leq 0,001$ ein höchst signifikanter Unterschied vor, bei Kollagen Typ 1 ist mit $p = 0,006$ der Unterschied hoch signifikant. Zwischen der unbezahnten (3) und der teilbezahnten (2) Gruppe ist lediglich das Vorkommen von VEGF mit $p = 0,015$ signifikant. Der Unterschied zwischen der unbezahnten (3) und vollbezahnten (1) Versuchsgruppe ist mit $p \leq 0,001$ bei dem Nachweis von VEGF und Versican höchst signifikant, bei Kollagen Typ 1 mit $p = 0,002$ hoch signifikant.

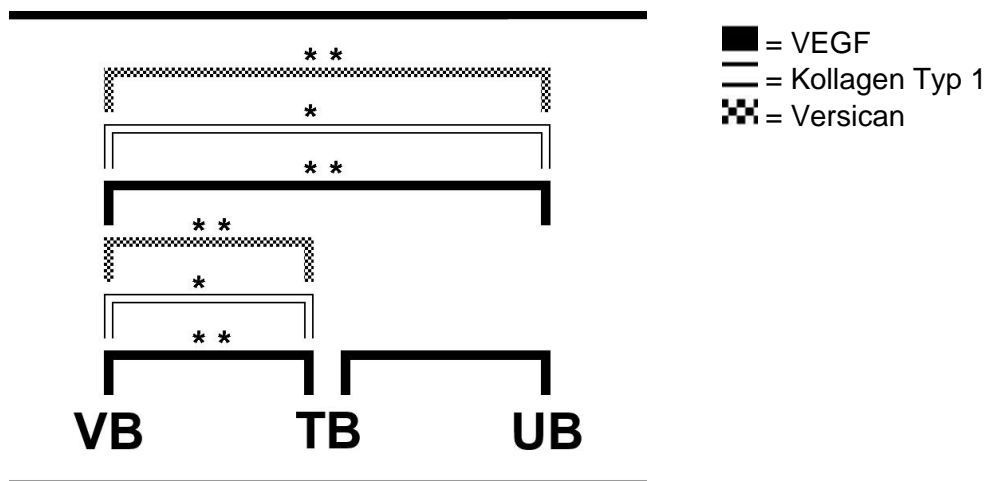


Abb. 41 Mann-Whitney-Test der drei Versuchsgruppen (VB: vollbezahnt; TB: teilbezahnt; UB: unbezahnt). Die jeweiligen Balken zwischen den Gruppen zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$). hoch signifikant ($p \leq 0,01$): *; höchst signifikant ($p \leq 0,001$): **.

In Abbildung 42 ist beispielhaft der Nachweis der Immunreaktivität von VEGF eines mesiolateralen Präparats zu erkennen. Es sind Anfärbungen als Zeichen der Immunreaktivität des Gewebes an der Oberfläche (durchgezogene Pfeile) und teilweise in der Tiefe (gestrichelter Pfeil) zu erkennen.

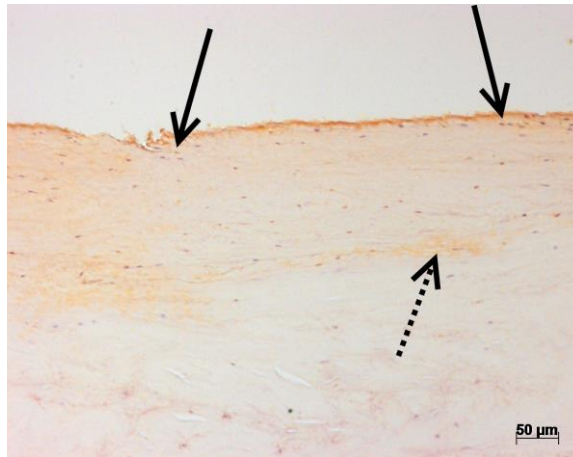


Abb. 42 Beispiel für den Nachweis der Immunreaktivität von VEGF eines mesiolateralen Präparats.

3.2.2 Gruppe Mesiomedial

In Abbildung 43 liegt zwischen den Versuchsgruppen Teilbezahnt (2) und Vollbezahnt (1) bei dem Vorkommen von VEGF und Kollagen Typ 1 mit $p \leq 0,001$ ein höchst signifikanter Unterschied vor, bei Versican mit $p = 0,003$ ein hoch signifikanter Unterschied. Zwischen der unbezahnten (3) und der teilbezahnten (2) Gruppe ist das Vorkommen von Versican mit $p = 0,025$ und von Kollagen Typ 1 mit $p = 0,042$ signifikant. Der Unterschied zwischen der unbezahnten (3) und vollbezahnten (1) Versuchsgruppe ist mit $p \leq 0,001$ bei dem Nachweis von VEGF und Versican höchst signifikant.

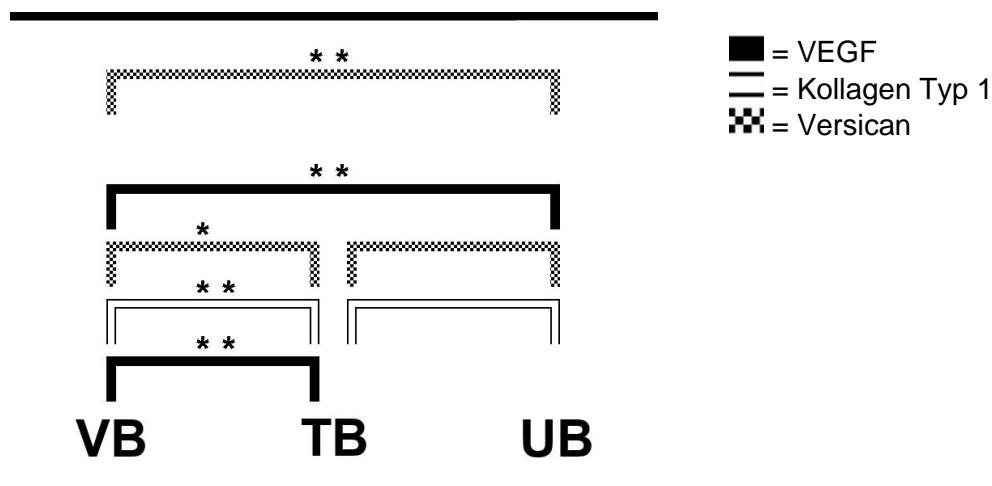


Abb. 43 Mann-Whitney-Test der drei Versuchsgruppen (VB: vollbezahnt; TB: teilbezahnt; UB: unbezahnt). Die jeweiligen Balken zwischen den Gruppen zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$). hoch signifikant ($p \leq 0,01$): *; höchst signifikant ($p \leq 0,001$): **.

In Abbildung 44 ist beispielhaft der Nachweis der Immunreaktivität von Versican eines mesiomedialen Präparats zu erkennen. Es sind Anfärbungen der Zellen (durchgezogene Pfeile) durch Hämalaun zu erkennen. Der immunhistochemische Nachweis der Immunreaktivität ist an der Oberfläche des Gewebes (Stern) zu sehen.

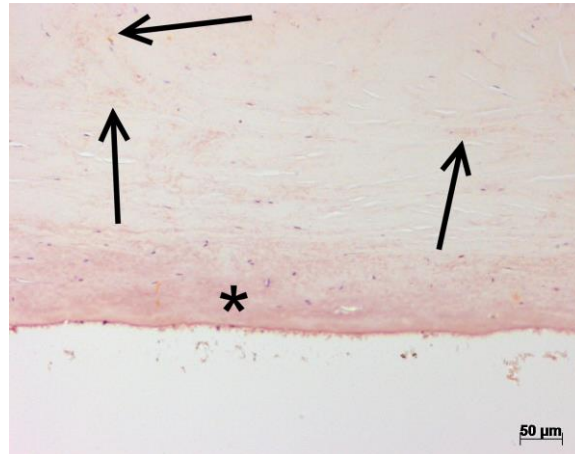


Abb. 44 Beispiel für den Nachweis der Immunreaktivität von Versican eines mesiomedialen Präparats.

3.2.3 Gruppe Distolateral

In Abbildung 45 liegt zwischen den Versuchsgruppen Teilbezahnt (2) und Vollbezahnt (1) bei dem Nachweis von Kollagen Typ 1 und Versican mit $p \leq 0,001$ ein höchst signifikanter Unterschied vor. Zwischen der unbezahnten (3) und der teilbezahnten (2) Gruppe ist lediglich das Vorkommen von VEGF mit $p = 0,006$ hoch signifikant. Der Unterschied zwischen der unbezahnten (3) und vollbezahnten (1) Versuchsgruppe ist mit $p \leq 0,001$ bei dem Nachweis von VEGF und Versican höchst signifikant, bei Kollagen Typ 1 mit $p = 0,010$ hoch signifikant.

