

De neuro-odontoblast relatie en het odontoblast cultuursysteem uit gezonde humane pulpa

Geert FREDERIX

promotor :
Prof. dr. Ivo LAMBRICHTS

Voorwoord

Gedurende de 6 maanden waarin ik aan mijn thesis heb kunnen werken op de afdeling morfologie aan de Universiteit Hasselt, ben ik in contact gekomen met veel mensen die me bij mijn werk hebben geholpen en bijgestaan. Bij deze zou ik die personen graag willen bedanken.

Allereerst zou ik graag Prof. Dr. Ivo Lambrichts willen bedanken om de mogelijkheid gekregen te hebben bij hem stage te volgen. Ook wil ik hem bedanken voor zijn begeleiding en voor het aanreiken van de informatie die me mogelijk heeft gemaakt de materie te verwerken.

Drs. Tom Struys wil ik bedanken voor zijn begeleiding in het labo en zijn inzichten die geholpen hebben bij de vormgeving van mijn thesis.

Mijn tweede beoordelaar, Prof. Dr. Emmy Van Kerkhove, wil ik bedanken voor de tijd die zij aan het lezen van mijn thesis en het in orde brengen van de nodige papieren heeft besteed.

Ook de mensen van de afdeling MKA van het ziekenhuis Oost-Limburg, in het bijzonder Dr. C. Politis, verdienen een bedankje voor hun geduld tijdens mijn vele uren daar en voor de weefselstalen die ik door hen heb verkregen.

De afdeling morfologie was een aangename groep om deze tijd bij door te brengen, bij deze wil ik hen bedanken voor de gezelligheid en de hulp die ze me verleenden.

Deze 6 maanden waren waarschijnlijk een heel stuk eenzamer geweest zonder mijn medestudenten Maarten Willems en Inge Robeyns met wie ik het lokaal deelde. Ze zorgden voor de mogelijkheid tot discussie rond mijn onderwerp en de occasionele ontspannende babbel.

Tot slot wil ik graag mijn vriendin Mieke bedanken voor haar steun tijdens deze periode en voor de vele malen dat ze mijn thesis nalas.

Samenvatting

Inleiding: De tand wordt gekenmerkt door een enorme pijngevoeligheid. Drie hypothesen zijn reeds geformuleerd om deze gevoeligheid te verklaren. Een eerste hypothese postuleert dat de tubulaire dentinestructuur vloeistofbeweging toelaat. Deze bewegingen worden door de vrije zenuwuiteinden, die dicht bij het dentine liggen, geregistreerd en dit leidt tot pijnsensatie. De tweede hypothese gaat er vanuit dat het dentine zenuwuiteinden bevat die direct gestimuleerd kunnen worden. De derde hypothese neemt aan dat de odontoblast fungeert als een receptor en gekoppeld is aan de zenuwuiteinden in de pulpa. Deze derde hypothese zal in dit werk getest worden. Een tweede probleem dat zich voordoet is dat odontoblasten terminaal gedifferentieerde cellen zijn en niet meer kunnen vermenigvuldigen. Toch worden deze cellen na schade vervangen door nieuwe odontoblasten. De oorsprong van deze nieuw gedifferentieerde odontoblasten wordt hier onderzocht.

Materiaal en methode: Lichtmicroscopisch onderzoek werd uitgevoerd op voor S-100, GFAP en CGRP immunologisch gekleurde tand coupe orgaanculturen. Met de transmissie elektronenmicroscopie werd naar odontoblast-zenuwcel synapsvorming gezocht. Er werd getracht een odontoblast cultuursysteem aan te leggen uit gezonde humane pulpa door deze cellen bloot te stellen aan β GP of DMP. Immunokleuringen voor Vimentine, α -SMA, S-100 en GFAP werden uitgevoerd en de culturen werden elektronenmicroscopisch geanalyseerd.

Resultaten en discussie: Wanneer humaan pulpaal weefsel in cultuur gebracht wordt met toevoeging van β GP en DMP resulteert dit in een differentiële groei. De controle groeide een weinig sneller dan de β GP conditie. De DMP conditie had steeds een grote groeiachterstand. De DMP bevatten mogelijk proteïnes die groei inhiberen of is er een verminderde celgroei door een toename in differentiatie. De immunologische kleuringen voor S-100, GFAP, Vimentine en α -SMA suggereren dat er differentiërende cellen aanwezig zijn. Voor de oorsprong van deze gedifferentieerde cellen wordt gedacht aan cellen van mesenchymale oorsprong, stamcellen of pericyten. De EM analyse laat zien dat de cellen sterke synthetiserende eigenschappen vertonen alsook uitlopers hebben. De analyse van de tand coupe orgaanculturen bij ratten laten een relatie zien tussen de odontoblasten en neurale structuren. De odontoblasten zijn nauw gelegen aan de zenuwvezels en ze vertonen eigenschappen van een synaps. Ook werden er primaire cilia gedetecteerd die wel eens een receptorfunctie zouden kunnen hebben.

Conclusie: Voldoende resultaten geven de indruk dat er een mogelijke rol bestaat voor de odontoblast als sensorische receptor bij de dentinegevoeligheid. Er is echter nog geen duidelijkheid over het celtype waaruit nieuwe odontoblasten zich differentiëren na schade.

Lijst met afkortingen

ALPase	Alkaline phosphatase
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BME	Basal medium Eagle
CGRP	Calcitonin gene related peptide
DAB	Diaminobenzidine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMP	Dentine matrix proteïnes
EDTA	Ethylenediamine tetra-acetic acid
EM	Elektronenmicroscop
FCS	Fetal calf serum
GDNF	Glial derived neurotrophic factor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GM	Groeimedium
HRP	Horse radish peroxidase
LM	Lichtmicroscop
NGF	Nerve growth factor
PBS	Phosphate Buffer Saline
PLL	Poly-L-lysine
TEM	Transmissie elektronenmicroscop
α-SMA	Alpha-smooth muscle actin
βGP	β-Glycerofosfaat

Inhoudstafel

1	Inleiding	1
1.1	Algemene bouw van de tand	1
1.1.1	Glazuur	2
1.1.2	Dentine.....	2
1.1.3	Pulpa.....	2
1.1.4	Cement.....	2
1.1.5	Parodontaal ligament.....	3
1.1.6	Alveolair bot	3
1.1.7	Gingiva	3
1.2	Pulpa-dentine complex.....	3
1.2.1	Algemene samenstelling van de pulpa	4
1.2.2	Cellen van de pulpa	4
1.2.3	Matrix en grondsubstantie van de pulpa.....	7
1.2.4	Algemene samenstelling van het dentine	7
1.2.5	Dentinevorming.....	7
1.2.6	Types van dentine.....	8
1.3	Odontogenese	8
1.3.1	Lamina stadium.....	8
1.3.2	Knop Stadium	9
1.3.3	Knop naar kap transitie.....	10
1.3.4	Kap stadium	10
1.3.5	Vroege klok stadium	10
1.3.6	Late klok stadium.....	11
1.3.7	Tanderuptie	11
1.4	Bezenuwing van de tanden.....	12
1.4.1	Neurulatie van de pulpa.....	12
1.4.2	Verloop	13
1.4.3	Type zenuwvezels en eindpunten.....	14
1.5	Doel van het onderzoek.....	15
1.5.1	Het odontoblast cultuursysteem.....	15
1.5.2	De neuro-odontoblast relatie.....	16
2	Materiaal en methoden	17
2.1	Het odontoblast cultuursysteem.....	17
2.1.1	Weefselisolatie	17
2.1.2	Explant cultuur	17
2.1.3	Trypsinisolatie.....	18
2.1.4	Uitzaaiing.....	18
2.1.5	DMP en β GP behandeling	18
2.1.6	Immunohistologische kleuring.....	19
2.1.7	Lichtmicroscopisch onderzoek	20
2.1.8	Elektronenmicroscopische onderzoek.....	20
2.2	GFAP, S-100 en CGRP in tand coupe orgaan culturen	20
2.2.1	Tand coupe orgaan productie.....	20
2.2.2	Tand coupe orgaan cultuur	21
2.2.3	Immunohistologische kleuring.....	21
2.2.4	Lichtmicroscopisch onderzoek	22
2.2.5	Elektronenmicroscopisch onderzoek.....	22

3	Resultaten.....	23
3.1	Het odontoblast cultuursysteem.....	23
3.1.1	GFAP.....	23
3.1.2	α -SMA	25
3.1.3	Vimentine	28
3.1.4	S-100.....	31
3.1.5	Elektronenmicroscopische beelden van het odontoblast cultuursysteem.....	34
3.2	Tand coupe orgaan cultuursysteem.....	34
3.2.1	CGRP.....	34
3.2.2	GFAP.....	36
3.2.3	S-100.....	37
3.2.4	Primair ciulium en de neuro-odontoblast relatie.....	39
4	Discussie en conclusie.....	41
	Literatuurlijst.....	47
	Bijlagen.....	49
	Bijlage 1 Kwantitatieve bepaling van de immunokleuring	49
	Bijlage 2 Ontwikkeling van de GEMA-tabel.....	51
	Bijlage 3 Pixels- μ m omzetting in Image J van Nikon Coolscope afbeeldingen.....	53

1 Inleiding

De tanden zijn accessoire verteringsorganen. Hun functie bij het verteringsproces is het fijnmalen van voedsel zodat de inwerking van enzymen vergemakkelijkt wordt tijdens het verdere verteringsproces. Mensen hebben twee sets van tanden, 20 melktanden die uiteindelijk vervangen worden door 32 permanente tanden. Bij beide groepen zijn de tanden gelijk verdeeld over de boven- en onderkaak. De verschillende tandtypes (molaren, premolaren, hoektanden, snijtanden) hebben ook verschillende morfologische kenmerken, aantal wortels en functies. In de volgende secties zal ingegaan worden op de algemene bouw, ontwikkeling en bezuiging van de tanden. Er zal ook meer specifiek ingegaan worden op het pulpa-dentine complex. Als laatste zal het doel van het onderzoek aangekaart worden (1,2).

1.1 Algemene bouw van de tand

De tanden vervullen verschillende functies, waarvan kauwen de belangrijkste is. Om deze kauwfunctie uit te oefenen moeten de tanden hard zijn en stevig zijn vastgehecht aan het kaakbeen. Tand en tandbeen zijn voornamelijk samengesteld uit dentine, een verkalkt bindweefsel dat aan de tand haar basisvorm en haar rigiditeit verleent. Het dentine omsluit de pulpaholte waarin de pulpa zich bevindt, een bindweefsel dat bloedvaten, zenuwen en lymfevaten bevat. De pulpaholte loopt apicaal uit in wortelkanalen die uitmonden in de apicale foramina. Hierdoor passeren neuro-vasculaire en lymfatische structuren (2,4,5). Er kunnen ook accessoire kanalen aanwezig zijn die de pulpaholte met de buitenkant van de tand verbinden, ook hierdoor kunnen structuren zoals zenuwen lopen (3). Het kroondentine wordt bedekt met glazuur, het hardste materiaal in het lichaam, dat de tanden tegen slijtage beschermt. Het worteldentine wordt bedekt met cement, hetgeen de tand verbindt met het parodontaal ligament. De kroon en de wortel zijn tevens twee van de drie anatomische regio's van de tand. De derde regio, de overgang tussen de twee vorige, is de hals. De term klinische kroon wordt gebruikt om dat deel van de tand aan te duiden dat in de mondholte zichtbaar is. De klinische wortel is dan dat deel dat zich in de alveolus bevindt.

De tanden zijn vastgehecht aan het bot van de kaak door tandondersteunend bindweefsel bestaande uit cement, parodontaal ligament en alveolair bot. Deze structuren geven een stevige vasthechting aan de tand die toch flexibel genoeg is om de krachten van het kauwen te weerstaan (2,4,5).

1.1.1 Glazuur

Het glazuur, geproduceerd door ameloblasten, is het meest gemineraliseerde en hardste materiaal in het lichaam. Het bestaat voor 96% uit anorganisch materiaal, voornamelijk hydroxyapatiet kristallen. Glazuur is een niet-vitaal en ongevoelig weefsel en kan na schade niet worden hersteld of vervangen. Haar structuur en samenstelling laten het glazuur toe de grote wrijvingskrachten van het kauwen te weerstaan en zowel zuur- als bacteriële aanvallen aan te kunnen. Ook al is glazuur strikt biologisch dood weefsel, toch is er door haar permeabiliteit ionenuitwisseling mogelijk met de omgeving (5, 6).

1.1.2 Dentine

Dentine vormt het grootste deel van de tand, het ondersteunt het glazuur en compenseert voor diens breekbaarheid. Het is namelijk zo dat glazuur wel zeer stevig is op het gebied van slijtage maar onder hoge druk gemakkelijk breekt tenzij er een meer veerkrachtige structuur onder aanwezig is. Het dentine en het pulpaweefsel zijn van dezelfde oorsprong en zouden als een geheel beschouwd kunnen worden, dit zal ook gebeuren in het onderdeel het pulpa-dentine complex waar verder op dit weefsel wordt ingegaan (5).

1.1.3 Pulpa

De pulpa, gelegen in de centrale pulpakamer, is een zacht bindweefsel, wordt besproken samen met het dentine in het onderdeel het pulpa-dentine complex. De pulpa vormt, onderhoudt, beschermt en herstelt het dentine en om die redenen worden beide componenten best samen besproken (5).

1.1.4 Cement

Het cement is bleekgeel van kleur, zachter en meer permeabel dan dentine. Met toenemende leeftijd neemt deze permeabiliteit af, maar blijft in cellulair cement hoger dan in acellulair cement. Cement bedekt de tandwortel en is stevig geassocieerd met het worteldentine. Het is een gemineraliseerd bindweefsel gelijkaardig aan bot behalve dan dat cement avasculair is. De vorming gebeurt door cementoblasten en de structuur is voor meer dan de helft gemineraliseerd met apatiet kristallen, voornamelijk hydroxyapatiet. De organische matrix is voornamelijk type I collageen en kan zowel door de cementoblasten als door het parodontaal ligament zijn geproduceerd. Er zijn twee types cement zoals reeds vermeld, cellulair en acellulair cement. Acellulair, primair cement bekleedt het bovenste deel van de wortel en verankert de tand aan het parodontaal ligament. Cellulair, secundair cement bekleedt de

apicale delen van de wortel en heeft een adaptieve rol. Bij dit cement zijn cementoblasten in lacunae vast komen te zitten en deze worden nu cementocyten genoemd (5,7).

1.1.5 Parodontaal ligament

Het parodontaal ligament is het zacht, gespecialiseerd bindweefsel dat zich tussen het cement en het bot van de tandalveolus bevindt. Het is het dunste in het middelste deel van de wortel en neemt in dikte af met toenemende leeftijd. De primaire functie is het ondersteunen van de tand in diens alveolus en tegelijkertijd de tand toelaten de enorme kracht van het kauwen te weerstaan. Een secundaire functie is die als sensorische receptor (8).

1.1.6 Alveolair bot

Alveolair bot is dat deel van de maxilla of mandibula dat de tanden ondersteunt en beschermt. De scheiding tussen het alveolus en de rest van het bot is een kwestie van afspraak. Bot is een aanhechtingsvlak van spieren, fungeert als ion reservoir en als matrix voor het beenmerg. Alveolair bot is afhankelijk van de aanwezigheid van tanden voor zijn ontstaan en onderhoud. Het minerale gedeelte is hydroxyapatiet. Het grootste deel van het organisch materiaal is collageen type I. Het is sterk maar toch plastisch, en kan dus snel geremodelleerd worden (9).

1.1.7 Gingiva

De gingiva is dat deel van de orale mucosa dat de tand en het alveolair bot omringt en eraan bevestigd is. Het is functioneel in twee delen op te delen, het deel dat de alveolen bedekt om weerstand te bieden bij het kauwen en het deel direct aan de tand gelegen dat als functie heeft de tand aan de gingiva te bevestigen. Deze bevestiging is niet impermeabel en kan antigenen doorlaten hetgeen tot gingivitis kan leiden (5,10).

1.2 Pulpa-dentine complex

Dentine en pulpa zijn beide gevormd uit de tandpapil en beide weefsels blijven nauw geassocieerd tijdens ontwikkeling en doorheen het leven van de tand. Ze worden bijgevolg dan ook beschreven onder de naam pulpa-dentine complex.

Bij de algemene bouw van de tand werd al reeds kort het dentine en de tandpulpa aangehaald. In dit onderdeel zal er verder op dit complex worden ingegaan omtrent de bouw samenstelling en functie.

1.2.1 Algemene samenstelling van de pulpa

De tandpulp is het zachte bindweefsel dat het dentine ondersteunt. Histologisch is de pulpa in te delen in vier zones. Deze zones zijn van periferie naar binnen toe de odontoblastzone, een celvrije zone of zone van Weil, een celrijke zone en de pulpa kern waarin de belangrijkste bloedvaten en zenuwen zich bevinden. Het pulpale weefsel bestaat uit een cellulair en een extracellulair compartiment (11).

1.2.2 Cellen van de pulpa

De voornaamste cellen die in de pulpa voorkomen zijn de odontoblasten, fibroblasten en de ongedifferentieerde ectomesenchymale cellen waaruit de twee vorige gevormd kunnen worden. Buiten de cellen geassocieerd met de neurovasculaire voorziening bevinden zich ook drie belangrijke types immunocompetente cellen, namelijk macrofagen, dendritische cellen en lymfocyten (11,12,13).

Odontoblast

De odontoblasten zijn de meest opvallende cellen van de tandpulp. Ze begrenzen de periferie van de pulpa en hebben uitlopers die tot in het dentine komen. In gezonde tanden is het aantal odontoblasten gelijk aan het aantal dentinetubuli, waarin de odontoblastuitlopers zitten. Zowel het aantal odontoblasten als het aantal dentinetubuli verschillen naargelang het tandtype en de locatie in de tand. Het aantal odontoblasten in het coronale dentine wordt geschat te liggen tussen 59.000 en 76.000 cellen per mm². Dit aantal is lager in het worteldentine. De odontoblasten in de kroon zijn iets langer dan odontoblasten in de wortel, dit komt doordat tijdens de migratie naar het centrum de odontoblasten in de kroon steeds minder plaats hebben en elkaar platduwen.

De morfologie van de odontoblasten reflecteert hun functie en varieert van een actieve synthetiserende toestand naar één in rust. De actieve cel is uitgerokken en heeft een basaal gelegen kern met veel basofiel cytoplasma. Ze bevat ook veel synthesegeëlateerde organellen zoals Golgi-complex, ruw endoplasmatisch reticulum, mitochondriën en talrijke vesikels. Een odontoblast in rust is korter en dikker, heeft weinig cytoplasma, weinig synthesegeëlateerde organellen en een meer apicale, hematofiele kern. Er is nog een derde, overgangsfase tussen deze twee odontoblastfases. De overgangsongodontoblast is smaller, heeft een minder basaal gelegen kern en minder synthesegeëlateerde organellen. Ze bevat meer gecondenseerd chromatine en autofage vacuolen voor cytoplasma reorganisatie.