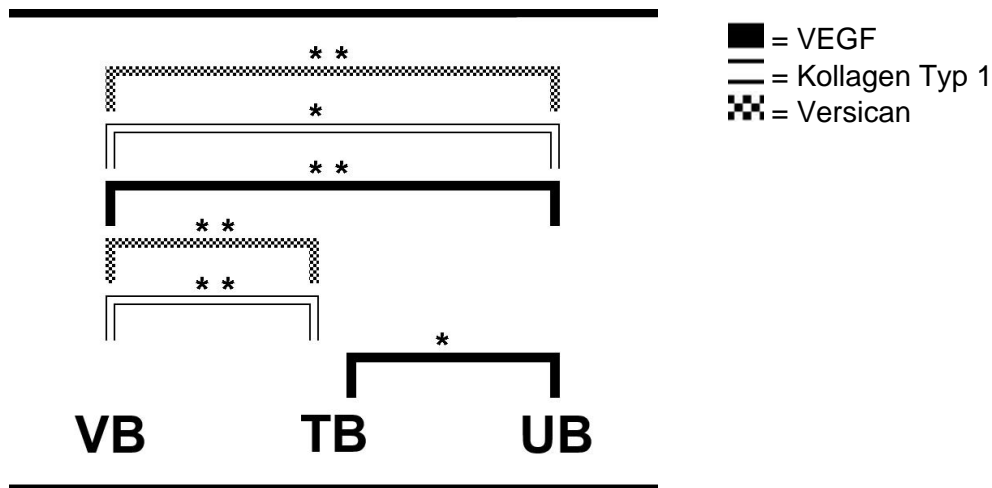


Abb. 45 Mann-Whitney-Test der drei Versuchsgruppen (VB: vollbezahnt; TB: teilbezahnt; UB: unbezahnt). Die jeweiligen Balken zwischen den Gruppen zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$). hoch signifikant ($p \leq 0,01$): *; höchst signifikant ($p \leq 0,001$): **.

In Abbildung 46 ist beispielhaft der Nachweis der Immunreaktivität von Kollagen Typ 1 eines distolateralen Präparats zu erkennen. Es ist deutlich eine Anfärbung als Zeichen der Immunreaktivität des unter der Oberfläche liegenden Gewebes zu erkennen (Sterne).

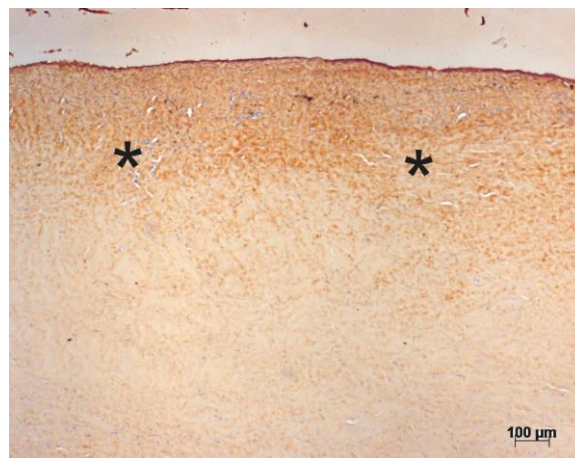


Abb. 46 Beispiel für den Nachweis der Immunreaktivität von Kollagen Typ 1 eines distolateralen Präparats.

3.2.4 Gruppe Distomedial

In Abbildung 47 liegt zwischen den Versuchsgruppen Teilbezahnt (2) und Vollbezahnt (1) bei dem Nachweis von Kollagen Typ 1 mit $p \leq 0,001$ ein höchst signifikanter Unterschied vor, bei dem Vorkommen von VEGF mit $p = 0,002$ und ebenfalls von Versican mit $p = 0,002$ ein hoch signifikanter Unterschied. Zwischen der unbezahnten (3) und der teilbezahnten (2) Gruppe ist bei keiner der Immunhistochemischen Färbungen ein signifikanter Unterschied. Der Unterschied zwischen der unbezahnten (3) und vollbezahnten (1) Versuchsgruppe ist mit $p \leq 0,001$ bei dem Nachweis von VEGF und Versican höchst signifikant, bei Kollagen Typ 1 mit $p = 0,002$ hoch signifikant.

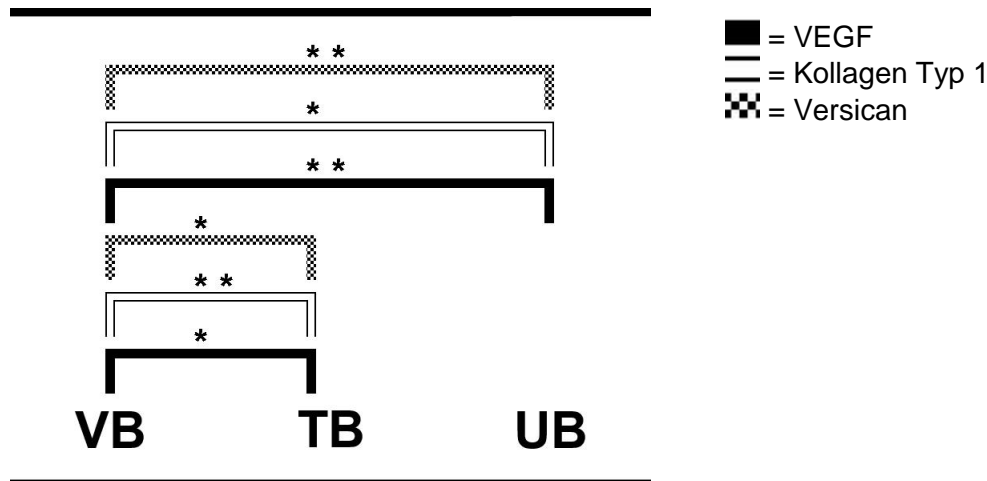


Abb. 47 Mann-Whitney-Test der drei Versuchsgruppen (VB: vollbezahnt; TB: teilbezahnt; UB: unbezahnt). Die jeweiligen Balken zwischen den Gruppen zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$). hoch signifikant ($p \leq 0,01$): *; höchst signifikant ($p \leq 0,001$): **.

In Abbildung 48 ist beispielhaft der Nachweis der Immunreaktivität von Kollagen Typ 1 eines distomedialen Präparats zu erkennen. Es sind Anfärbungen der Zellen (durchgezogene Pfeile) durch Hämalan zu erkennen. Der immunhistochemische Nachweis der Immunreaktivität ist in der Tiefe des Gewebes (Stern) zu sehen.

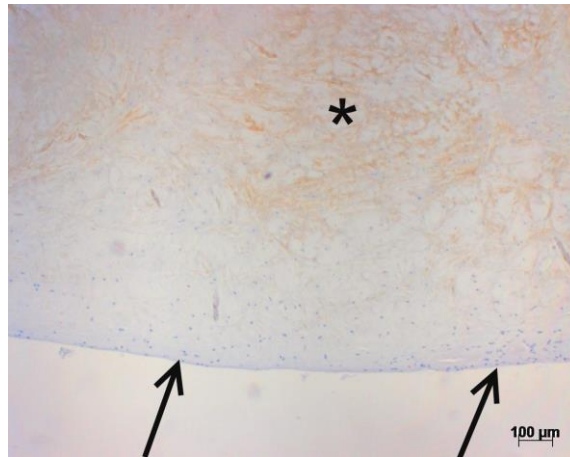


Abb. 48 Beispiel für den Nachweis der Immunreaktivität von Kollagen Typ 1 eines distomedialen Präparats.

Bei dem Vergleich zwischen dem Vorkommen von VEGF, Kollagen Typ 1 und Versican zwischen den drei vertikalen Ebenen (kranial, mittig und kaudal) kam es zu folgenden Ergebnissen:

3.2.5 Gruppe Kranial

In Abbildung 49 liegt zwischen den Versuchsgruppen Teilbezahnt (2) und Vollbezahnt (1) bei dem Nachweis von VEGF, Kollagen Typ 1 und Versican mit $p \leq 0,001$ ein höchst signifikanter Unterschied vor. Zwischen der unbezahnten (3) und der teilbezahnten (2) Gruppe ist das Vorkommen von VEGF und Versican mit $p = 0,032$ signifikant. Der Unterschied zwischen der unbezahnten (3) und vollbezahnten (1) Versuchsgruppe ist mit $p \leq 0,001$ bei dem Vorkommen von VEGF, Kollagen Typ 1 und Versican höchst signifikant.

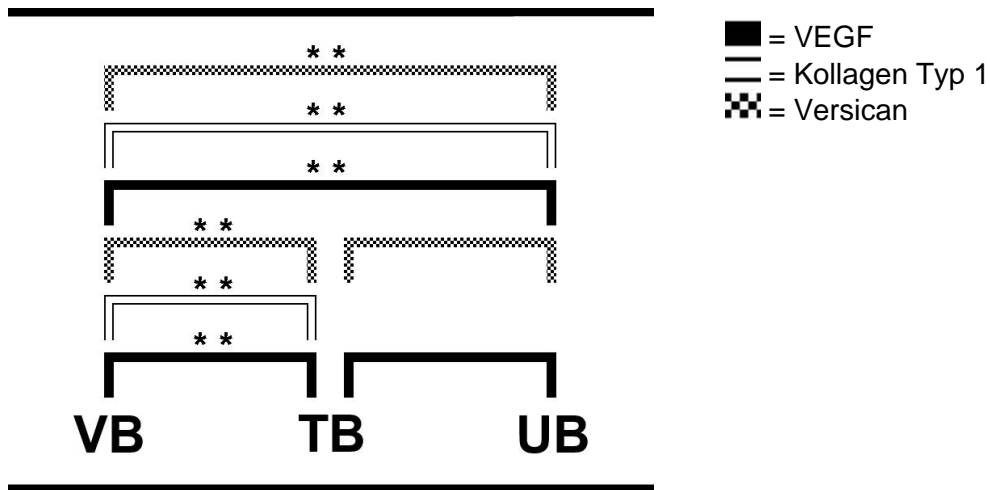


Abb. 49 Mann-Whitney-Test der drei Versuchsgruppen (VB: vollbezahnt; TB: teilbezahnt; UB: unbezahnt). Die jeweiligen Balken zwischen den Gruppen zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$). hoch signifikant ($p \leq 0,01$): *; höchst signifikant ($p \leq 0,001$): **.

In Abbildung 50 ist beispielhaft der Nachweis der Immunreaktivität von Versican eines kranialen Präparats zu erkennen. Vor allem unter der Oberfläche des Präparats haben sich Zellen als Zeichen der Immunreaktivität angefärbt (durchgezogene Pfeile).

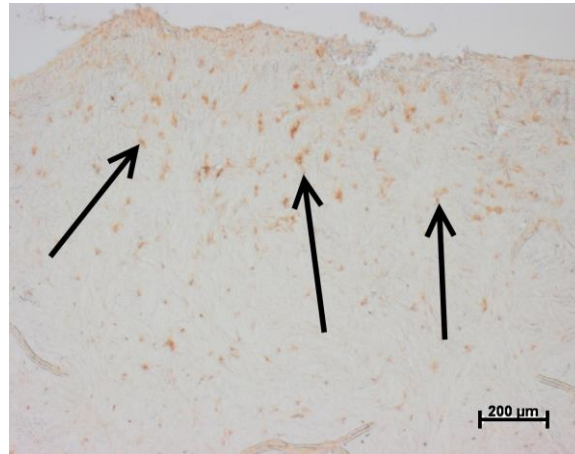


Abb. 50 Beispiel für den Nachweis der Immunreaktivität von Versican eines kranialen Präparats.

3.2.6 Gruppe Mittig

In Abbildung 51 liegt zwischen den Versuchsgruppen Teilbezahnt (2) und Vollbezahnt (1) bei dem Nachweis von VEGF mit $p=0,008$ ein hoch signifikanter Unterschied vor, bei dem Vorkommen von Versican mit $p\leq 0,001$ ein höchst signifikanter Unterschied. Zwischen der unbezahnten (3) und der teilbezahnten (2) Gruppe ist lediglich bei dem Vorkommen von Versican mit $p=0,042$ ein signifikanter Unterschied vorhanden. Der Unterschied zwischen der unbezahnten (3) und vollbezahnten (1) Versuchsgruppe ist mit $p\leq 0,001$ bei dem Nachweis von VEGF und Versican höchst signifikant.

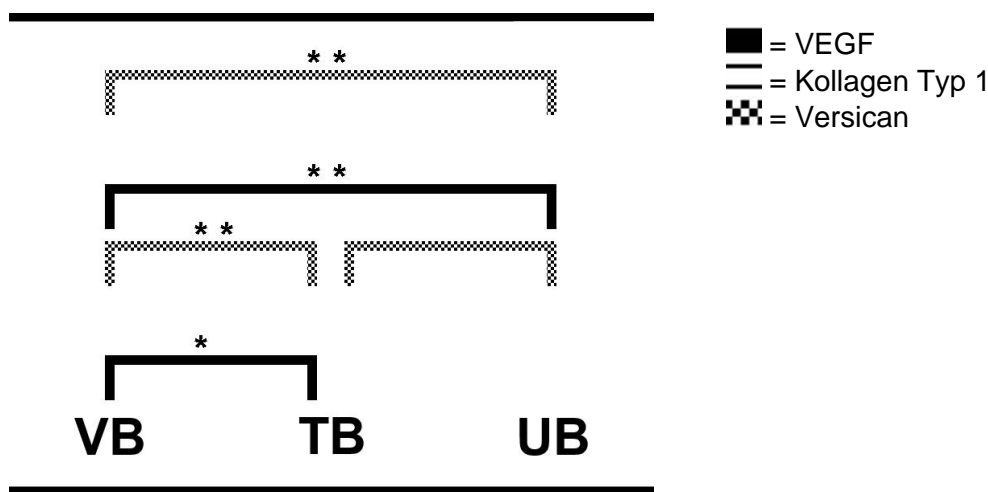


Abb. 51 Mann-Whitney-Test der drei Versuchsgruppen (VB: vollbezahnt; TB: teilbezahnt; UB: unbezahnt). Die jeweiligen Balken zwischen den Gruppen zeigen einen signifikanten Unterschied ($p\leq 0,05$). hoch signifikant ($p\leq 0,01$): *; höchst signifikant ($p\leq 0,001$): **.

In Abbildung 52 ist beispielhaft der Nachweis der Immunreaktivität von Versican eines mittigen Präparats zu erkennen. Neben zwei großen Rissen im Präparat (gestrichelte Pfeile), ist teilweise umliegendes Gewebe (durchgezogene Pfeile) als Nachweis der Immunreaktivität angefärbt.

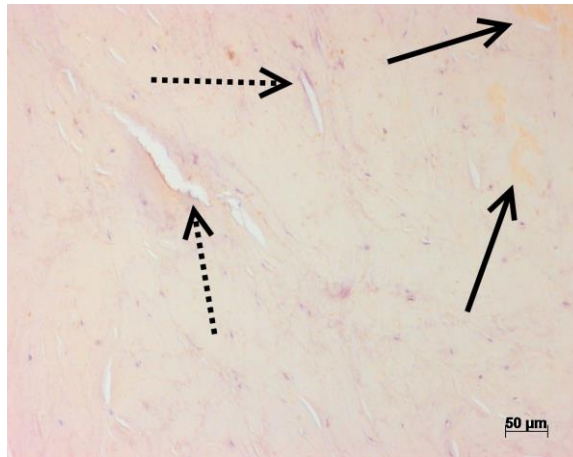


Abb. 52 Beispiel für den Nachweis der Immunreaktivität von Versican eines mittigen Präparats.

3.2.7 Gruppe Kaudal

In Abbildung 53 liegt zwischen den Versuchsgruppen Teilbezahnt (2) und Vollbezahnt (1) bei dem Nachweis von VEGF, Kollagen Typ 1 und Versican mit $p \leq 0,001$ ein höchst signifikanter Unterschied vor. Zwischen der unbezahnten (3) und der teilbezahnten (2) Gruppe ist bei keiner der Immunhistochemischen Färbungen ein signifikanter Unterschied. Der Unterschied zwischen der unbezahnten (3) und vollbezahnten (1) Versuchsgruppe ist mit $p \leq 0,001$ bei dem Vorkommen von VEGF, Kollagen Typ 1 und Versican höchst signifikant.

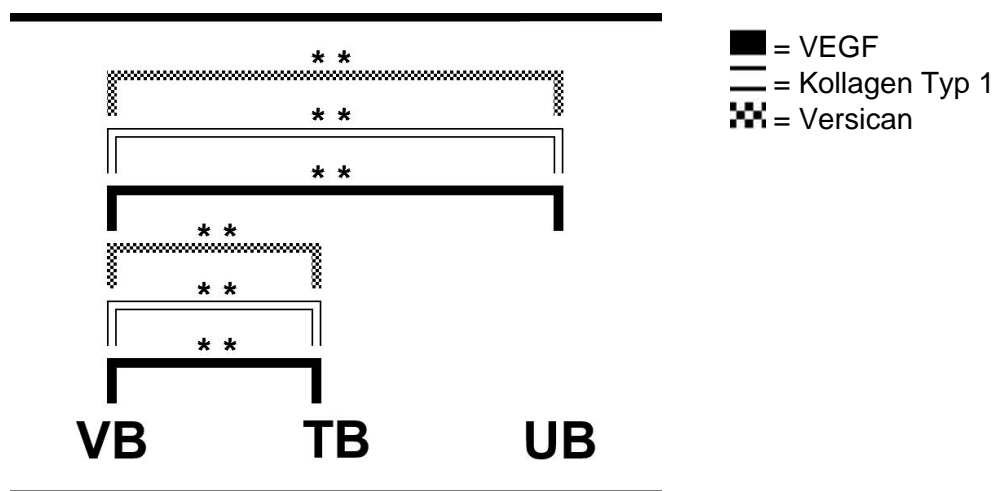


Abb. 53 Mann-Whitney-Test der drei Versuchsgruppen (VB: vollbezahnt; TB: teilbezahnt; UB: unbezahnt). Die jeweiligen Balken zwischen den Gruppen zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$). hoch signifikant ($p \leq 0,01$): *; höchst signifikant ($p \leq 0,001$): **.