De collageensynthese in de odontoblast en diens intracellulair en extracellulaire assemblage is gelijkaardig aan die van de fibroblast. Uiteindelijk zullen de secretoire granules die het collageen bevatten naar de odontoblastuitloper getransporteerd worden waar hun inhoud wordt vrijgegeven aan het extracellulair milieu.

De odontoblastuitloper begint aan de nek van de cellen net boven het apicaal junctioneel complex. Bij dit complex versmalt de cel geleidelijk aan en dringt ze het dentine binnen. De uitloper bevat geen organellen maar wel veel microtubuli en filamenten. Aan het celmembraan van de uitloper is er ook sprake van pinocytotische activiteit.

Tussen aanliggende odontoblasten komen verbindingen zoals gap junctions, tight junctions, desmosomen, etc. Waar het cellichaam overgaat in uitloper nemen de verbindingen de vorm aan van een junctioneel complex voornamelijk bestaande uit adherens verbindingen verspreid tussen tight junctions gebieden. De actine-filamenten, die aan de adherens verbindingen verbonden zijn, zijn prominent en vormen een terminaal web. Dit junctioneel complex omsluit niet de volledige cel.

De levensverwachting van een odontoblast wordt geschat op de levensduur van een levensvatbare tand omdat de odontoblasten terminaal gedifferentieerde cellen zijn (11,14,15).

Het primair cilium is een bijna alomtegenwoordig organel in gewervelde dieren. Het wordt op de meeste cellen teruggevonden, ook op odontoblasten. De primaire cilia zijn bedekt met een gespecialiseerd plasma membraan. De primaire cilia hebben een 9+0 microtubuli opbouw, bestaande uit 9 buitenste doubletten, met afwezigheid van het centrale paar. Dit centrale paar is nodig om bewegingsfunctie aan de cilia te verlenen, de primaire cilia kunnen dus niet instaan voor beweging. De cilia hebben als basis een basaal lichaam dat van een centriool afgeleid is en als microtubuli organisatorisch centrum optreedt. In de odontoblast ligt het primair cilium dicht bij het centriool en in de nabijheid van het Golgi complex (16,17,18,19,20). Onderzoek heeft bevestigd dat primaire cilia aanwezig zijn op odontoblasten afkomstig uit alle zones van de pulpa (17).

De functies van de primaire cilia nog niet achterhaald. Recent zijn er studies gedaan naar de mogelijke sensorische rol die de primaire cilia zouden kunnen vervullen (21).

Fibroblast

De fibroblasten zijn de meest voorkomende cellen van de pulpa, voornamelijk aanwezig in het coronale deel waar zij de celrijke zone vormen. Hun functie is het vormen en onderhouden van de pulpale matrix dewelke bestaat uit collageen en grondsubstantie. Ze hebben ook de capaciteit om collageen op te nemen en af te breken. Naarmate de leeftijd van de pulpa

toeneemt neemt de synthesebehoefte af en verandert het uiterlijk van deze cel van dikke met veel secreterende organellen naar afgeplatte spoelvormige cellen met een dichte kern (11).

Ongedifferentieerde ectomesenchymale cellen

Deze ongedifferentieerde ectomesenchymale cellen zijn de cellen waarvan, afhankelijk van de stimuli, odontoblasten of fibroblasten gevormd kunnen worden. Ze zijn te vinden in het celrijke gebied van de pulpa kern en worden vaak in de nabijheid van bloedvaten aangetroffen. Hun aantal en bijgevolg de regeneratieve capaciteit van de pulpa, neemt af bij het ouder worden. Ze zijn herkenbaar aan hun veelvuldig cytoplasma en perifere cytoplasmatische uitlopers. Het zijn grote veelhoekige cellen met een grote lichtgekleurde centraal gelegen kern (11).

Lymfocyten

B lymfocyten zijn schaars in de gezonde pulpa, T lymfocyten komen er vaker in voor. Tijdens chronische ontsteking neemt hun aantal toe. Polymorfonucleaire leukocyten komen enkel voor tijdens ontsteking (11,12).

Dendritische cellen

Deze antigen presenterende dendritische cellen, gevormd uit beenmergcellen, bevinden zich in en rond de odontoblastenlaag vóór eruptie en onder de odontoblastenlaag na eruptie. Ze hebben een nauwe relatie met vasculaire en neurale structuren en hun functie is gelijkaardig aan die van epitheliale Langerhans cellen. Deze cellen staan in voor immunosurveillance en nemen in aantal toe in gecarieerde tanden, ze infiltreren dan de odontoblastenlaag en laten hun uitlopers de dentinetubuli binnengaan (11).

Macrofagen

Macrofagen zijn doorheen de gehele pulpa verspreid en zijn herkenbaar aan hun spoelvormig groot ovale uiterlijk met een donker gekleurde nucleus. Hun functie is het opruimen van dode cellen. Hiervoor hebben ze lysosomen ter beschikking die zichtbaar zijn als klare gebieden in hun cytoplasma. Macrofagen en dendritische cellen nemen ongeveer 8% van de totale pulpa celpopulatie voor hun rekening waarbij er meer dendritische cellen zijn dan macrofagen (11).

1.2.3 Matrix en grondsubstantie van de pulpa

Het extracellulaire compartiment van de pulpa, ook wel matrix genoemd, bestaat uit collageenvezels en een grondsubstantie. Collageen is het meest voorkomende proteïne in de tandpulp (34%) en komt voornamelijk voor als type I en III collageen. Van al het collageen is 60% type I de rest bijna volledig type III, een ratio die behouden wordt, ondanks het feit dat de hoeveelheid collageen toeneemt met stijgende leeftijd. Op jonge leeftijd liggen de collageenfibrillen verspreid doorheen de pulpa, later zullen deze zich in vezelbundels organiseren. Er zijn regionale verschillen in de collageendistributie, de grootste concentratie zijne apicaal en de laagste coronaal.

De grondsubstantie bestaat voornamelijk uit glycosaminoglycanen, glycoproteïnen en water. De glycosaminoglycanen zijn samen met de oligosacchariden de zijketens op de proteïne kern in de voornaamste component van de grondsubstantie, proteoglycaan. Het voornaamste glycoproteïne is fibronectine. De grondsubstantie ondersteunt de cellen en fungeert als transportmedium voor nutriënten van bloedvat naar cel en voor metabolieten van cel naar bloedvat. Verandering in de samenstelling bij het ouder worden of ziekte interfereert met deze functie (11,12,22).

1.2.4 Algemene samenstelling van het dentine

Dentine is een hard elastisch geelwit niet-vasculair weefsel dat de centrale pulpaholte omsluit. Het bestaat voor 70% uit anorganisch materiaal, voornamelijk hydroxyapatiet als plaatvormige kristallen. De organische component, die 20% van het dentine volume inneemt, bestaat voornamelijk uit collageen. De rest van het organische aspect bestaat uit dentine fosfoproteïnen, glycoproteïnen, dentine matrix proteïnen, en andere. Een karakteristiek kenmerk van het dentine is de permeabiliteit door de vele tubuli die de volledige dikte van het dentine doorkruisen. Deze tubuli bevatten cytoplasmatische uitlopers van de cellen die het dentine gevormd hebben en onderhouden, de odontoblasten (5,11).

1.2.5 Dentinevorming

Dentine wordt door de odontoblasten eerst geproduceerd onder de vorm van predentine. Predentine is de laag ongeminaliseerde matrix gelegen net onder het dentine. Predentine mineraliseert geleidelijk aan ter vorming van dentine. Dit gebeurt doordat verscheidene niet-collageen matrixproteïnes worden ingebouwd. Deze incorporatie gebeurt in een regio die mineralisatiefront genoemd wordt. De dikte van het predentine blijft constant omdat de mineralisatie en de vorming van nieuw predentine gelijk is (11,23).

1.2.6 Types van dentine

Er wordt onderscheid gemaakt tussen drie types van dentine, primair, secundair en tertiair. Het dentine dat tijdens de odontogenese door de odontoblasten wordt geproduceerd heet primair dentine. Het grootste deel van de tand bestaat uit dit primair dentine. Nadat de wortelvorming voltooid is en de tand dus eigenlijk “af” blijft er een continue dentineproductie doorgaan. Dit proces is veel trager het product wordt secundaire dentine genoemd. Doorheen het leven van de tand zal door de productie van dit secundaire dentine de pulpaholte verkleinen. Tertiair dentine kan door bestaande of door nieuw gevormde odontoblasten worden geproduceerd als antwoord op verschillende stimuli zoals cariës. De productie gebeurt enkel door die cellen die direct door de stimulus worden beïnvloed. Het tertiaire dentine kan al dan niet tubuli bevatten al dan niet onregelmatig of continu met bestaande tubuli (11,24).

1.3 Odontogenese

De odontogenese, de tandontwikkeling, kan ingedeeld worden in 3 overlappende fases: initiatie, morfogenese en histogenese. De initiatie is de determinatie van de positie van de tanden. Hier wordt de exacte plaats van de toekomstige tanden bepaald door het verschijnen van de tandkiem. Deze tandkiem is gelegen aan een invaginatie van het orale epitheel, de dentale lamina genaamd. Tijdens de morfogenese, zal de vorm en de grootte van de tand bepaald worden door een combinatie van celproliferatie en celmigratie. Tijdens de histogenese gebeurt de differentiatie van de cellen. Dit proces begint al tijdens de morfogenese, met als eindresultaat volledig gevormde dentale weefsels, zowel de gemineraliseerde als de ongemineraliseerde.

Odontogenese wordt gekarakteriseerd door complexe interacties tussen de dentale epitheliale en mesenchymale weefsels, waarbij voor elke stap in de ontwikkeling complexe met elkaar verweven cascades van genexpressie plaatsvinden om de cellen in de juiste richting te sturen in hun differentiatie, migratie en proliferatie. Tandontwikkeling kan ook onderverdeeld worden in makkelijk microscopisch herkenbare stadia, deze zijn van vroeg tot laat: lamina, knop, kap, vroege klok en late klok stadium gevolgd door de eruptie van de tand in de mondholte. Deze stadia zullen hier verder kort besproken worden waarbij niet ingegaan wordt op de complexe netwerken van genexpressie (25,26,27,28).

1.3.1 Lamina stadium

In het embryo wordt de primitieve mondholte, het stomatodeum, bekleed door een epitheel laag van 2 à 3 cellen dik die het onderliggende ectomesenchym bedekt. Dit

ectomesenchym is embryonaal bindweefsel waarin neurale crista cellen zijn in gemigreerd en het bestaat uit een weinig aantal spoelvormige cellen gescheiden door een gelatineachtige grondsubstantie. Een verdikking van dit orale epitheel is het eerste morfologische teken van odontogenese en is zichtbaar rond ongeveer de 5^{de} week van de menselijke ontwikkeling. Deze verdikking, ook wel dentale lamina genoemd, komt enkel voor daar waar het tandorgaan zich gaat ontwikkelen. Deze dentale lamina heeft het potentieel om tandvorming te induceren door de acties van het onderliggende ectomesenchym te dicteren.

Na ongeveer 37 dagen ontwikkeling zal er zich een continue hoefijzervormige band van verdikt epitheel gevormd hebben in zowel de toekomstige boven- als onderkaak. De vorming van deze verdikte epitheliale banden is niet zozeer het gevolg van een toegenomen proliferatie maar van een verandering in de oriëntatie van de mitotische spoel en het klievingvlak van deze cellen. Elke epitheliale band, ook wel primaire epitheliale band, geeft al snel aanleiding tot de vorming van de vestibulaire lamina en de dentale lamina. De vestibulaire lamina prolifereert en dringt het ectomesenchym binnen waarna de cellen snel vergroten en vervolgens degenereren ter vorming van de vestibule tussen de wang en het tanddragende gedeelte. In de dentale lamina is er voortgezette en gelokaliseerde proliferatie-activiteit en dit leidt in het volgende stadium tot de vorming van epitheliale uitgroeiingen in het ectomesenchym op de plaatsen van de toekomstige melktanden. De epitheliale cellen groeien en prolifereren sneller dan het onderliggende ectomesenchym, hierdoor zullen de ectomesenchymale cellen beginnen te accumuleren rond de epitheliale uitgroeiingen (25,26,29).

1.3.2 Knop Stadium

Het knopstadium wordt gekenmerkt door de eerste epitheliale indringing in het ectomesenchym van de kaak, hierbij vertonen de epitheliale cellen weinig tot geen verandering in vorm of functie. Terwijl de dentale lamina verder groeit en verdikt ter vorming van een knop, prolifereren en condenserende cellen van het ectomesenchym. Ze raken dicht bij elkaar gepakt onder en rond de epitheliale knop en vormen stilaan de tandpapil. Tijdens dit stadium wordt het inductieve of tandvormingspotentieel overgedragen van de dentale epitheel naar het ectomesenchym. De tandpapil zal vanaf nu ook de tandontwikkeling onderhouden (25,26).

1.3.3 Knop naar kap transitie

Tijdens de overgang van knop naar kap ontstaan de morfologische verschillen tussen de tandkiemen die de verschillende tandtypes zullen vormen. De transitie tussen de knop en kap stadia is tevens een belangrijke stap in de odontogenese, daar deze het begin van de kroonvorming beslaat. De glazuur knoop is hierbij een belangrijk organisatorisch centrum dat cuspace patroonvorming initieert, de vorm van de kroon bepaalt en de ontwikkeling van de tandpapil beïnvloedt. Nadat cuspace patroonvorming compleet is, ondergaat de glazuur knoop apoptose bij het begin van het vroege klok stadium. De glazuur knoop ontstaat uit de enige cellen in de centrale regio van het tandorgaan die niet groeien (25,26,30).

1.3.4 Kap stadium

In dit stadium neemt de tandknop de vorm aan van een kap die omringd wordt door tandpapil. Van dit tandorgaan wordt het gedeelte van ectodermale oorsprong dentaal of glazuur orgaan genoemd. Het glazuur orgaan en tandpapil worden omkapseld door een andere laag van gecondenseerde mesenchymale cellen, tandfollikel genaamd, deze scheidt de tandorgaan papil van de andere bindweefsels van de kaak en zal de ondersteunende structuren van de tand vormen.

Terwijl de epitheliale knop verder prolifereert in het ectomesenchym, neemt de cellulaire dichtheid onmiddellijk aangrenzend aan de epitheliale knop verder toe. Dit proces wordt ook wel eens ectomesenchymale condensatie genoemd, het resulteert uit een lokaal groepje cellen die niet geslaagd zijn in het produceren van een extracellulaire substantie en bijgevolg niet los zijn geraakt van elkaar. Naarmate de knop groter wordt sleurt het een deel van de dentale lamina met zich mee, waardoor de knop via de laterale lamina, een extensie van de dentale lamina aan de dentale lamina vast hangt. De epitheliale uitgroei, dentaal orgaan, glazuur orgaan, vormt glazuur van de tand. De kern van gecondenseerd ectomesenchymale cellen, de tandpapilla genaamd vormt de dentine en de pulp (25,26).

1.3.5 Vroege klok stadium

In het vroege klok stadium heeft elke laag van het tandorgaan een speciale functie aangenomen. De wederzijdse uitwisseling van moleculaire informatie tussen tandorgaan en tandpapil beïnvloeden de belangrijke gebeurtenissen die leiden tot celdifferentiatie in het late klok stadium.

De cellen van het tandorgaan gaan verder met delen tegen verschillende snelheden, waardoor het tandorgaan stilaan de vorm aanneemt van een klok. Het tandorgaan wordt bekleed door

een externe of buitenste dentale epitheel en een interne of binnenste dentale epitheel. Het externe of buitenste dentale epitheel is een enkele laag van kubusvormige cellen en bekleedt de periferie van het tandorgaan, terwijl de interne of binnenste dentale epitheel bestaat uit cilindervormige cellen die grenzen aan de tandpapil. Uit het binnenste dentale epitheel zullen zich de ameloblasten vormen. Cellen gelokaliseerd in het centrum van het tandorgaan produceren grote hoeveelheden glycosaminoglycanen. Deze zijn in staat grote hoeveelheden vloeistoffen en groeifactoren vast te houden die tot een expansie leiden. Dit netwerk van stervormige cellen wordt stroma reticulum genoemd. Tussen dit reticulum en het interne epitheel is een dunne laag afgeplatte cellen, stratum intermedium aanwezig. Deze cellen produceren grote hoeveelheden alkaline phosphatase (ALPase). Het stratum intermedium beïnvloedt de biomineralisatie van het glazuur. Het interne en externe epitheel komen apicaal samen als de cervicale lus (25).

1.3.6 Late klok stadium

In het late klok stadium van de odontogenese verdwijnt de dentale lamina, de verbinding tussen het tandorgaan en het orale epitheel, geleidelijk aan. In deze fase wordt ook de vorm van de kroon bepaald door het verder uitgroeien van de interne dentale epitheel cellen. Odontoblasten verschijnen nu voor het eerst als gedifferentieerde cellen uit de meest perifere cellen van de tandpapil. Vanaf nu wordt de tandpapil tandpulp genoemd.

In dit stadium leggen odontoblasten de eerste laag predentine matrix neer en differentiëren cellen van de interne dentale epitheel verder in ameloblasten, glazuurproducerende cellen. Terwijl ze het glazuur produceren trekken de ameloblasten zich terug naar de buitenrand van de kroon waar men denkt dat ze apoptose ondergaan, dit in contrast met de odontoblasten die het hele leven van de tand metabolisch actief zijn.

Terwijl de wortelvorming verder verloopt, prolifereren de epitheliale cellen van de cervicale lus en beïnvloeden de differentiatie van odontoblasten uit de tandpapil en cementoblasten uit het follikel mesenchym. Dit leidt tot de depositie van worteldentine en cement.

Uit het tandfollikel zullen zich de componenten van periodontium, parodontaal ligament fibroblasten, het alveolair bot het cement ontwikkelen (25).

1.3.7 Tanderuptie

De tanderuptie is in essentie de beweging van de zich ontwikkelende tand in diens follikel als resultaat van het verschil in groeisnelheid van de pulp en het follikel. Tanderuptie hangt dus

niet alleen af van wortelvorming of botdepositie. Tevens duidt dit stadium de eindfase van de odontogenese aan.

Tijdens het eruptieproces wordt de verkalkte tandkroon weggedragen van de follikelbasis en gaat de wortelvorming verder. Vooraleer de kroon de mondholte bereikt moet ze doorheen de benige crypten en het bovenliggende mucosa raken. Dit kan doordat het overliggende bot al snel geresorbeerd wordt, waarna de kroon doorheen het mucosa bindweefsel beweegt waar ervoor al een zekere afbraak plaatsvond. De glazuur kroon is, sinds de glazuurvorming ten einde kwam, bedekt met een gereduceerd glazuurepitheel (laag ameloblasten, overblijfselen van de andere drie lagen glazuur orgaan) dat, terwijl de tand beweegt in diens follikel, het epitheel van het overliggende tandvlees nadert en ermee versmelt. Via dit gebied van versmolten epitheel komt de kroon de mondholte binnen, dit zonder dat het omliggende bindweefsel bloot komt te liggen en zonder bloedingen. Dit laatste is te wijten aan het degenereren van cellen in de centrale massa van het versmolten epitheel ter vorming van het epitheliale kanaal waardoor de kroon kan migreren. Uit dit versmolten epitheel ontstaat ook de dentogingivale junctie. Tanderuptie en wortelvorming gaan verder zolang het apicale foramina openblijft (26,31,32).

1.4 Bezenuwing van de tanden

Anatomische karakteristieken van de tandbezenuwing geven inzicht in de functionele capaciteiten alsook de beperkingen van dit orgaan. In dit deel wordt bezenuwing in drie punten behandeld. De eerste sectie gaat over de neurale ontwikkeling van de tand tijdens de odontogenese. De tweede sectie komt terug op welk traject de zenuwvezels afleggen om de periferie van de pulpa te bereiken. Het laatste punt van dit onderdeel gaat in op de verschillende zenuwvezels die aanwezig zijn in de pulpa en waar ze hun eindpunten hebben.

1.4.1 Neurulatie van de pulpa

De tand is in vergelijking met andere sensorische organen relatief laat met haar neurale ontwikkeling. Zo zijn tanden al gedurende een redelijk lange periode functioneel actief voordat hun bezenuwing voltooid is. Het exacte tijdstip wanneer zenuwen de tand binnendringen is variabel maar gebeurt ruim vóór de wortelvorming (33,34).

De zich ontwikkelende tand wordt tijdens de knop en kap stadia van de odontogenese door de eerste zenuwen benaderd. Deze pionierszenuwen zijn ongemyeliniseerd en hebben de tandfollikel als doelwit. Tijdens het knop stadium liggen takken van de alveolaire zenuwen dicht bij de basis van de ontwikkelende papil. Deze zenuwtakken zullen tijdens het vroege

kap stadium een basaal plexus vormen onder de papil en zullen verdere takken afgeven in het ontwikkelende follikel tijdens het late kap stadium. Het follikel wordt dus eerder bezenuwd dan de papil. Pas wanneer de dentinogenese begint, penetreren de zenuwen de tandpapil, de latere pulpa.

De timing van het neerleggen van de papillaire vasculaire en neurale voorzieningen verschilt, hetgeen een mogelijke relatie omtrent hun ontwikkeling in de tand uitsluit. Er zijn geen autonome zenuwvezels aanwezig bij de pionierszenuwvezels die de tandkiem benaderen. Bijgevolg is de initiële bezenuwning van de zich ontwikkelende tand bedoeld voor de sensorische bezenuwning van het toekomstige parodontaal ligament en pulpa. Het glazuur orgaan wordt nooit door zenuwvezels doorkruist (26,35).

1.4.2 Verloop

Sensorische zenuwvezels komen de tand binnen als een of meerdere tandzenuwen. Deze zenuwen bestaan net zoals andere sensorische perifere zenuwen, uit een parallel gerangschikte mengeling van gemyeliniseerde en ongemyeliniseerde zenuwvezels. Bijna alle zenuwvezels komen de tand binnen via één of een klein aantal apicale foramina, slechts enkele komen soms binnen via de accessoire kanalen. Zenuwvezels lopen gegroepeerd in zenuwbundels doorheen de wortelpulpa. Er gebeuren slechts weinig terminale vertakkingen in de wortelpulpa zodat slechts een klein aantal ongemyeliniseerde axonen te vinden zijn in de periferie. Het percentage zenuwvezels die eindigen in de wortel ligt waarschijnlijk lager dan 10%. Zenuwvezels en bloedvaten komen vaak samen voor als een neurovasculaire bundel. Hierop zijn veel uitzonderingen te vinden en dus wordt de associatie meer als toevallig beschouwd, rekening houdend met het kleine volume van de pulpa.

In de coronale pulpa divergeren de zenuwbundels, ze waaieren als het ware uit op hun weg naar de pulpa-dentine grens. Zenuwdivergentie gaat verder tot elke zenuwbundel zijn integriteit als bundel verliest met steeds kleinere vezelgroeperingen. De route die ze volgen is relatief recht totdat de vezels via haarspeldbochten lussen vormen. Het resulterende netwerk wordt ook wel plexus van Rashkov genoemd. De functie van deze plexus is nog onbekend en verandert van configuratie bij dentinevorming. De aanwezigheid van zenuwvezels in dentine werd reeds aangetoond. De vraag of ze vast komen te zitten tijdens de dentinevorming is nog niet beantwoord.

Vier types van terminale configuratie worden beschreven. In een eerste configuratie lopen eenvoudige marginale zenuwvezels van het subodontoblast zenuwplexus naar de odontoblastenlaag, maar deze gaan het predentine niet binnen. In een tweede type lopen

eenvoudige predentinale zenuwvezels recht of spiraalvormig door de dentinetubuli. Bij het derde type reiken complexe predentinale zenuwvezels tot in het predentine en ondergaan terminale vertakking met meervoudige takken en vergrotingen op het einde van elke tak. Penetratie in het dentine is hierbij tot enkele μm beperkt. Bij het laatste type lopen dentinale zenuwvezels zonder transverse routes of vertakkingen doorheen de dentinetubuli. Deze vorm van penetratie is meestal beperkt tot ongeveer 100 μm (35).

1.4.3 Type zenuwvezels en eindpunten

De sensorische voorziening van de tanden eindigt voornamelijk in de coronale odontoblastenlaag, in het predentine en in het binnenste dentine. Morfologisch bestaat de sensorische voorziening van de tand uit zes verschillende soorten vezels waarvan elk zijn voorkeurslocatie heeft.

De middelgrote, A β , gemyeliniseerde vezels nemen slechts een klein aandeel van de bezenuwing voor hun rekening. Ze bezenuwen voornamelijk het dentine en de dentine-pulpagrens nabij de toppen van de pulpahoornen. Op A β -vezels ontbreken receptoren voor de lage affiniteit nerve growth factor (NGF) receptor en deze vezels zijn de meest gevoelige vezels voor mechanische (hydrodynamische) stimulatie van dentine. De A β -vezels vormen sommige van de grootste eindpunten die in nauw contact komen met de odontoblasten.

Ongeveer 25-50% van de tandzenuwvezels behoren tot de kleine gemyeliniseerde, A δ -vezels die het neuropeptide calcitonin gene related peptide (CGRP) en receptoren voor NGF tot uiting brengen. De meeste van deze vezels bezenuwen dentine, predentine en de odontoblastenlaag in de coronale regionen onder het glazuur. De dentinale eindpunten komen voor dichtbij de odontoblast uitlopers en zouden een soort van associatie hiermee kunnen aangaan. De meeste van de A δ -bezenuwing is geconcentreerd in het dentine nabij de pulpahoorn top. Het is progressief minder frequent nabij de cervicale regio en minst voorkomend in het worteldentine. De A δ -vezels kunnen opgedeeld worden in trage en snel geleidende vezels, respectievelijk A δ -s en A δ -f. De A δ -s-vezels zijn capsaicine gevoelig en eindigen voornamelijk in de primaire pulpa. De A δ -f-vezels zijn voornamelijk te vinden in de nabijheid van odontoblastuitlopers en lopen dieper het dentine in.

Het grootste deel van de zenuwvezels in de tanden zijn ongemyeliniseerde, traag geleidende C-vezels. De meeste worden gereguleerd door NGF in de volwassen tand. Ongeveer de helft heeft ook NGF nodig tijdens de ontwikkeling, terwijl andere brain derived neurotrophic factor- (BDNF) of glial derived neurotrophic factor- (GDNF) afhankelijk zijn. Ondanks de verschillen in morfologie en terminale distributie zijn de meeste C-vezels van de pulpa

functioneel redelijk uniform. Ze zijn polymodaal en reageren op capsaïcine en op ontstekingsmediatoren zoals histamine en bradykinine. C-vezels brengen NGF-receptoren en neuropeptides zoals substance P, CGRP of neurokinine A tot uiting. Ze hebben hun eindpunten in de perifere pulpa of langs de bloedvaten en worden voornamelijk geactiveerd door pulpale schade (36).

1.5 Doel van het onderzoek

Het doel van dit onderzoek is tweeledig. Er zal getracht worden odontoblasten te laten differentiëren uit pulpale cellen om zo een odontoblast cultuursysteem te verkrijgen. Een tweede doel is een interactie te zoeken tussen de odontoblasten en zenuwcellen.

1.5.1 *Het odontoblast cultuursysteem*

De levensduur van een odontoblast wordt algemeen aanvaard zijnde hetzelfde als de levensduur van een levensvatbare tand. Dit omdat odontoblasten terminaal gedifferentieerde cellen zijn en zichzelf niet meer kunnen vermenigvuldigen door celdeling. Dit leidt tot een belangrijk probleem bij beschadiging van het pulpale weefsel door tandschade zoals cariës, hetgeen lethaal is voor odontoblasten.

Herstel van deze tandschade vindt plaats door de formatie van nieuw dentine door odontoblasten. Dit betekent dat nieuwe odontoblasten gedifferentieerd zijn uit pulpale cellen en vervolgens migreerden naar de plaats van beschadiging. De differentiatie van odontoblasten tijdens de odontogenese is afhankelijk van een cascade van determinanten, zoals de aanwezigheid van cellen van het binnenste dentale epitheel. Epitheliale cellen zijn echter niet meer aanwezig in de ontwikkelde tand en dus zal de stimulus voor de differentiatie van nieuwe odontoblasten moeten komen op een verschillende en tot nu toe ongekende manier (11).

Er zal getracht worden een primaire odontoblasten cultuursysteem op te zetten uit gezonde humane pulpa door deze pulpale cellen in cultuur te brengen met toevoeging van beta-glycerofosfaat (β GP) of dentine matrix proteïnes (DMP). Bij tandschade komt de pulpa in aanraking met dentine matrix proteïnes die vrijkomen na deze schade. Mogelijk initiëren deze stoffen een differentiatie van pulpale cellen naar odontoblasten. Om het mineralisatie proces te laten plaatsvinden is er voldoende calcium en fosfaat nodig en deze reactie moet gecontroleerd worden. In cel culturen is er meestal voldoende calcium aanwezig in het cultuur medium, zo ook in het Basal medium Eagle (BME) medium en het Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) onder de vorm van 1,80 mM Calcium Chloride ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). De

fosfaat concentratie wordt artificieel verhoogd door de toevoeging van 10 mM β GP. Het is bekend dat voor mineralisatie het proteïne ALPase door de cellen wordt geproduceerd. Dit proteïne zet het fosfaat uit het β GP vrij. Op die manier is er voldoende fosfaat aanwezig voor mineralisatie (37). Deze β GP toevoeging geeft de pulpa de kans om aan mineralisatie te doen indien er cellen uit de pulpa differentiëren die dit kunnen zoals odontoblasten.

In het odontoblast cultuur systeem zal gekeken worden naar de expressie van Glial fibrillary acidic protein (GFAP), S-100, Vimentine en alpha-smooth muscle actin (α -SMA). GFAP is hierbij een Schwann cel merker net als S-100, deze laatste wordt ook tot expressie gebracht in fibroblasten. Het vimentine is dan weer te vinden in mesenchymale cellen. Tot slot is het α -SMA een merker voor differentiërende cellen en gladde spiercellen. Naast dit lichtmicroscopisch onderzoek zullen de culturen ook door middel van een transmissie elektronenmicroscop (TEM) bestudeerd worden.

1.5.2 De neuro-odontoblast relatie

Een van de meest vreemde eigenschappen van het pulpa-dentine complex is diens gevoeligheid. Er zijn drie hypothesen gepostuleerd om deze gevoeligheid te verklaren. De eerste hypothese zegt dat het dentine zenuwuiteinden bevat die op een directe manier gestimuleerd kunnen worden. Een tweede hypothese haalt aan dat de odontoblast zelf als een receptor fungeert en gekoppeld is aan de zenuwen in de pulpa. De derde hypothese gaat er van uit dat de tubulaire structuur van het dentine vloeistofbewegingen toelaat die door de vrije zenuwuiteinden, dicht bij het dentine gelegen, geregistreerd worden (11).

Voor het tweede deel van het onderzoek wordt verder ingegaan op de tweede hypothese om de gevoeligheid van tanden te verklaren, namelijk dat de odontoblast als receptor fungeert en communiceert met het aanliggend neurale weefsel. Om deze hypothese te testen zal de aanwezigheid van verscheidene aan zenuwweefsel gerelateerde eiwitten zoals S-100, GFAP en CGRP onderzocht worden in de nabijheid van de odontoblast. Lichtmicroscopisch onderzoek zal uitgevoerd worden op immunocytochemisch gekleurde tand coupe orgaan culturen en ook zal er met de TEM naar synapsen gezocht worden tussen de odontoblast en de zenuwcel.

2 Materiaal en methoden

In dit onderdeel worden de procedures en de stoffen besproken die gebruikt werden in het cultiveren van pulpacellen met het oog op differentiatie naar odontoblasten. In het tweede deel wordt de tand coupe orgaan cultuur beschreven en de verschillende immunokleuringen die er op werden toegepast om vervolgens de neuro-odontoblast relatie te onderzoeken.

2.1 Het odontoblast cultuursysteem

Voor deze studie werden pulpa's uit wijsheidstanden gebruikt. De pulpa cellen werden gedurende 7, 14 en 28 dagen in cultuur gebracht om het effect van β GP en DMP op deze cellen te bestuderen ten opzichte van een controle. Dit werd gedaan om een mogelijke differentiatie van pulpa cellen naar odontoblasten te detecteren.

2.1.1 Weefselisolatie

Intacte wijsheidstanden, om orthodontische redenen operatief door een chirurg van het Ziekenhuis Oost-Limburg verwijderd, werden onmiddellijk postextractie gespoeld met een 97% ethanol, 3% ethyleter oplossing. Na verwijdering van de apicale stopjes werden de tanden met behulp van een gemodificeerde moerenspijter opengeboken. Op deze manier splijt de tand in twee delen zodat de pulpa van apex tot kroon bloot komt te liggen en gemakkelijk verwijderd kan worden. Indien er nog geen wortelvorming had plaatsgevonden of wanneer deze incompleet was kon de pulpa verwijderd worden zonder eerst de tand open te breken.

De pulpa's werden voor vervoer op 37°C gehouden in groeimedium (GM) bestaande uit BME medium (GIBCO, Grand Island, NY USA), zonder L-glutamine, verrijkt met Earle's en aangevuld met respectievelijk 100 U/ml en 50 μ g/ml penicilline/streptomycine (Life technologies, Paisley, USA), 25 μ g/ml amphotericine B (GIBCO, Grand Island, NY USA), 50 μ g/ml L-ascorbine zuur (Sigma chemical CO, St. Louis USA) en 15% hitte geïnactiveerd (56°) fetal calf serum (FCS) (Biochrom AG, Berlijn, Duitsland).

2.1.2 Explant cultuur

De pulpa's werden vervolgens gefragmenteerd en de pulpablokjes overgebracht in 25 cm² cultuurflesjes aangevuld met GM. De culturen werden in een incubator gehouden op 37°C in een atmosfeer bestaande uit 5% CO₂. Het cultuurmedium werd om de 48 uur ververs.

2.1.3 Trypsinisatie

Nadat confluente bereikt was werden de pulpablokjes verwijderd. Een trypsinisatie met 2,5 ml 0.25% trypsine (Molecular probes, Merelbeke, België) werd vervolgens uitgevoerd. Na 2 minuten inwerking van het trypsine in de incubator (37°C, 5% CO₂) werden de cellen manueel losgeklopt. Het trypsine werd door toevoeging van 7,5 ml FCS geïnhibeed. Na de trypsinisatie werd de celsuspensie 8 minuten gecentrifugeerd bij 1300 RPM op kamertemperatuur waarna de cel pellet geresuspendeerd werd in GM.

De cellenconcentratie werd in een Fuchs-Rosenthal telkamer bepaald met behulp van trypaanblauw.

2.1.4 Uitzaaïing

De cellen werden op draagglaasjes uitgezaaid aan een concentratie van 6250 cellen/ml. Twee typen draagglaasjes werden hierbij gebruikt, gewone 12 mm diameter draagglaasjes (Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Duitsland) die gedurende 45 minuten met 10 µg/ml poly-L-lysine (PLL) gecoat waren en 13 mm diameter Thermanox® draagglaasjes (Nalge Nunc international, Rochester, NY USA) die gedurende 45 minuten met 5 µg/ml PLL gecoat waren. Op de draagglaasjes werd 160 µl celsuspensie aangebracht en na een hechtingsperiode van 10 minuten werden ze tot 500 µl met GM aangevuld.

2.1.5 DMP en βGP behandeling

Na 24 uur werd het medium vervangen en werd er een onderscheid gemaakt tussen drie verschillende cultuurcondities. Bij de eerste cultuurconditie, de controle, werd het medium vervangen door GM. Bij de tweede cultuurconditie werd het medium vervangen door GM verrijkt met 10 mM βGP (glycerol 2-fosfaat dinatrium zouthydraat, Sigma Aldrich, St.Louis, USA). Voor de derde conditie werd het medium vervangen door GM verrijkt met 10 mM DMP. Dit DMP werd ons aangeleverd door Prof. Dr. A.J. Smith van de University of Birmingham, England. Om dit DMP extract te bekomen werd dentine gedissecteed uit gezonde humane tanden. Na verpulvering van dit dentine in een met vloeibare stikstof gekoelde percussiemolen, werd het gedurende 10 dagen geëxtraheerd. Het extractieproces werd uitgevoerd met 10% ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) (pH 7,2 met N-ethylmaleimide en phenylmethylsulphonyl fluoride als protease inhibitoren) dat dagelijks verversd werd. Alle extracten werden vervolgens gepoold en grondig aan een dialyse onderworpen met gedestilleerd water alvorens te vriesdrogen.

Van iedere conditie werden cellen in cultuur gebracht voor 7, 14 of 28 dagen. Het cultuurmedium werd om de 48 uur verversd.