In Abbildung 54 ist beispielhaft der Nachweis der Immunreaktivität von VEGF eines kaudalen Präparats zu erkennen. Im gesamten Bildausschnitt sind Zellen, wie auch das umliegende Gewebe (Sterne) als Nachweis der Immunreaktivität angefärbt.

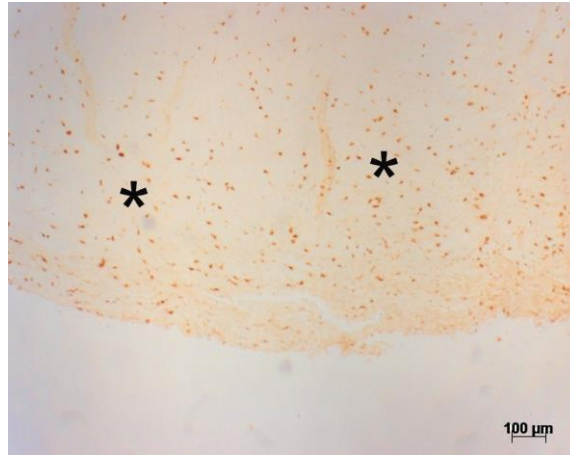


Abb. 54 Beispiel für den Nachweis der Immunreaktivität von VEGF eines kaudalen Präparats.

IV. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden 17 Disci articulares von Körperspendern aus dem Anatomischen Institut in Kiel entnommen. Dabei wurde unterschieden in sechs vollbezahnte (Gruppe 1), fünf teilbezahnte (Gruppe 2) und sechs unbezahnte (Gruppe 3) Körperspender. Die Disci wurden mittels Hämatoxylin-Eosin Färbung auf anerkannte Degenerationszeichen (Risse, Zellzahl und -verteilung und Gewebshomogenität) und immunhistochemischen Färbungen auf den Nachweis der Immunreaktivität von VEGF, Versican und Kollagen Typ 1 untersucht. Die Proben wurden vorher in vertikaler Richtung geviertelt. Bei der Auswertung wurde zusätzlich in drei verschiedenen Zonen in koronaler Richtung mikroskopiert.

Die eingehenden Fragen dieser Studie konnten beantwortet werden. Auf zellulärer Ebene mit Hämatoxylin-Eosin-Färbungen unterschieden sich die Versuchsgruppen bei der Anzahl von Chondrozyten im Gewebe hoch signifikant ($p=0,004$) voneinander. Der U-Test nach Mann-Whitney konnte zeigen, dass in der teilbezahnten Versuchsgruppe (2) signifikant ($p=0,017$) mehr Chondrozyten im Gewebe vorlagen als in der unbezahnten (3) und hoch signifikant ($p=0,002$) mehr Chondrozyten als in der vollbezahnten (1) Versuchsgruppe. Zwischen der vollbezahnten (1) und der unbezahnten (3) Versuchsgruppe gab es keinen signifikanten Unterschied.

Folgende Ergebnisse lieferte der Vergleich der Zellzahlen zwischen den einzelnen Ebenen des Discus: Die Zellzahl in den mesiomedialen Teilen des Discus articularis war deutlich höher als bei den anderen drei Vierteln. Dort war ebenfalls ein höchst signifikanter ($p\leq 0,001$) Unterschied zwischen der vollbezahnten (1) Versuchsgruppe und den anderen beiden Gruppen (2, 3) zu verzeichnen. Die Literatur zeigt, dass bei Osteoarthritis des Knorpels sich Morphologie und Struktur der Chondrozyten verändern (Stoppiello et al. 2014). So geht die Organisation und der Zellverbund zwischen den einzelnen Chondrozyten verloren. Dies hat maßgeblichen Einfluss auf die umgebende Extrazellulärmatrix und ist je nach Lokalisation im Knorpel verschieden (Aicher und Rolauffs 2014). Eine Reaktion auf die chronische Entzündung ist die Proliferation der Chondrozyten (Staal et al. 2014). Die Ergebnisse stimmen mit der Literatur hinsichtlich der Zellproliferation und Veränderung der Morphologie weitestgehend überein. Nicht in allen Teilen des Discus articularis zeigte sich ein signifikanter Anstieg von Chondrozyten. Einerseits kann es in dem

mesiomedialen Teil des Discus articularis vermehrt zur Proliferation von Chondrozyten gekommen sein. Andererseits ist es möglich, dass in dem restlichen Teil des Knorpelgewebes die Zellzahl stark abgenommen hat und die Anzahl von Chondrozyten mesiomedial dadurch lediglich erhöht scheint.

Die Anzahl der im Gewebe vorliegenden Fibroblasten war in allen Versuchsgruppen gleich und zeigte keinen Unterschied. Dieses Ergebnis ist konträr zur Literatur, da davon ausgegangen wird, dass im physiologisch gesunden Gewebe keine Fibroblasten auftreten und erst bei pathologischen Umbauvorgängen des Gewebes vorkommen (Marchetti et al. 1999; Leonardi et al. 2001). Eine Erklärung dieser Ergebnisse kann sein, dass die Körperspender nicht auf vorangegangene Kiefergelenkserkrankungen untersucht wurden; weiterhin kann es altersbedingt zu einer Zunahme der Fibroblasten kommen. Eine Diskusverlagerung hätte somit bei Proben aus der vollbezahnten Versuchsgruppe (1) zu einer Entzündung des Gewebes führen können, was die Anwesenheit von Fibroblasten erklären würde.

Risse im Gewebe durch Fehl- und Überbelastung waren in den drei Versuchsgruppen unterschiedlich ausgeprägt. Die Ergebnisse zeigen höchst signifikante ($p \leq 0,001$) Unterschiede zwischen den teil- (2) und unbezahnten (3) Versuchsgruppen zu der vollbezahnten Versuchsgruppe (1). Die Intensität der Risse nahm mit fortschreitender Gewebsdegeneration ebenfalls zu. Waren es im Knorpelgewebe der vollbezahnten Versuchsgruppe (1) noch Kollagenauflockerungen, so zeigten sich in den beiden anderen Versuchsgruppen (2, 3) deutliche Risse und Spalten. Zudem gab es im Gegensatz zu den Disci articulares der vollbezahnten Gruppe (1) in den anderen beiden Versuchsgruppen (2, 3) selten den Fall, dass das Gewebe frei von Rissen war. Besonders deutlich zeigte sich in den drei untersuchten axialen Ebenen (kranial, mittig und kaudal) ein jeweils hoch signifikanter Unterschied ($p \leq 0,01$) zwischen der unbezahnten (3) und der vollbezahnten (1) Versuchsgruppe. Das lässt vermuten, dass bei Stützzonenverlust ungleichmäßige und größere Kräfte auf den Discus articularis wirken als bei physiologisch gesunden Verhältnissen. Es konnte zwar gezeigt werden, dass Patienten mit verkürzter Zahnreihe (Shortened dental arch, SDA) kein erhöhtes Risiko einer Parafunktion besitzen (Reissmann et al. 2014; Sousa et al. 2014). Unter fortschreitender Verlust von Zähnen und dem damit verbundenen Stützzonenkollaps scheinen jedoch die auftretenden Kaukräfte zu steigen (Kawakami et al. 2014).

Insbesondere bei Kaubelastung über den Front-, Eckzahn- oder Prämolarenbereich sind die auftretenden Kräfte auf das Gelenk und die Muskulatur signifikant höher als bei unilateraler oder bilateraler Belastung über den Molarenbereich (Rues et al. 2011). Studien haben bei anteriorer Diskusverlagerung ein erhöhtes Vorkommen von Rissen im Gewebe gezeigt (Leonardi et al. 2004; Leonardi et al. 2007). Der Auslöser wird vermutlich ebenfalls die unphysiologische und erhöhte Krafteinwirkung auf den Discus articularis sein. Folglich stimmen die Ergebnisse mit den Beschreibungen in der Literatur überein.