Nadat de toegewezen cultuurtijd verstreken was werden de cellen gefixeerd. De op de gewone draagglaasjes geëxplanteerde cellen, bestemd voor lichtmicroscopie, werden gefixeerd met 4% formaldehyde (*Unifix, Duiven, Nederland*). De op de Thermanox® draagglaasjes geëxplanteerde cellen, bestemd voor elektronenmicroscopie, werden gefixeerd met 2% glutaraaldehyde in een 0.05M cacodylaat buffer (pH 7,3). Bewaring van de platen gebeurde op 4°C.

2.1.6 Immunohistologische kleuring

Immunokleuringen werden uitgevoerd op die cellen die geëxplanteerd waren op de gewone draagglaasjes nadat deze gedurende 24 uur met 4% formaldehyde gefixeerd werden. Deze immunokleuringen waren ter detectie van de stoffen GFAP, vimentine, α -SMA en S-100. Voor de immunocytochemische karakterisatie werd er gebruik gemaakt van een indirecte techniek die berust op het peroxidase gebaseerde EnVision System® (DakoCytomation, Glostrup, Denemarken). Na een wasstap in 0.01M phosphate buffer saline (PBS) (pH 7,2) werden de cellen gepermeabiliseerd met 0.05% Triton X-100 (Boehringer, Mannheim, Duitsland) in PBS gedurende 30 minuten. Nadien werd een tweede wasstap uitgevoerd. Vervolgens werden niet-specifieke bindingsplaatsen geblokkeerd met 3% normaal geitenserum (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) in PBS gedurende 20 minuten. Na het wassen werden de cellen gedurende 1 uur geïncubeerd met het primaire antilichaam. De gebruikte primaire antilichamen staan beschreven in tabel 1.

Tabel 1. De primaire antilichamen gebruikt bij de immunokleuring tegen GFAP, vimentine, α -SMA en S-100.

Primair AL	Soort	Verdunning	Doelwit	Bron
GFAP	Muis IgG1	1:200	Schwann cel	Novocastra UK
Vimentine	Muis IgG1	1:500	Mesenchymale cellen, odontoblasten	Dako, Denmark
α -SMA	Muis IgG2a	1:40	Gladde spiercellen, differentiërende cellen	Novocastra, UK
S-100	Konijn polyclonaal	1:800	Schwann cel, fibroblast	Dako, Denmark

Na een volgende wasstap werd er gedurende 30 minuten geïncubeerd met het secundaire antilichaam zijnde een Horse Radish Peroxidase (HRP) geconjugeerd geit anti-muis, of in het geval van S-100 een HRP geconjugeerd geit anti-konijn antilichaam. Een zeer gevoelig diaminobenzidine (DAB) chromogeen substraat systeem werd gebruikt om peroxidase te

visualiseren. Een Mayer's hematoxyline diende als tegenkleuring. De vasthechting op draagglaasjes gebeurde met een waterachtig vasthechtingsmedium (Aquatex, Merck, Darmstadt, Duitsland).

2.1.7 Lichtmicroscopisch onderzoek

Lichtmicroscopisch onderzoek werd uitgevoerd bij vergrotingen van X100 met een lichtmicroscop (LM) (Leitz Wetzlar Microscope, Ernst Leitz, Wetzlar, Duitsland). Beeldanalyse van de JPEG beelden genomen bij een vergroting van X100 werden visueel geëvalueerd om kwantitatieve verschillen in immunolabeling en groeisnelheid tussen de coupes te detecteren.

2.1.8 Elektronenmicroscopische onderzoek

Op de cellen die gedurende 24 uur op Thermanox® draagglaasjes gefixeerd waren, werd vervolgens een post-fixatie met 2% osmium tetroxide gedurende 1 uur uitgevoerd. Nadien volgde een inbedding in epoxyhars (Araldite®) volgens de pop-off methode (38). Ultra-dunne coupes (0.06 µm) werden opgevangen op grids gecoat met 0.7% formvar, gecontrasteerd met uranyl acetaat en loodcitraat, en bekeken met een Philips elektronenmicroscop (EM) 208 TEM op 80 kV versnelspanning.

2.2 GFAP, S-100 en CGRP in tand coupe orgaan culturen

Deze studie werd uitgevoerd met 13 Wistar ratten van dewelke de kaken werden verwijderd. De kaken werden in coupes versneden op zo'n manier dat de molaire pulpakamer bloot kwam te liggen van apex tot pulpahoorns. De kaak coupes van elke rat werden gedurende 0, 1 en 3 dagen in cultuur gebracht.

2.2.1 Tand coupe orgaan productie

De kaken werden in steriel wasmedium geplaatst, bestaande uit DMEM medium (Sigma-Aldrich Chemical, Steinheim, Duisland), aangevuld met 4 mM L-glutamine en penicilline/streptomycine/amphotericine (respectievelijk 100 U/ml, 100 µg/ml en 25 µg/ml). De kaken werden vervolgens in drie 1 mm dikke coupes gesneden door gebruik te maken van een met steriel water op kamertemperatuur gekoelde diamond-cutting horizontal saw (Leica SP 1600, Nussloch, Duitsland). De kaakcoupes werden onmiddellijk verscheidene malen gespoeld in wasmedium op 37°C alvorens ze in cultuur te brengen.

2.2.2 Tand coupe orgaan cultuur

De kaak coupes werden overgebracht in een steriele petrischaal die ongeveer 5 ml DMEM bevatte aangevuld met 4 mM L-glutamine, penicilline/streptomycine/amphotericine (respectievelijk 100 U/ml, 100 µg/ml en 25 µg/ml), 0,15 mg/ml L-ascorbine zuur en 10% hitte geïnactiveerd (56°) FCS. De culturen werden gehouden op 37°C in een atmosfeer bestaande uit 5% CO₂. Van elke kaak werden 3 coupes gemaakt, elk zo'n coupe werd in cultuur gebracht voor ofwel 0, 1 of 3 dagen. Het cultuurmedium werd om de 24 uur ververs. Nadat de toegewezen cultuur tijd verstreken was werden de coupes gefixeerd met 4% formaldehyde gedurende 24 uur, gewassen met fosfaat buffer gedurende 24 uur en dan geplaatst in 25% EDTA bij 4°C op een traag roterende mixer (IKA® Vibrax VXR basic, Janke&Kunkel, Staufen, Germany) gedurende 7 dagen om te ontkalken.

2.2.3 Immunohistologische kleuring

Immunohistologisch onderzoek werd uitgevoerd door gebruik te maken van polyclonale konijnen antilichamen. Immunohistologische labelling werd uitgevoerd op 30 µm cryocoupes van de kaken door gebruik te maken van een Vectastain pK4001-kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). De coupes werden kortstondig gewassen in 0,01 M PBS en gedurende 30 minuten geïncubeerd met 0,3% waterstof peroxide in PBS op 4°C. Na de PBS wasstappen ondergingen de coupes een incubatiestap met normaal geit serum in PBS gedurende 1 uur bij kamertemperatuur. Vervolgens werden de coupes geïncubeerd met het primaire antilichaam verdund in 1% bovine serum albumine bevattend PBS (Sigma, Steinheim, Duitsland) gedurende 72 uur bij 4°C. De gebruikte primaire antilichamen staan beschreven in tabel 2.

Tabel 2. De primaire antilichamen gebruikt bij de immunokleuring tegen GFAP, CGRP en S-100.

Primair AL	Soort	Verdunning	Doelwit	Bron
GFAP	Konijn polyclonaal	1:500	Schwann cel	Dako, Denmark
CGRP	Konijn polyclonaal	1:10.000	A-δ zenuwvezels	Novocastra UK
S-100	Konijn polyclonaal	1:800	Schwann cel, fibroblast	Dako, Denmark

Een negatieve controle van de immunohistologische reactie werd uitgevoerd door het incuberen van coupes waarbij het primaire antilichaam was weggelaten. Na de PBS wasstappen werden gebiotynileerde geiten secundaire antilichamen tegen het konijnen IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) toegevoegd aan de coupes waarbij deze 4 uur geïncubeerd werden met avidine-biotine-peroxidase complex. Tot slotte werd visualisatie

mogelijk gemaakt door 0,2% nikkel-versterkt 0,05% DAB (Sigma, Saint Louis, USA) en 0,003% waterstof peroxide. De coupes werden vervolgens aangebracht op draagglaasjes gecoat met gelatine en van een tegenkleuring voorzien.

2.2.4 Lichtmicroscopisch onderzoek

Lichtmicroscopisch onderzoek werd uitgevoerd bij vergrotingen van X100, X250 en X400 met een LM (Leitz Wetzlar Microscope, Ernst Leitz, Wetzlar, Duitsland). Beeldanalyse van de JPEG beelden genomen bij een vergroting van X250 voor CGRP en JPEG beelden genomen bij vergroting van X100 voor GFAP en S-100 werden geëvalueerd met Image J 1.34s om kwantitatieve verschillen in immunolabeling tussen coupes te detecteren. SPSS 13,0 for windows werd toegepast om een Student T-test tussen de gepaarde groepen te berekenen.

2.2.5 Elektronenmicroscopisch onderzoek

De fixatie van de tand coupe orgaan culturen gebeurde met 2% glutaraaldehyde in een 0.05M cacodylaat buffer (pH 7,3). Vervolgens werd een post-fixatie uitgevoerd met 2% osmium tetroxide. Nadien volgde een inbedding in epoxyhars (Araldite®) volgens de pop-off methode (38). Ultra-dunne coupes (50 nm) werden opgevangen op grids gecoat met 0.7% formvar, gecontrasteerd met uranyl acetaat en loodcitraat, De analyse werd uitgevoerd met een Philips elektronenmicroscop (EM) 208 TEM op 80 kV versnelspanning.

3 Resultaten

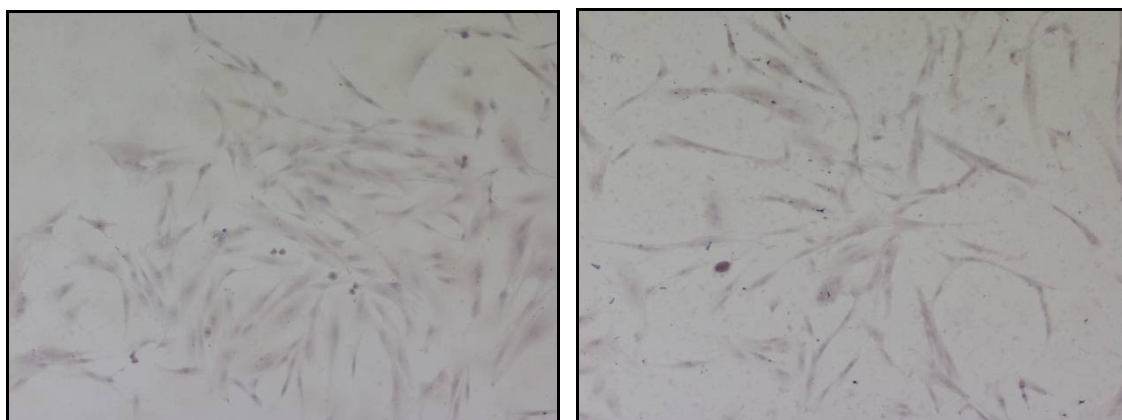
In dit hoofdstuk worden de resultaten besproken van het odontoblast cultuursysteem en de resultaten van het tand coupe orgaan cultuursysteem. Dit om respectievelijk te kijken of odontoblasten differentiëren uit pulpaal weefsel en om een interactie te zoeken tussen neuraal weefsel en odontoblasten.

3.1 Het odontoblast cultuursysteem

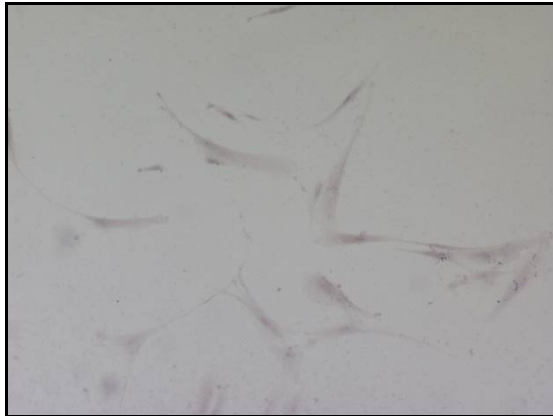
Pulpaal weefsel werd in cultuur gebracht onder verschillende condities, een eerste groep kreeg standaard medium, een tweede groep kreeg dit standaard medium verrijkt met 10 mM β GP en een laatste groep kreeg het standaard medium verrijkt met 10 mM DMP. Na 7, 14 of 28 dagen werden immunokleuringen uitgevoerd voor de proteïnen GFAP, S-100, vimentine en α -SMA. Deze proteïnes werden geselecteerd omwille van hun aanwezigheid in neuraal gerelateerde cellen en in differentiërende cellen.

3.1.1 GFAP

De onderstaande figuur 1 laat zien dat op dag 7 de cellen op het glaasje van de controle clusters beginnen te vormen maar dat er nog veel open ruimte aanwezig is. Het β GP glaasje vertoont ongeveer evenveel cellen maar deze zijn hier minder geclusterd dan bij de controle. De cellen behandeld met DMP zijn veel minder talrijk aanwezig en liggen verspreid over het volledige glaasje. Er is nog geen immunoreactiviteit waargenomen.

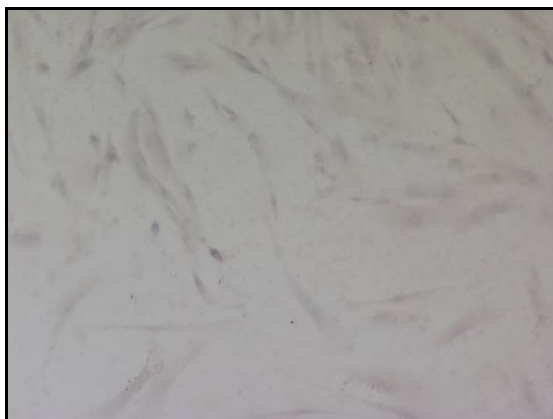
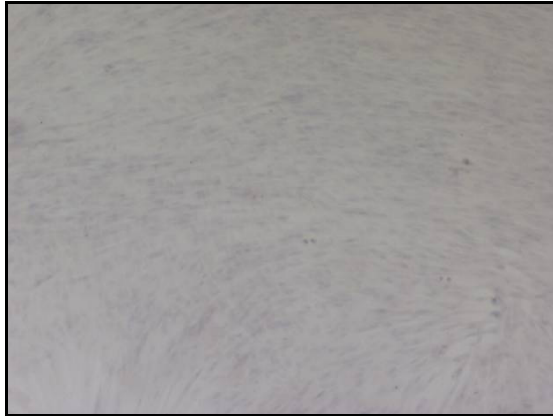


Figuur 1A. LM beelden (100x vergroting) van immunoreactiviteit voor GFAP in pulpacellen na 7 dagen. Links: Controle. Rechtsboven: Behandeld met 10 mM β GP.



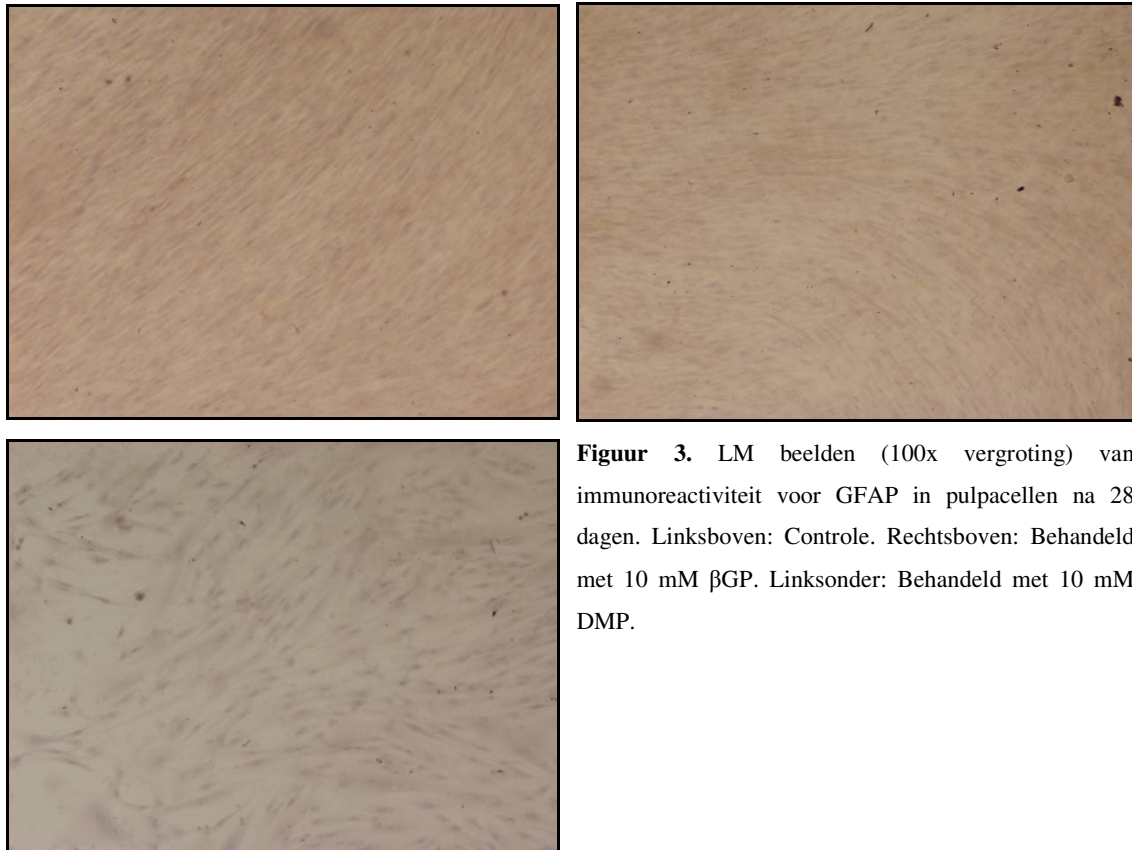
Figuur 1B. LM beelden (100x vergroting) van immunoreactiviteit voor GFAP in pulpacellen na 7 dagen. Links: Behandeld met 10 mM DMP.

Zoals te zien is in figuur 2 is de controle op dag 14 volledig confluent, maar er is nog altijd geen immunoreactiviteit aanwezig. De cellen behandeld met β GP zijn echter op dag 14 nog niet volledig confluent, er zijn nog open ruimtes en ook hier is er van immunokleuring geen sprake. Op het met DMP behandelde glaasje is er op dag 14 verspreide groei en er is slechts een kleine neiging tot cluster groei. Ook bij deze laatste wordt er geen immunoreactiviteit waargenomen.



Figuur 2. LM beelden (100x vergroting) van immunoreactiviteit voor GFAP in pulpacellen na 14 dagen. Linksboven: Controle. Rechtsboven: Behandeld met 10 mM β GP. Linksonder: Behandeld met 10 mM DMP.

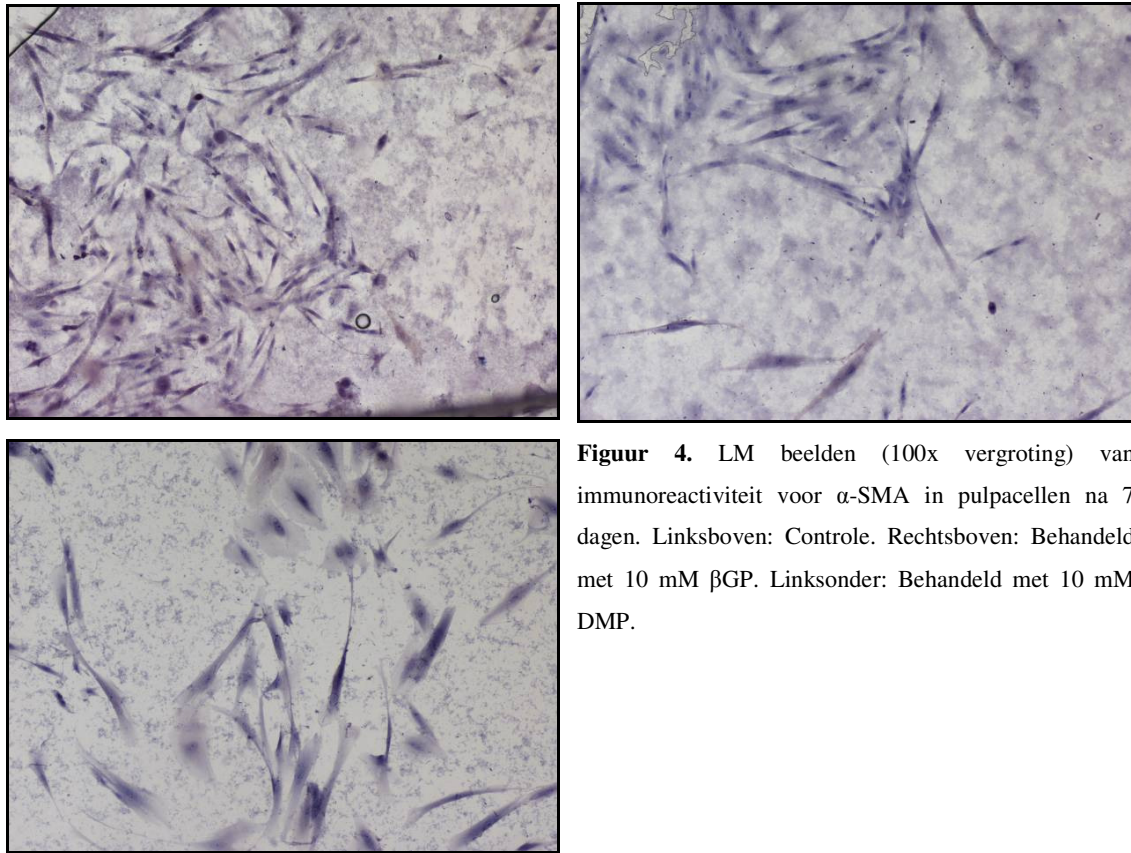
Figuur 3 toont dat op dag 28 de glaasjes van de controle en de β GP volledig confluent zijn. Bij de controle is er een sterke immunoreactiviteit voor GFAP. Deze immunoreactiviteit wordt ook bij de β GP waargenomen, hetzij minder prominent. Het DMP glaasje daarentegen is maar voor ongeveer de helft met cellen bedekt maar vertoont wel een hoge immunoreactiviteit.



Figuur 3. LM beelden (100x vergroting) van immunoreactiviteit voor GFAP in pulpacellen na 28 dagen. Linksboven: Controle. Rechtsboven: Behandeld met 10 mM β GP. Linksonder: Behandeld met 10 mM DMP.

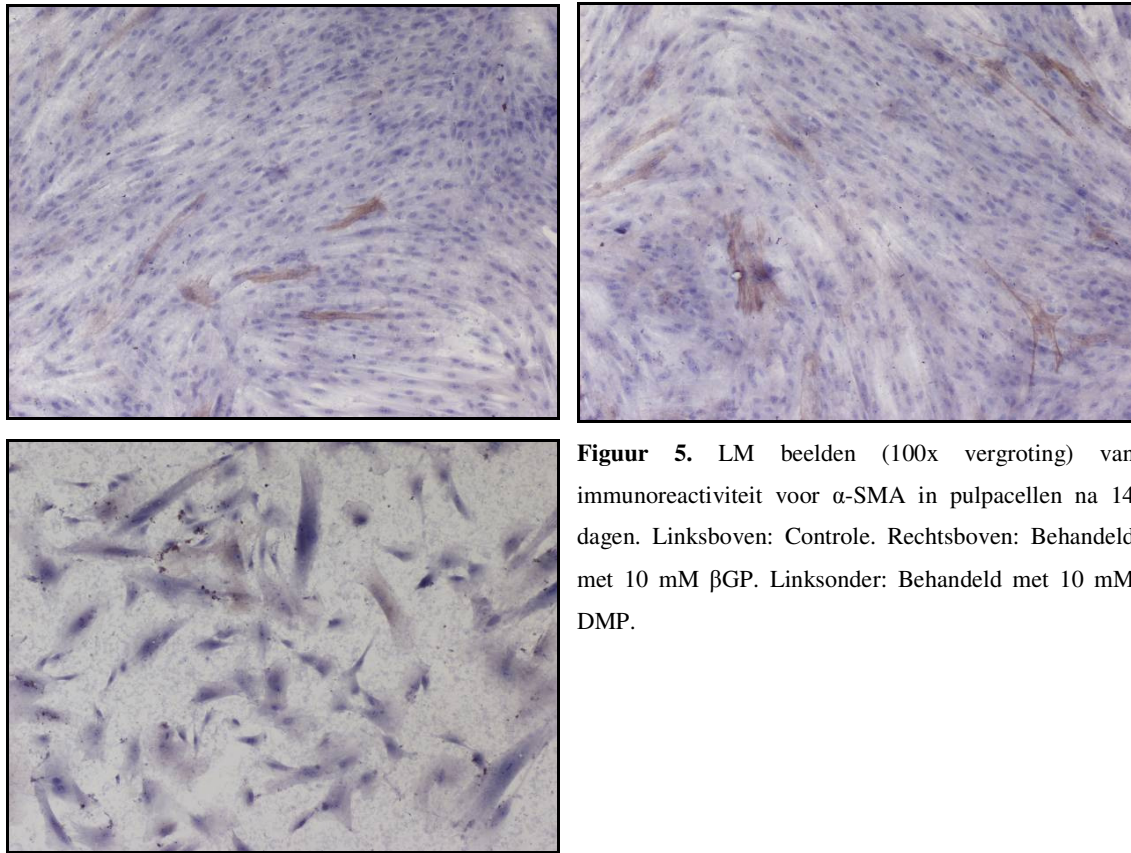
3.1.2 α -SMA

Voor de immunoreactiviteit tegen α -SMA op dag 7 laat figuur 4 zien dat er bij de controle slechts een verspreide celgroei is en dat de zeldzame cellen geen immunokleuring vertonen. Bij β GP zijn er meer cellen aanwezig dan bij de controle, maar het glaasje is nog lang niet confluent. Er is geen aanwezige immunoreactiviteit. De kernen zijn zeer prominent. Op het DMP glaasje zijn ongeveer evenveel cellen aanwezig als bij β GP, en dus meer dan bij de controle, maar ze liggen wat meer verspreid dan bij β GP, ook hier is er geen immunoreactiviteit.



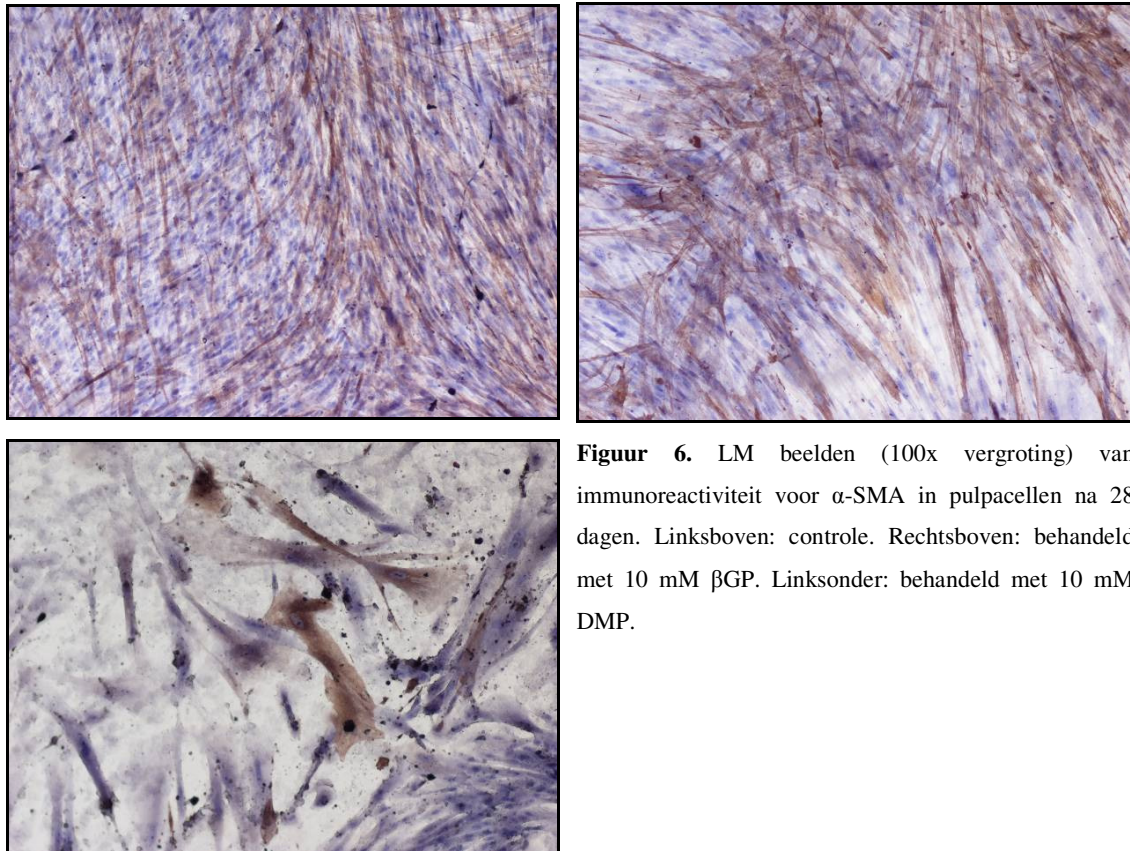
Figuur 4. LM beelden (100x vergroting) van immunoreactiviteit voor α -SMA in pulpacellen na 7 dagen. Linksboven: Controle. Rechtsboven: Behandeld met 10 mM β GP. Linksonder: Behandeld met 10 mM DMP.

Bij de controle op dag 14, zoals figuur 5 duidelijk maakt, is er op korte tijd bijna confluentie bereikt. Hier en daar is er nog wat ruimte en sporadisch komen immunoreactieve cellen voor. De met β GP behandelde cellen zijn ook bijna confluent, maar minder dicht als bij de controle. Er zijn clusters van immunoreactieve cellen aanwezig, het β GP glaasje heeft dus een grotere immunocytochemische component dan de controle. Bij het DMP glaasje liggen de cellen erg verspreid en is er nog heel veel ruimte. Hier en daar zijn er gekleurde cellen, maar deze zijn zeldzaam.



Figuur 5. LM beelden (100x vergroting) van immunoreactiviteit voor α -SMA in pulpacellen na 14 dagen. Linksboven: Controle. Rechtsboven: Behandeld met 10 mM β GP. Linksonder: Behandeld met 10 mM DMP.

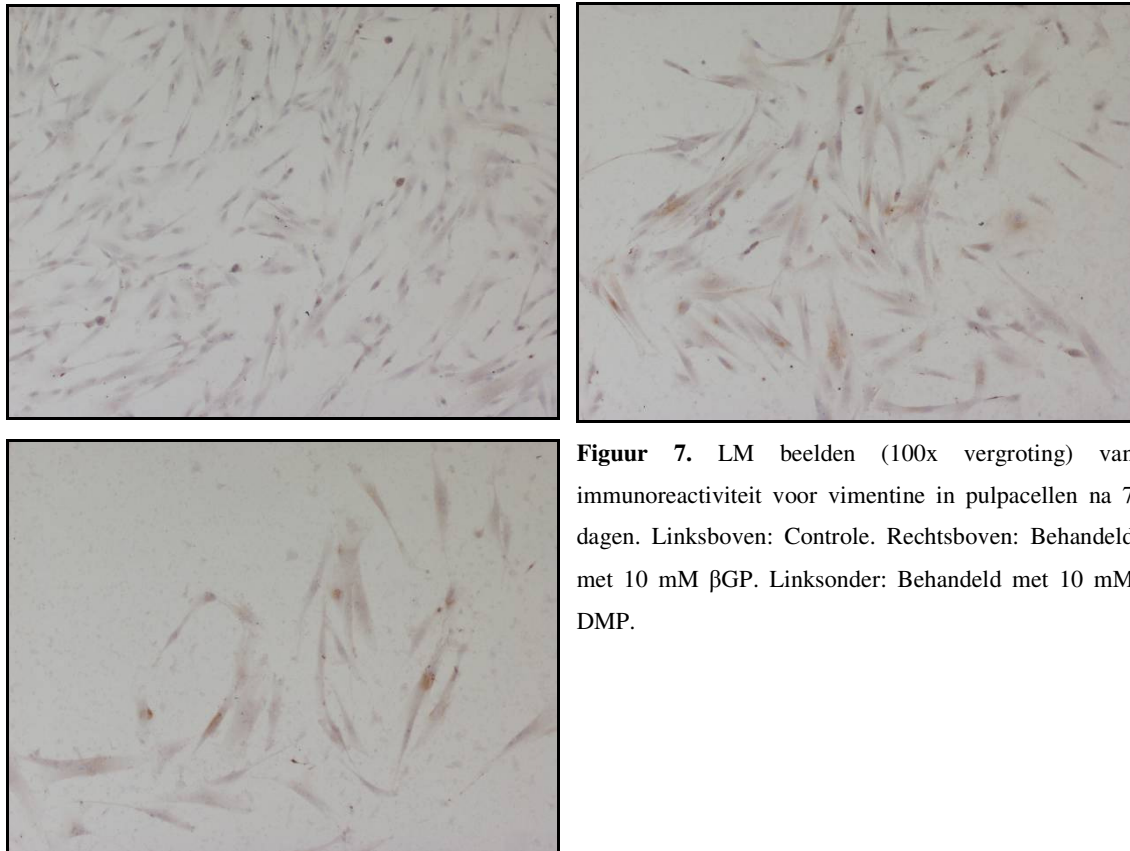
Bij figuur 6 is te zien dat de controle en het β GP glaasje op dag 28 confluent zijn, de cellen zijn er zelfs een multilayer gaan vormen en er is een sterke immunoreactiviteit waarneembaar. Op het β GP glaasje zijn er nog wel verscheidene plaatsen met een monolayer. De immunoreactiviteit is hier duidelijker te zien dan bij de controle. Het DMP glaasje is nog niet confluent, de cellen liggen verspreid. Er zijn wel een aantal celclusters aanwezig. De immunoreactiviteit is slechts sporadisch aanwezig bij de aanwezige cellen, maar is wel duidelijk zichtbaar.



Figuur 6. LM beelden (100x vergroting) van immunoreactiviteit voor α -SMA in pulpacellen na 28 dagen. Linksboven: controle. Rechtsboven: behandeld met 10 mM β GP. Linksonder: behandeld met 10 mM DMP.

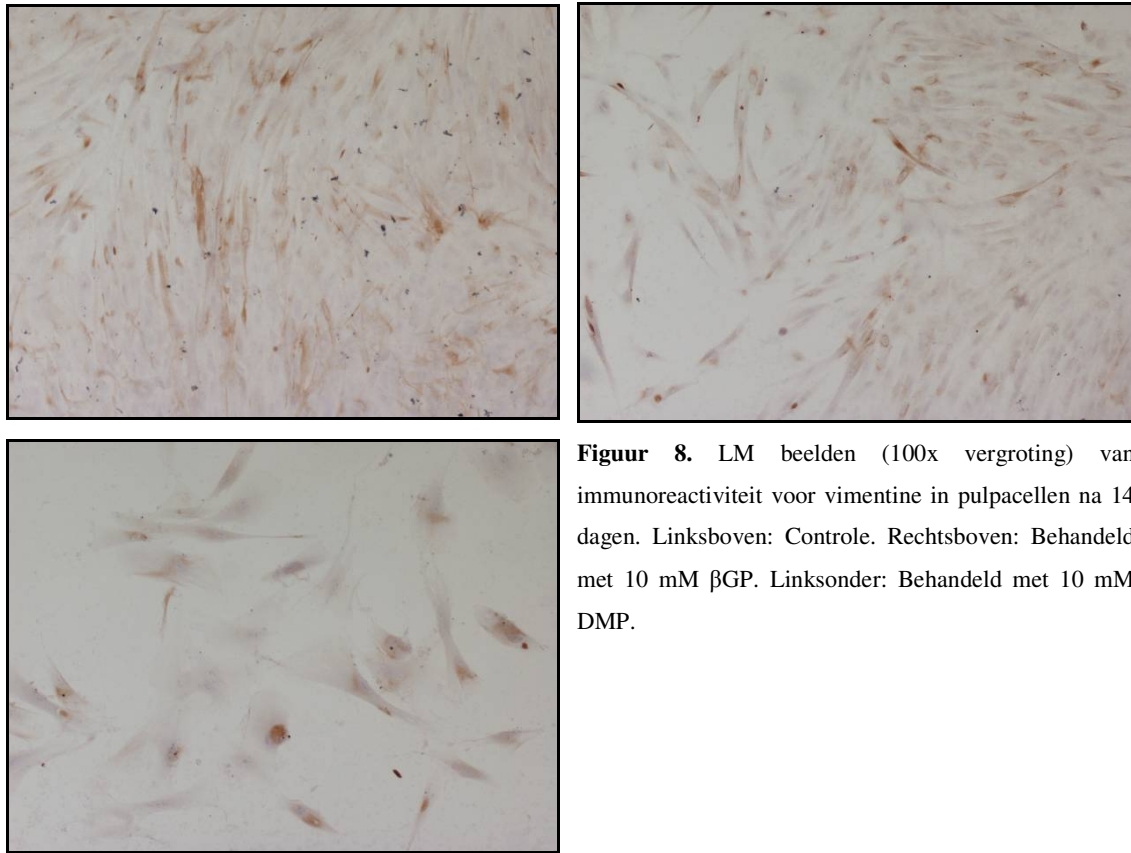
3.1.3 Vimentine

Op dag 7 laat figuur 7 zien dat bij de controle al veel cellen gegroeid zijn, verspreid over het hele glaasje. Er zijn geen immunoreactieve cellen (met uitzondering van delende cellen). Bij β GP zijn de cellen ook aanwezig over heel het glaasje, wel minder dicht bij elkaar gegroeid dan bij de controle. Er is zowel immunoreactiviteit te zien bij delende als bij gewone cellen. Het DMP glaasje bevat veel minder cellen dan het β GP glaasje of de controle. De immunoreactiviteit is vrij goed zichtbaar en aanwezig bij ongeveer de helft van de cellen.