Die Färbung des Gewebes mit Toluidinblau zeigte hoch signifikant ($p=0,007$) inhomogenere Anordnung und Verteilung der Kollagenfibrillen in der unbezahnten (3) Versuchsgruppe im Vergleich zur vollbezahnten (1) Versuchsgruppe. Im Detail ist der Unterschied in axialer Ebene zwischen der vollbezahnten Versuchsgruppe (1) und der unbezahnten (3) Versuchsgruppe kranial signifikant ($p=0,03$) und kaudal hoch signifikant ($p=0,01$). Die anderen Schichten und auch der Vergleich zwischen der teilbezahnten (2) zu den anderen beiden Gruppen (1, 3) zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Im Anfangsstadium einer Osteoarthritis beginnt der Umbau von Kollagenfibrillen in den äußeren Schichten des Knorpels. So geht die Anordnung und Parallelität der Fibrillen verloren (Saarakkala et al. 2010). Erst im Endstadium der Erkrankung nimmt die Anzahl der Kollagenfibrillen ab. Der Verlust von Stärke und Steifigkeit der Fibrillen nimmt jedoch auch mit fortschreitendem Alter im Zusammenhang mit einem Funktionsverlust der Chondrozyten zu (Martin und Buckwalter 2001). Die Ergebnisse stimmen im Vergleich zwischen der vollbezahnten (1) und der unbezahnten (3) Versuchsgruppe mit der Literatur überein. So konnte eine größere Inhomogenität in der Anordnung und Verteilung der Kollagenfibrillen der unbezahnten Gruppe (3) in den äußeren Schichten des Knorpels, welche bei der Artikulation direkt mit anderen Gelenkflächen in Kontakt stehen, im Vergleich zu der vollbezahnten Gruppe (1) festgestellt werden.

Versican wurde in den teilbezahnten (2) und unbezahnten (3) Versuchsgruppen höchst signifikant ($p\leq 0,001$) stärker exprimiert im Vergleich zu der vollbezahnten Versuchsgruppe (1). Auch zwischen der teilbezahnten (2) und unbezahnten (3) Gruppe konnte ein hoch signifikanter ($p=0,007$) Unterschied in der Expression von Versican gezeigt werden.

Das Proteoglykan Versican ist ein essentieller Bestandteil der Extrazellulärmatrix. Es ist beteiligt an Entzündungsvorgängen, Wundheilung und Angiogenese (Toriya et al. 2006; Choocheep et al. 2010). Eine zentrale Rolle spielt es bei der Einleitung und Zunahme von Entzündungsvorgängen (Zhang et al. 2012). Die Ergebnisse entsprechen den Erwartungen, dass Versican im Rahmen einer Degeneration des Discus articularis und den damit verbundenen Umbau- und Entzündungsvorgängen stärker exprimiert wird als im physiologisch gesunden Gewebe.

Vergleichbare Ergebnisse konnten bei der Expression des VEGF festgestellt werden. So ist ein hoch signifikanter ($p=0,005$) Unterschied zwischen der unbezahnten (3) und teilbezahnten (2) Versuchsgruppe für das Auftreten des Wachstumsfaktors festzustellen. Der Nachweis der Immunreaktivität des Wachstumsfaktors ist in den Gruppen (3) und (2) höchst signifikant ($p\leq 0,001$) größer im Vergleich zu der vollbezahnten Versuchsgruppe (1). So war VEGF in der vollbezahnten Versuchsgruppe kaum nachzuweisen. Das Einwachsen von Gefäßen sowie das Auftreten von VEGF, welches durch Faktoren wie Entzündungszytokine, Gewebehypoxie und erhöhte Krafteinwirkung vermehrt vorkommt, deutet auf degenerative Erkrankungen des Kiefergelenks und dem damit verbundenem Gewebsumbau hin (Pufe et al. 2005). Ein deutlich erhöhtes Auftreten von VEGF findet also bereits bei einer Fehlbelastung, wie es im teilbezahnten Gebiss der Fall ist, statt. Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen überein, in denen die Ausschüttung von VEGF zwischen den Disci articulares von gesunden Spendern und den Disci articulares von Spendern mit vorangegangener Diskusverlagerung und Gewebsdegeneration verglichen wurde (Leonardi et al. 2003). Die Ergebnisse zeigten ebenfalls ein erhöhtes Vorkommen von VEGF in pathologisch veränderten Disci articulares. Studien konnten zeigen, dass VEGF nicht nur von Endothelzellen, sondern ebenfalls von hypertrophen Chondrozyten parakrin sezerniert wird und somit zur Migration von Endothelzellen beiträgt (Carlevaro et al. 2000). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass VEGF nicht nur in Anwesenheit von neugeformten Blutgefäßen ausgeschüttet wird, sondern bereits vorher im Knorpelgewebe auch in Abwesenheit von Blutgefäßen es in den Chondrozyten zu einem Auftreten von VEGF kommt (Leonardi et al. 2003). Einer Erklärung dafür liefert die Fähigkeit der Chondrozyten, Inhibitoren als auch Stimulatoren der Angiogenese auszuschütten, abhängig von ihrem Differenzierungsgrad und der umgebenden Extrazellulärmatrix (Moses et al. 1992).

Die Untersuchungen zu Kollagen Typ 1 zeigten, dass im Vergleich zwischen der vollbezahnten Versuchsgruppe (1) und den anderen beiden Gruppen (2, 3) ein höchst signifikanter ($p \leq 0,001$) Unterschied vorliegt. Die Expression von Kollagen Typ 1 war in der vollbezahnten Gruppe (1) erhöht. Die Expression von Kollagen Typ 1 war in der teil- (2) und unbezahnten (3) Gruppe deutlich geringer, zwischen denen es keine signifikanten Unterschiede gab. Auffällig war dabei, dass der Unterschied nicht im mittigen Teil des Discus articularis lag, sondern nur an der Oberfläche des Knorpelgewebes. Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen von Vergleichsstudien zwischen gesunden und erkrankten Kiefergelenken. So zeigt die Studie von *Wang Kou et al.*, dass bei chronischer Entzündung des Kiefergelenks die Quantität der Kollagenfibrillen zunimmt. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass sich der Discus articularis makroskopisch verändert, es findet vor allem im anterioren und intermediären Teil eine Dickenzunahme des Gewebes statt (Wang et al. 2012). Eine weitere Studie zeigte ebenfalls eine Erhöhung von Kollagen Typ 1 im Gewebe des Discus articularis von Spendern mit Osteoarthritis (Natiella et al. 2009). Man war davon ausgegangen, dass bei fortschreitender Erkrankung der Anteil von Kollagenfibrillen abnehmen würde. Eine mögliche Erklärung der Ergebnisunterschiede mag erneut in der unterschiedlichen Versuchsdurchführung liegen. Dabei wurden in dieser Studie die entnommenen Disci articulares nicht auf vorangegangene Gelenkerkrankungen untersucht und es war daher nicht bewusst, ob oder wie lange eine Erkrankung bereits bestand. So ist es möglich, dass in den teil- (2) und unbezahnten (3) Versuchsgruppen aufgrund der erhöhten Kaubelastung bereits seit längerer Zeit eine Entzündungsreaktion vorlag. In diesem Fall verlieren Chondrozyten nach längerem Bestehen einer Erkrankung die Möglichkeit, verloren gegangenes Gewebe durch Sezernierung von Kollagen Typ 1 zu ersetzen. Allein durch den Alterungsprozess nimmt das Vorkommen von Proteoglykanen der Chondrozyten ab und auch die Wirkung von Wachstumsfaktoren auf die Zellen sinkt (Martin und Buckwalter 2001). Der Grund für das unterschiedliche Vorkommen von Kollagen Typ 1 zwischen der vollbezahnten Versuchsgruppe (1) und den anderen beiden Gruppen kann also in dem Fortschritt der vorangegangenen degenerativen Erkrankung liegen. So muss man in Betracht ziehen, dass die Disci articulares der Versuchsgruppe 1 entweder gesund oder in einem Zeitpunkt der Gelenkerkrankung waren, in der Reparaturversuche durch Chondrozyten noch möglich waren.

Es konnte gezeigt werden, dass das Vorkommen von VEGF, Kollagen Typ 1 und Versican bei fortschreitender Degeneration des Discus articularis in Abhängigkeit des Zahnstatus signifikant zunimmt. Dies ist als Reaktion auf die vorliegende Entzündung des Gewebes zu sehen mit den damit verbunden Umbauvorgängen im Kollagengeflecht, aber auch in dem Einwachsen von Gefäßen in das Knorpelgewebe. Histopathologisch ließ sich bestätigen, dass Risse im Kollagengeflecht vermehrt bei voranschreitender Degeneration auftreten. Die Zellzahl von Chondrozyten und Fibroblasten sowie die Gewebshomogenität zeigten keine auffälligen Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen und scheinen daher, gemessen an dem verbundenen Aufwand, eher ungeeignet für die Erhebung zu sein. Die Zellverteilung hingegen konnte zeigen, dass es vor allem an der Oberfläche des Knorpels zu unregelmäßigen Proliferationen und Zellnestern kommt. Die Unterschiede in koronaler und axialer Ebene waren bei den restlichen Degenerationszeichen zu unregelmäßig, um ein Muster erkennen zu können.