Figuur 7. LM beelden (100x vergroting) van immunoreactiviteit voor vimentine in pulpacellen na 7 dagen. Linksboven: Controle. Rechtsboven: Behandeld met 10 mM β GP. Linksonder: Behandeld met 10 mM DMP.

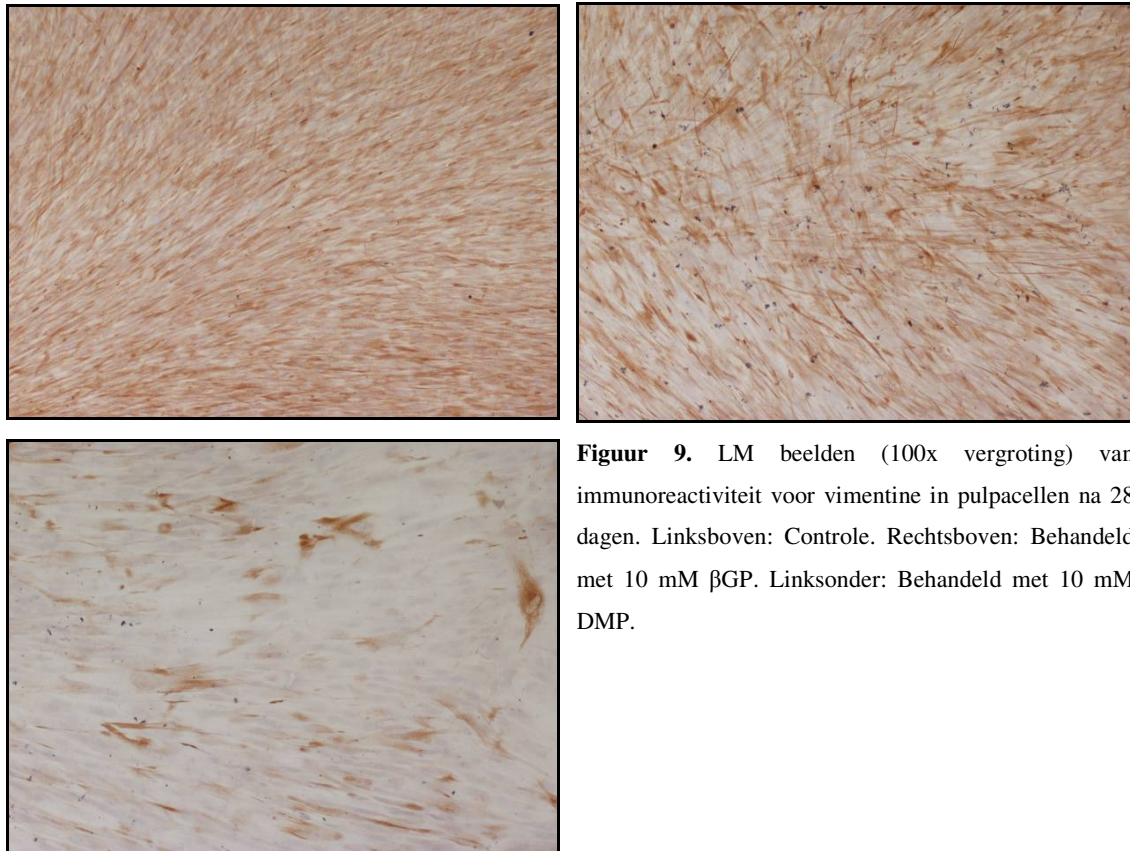
Figuur 8 laat zien dat op dag 14 er iets meer cellen bij de controle aanwezig zijn, ook zijn de ruimtes tussen de cellen kleiner geworden. De immunoreactiviteit is ook merkbaar bij niet-delende cellen en is verspreid over het glaasje. Voor het β GP glaasje is de ruimte tussen de cellen kleiner geworden en is het glaasje goed dichtgegroeid. Er is een toename in immunoreactiviteit. Bij de DMP behandelde cellen zijn er nog steeds weinig, verspreide cellen aanwezig. Hier en daar zijn er kleine clustertjes en de immunoreactiviteit is iets meer uitgesproken dan bij dag 7.



Figuur 8. LM beelden (100x vergroting) van immunoreactiviteit voor vimentine in pulpacellen na 14 dagen. Linksboven: Controle. Rechtsboven: Behandeld met 10 mM β GP. Linksonder: Behandeld met 10 mM DMP.

Op dag 28, te zien in figuur 9, zijn de cellen van de controle zo sterk in aantal toegenomen dat ze een multilayer zijn gaan vormen. Deze cellen zijn ook zeer sterk immunocytochemisch gekleurd. Op het met β GP behandelde glaasje is er nu zeer veel, bijna op elke cel, immunoreactiviteit zichtbaar. Multilayers komen op verscheidene plaatsen voor, op andere plaatsen is er nog geen confluentie.

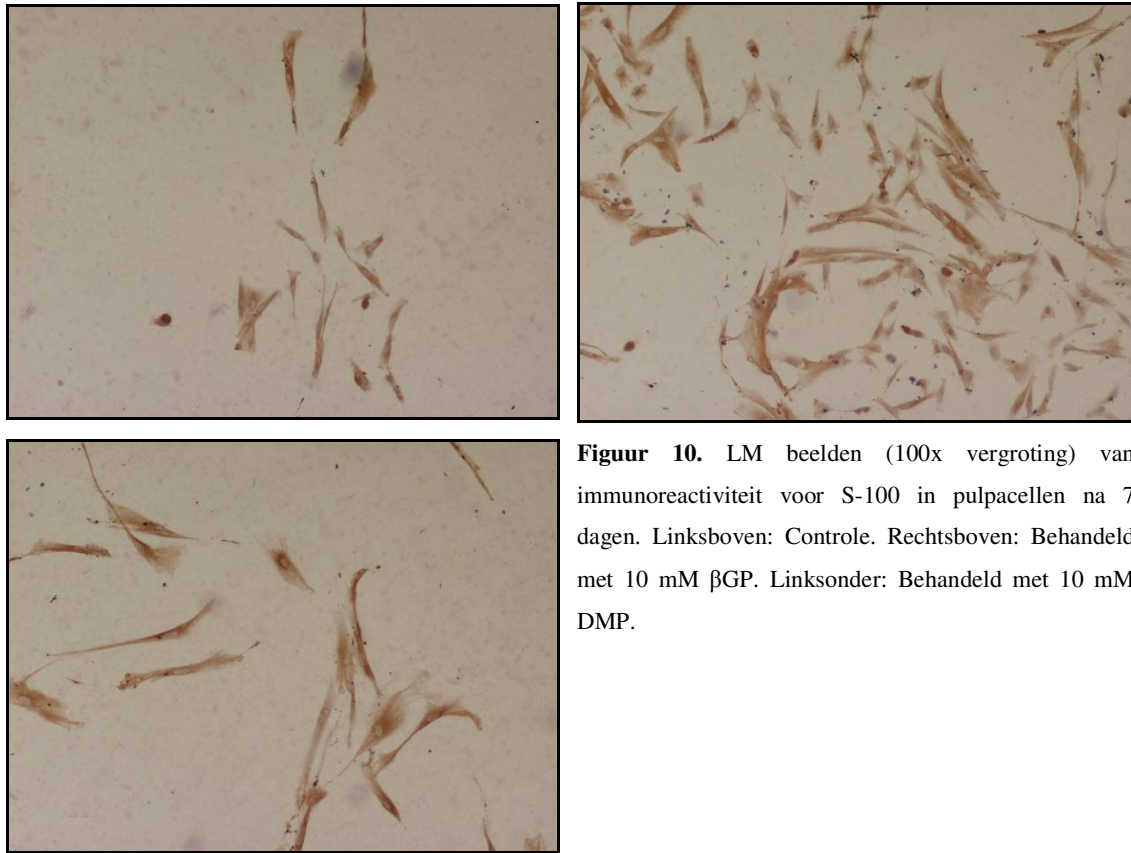
Het glaasje van de DMP is vrij goed dichtgegroeid. Alleen op de randen is er nog wat ruimte over. Ongeveer de helft van deze cellen is immunoreactief.



Figuur 9. LM beelden (100x vergroting) van immunoreactiviteit voor vimentine in pulpacellen na 28 dagen. Linksboven: Controle. Rechtsboven: Behandeld met 10 mM β GP. Linksonder: Behandeld met 10 mM DMP.

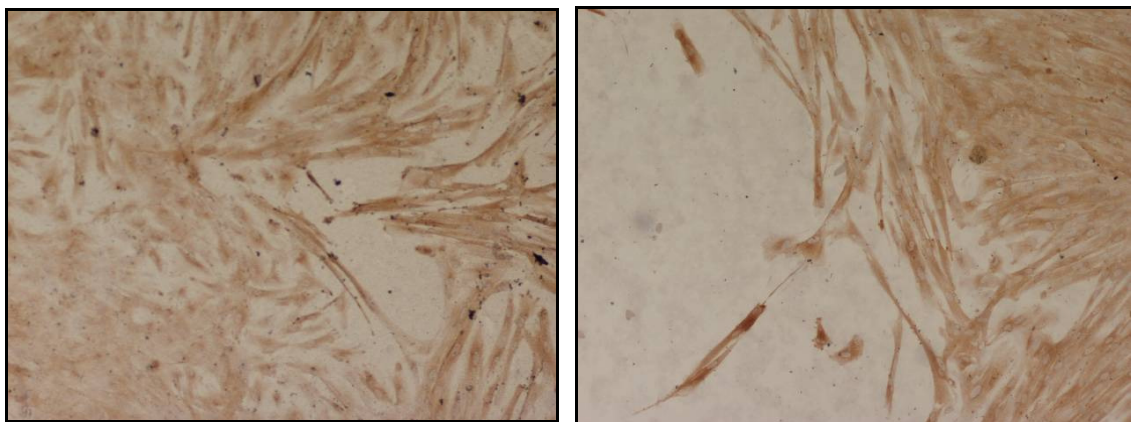
3.1.4 S-100

Op dag 7 zijn er voor de controle nog maar weinig cellen zichtbaar, maar zoals figuur 10 laat zien zijn deze wel allemaal sterk immunoreactief. Vooral de cellen aan de rand zijn sterk gekleurd, de cellen in het midden minder. Voor de β GP conditie zijn er meer cellen zichtbaar dan bij de controle, deze liggen verspreid over het gehele glaasje en sterk immunoreactief zoals bij de controle. De met DMP behandelde cellen zijn op dag 7 dunner verspreid dan bij β GP maar meer als bij de controle. De immunoreactiviteit hierbij is ongeveer dezelfde als bij β GP.

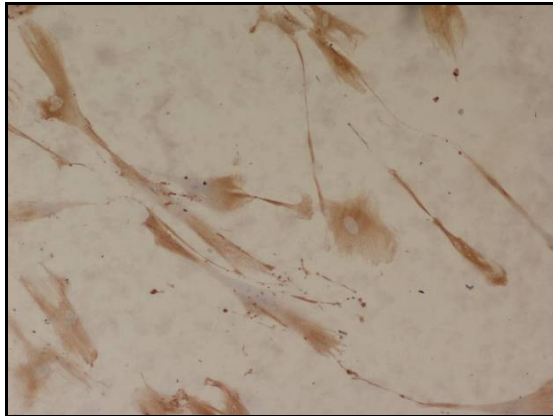


Figuur 10. LM beelden (100x vergroting) van immunoreactiviteit voor S-100 in pulpacellen na 7 dagen. Linksboven: Controle. Rechtsboven: Behandeld met 10 mM β GP. Linksonder: Behandeld met 10 mM DMP.

De controle op dag 14 vertoont, zoals figuur 11 laat zien, een sterke immunoreactiviteit. Het glaasje is bijna volledig confluent. Op het β GP glaasje zijn de cellen op dag 14 minder talrijk aanwezig dan bij de controle, maar hun immunoreactiviteit is even sterk. Het DMP glaasje vertoont slechts een weinig aantal cellen, vrij verspreid over het glaasje. De immunoreactiviteit is wel nog altijd even sterk.



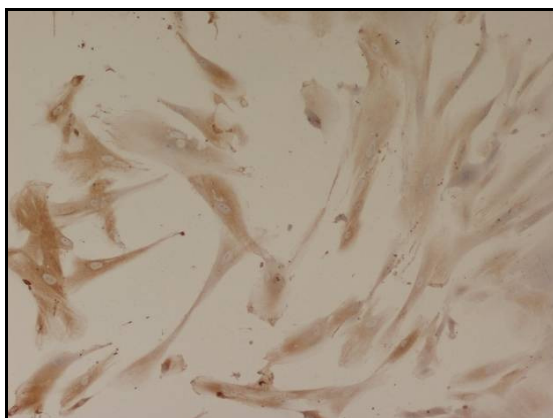
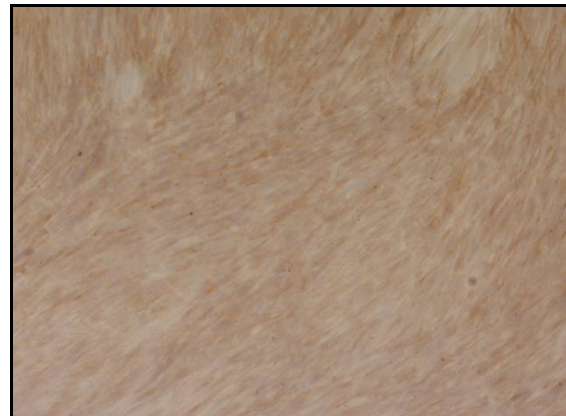
Figuur 11A. LM beelden (100x vergroting) van immunoreactiviteit voor S-100 in pulpacellen na 14 dagen. Links: Controle. Rechts: Behandeld met 10 mM β GP.



Figuur 11B. LM beelden (100x vergroting) van immunoreactiviteit voor S-100 in pulpacellen na 14 dagen. Links: behandeld met 10 mM DMP.

De controle en de β GP glaasjes zijn op dag 28 volledig confluent. Deze controle heeft een even sterke immunoreactiviteit als de controle van dag 14. De immunoreactiviteit bij β GP is niet zo sterk als bij de controle maar toch nog prominent aanwezig.

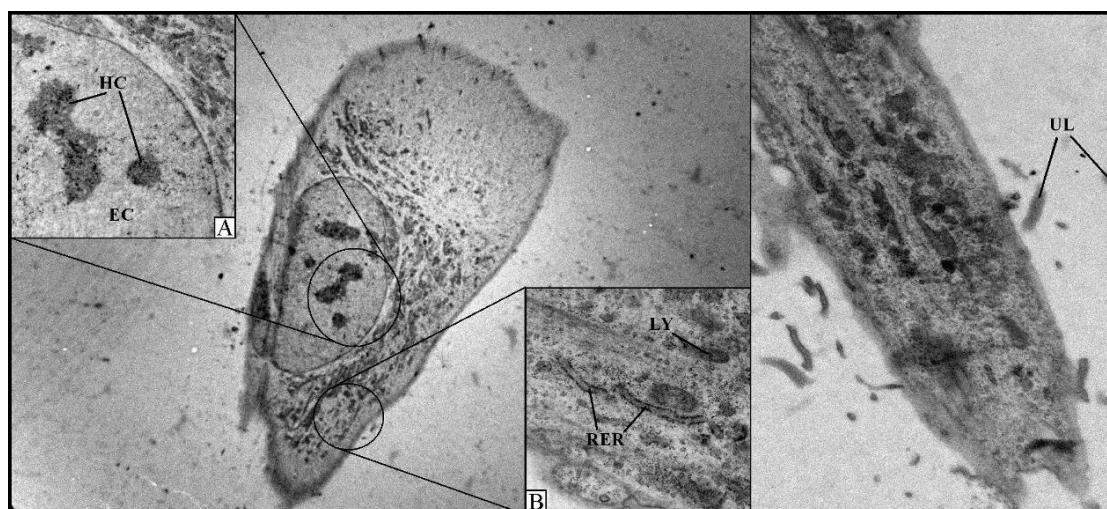
Voor de DMP conditie zijn er niet zo veel cellen aanwezig, de cellen worden enkel groter en zijn immunoreactief. Aan de rand zijn ze echter sterker immunoreactief gekleurd.



Figuur 12. LM beelden (100x vergroting) van immunoreactiviteit voor S-100 in pulpacellen na 28 dagen. Linksboven: controle. Rechtsboven: behandeld met 10 mM β GP. Linksonder: behandeld met 10 mM DMP.

3.1.5 Elektronenmicroscopische beelden van het odontoblast cultuursysteem

Op de EM coupes van het odontoblast cultuursysteem waren slechts weinig cellen aanwezig. Het linkerdeel van figuur 13 laat zien dat deze cellen actieve synthetiserende eigenschappen vertonen en grote hoeveelheden euchromatine en ruw endoplasmatisch reticulum bezitten. Inzet A laat dit uitgebreide euchromatine duidelijker zien terwijl in inzet B het ruw endoplasmatisch reticulum beter wordt gevisualiseerd. Het rechterdeel van figuur 13 laat een andere cel zien met daar rond uitlopers van zichzelf of van aanliggende cellen.



Figuur 13. EM afbeelding van een cel uit het odontoblast cultuursysteem. HC: Heterochromatine. EC: Euchromatine. RER: Ruw endoplasmatisch reticulum. LY: Lysosoom. UL: Uitloper.

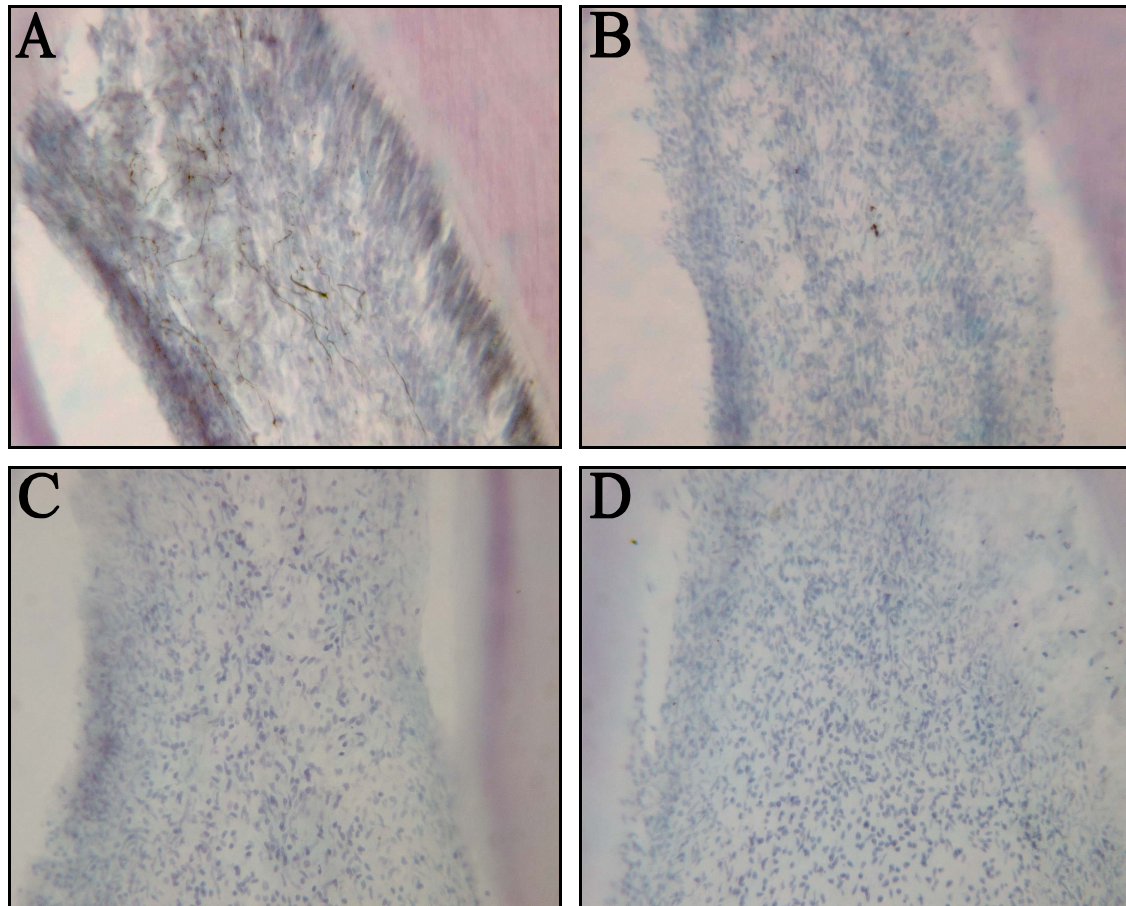
3.2 Tand coupe orgaan cultuursysteem

Tand coupe orgaan culturen werden gedurende verschillende tijdstippen in cultuur gehouden. Na 0, 1, 3 of 7 dagen in cultuur ondergingen ze een immunokleuring voor de proteïnen GFAP, S-100 en CGRP. Deze proteïnes werden onderzocht omwille van hun aanwezigheid in neuraal gerelateerde cellen.

3.2.1 CGRP

Een significant verschil in immunoreactiviteit werd waargenomen tussen de coupes die 0 dagen en 1 dag in cultuur werden gebracht ($p=0,031$), als ook tussen dag 0 en dag 3 ($p=0,021$) en dag 0 en dag 7 ($p=0,023$). De significante afname in immunoreactiviteit, waargenomen tussen dag 0 en dag 1 wordt verder gezet in de coupes naar dag 3 toe, er is een significant verschil tussen dag 1 en dag 3 ($p=0,042$). Tussen dag 1 en dag 7 werd ook een significant verschil waargenomen ($p=0,037$) maar niet tussen dag 3 en 7 ($p=0,111$). De afname in

immunoreactiviteit is te zien in figuur 14. De waardes waarop de T-test gebaseerd is en de bijhorende p-waardes zijn te vinden in respectievelijk tabel 3 en 4.



Figuur 14. LM beelden (250x vergroting) van immunoreactiviteit voor CGRP in tand coupe orgaan culturen. A: Na 0 dagen. B: Na 1 dag. C: Na 3 dagen. D: Na 7 dagen.

Tabel 3. Het procentueel voorkomen van immunoreactiviteit tegen CGRP op 3 afbeeldingen per tijdstip.

Dag 0	Dag 1	Dag 3	Dag 7
0,93	0,07	0,00	0,01
0,65	0,15	0,00	0,03
1,10	0,13	0,00	0,02

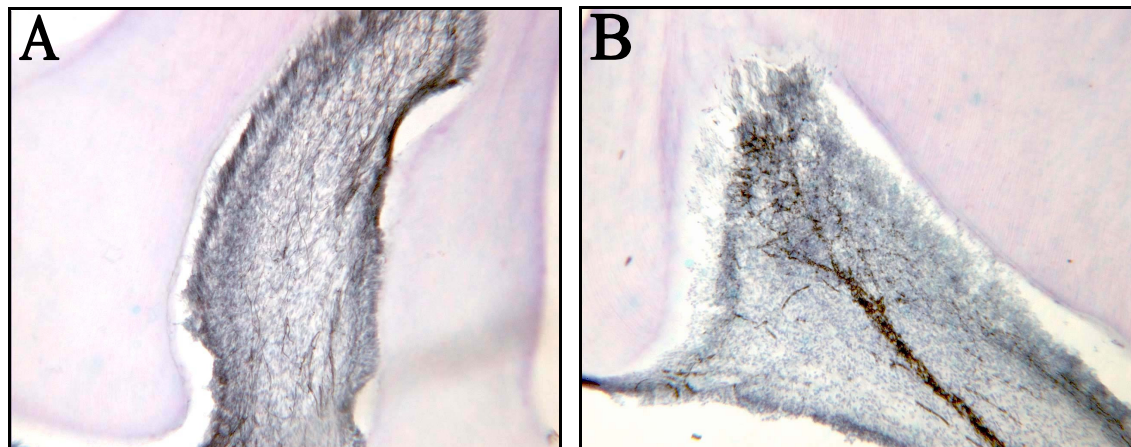
Resultaten

Tabel 4. Student T-test voor gepaarde groepen uitgevoerd voor de CGRP-immunolabeling tussen de verschillende tijdstippen.

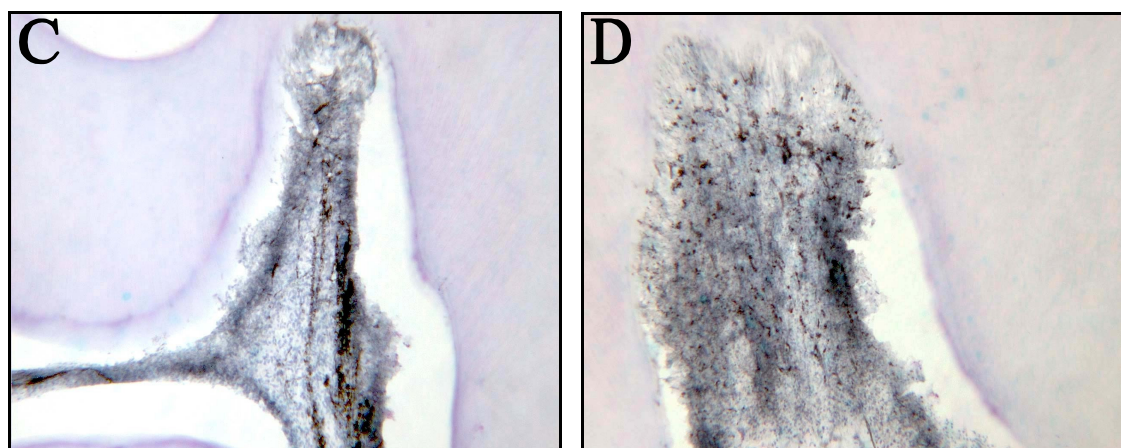
Paired Samples Test									
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	DAG_0 - DAG_1	,77590	,24130	,13932	,17647	1,37533	5,569	2	,031
Pair 2	DAG_0 - DAG_3	,89246	,22569	,13030	,33181	1,45310	6,849	2	,021
Pair 3	DAG_0 - DAG_7	,87411	,23452	,13540	,29154	1,45669	6,456	2	,023
Pair 4	DAG_1 - DAG_3	,11656	,04273	,02467	,01040	,22272	4,724	2	,042
Pair 5	DAG_1 - DAG_7	,09821	,03351	,01935	,01496	,18146	5,076	2	,037
Pair 6	DAG_3 - DAG_7	-,01835	,01158	,00669	-,04712	,01043	-2,744	2	,111

3.2.2 GFAP

Voor de kwantificatie van de immunokleuring tegen GFAP werd geen significant verschil ontdekt tussen de verschillende tijdstippen. Figuur 15 laat deze onveranderde situatie zien en tabel 5 geeft enkele procentuele waarden voor de kwantificatie. De waarden van tabel 5 werden gebruikt in een T-test voor gepaarde groepen en de output met de p-waarden is te vinden in tabel 6. (tussen 0 en 1 dagen $p=0,603$; tussen 0 en 3 dagen $p=0,793$; tussen 0 en 7 dagen $p=0,753$; tussen 1 en 3 dagen $p=0,752$; tussen 1 en 7 dagen $p=0,459$; tussen 3 en 7 dagen $p=0,883$) Figuur 15 toont ook dat het kleuringspatroon veranderd van een vezelvormig patroon op dag 0 en 1 naar een meer globulair op dag 7.



Figuur 15A. LM beelden (100x vergroting) van immunoreactiviteit voor GFAP in tand coupe orgaan culturen. A: Na 0 dagen. B: Na 1 dag.



Figuur 15B. LM beelden (100x vergroting) van immunoreactiviteit voor GFAP in tand coupe orgaan culturen.
C: Na 3 dagen. D: Na 7 dagen.

Tabel 5. Het procentueel voorkomen van immunoreactiviteit tegen GFAP op 2 afbeeldingen per tijdstip.

Dag 0	Dag 1	Dag 3	Dag 7
4,51	10,32	6,74	10,52
6,55	5,67	9,20	5,53

Tabel 6. Student T-test voor gepaarde groepen uitgevoerd voor de GFAP-immunolabeling tussen de verschillende tijdstippen.

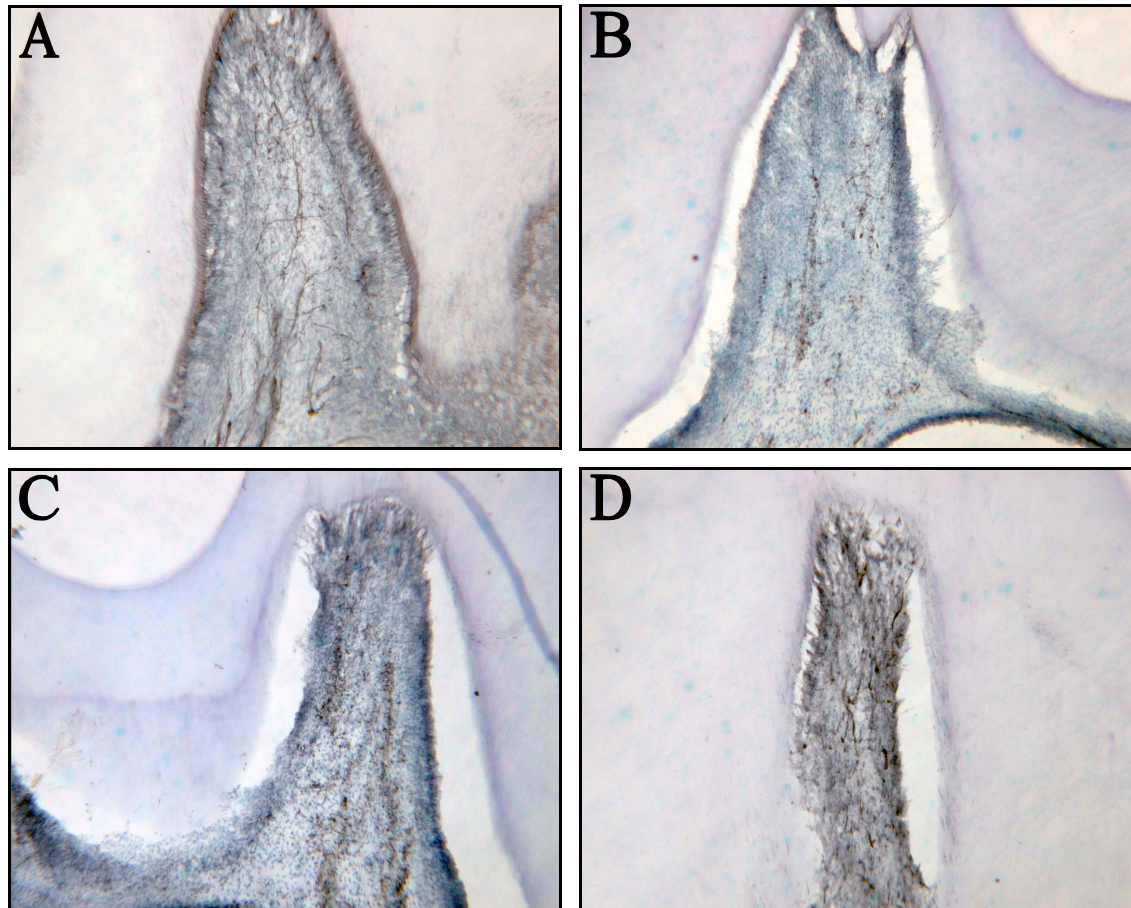
Paired Samples Test									
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	DAG_0 - DAG_1	-1,36001	3,85004	2,22282	-10,92404	8,20402	-,612	2	,603
Pair 2	DAG_0 - DAG_3	-,56402	3,25837	1,88122	-8,65825	7,53021	-,300	2	,793
Pair 3	DAG_0 - DAG_7	-,92646	4,44246	2,56486	-11,96215	10,10924	-,361	2	,753
Pair 4	DAG_1 - DAG_3	,79599	3,80046	2,19420	-8,64487	10,23685	,363	2	,752
Pair 5	DAG_1 - DAG_7	,43355	,82538	,47653	-1,61681	2,48391	,910	2	,459
Pair 6	DAG_3 - DAG_7	-,36244	3,76554	2,17404	-9,71656	8,99169	-,167	2	,883

3.2.3 S-100

Er werd geen significant verschil gevonden in de hoeveelheid immunoreactiviteit voor S-100 tussen de verschillende coupes die gedurende 0, 1, 3 of 7 dagen in cultuur gebracht werden. Figuur 16 laat deze onveranderde toestand in de hoeveelheid immunoreactiviteit zien. Figuur 16 laat ook een zekere overgang zien in het patroon van de kleuring gaande van een vezelvormige kleuring op dag 0 naar een meer globulaire op dag 7, ook is er een sterke kleuring in de odontoblastzone. In tabel 7 worden procentuele waarden voor immunokleuringen getoond van twee afbeeldingen per tijdstip en in tabel 8 zijn de p-waarden

Resultaten

voor de bijhorende T-test te vinden. (tussen 0 en 1 dagen $p=0,463$; tussen 0 en 3 dagen $p=0,119$; tussen 0 en 7 dagen $p=0,948$; tussen 1 en 3 dagen $p=0,080$; tussen 1 en 7 dagen $p=0,859$; tussen 3 en 7 dagen $p=0,248$)



Figuur 16. LM beelden (100x vergroting) van immunoreactiviteit voor S-100 in tand coupe orgaan culturen. A: Na 0 dagen. B: Na 1 dag. C: Na 3 dagen. D: Na 7 dagen.

Tabel 7. Het procentueel voorkomen van immunoreactiviteit tegen S-100 op 2 afbeeldingen per tijdstip.

Dag 0	Dag 1	Dag 3	Dag 7
6,93	6,99	12,07	8,40
4,74	5,73	12,28	3,49

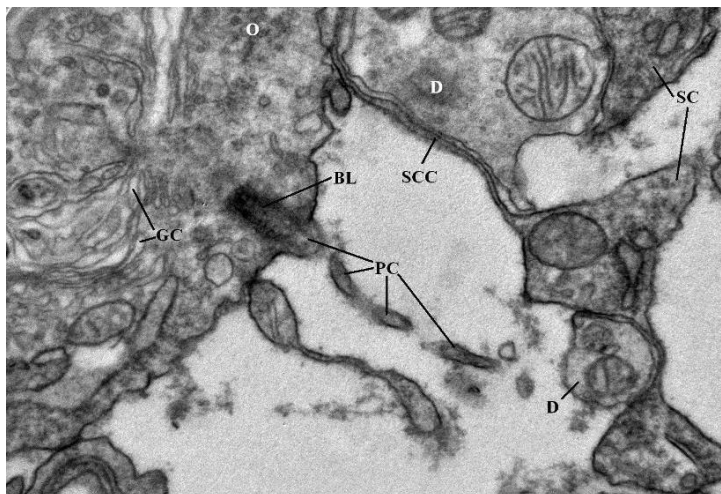
Resultaten

Tabel 8. Student T-test voor gepaarde groepen uitgevoerd voor de S-100-immunolabeling tussen de verschillende tijdstippen.

Paired Samples Test									
		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	DAG_0 - DAG_1	-,52062	,65614	,46396	-6,41584	5,37460	-1,122	1	,463
Pair 2	DAG_0 - DAG_3	-6,34150	1,69442	1,19814	-21,56530	8,88230	-5,293	1	,119
Pair 3	DAG_0 - DAG_7	-,11028	1,92180	1,35892	-17,37698	17,15643	-,081	1	,948
Pair 4	DAG_1 - DAG_3	-5,82088	1,03828	,73417	-15,14945	3,50770	-7,928	1	,080
Pair 5	DAG_1 - DAG_7	,41035	2,57795	1,82288	-22,75158	23,57227	,225	1	,859
Pair 6	DAG_3 - DAG_7	6,23122	3,61623	2,55706	-26,25928	38,72173	2,437	1	,248

3.2.4 Primair cilium en de neuro-odontoblast relatie

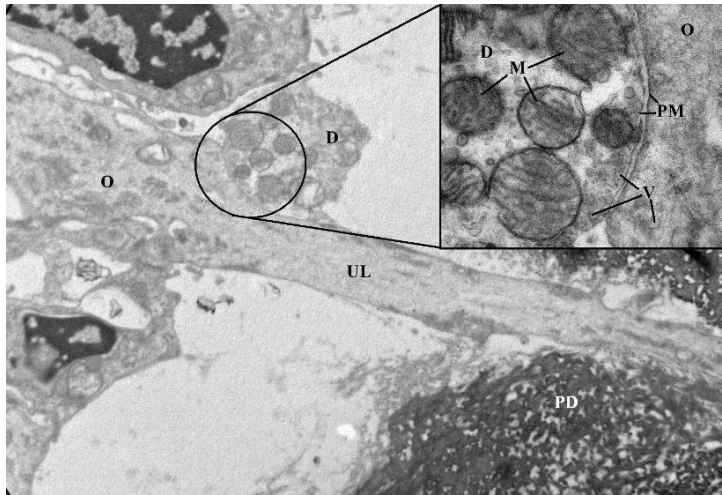
Odontoblasten uit het tand coupe orgaan cultuursysteem vertonen een primair cilium, dit is duidelijk te zien in figuur 17. Dit primair cilium zit verankerd aan een basaal lichaam dat zich net onder het plasmamembraan van de odontoblast bevindt. Het basaal lichaam ligt dicht bij het golgicomplex. Figuur 17 laat ook zien dat ter hoogte van de odontoblast ongemyeliniseerde zenuwvezels voorkomen, omringd door Schwann cel cytoplasma. Dit Schwann cel cytoplasma omsluit de zenuwceluitlopers maar gedeeltelijk.