Auf Grund des durchschnittlichen Körperspenderalters von 77,5 Jahren können keine Rückschlüsse auf das Gewebe bei jüngeren Menschen gezogen werden. Möglicherweise treten allein durch das Lebensalter im vollbezahnten Gebiss ähnliche Degenerationen wie beim teil- und unbezahnten Gebiss auf, wie es in den Ergebnissen der Gewebefärbung auch zu sehen ist. Es ist zwar anzunehmen, dass das Knorpelgewebe im vollbezahnten jugendlichen Gebiss keine Degenerationen aufweist, aber dies konnte in dieser Studie nicht gezeigt werden.

Zu vermerken ist zudem, dass die geringe Anzahl an Präparaten die Aussagekraft der Ergebnisse einschränkt. Die Verfügbarkeit von adäquaten Präparaten des Discus articularis ist sehr eingeschränkt. Die Suche und Auswahl nach Körperspendern am Anatomischen Institut verlief über einen Zeitraum von einem Jahr. Jedes Jahr liegen dem Institut etwa 70 Körperspender vor. Von diesen konnten jedoch nur wenige Disci articulares entnommen werden, da der Großteil für Lehrzwecke zur Verfügung steht. Hinzu kam die Anforderung an den Zahnstatus des Körperspenders. Das Alter der Körperspender spielte ebenfalls eine große Rolle. Wie das Durchschnittsalter dieser Arbeit zeigt, sind die Körperspender im Institut vorwiegend von höherem Alter. Durch den zunehmenden Zahnverlust im erhöhten Alter, wie es in unserer Gesellschaft gegeben ist, erwies es sich als äußerst schwierig, vollbezahnte Körperspender für diese Arbeit zu finden.

Da es sich um Disci von Körperspendern in dieser Arbeit handelt, konnte keine Anamnese in Bezug auf Kiefergelenksbeschwerden erhoben werden. In weiteren Untersuchungen sollte die Anzahl der Präparate erhöht werden und im Voraus mögliche degenerative Vorerkrankungen abgeklärt werden, um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen.

V. Zusammenfassung

Der Discus articularis ist während des Kau- und Sprechaktes großen Kräften ausgesetzt und dient als Dämpfung und Gleitlager für die umliegenden Knochenstrukturen. Bei unphysiologischer Belastung des Knorpels kommt es zur Degeneration des Gewebes und äußert sich klinisch in Gelenkgeräuschen, Mundöffnungseinschränkungen und Schmerzen. Uns hat die Frage interessiert, ob bei vermehrtem Zahnverlust die Degeneration des Knorpelgewebes des Discus articularis zunimmt und diese Degeneration mit dem Vorkommen des Proteoglykans Versican und des Neoangiogenesefaktors VEGF korreliert.

Dazu wurden die rechten Disci articulares von 17 Körperspendern (6 vollbezahnt, 5 teilbezahnt und 6 unbezahnt) entnommen und anschließend geviertelt (mesiomedial, mesiolateral, distomedial und distolateral). Es erfolgte die Färbung der Präparate mit Hämatoxylin-Eosin, Toluidinblau und mittels Immunhistochemie auf den Nachweis der Immunreaktivität von Kollagen Typ 1, VEGF und Versican. Die Disci wurden zusätzlich in jedem Viertel in drei koronalen Ebenen (kranial, mittig und kaudal) untersucht und auf histologische Degenerationszeichen sowie das Vorkommen von Kollagen Typ 1, VEGF und Versican semiquantitativ ausgewertet.

Die Ergebnisse zeigten auf zellulärer Ebene einen signifikanten Unterschied in der Zellzahl der Chondrozyten zwischen der teilbezahnten (2) Versuchsgruppe und den anderen beiden Gruppen. Zudem lag die gesamte Zellzahl im mesiomedialen Teil des Discus articularis deutlich über den anderen Vierteln, die gleichmäßig verteilt sind. Die Zellzahl von Fibroblasten unterschied sich zwischen den Versuchsgruppen nicht signifikant, ebenso nicht die Homogenität der Struktur der Kollagenfibrillen (durch die Anfärbung des Gewebes mit Toluidinblau). Bei der Zellverteilung zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen der vollbezahnten (1) und der unbezahnte (3) Gruppe. Dies zeigte sich vor allem häufig in einer oberflächlichen Zellproliferation oder Zellnestern. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei der Intensität der Gewebsrisse. So stieg die Intensität in der teilbezahnten (2) und unbezahnten (3) Gruppe im Vergleich zur vollbezahnten (1) Gruppe von leichten Kollagenauflockerungen zu starken Gewebsrissen an und zeigte sich in einem höchst signifikanten Unterschied. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen sprechen für eine fortschreitende Degeneration mit zunehmendem Zahnverlust. So war das Vorkommen von VEGF und Versican in der teilbezahnten (2) und unbezahnten (3) Versuchsgruppe signifikant höher als in der vollbezahnten

(1) Gruppe. Umgekehrt war der Nachweis der Immunreaktivität von Kollagen Typ 1 im vollbezahnten (1) Präparat signifikant höher als in den anderen beiden Gruppen (2,3).

Diese Ergebnisse sprechen für eine fortschreitende Degeneration bei einem zunehmenden Stützzonenverlust der Okklusion. So zeigte sich in den teil- und unbezahnten Versuchsgruppen durch das gesteigerte Vorkommen von VEGF ein erhöhtes Vorkommen von Blutgefäßen. Ebenfalls lässt sich feststellen, dass histopathologische Degenerationszeichen wie Gewebsrisse und eine inhomogene Zellverteilung bzw. -proliferation insbesondere an der Diskusoberfläche zu beobachten waren. Diese Ergebnisse bestätigen die anfangs aufgestellte Hypothese, dass auf zellulärer Ebene mit vermehrtem Zahnverlust die Degenerationszeichen zunehmen und diese Degeneration mit dem Vorkommen des Proteoglykans Versican und des Neoangiogenesefaktors VEGF korreliert.

VI. Literaturverzeichnis

- Aicher WK, Rolaufts B (2014) The spatial organisation of joint surface chondrocytes: review of its potential roles in tissue functioning, disease and early, preclinical diagnosis of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* **73**(4), 645-653.
- Alomar X, Medrano J, Cabratosa J, Clavero JA, Lorente M, Serra I, Monill JM, Salvador A (2007) Anatomy of the temporomandibular joint. *Semin Ultrasound CT MR* **28**(3), 170-183.
- Arner EC, Pratta MA (1989) Independent effects of interleukin-1 on proteoglycan breakdown, proteoglycan synthesis, and prostaglandin E2 release from cartilage in organ culture. *Arthritis Rheum* **32**(3), 288-297.
- Bagis B, Ayaz EA, Turgut S, Durkan R, Ozcan M (2012) Gender difference in prevalence of signs and symptoms of temporomandibular joint disorders: a retrospective study on 243 consecutive patients. *Int J Med Sci* **9**(7), 539-544.
- Belmonte-Serrano MA, Bloch DA, Lane NE, Michel BE, Fries JF (1993) The relationship between spinal and peripheral osteoarthritis and bone density measurements. *J Rheumatol* **20**(6), 1005-1013.
- Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T (1995) Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett* **372**(1), 83-87.
- Berendsen AD, Olsen BR (2014) How vascular endothelial growth factor-A (VEGF) regulates differentiation of mesenchymal stem cells. *J Histochem Cytochem* **62**(2), 103-108.
- Blaustein DI, Scapino RP (1986) Remodeling of the temporomandibular joint disk and posterior attachment in disk displacement specimens in relation to glycosaminoglycan content. *Plast Reconstr Surg* **78**(6), 756-764.

- Brown LF, Detmar M, Claffey K, Nagy JA, Feng D, Dvorak AM, Dvorak HF (1997) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS* **79**, 233-269.
- Carlevaro MF, Cermelli S, Cancedda R, Descalzi Cancedda F (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. *J Cell Sci* **113** (Pt 1), 59-69.
- Carvalho RS, Yen EH, Suga DM (1995) Glycosaminoglycan synthesis in the rat articular disk in response to mechanical stress. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* **107**(4), 401-410.
- Chandra H, Symons MC (1987) Sulphur radicals formed by cutting alpha-keratin. *Nature* **328**(6133), 833-834.
- Choocheep K, Hatano S, Takagi H, Watanabe H, Kimata K, Kongtawelert P, Watanabe H (2010) Versican facilitates chondrocyte differentiation and regulates joint morphogenesis. *J Biol Chem* **285**(27), 21114-21125.
- de Bont LG, Stegenga B (1993) Pathology of temporomandibular joint internal derangement and osteoarthritis. *Int J Oral Maxillofac Surg* **22**(2), 71-74.
- Detmar M, Brown LF, Berse B, Jackman RW, Elicker BM, Dvorak HF, Claffey KP (1997) Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. *J Invest Dermatol* **108**(3), 263-268.
- Detmar M, Yeo KT, Nagy JA, Van de Water L, Brown LF, Berse B, Elicker BM, Ledbetter S, Dvorak HF (1995) Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol* **105**(1), 44-50.
- Dewhirst FE, Ago JM, Peros WJ, Stashenko P (1987) Synergism between parathyroid hormone and interleukin 1 in stimulating bone resorption in organ culture. *J Bone Miner Res* **2**(2), 127-134.

- Dixon AD (1962) Structure and functional significance of the intraarticular disc of the human temporomandibular joint. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **15**, 48-61.
- Dvorak HF, Detmar M, Claffey KP, Nagy JA, van de Water L, Senger DR (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* **107**(1-3), 233-235.
- Fava RA, Olsen NJ, Spencer-Green G, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Senger DR, Dvorak HF, Brown LF (1994) Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. *J Exp Med* **180**(1), 341-346.
- Flygare L, Rohlin M, Akerman S (1992) Macroscopic and microscopic findings of areas with radiologic erosions in human temporomandibular joints. *Acta Odontol Scand* **50**(2), 91-100.
- Guarda-Nardini L, Piccotti F, Mogno G, Favero L, Manfredini D (2012) Age-related differences in temporomandibular disorder diagnoses. *Cranio* **30**(2), 103-109.
- Halper J (2014) Proteoglycans and diseases of soft tissues. *Adv Exp Med Biol* **802**, 49-58.
- Haskin CL, Milam SB, Cameron IL (1995) Pathogenesis of degenerative joint disease in the human temporomandibular joint. *Crit Rev Oral Biol Med* **6**(3), 248-277.
- Helmy ES (1993) Light microscopic and ultrastructural study of thinned discal areas in patients with temporomandibular joint internal derangement. *Egypt Dent J* **39**(1), 325-336.
- Huang Q, Opstelten D, Samman N, Tideman H (2002) Experimentally induced unilateral tooth loss: histochemical studies of the temporomandibular joint. *J Dent Res* **81**(3), 209-213.
- Iwasaki LR, Crosby MJ, Gonzalez Y, McCall WD, Marx DB, Ohrbach R, Nickel JC (2009) Temporomandibular joint loads in subjects with and without disc displacement. *Orthop Rev (Pavia)* **1**(2), 90-93.

- Jiang YZ, Wang K, Li Y, Dai CF, Wang P, Kendzierski C, Chen DB, Zheng J (2013) Transcriptional and functional adaptations of human endothelial cells to physiological chronic low oxygen. *Biol Reprod* **88**(5), 114.
- Juhasz T, Matta C, Somogyi C, Katona E, Takacs R, Soha RF, Szabo IA, Cserhati C, Szody R, Karacsonyi Z, Bako E, Gergely P, Zakany R (2014) Mechanical loading stimulates chondrogenesis via the PKA/CREB-Sox9 and PP2A pathways in chicken micromass cultures. *Cell Signal* **26**(3), 468-482.
- Jurvelin J, Kiviranta I, Saamanen AM, Tammi M, Helminen HJ (1990) Indentation stiffness of young canine knee articular cartilage--influence of strenuous joint loading. *J Biomech* **23**(12), 1239-1246.
- Kawakami S, Kumazaki Y, Manda Y, Oki K, Minagi S (2014) Specific diurnal EMG activity pattern observed in occlusal collapse patients: relationship between diurnal bruxism and tooth loss progression. *PLoS One* **9**(7), e101882.
- Kiviranta I, Jurvelin J, Tammi M, Saamanen AM, Helminen HJ (1987) Weight bearing controls glycosaminoglycan concentration and articular cartilage thickness in the knee joints of young beagle dogs. *Arthritis Rheum* **30**(7), 801-809.
- Kubein-Meesenburg D, Fanghanel J, Ihlow D, Lotzmann U, Hahn W, Thieme KM, Proff P, Gedrange T, Nagerl H (2007) Functional state of the mandible and rolling-gliding characteristics in the TMJ. *Ann Anat* **189**(4), 393-396.
- Kurita K, Westesson PL, Sternby NH, Eriksson L, Carlsson LE, Lundh H, Toremalm NG (1989) Histologic features of the temporomandibular joint disk and posterior disk attachment: comparison of symptom-free persons with normally positioned disks and patients with internal derangement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **67**(6), 635-643.
- Leonardi R, Lo Muzio L, Bernasconi G, Caltabiano C, Piacentini C, Caltabiano M (2003) Expression of vascular endothelial growth factor in human dysfunctional temporomandibular joint discs. *Arch Oral Biol* **48**(3), 185-192.
- Leonardi R, Loreto C, Barbato E, Polimeni A, Caltabiano R, Lo Muzio L (2007) A histochemical survey of the human temporomandibular joint disc of patients

with internal derangement without reduction. *J Craniofac Surg* **18**(6), 1429-1433.

Leonardi R, Michelotti A, Farella M, Caltabiano R, Lanzafame S (2004) Fibronectin upregulation in human temporomandibular joint disks with internal derangement. *J Craniofac Surg* **15**(4), 678-683; discussion 684-675.

Leonardi R, Rusu MC, Loreto C (2010) Temporomandibular joint disc: a proposed histopathological degeneration grading score system. *Histol Histopathol* **25**(9), 1117-1122.

Leonardi R, Villari L, Bernasconi G, Caltabiano M (2001) Histochemical study of the elastic fibers in pathologic human temporomandibular joint discs. *J Oral Maxillofac Surg* **59**(10), 1186-1192.

Lingaraj K, Poh CK, Wang W (2010) Vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed during articular cartilage growth and re-expressed in osteoarthritis. *Ann Acad Med Singapore* **39**(5), 399-403.

Lotz M, Carson DA, Vaughan JH (1987) Substance P activation of rheumatoid synoviocytes: neural pathway in pathogenesis of arthritis. *Science* **235**(4791), 893-895.

Luder HU (2002) Factors affecting degeneration in human temporomandibular joints as assessed histologically. *Eur J Oral Sci* **110**(2), 106-113.

Mao JJ, Rahemtulla F, Scott PG (1998) Proteoglycan expression in the rat temporomandibular joint in response to unilateral bite raise. *J Dent Res* **77**(7), 1520-1528.

Marchetti C, Cornaglia I, Casasco A, Bernasconi G, Baciliero U, Stetler-Stevenson WG (1999) Immunolocalization of gelatinase-A (matrix metalloproteinase-2) in damaged human temporomandibular joint discs. *Arch Oral Biol* **44**(4), 297-304.

Martin JA, Buckwalter JA (2001) Roles of articular cartilage aging and chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis. *Iowa Orthop J* **21**, 1-7.

- McCord JM (1974) Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* **185**(4150), 529-531.
- McCord JM (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* **312**(3), 159-163.
- McCord JM (1987) Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Fed Proc* **46**(7), 2402-2406.
- Milam SB (2003) Pathophysiology and epidemiology of TMJ. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **3**(4), 382-390; discussion 406-387.
- Mills DK, Daniel JC, Scapino R (1988) Histological features and in-vitro proteoglycan synthesis in the rabbit craniomandibular joint disc. *Arch Oral Biol* **33**(3), 195-202.
- Minarelli AM, Liberti EA (1997) A microscopic survey of the human temporomandibular joint disc. *J Oral Rehabil* **24**(11), 835-840.
- Morales TI, Hascall VC (1989) Factors involved in the regulation of proteoglycan metabolism in articular cartilage. *Arthritis Rheum* **32**(10), 1197-1201.
- Moses MA, Sudhalter J, Langer R (1992) Isolation and characterization of an inhibitor of neovascularization from scapular chondrocytes. *J Cell Biol* **119**(2), 475-482.
- Naeije M, Te Veldhuis AH, Te Veldhuis EC, Visscher CM, Lobbezoo F (2013) Disc displacement within the human temporomandibular joint: a systematic review of a 'noisy annoyance'. *J Oral Rehabil* **40**(2), 139-158.
- Nakano T, Scott PG (1989) A quantitative chemical study of glycosaminoglycans in the articular disc of the bovine temporomandibular joint. *Arch Oral Biol* **34**(9), 749-757.
- Nakao Y, Konno-Nagasaka M, Toriya N, Arakawa T, Kashio H, Takuma T, Mizoguchi I (2015) Proteoglycan expression is influenced by mechanical load in TMJ discs. *J Dent Res* **94**(1), 93-100.

- Natiella JR, Burch L, Fries KM, Upton LG, Edsberg LE (2009) Analysis of the collagen I and fibronectin of temporomandibular joint synovial fluid and discs. *J Oral Maxillofac Surg* **67**(1), 105-113.
- Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA (1998) Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol* **152**(6), 1445-1452.
- O'Byrne EM, Blancuzzi V, Wilson DE, Wong M, Jeng AY (1990) Elevated substance P and accelerated cartilage degradation in rabbit knees injected with interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Arthritis Rheum* **33**(7), 1023-1028.
- Pettipher ER, Henderson B, Hardingham T, Ratcliffe A (1989) Cartilage proteoglycan depletion in acute and chronic antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* **32**(5), 601-607.
- Pettipher ER, Henderson B, Moncada S, Higgs GA (1988) Leucocyte infiltration and cartilage proteoglycan loss in immune arthritis in the rabbit. *Br J Pharmacol* **95**(1), 169-176.
- Pettipher ER, Higgs GA, Henderson B (1986a) Arthritogenic activity of interleukin 1. *Agents Actions* **19**(5-6), 337-338.
- Pettipher ER, Higgs GA, Henderson B (1986b) Interleukin 1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(22), 8749-8753.
- Pincelli C, Fantini F, Giannetti A (1993) Neuropeptides and skin inflammation. *Dermatology* **187**(3), 153-158.
- Pufe T, Petersen W, Tillmann B, Mentlein R (2001) Splice variants VEGF121 and VEGF165 of the angiogenic peptide vascular endothelial cell growth factor are expressed in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **28**(7), 1482-1485.
- Pufe T, Petersen WJ, Mentlein R, Tillmann BN (2005) The role of vasculature and angiogenesis for the pathogenesis of degenerative tendons disease. *Scand J Med Sci Sports* **15**(4), 211-222.

- Reissmann DR, Heydecke G, Schierz O, Marre B, Wolfart S, Strub JR, Stark H, Pospiech P, Mundt T, Hannak W, Hartmann S, Wostmann B, Luthardt RG, Boning KW, Kern M, Walter MH (2014) The randomized shortened dental arch study: temporomandibular disorder pain. *Clin Oral Investig*.
- Rues S, Lenz J, Turp JC, Schweizerhof K, Schindler HJ (2011) Muscle and joint forces under variable equilibrium states of the mandible. *Clin Oral Investig* **15**(5), 737-747.
- Saarakkala S, Julkunen P, Kiviranta P, Makitalo J, Jurvelin JS, Korhonen RK (2010) Depth-wise progression of osteoarthritis in human articular cartilage: investigation of composition, structure and biomechanics. *Osteoarthritis Cartilage* **18**(1), 73-81.
- Salaorni C, Palla S (1994) Condylar rotation and anterior translation in healthy human temporomandibular joints. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* **104**(4), 415-422.
- Schmidt JA, Mizel SB, Cohen D, Green I (1982) Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation. *J Immunol* **128**(5), 2177-2182.
- Senger DR, Brown LF, Claffey KP, Dvorak HF (1994) Vascular permeability factor, tumor angiogenesis and stroma generation. *Invasion Metastasis* **14**(1-6), 385-394.
- Senger DR, Van de Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM, Dvorak HF (1993) Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* **12**(3-4), 303-324.
- Smith CH, Barker JN, Morris RW, MacDonald DM, Lee TH (1993) Neuropeptides induce rapid expression of endothelial cell adhesion molecules and elicit granulocytic infiltration in human skin. *J Immunol* **151**(6), 3274-3282.
- Sotoodehnejadmatalahi F, Burke B (2013) Structure, function and regulation of versican: the most abundant type of proteoglycan in the extracellular matrix. *Acta Med Iran* **51**(11), 740-750.

- Sousa ST, Mello VV, Magalhaes BG, Morais MP, Vasconcelos MM, Junior AD, Gomes SG (2014) The role of occlusal factors on the occurrence of temporomandibular disorders. *Cranio* **Epub ahead of print**, doi: 10.1179/2151090314Y.0000000015.
- Staal B, Williams BO, Beier F, Vande Woude GF, Zhang YW (2014) Cartilage-specific deletion of Mig-6 results in osteoarthritis-like disorder with excessive articular chondrocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(7), 2590-2595.
- Stoppioello LA, Mapp PI, Wilson D, Hill R, Scammell BE, Walsh DA (2014) Structural associations of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol* **66**(11), 3018-3027.
- Toriya N, Takuma T, Arakawa T, Abiko Y, Sasano Y, Takahashi I, Sakakura Y, Rahemtulla F, Mizoguchi I (2006) Expression and localization of versican during postnatal development of rat temporomandibular joint disc. *Histochem Cell Biol* **125**(3), 205-214.
- Tzeng HE, Tsai CH, Chang ZL, Su CM, Wang SW, Hwang WL, Tang CH (2013) Interleukin-6 induces vascular endothelial growth factor expression and promotes angiogenesis through apoptosis signal-regulating kinase 1 in human osteosarcoma. *Biochem Pharmacol* **85**(4), 531-540.
- Wang XD, Kou XX, Mao JJ, Gan YH, Zhou YH (2012) Sustained inflammation induces degeneration of the temporomandibular joint. *J Dent Res* **91**(5), 499-505.
- Yang L, Guo XG, Du CQ, Yang JX, Jiang DM, Li B, Zhou WJ, Zhang FR (2012) Interleukin-1 beta increases activity of human endothelial progenitor cells: involvement of PI3K-Akt signaling pathway. *Inflammation* **35**(4), 1242-1250.
- Ye P, Liu J, He F, Xu W, Yao K (2014) Hypoxia-induced deregulation of miR-126 and its regulative effect on VEGF and MMP-9 expression. *Int J Med Sci* **11**(1), 17-23.

Yoshida H, Fujita S, Nishida M, Iizuka T (1999) Angiogenesis in the human temporomandibular joint studied by immunohistochemistry for CD34 antigen. *J Oral Pathol Med* **28**(7), 289-292.

Zhang Z, Miao L, Wang L (2012) Inflammation amplification by versican: the first mediator. *Int J Mol Sci* **13**(6), 6873-6882.

VII. Anhang

1. Publikationen

Michaelis M, Möller B, Lucius R, Birkenfeld F Histological degeneration signs in temporomandibular joint discs. 29. Arbeitstagung in Würzburg 2012. DOI 10.3337/anatges.2012.0017

Michaelis M, Lucius R, Birkenfeld F Histopathologische Degenerationszeichen des Discus articularis des Kiefergelenks in Abhängigkeit des Zahnstatus, 48. Jahrestagung DGFDT in Bad Homburg

2. Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. Ralph Lucius für die Bereitstellung des Themas sowie der technischen Mittel und Räumlichkeiten.

Besonderen Dank gilt Herrn PD Dr. Dr. Falk Birkenfeld für die persönliche und engagierte Zusammenarbeit als auch seine Geduld beim Beantworten von Fragen.

Dem Direktorium des Anatomischen Instituts in Kiel und seinen Mitarbeitern danke ich für die freundliche Aufnahme und hilfreiche Unterstützung.

Mein Dank gilt auch Bettina Facomprè, Marion Kölln und Katrin Masuhr für die technische Unterstützung.

Für die konstruktive Manuskriptkorrektur möchte ich mich bei Falk Birkenfeld, Merle Michaelis und Perrine Wachter bedanken.

Meinen Eltern danke ich besonders dafür, dass sie mir das Studium der Zahnmedizin ermöglicht haben und mich in meinen Vorhaben stets unterstützten.

3. Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Malte Michaelis

Wohnhaft: Kohlgasse 12, 89073 Ulm

Geburtstag: 01.06.1989

Geburtsort: Kiel

Staatsbürgerschaft: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1995-1999 Grundschule Lindenschule, Bordesholm

1999-2008 Alexander-von-Humboldt Gymnasium, Neumünster

2005-2006 Auslandsaufenthalt an der Gerard Redmond Community Catholic School
in Hinton, Alberta, Kanada

07/2008 Abitur

Studium der Zahnmedizin:

08.10.2008 Immatrikulation an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

22.09.2009 naturwissenschaftliche Vorprüfung

24.03.2011 zahnärztliche Vorprüfung

19.11.2013 zahnärztliche Prüfung

20.11.2013 zahnärztliche Approbation

Berufliche Tätigkeit:

01.04.2014 – 31.01.2015 Assistenz Zahnarzt in der Praxis Hosseindjani an der
Medeco Zahnklinik Hamburg

Seit 01.03.2015 Assistenz Zahnarzt in der Abteilung für Zahnerhaltung und
Parodontologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. dent. B. Haller am
Universitätsklinikum Ulm