Figuur 17. EM afbeeldingen van primair cilium op odontoblasten uit het tand coupe orgaan cultuursysteem. O: Odontoblast. GC: Golgi complex. BL: Basaal lichaam. PC: Primair cilium. D: Dendriet. SC: Schwann cel. SCC: Schwann cel cytoplasma.

Figuur 18 laat de nauwe relatie tussen een odontoblast en een zenuwvezel zien. Er zijn kenmerken van synapsvorming tussen de twee structuren aanwezig. De plasmamembranen van beide structuren liggen zeer nauw tegen elkaar en zijn denser op deze plaats. De

zenuwvezel vertoont vele vesikels net onder haar plasmamembraan. Ook onder het odontoblast plasmamembraan worden vesikels waargenomen. Er zijn veel mitochondriën zichtbaar.



Figuur 18. EM beelden van odontoblasten uit het tand coupe orgaan cultuursysteem. O: Odontoblast. UL: Uitloper. M: Mitochondria. D: Dendriet. V: Vesikels. PM: Plasmamembraan. PD: Predentine.

4 Discussie en conclusie

In het odontoblast cultuursysteem werd getracht, door middel van een pulpacultuur bloot te stellen aan DMP en β GP, pulpale cellen te laten differentiëren naar cellen die fenotypische gelijkenissen vertonen met odontoblasten. Zowel controle cellen als cellen gekweekt in een medium verrijkt met DMP of β GP werden gedurende 7, 14 en 28 dagen in cultuur gebracht. Immunokleuringen werden vervolgens uitgevoerd om de proteïnes GFAP, vimentine, α -SMA en S-100 te detecteren in deze culturen. Door middel van LM analyse werd gekeken naar het verschil in groeisnelheid van de cellen onder de verschillende condities alsook naar de verschillen in immunoreactiviteit voor de verschillende proteïnes.

Bij de cellen gekleurd voor GFAP viel direct de differentiële groei op. De controle en de β GP conditie hadden op dag 7 ongeveer evenveel cellen. De controle bereikte echter reeds op dag 14 confluentie terwijl de β GP conditie er 28 dagen voor nodig had. Bij de cellen met DMP werd geen confluentie bereikt binnen de voorziene tijd. Wanneer de cellen gekleurd voor α -SMA op hun groei gecontroleerd werden waren de cellen van de β GP en de DMP conditie op dag 7 talrijker aanwezig dan bij de controle. Op dag 28 hadden zowel de controle cellen als de β GP cellen confluentie bereikt. De controle was op dag 14 echter al bijna confluent. De DMP conditie vertoonde slechts een weinig aantal cellen. De cellen die de immunokleuring voor vimentine ondergingen vertoonde op dag 7 voor de controle en de β GP conditie veel cellen hoewel deze bij de β GP conditie minder dicht bij elkaar lagen. Op dag 28 had de controle confluentie bereikt alsook bijna de β GP conditie. De met DMP verrijkte celcultuur was niet confluent wel meer cellen als de andere keren. De coupes gekleurd voor S-100 vertoonden op dag 7 weinig cellen voor de controle, meer voor de β GP conditie en het minst voor de DMP conditie. Op dag 14 had de controle bijna confluentie bereikt. Op dag 28 waren zowel de controle als β GP confluent. De DMP conditie vertoonde slechts weinig cellen.

De groeiachterstand van de met DMP verrijkte celcultuur zou te wijten kunnen zijn aan het inhiberend effect dat sommige van de DMP op de celdeling hebben (39). Een andere mogelijkheid is dat het DMP de cellen aanzet tot differentiatie. Het differentiatieproces vergt namelijk energie, energie die normaal in celdeling gestopt kan worden. Deze translocatie van het energieverbruik binnen de cel zou de verlaagde groeisnelheid van de cultuur verrijkt met DMP kunnen verklaren. De snelheid waarmee de controle en de β GP conditie groeiden, verschilde ook van elkaar. Op dag 7 was het afwisselend de controle of de β GP conditie die de meeste cellen had. Dit verschil was waarschijnlijk te wijten aan toeval. Het was wel telkens de controle die als eerste confluentie bereikte of er als eerste dicht bij in de buurt

kwam. Toevoeging van stoffen houdt altijd het risico in dat de celcyclus beïnvloed wordt. De controles zullen bijgevolg over het algemeen sneller groeien, omdat er minder van deze stoffen, hier β GP en DMP, aanwezig zijn die kunnen interferen met de normale celactiviteit.

Wanneer de immunoreactiviteit voor GFAP bekeken werd kon er pas een reactie gedetecteerd worden na 28 dagen. Zowel bij β GP, als bij de controle en in mindere mate bij DMP werd deze immunoreactiviteit voor GFAP waargenomen. In een recent onderzoek op ratten werd getracht GFAP immunoreactieve cellen in trigeminaal- en tandweefsel fenotypisch te typeren. In het trigeminaal weefsel waren het de astrocyten, ganglion satelliet cellen, en epineurale Schwann cellen die de GFAP immunoreactiviteit vertoonden. Het onderzoek in de tandpulp toonde echter aan dat odontoblasten niet immunoreactief kleurden voor GFAP. GFAP wordt vaak als merker voor Schwann cellen gebruikt maar in de tandpulp waren bijna alle Schwann cellen negatief voor GFAP immunoreactiviteit. Fibroblasten en ongedifferentieerde mesenchymale cellen vertonen wel immunoreactiviteit. In hun onderzoek suggereren ze dat GFAP immunoreactieve cellen waarschijnlijk fibroblasten en/of ongedifferentieerde mesenchymale cellen zijn of misschien zelfs stamcellen (40). In een ander onderzoek werd geconcludeerd dat cellen geïsoleerd van volwassen humane tandpulp clonogisch zijn en een multipotent differentiatie potentieel hebben. Deze cellen voldoen bijgevolg aan de criteria van postnatale somatische stamcellen (41). De mogelijkheid bestaat dus dat de GFAP immunoreactieve cellen een soort van stamcellen zijn die misschien op een veel later tijdstip pas differentiëren naar odontoblast-achtige cellen. Een ander onderzoek trekt dan weer in twijfel dat de gedetecteerde GFAP immunoreactieve moleculen ook effectief GFAP zijn. De data suggereren dat het om niet-specifieke bindingsreacties gaat met een nauw verwant type intermediair filament (42). Verder onderzoek naar de moleculaire samenstelling van de gedetecteerde proteïnes zal moeten uitwijzen of het om GFAP gaat. Over welk type cel het ook gaat, het lijkt erop dat de additie van DMP de proliferatie van dit type cel inhibeert terwijl β GP geen effect heeft ten opzichte van de controle.

Bij de immunokleuring voor α -SMA werd op dag 14 immunoreactiviteit waargenomen bij elke conditie. De met β GP behandelde cellen vertoonde meer immunoreactiviteit dan de controle en immunokleuring was zeldzaam in DMP. Na 28 dagen waren zowel controle als β GP sterk gekleurd en kwam immunoreactiviteit bij DMP slechts sporadisch voor. In een onderzoek van begin 2006 werd α -SMA geïdentificeerd als een mechanogevoelig proteïne dat gerekruteerd wordt naar stressvezels onder hoge spanning (43). Deze vezels duiken op wanneer bijvoorbeeld cellen differentiatie ondergaan. Bij zowel de controle als de β GP coupes lijken dus veel cellen te differentiëren, terwijl dit proces bij DMP zeldzaam is. Weer

bestaat de mogelijkheid dat tussen de DMP een proteïne aanwezig is dat differentiatie gedeeltelijk inhibeert. Een ander onderzoek bij osteoblasten toonde dan weer aan dat de aanwezigheid van hydroxyapatiet, ook een sleutel element in dentine, de genexpressie van deze cellen opreguleert en een trend naar differentiatie wordt waargenomen (44). Deze twee artikels lijken elkaar tegen te spreken.

Een ander onderzoek in de differentiatie van humane pulpacellen naar odontoblasten geeft een mogelijke oplossing. Ze halen aan dat pericyten de mogelijkheid hebben te differentiëren naar osteoblasten, chondrocyten en adipocyten. Verder suggereren ze dan dat odontoblast-achtige cellen wel eens afkomstig kunnen zijn van de perivasculaire cellen. Een experiment met een synthetisch glucocorticoid toonde aan dat de toevoeging ervan de celproliferatie significant inhibeerde en grondig de proportie van α -SMA positieve cellen verminderde. Het corticoid stimuleerde dan weer sterk de ALPase activiteit en induceerde expressie van een belangrijke odontoblast merker. Hun observaties tonen dat glucocorticoiden de progenitors afkomstig van tandpulpa in de richting van differentiatie naar odontoblast-achtige cellen duwt terwijl het de α -SMA activiteit laat dalen (39). Die resultaten in dit artikel geven een mogelijke verklaring waarom de DMP conditie zo weinig cellen vertoonde alsook waarom er slechts weinig α -SMA aanwezig was ten opzichte van de controle en de β GP.

Vimentine immunoreactiviteit was op dag 7 voor de controle enkel aanwezig in delende cellen. Voor de β GP conditie was er immunoreactiviteit in zowel delende als niet delende cellen. Ook DMP vertoonde in ongeveer de helft van de cellen immunoreactiviteit. Op dag 28 waren zowel de controle en de β GP sterk immunoreactief. Bij DMP was slechts ongeveer de helft van de cellen reactief. Wanneer een cel positief kleurt voor vimentine kan dit erop wijzen dat de cel van mesenchymale oorsprong is (45). Odontoblasten kleuren volgens een artikel ook positief voor vimentine en zijn dus ook van mesenchymale oorsprong (46). Ook tandpulpa stamcellen kleuren positief voor vimentine (41). De immunoreactieve cellen in de coupes waren dus van mesenchymale oorsprong of een vorm van stamcellen. Het is niet geweten of het hier om odontoblasten gaat of andere cellen zoals fibroblasten. Het aanbrengen van een dubbelkleuring op dezelfde coupes kan hierbij uitsluitsel geven. De tweede kleuring is hierbij reactief voor een ander proteïne in odontoblasten. Voor zo een dubbelkleuring kan eventueel gebruik gemaakt worden van antilichamen gekoppeld aan green fluorescent protein en mutaties hiervan met een andere kleur.

De coupes gekleurd voor S-100 vertoonden een sterke immunoreactiviteit voor elke conditie op elk tijdstip. S-100 proteïnes zijn een groep van 3 dicht gerelateerde isovormen. Er is aangetoond door gebruik te maken van polyclonale antilichamen dat ze in het cytoplasma van

odontoblasten voorkomen. Gesuggereerd wordt dat S-100 een rol speelt in bepaalde functies van de odontoblast (47). Uit een later uitgevoerd onderzoek bleek dat de twee α -isovormen niet voorkwamen in de tandpulp en enkel de β -vorm hier gedetecteerd werd. Hun resultaten indiceerden dat S-100 β een merker is voor Schwann cellen (48).

Naar de toekomst toe is het misschien nuttig om de verschillende proteïnes in DMP te identificeren en hun afzonderlijk effect op tandpulpaculturen te controleren. Het is misschien zo dat er meerdere celtypen uiteindelijk leiden tot odontoblast-differentiatie, of dat er een langere periode nodig is vooraleer deze differentiatie optreedt.

Het odontoblast cultuursysteem werd ook door middel van EM geanalyseerd. Uit het onderzoek bleek dat de cellen sterke synthetiserende eigenschappen vertoonden zoals overvloedig synthesesegelerelateerde organellen en uitgebreid euchromatine. Uitlopers werden ook waargenomen in de directe omgeving van de cel. Verdere analyse zal moeten uitwijzen of deze cellen inderdaad odontoblast-gelijken cellen zijn.

Tand coupe orgaan culturen werden geproduceerd van rattenkaken. Deze culturen werden gedurende 0, 1, 3 of 7 dagen in cultuur gebracht. LM analyse werd vervolgens uitgevoerd door immunokleuringen voor de proteïnes GFAP, CGRP en S-100 toe te passen op de tand coupe orgaanculturen. Deze proteïnes zijn neurale gerelateerde moleculen en worden hier gebruikt om hun aanwezigheid in tand coupes te bestuderen op het moment van schade en de periode die daarop volgt.

Uit de resultaten van deze studie blijkt dat het neuropeptide CGRP aanwezig was op dag nul, de dag dat de coupes gemaakt werden. De hoeveelheid CGRP daalde vervolgens significant naar dag 1 en dag 3 toe. Tussen dag 3 en 7 was er geen significant verschil zichtbaar en was de immunoreactiviteit nagenoeg nul. CGRP is een neuropeptide geassocieerd met ontsteking (49). Een studie op rattentanden werd uitgevoerd waarbij de CGRP immunohistochemie in de wondheling na schade bestudeerd werd. De resultaten suggereren dat CGRP een rol speelt in het herstelproces door een belangrijke factor te zijn in het dentine brugvorming (50). CGRP oefent groeiregulerende effecten uit op pulpale cellen in vitro, dit suggereert dat sensorische neuropeptiden een rol spelen tijdens pulpale ontwikkeling of in de wondheling na pulpale schade (51). Verschillende studies hebben de rol van CGRP in het reguleren van immuunfuncties al aangetoond, afwezigheid van CGRP op plaatsen van pulpale schade had bijgevolg negatieve effecten op het herstelproces (52-54).

De studie toonde voor de S-100 immunoreactiviteit aan dat er geen significant verschil was tussen de vier tijdstippen. Er kan dus geconcludeerd worden dat gaande tot dag 7 de

hoeveelheid S-100 immunoreactiviteit onveranderd blijft. De studie liet wel een verschil zien in het kleuringspatroon, gaande van vezelvormig tot een meer globulair patroon. Voor S-100 immunoreactiviteit toonde de studie ook aan dat er geen significant verschil was tussen de vier tijdstippen. Ook viel de sterke kleuring in de odontoblastenlaag op. Dit toont aan dat er geen verhoogde of verlaagde expressie van S-100 proteïne is en dat de Schwann cellen waarvan S-100 een merker zijn geen proliferatie of een op-regulatie van hun activiteit zouden ervaren. S-100 proteïnes zijn calcium bindende proteïnen, ze spelen een rol in de Ca^{2+} signalering en controleren belangrijke cellulaire processen zoals differentiatie en metabolisme (55). Deze proteïnes spelen dus een belangrijke rol in het herstel waarbij proliferatie van gezonde cellen nodig is om de beschadigde cellen te vervangen. Hun tweede belangrijke functie is het calciummetabolisme, waarin zij een belangrijke rol spelen voor het herstel van het dentine. De overgang naar het globulaire patroon zou het gevolg kunnen zijn van de degeneratie van de Schwann cellen. De verhoogde immunoreactiviteit in de odontoblastenlaag betekent dan misschien dat de odontoblasten de S-100 synthetiserende functie van de Schwann cellen overnemen zodat de rol van S-100 in het herstel niet verstoord wordt.

Voor GFAP immunoreactiviteit toonde de studie ook aan dat er geen significant verschil is tussen de vier tijdstippen. Hier kon ook, net zoals bij S-100 geconcludeerd worden dat gaande tot dag 7 de GFAP immunoreactiviteit onveranderd blijft. De studie liet ook hier een verschil in kleuringspatroon zien, gaande van vezelvormig tot een meer globulaire. GFAP is ook een merker van Schwann cellen, bij GFAP echter vertoonde de odontoblastenlaag geen verhoogde kleuring. Dit trekt de degeneratie van de Schwann cellen in twijfel in het tand coupe orgaan cultuur systeem. Ook al was er een verandering in kleuringspatroon zoals bij S-100, de hoeveelheid bleef onveranderd zonder dat de odontoblasten de functie overnamen. Mogelijk ondergingen de Schwann cellen slechts een morfologische verandering om aan het nieuwe milieu aan te passen.

De tand coupe orgaan culturen werden ook aan een EM analyse onderworpen. Deze analyse liet zien dat de odontoblast nauw gelegen is aan zenuwceluitlopers en dat de structuren eigenschappen vertonen van een synaps. Er werden ook primaire cilia gevonden op de odontoblasten, deze structuren lagen ook in de buurt van de zenuwceluitlopers. De zenuwceluitlopers waren vaak gedeeltelijk omsloten door cytoplasma van Schwann cellen. In de buurt van het odontoblastlichaam en de primaire cilia echter was dit Schwann cel cytoplasma afwezig. De afwezigheid van Schwann cel cytoplasma zou wel de mogelijkheid bieden tot communicatie tussen de odontoblast en de zenuwceluitlopers. Er zijn al

verschillende onderzoeken uitgevoerd die suggereren dat het primair cilium wel eens een sensorische receptorfunctie zou uitoefenen (19,56). Er is echter nog niet veel onderzoek gedaan naar de mogelijke synapsvorming tussen de odontoblast en de zenuwvezel. In vele dentinetubuli liggen de odontoblast uitloper en de zenuwvezel samen (57). Tot nu toe werden nog geen gespecialiseerde membraanstructuren tussen de twee waargenomen (58). Een hypothese zou kunnen zijn dat de zenuwvezel als sensor fungeert in de dentinetubuli terwijl de primaire cilia een sensorische rol spelen in de odontoblastenlaag. De synapsachtige structuren, waargenomen in deze studie tussen het odontoblast cellichaam en de zenuwvezel, zouden wel eens de integratie van de twee sensorische datastromen kunnen zijn. Verdere studies hieromtrent zullen nodig om deze hypothese te testen.

Literatuurlijst

1. Gartner PG, Hiatt JL. Color textbook of histology. Philadelphia: Saunders; 2001. p. 366.
2. Tortora GJ, Grabowski SR. Principles of Anatomy and Physiology. New York: Wiley; 2001. p. 827.
3. Kuroiwa M, Kodaka T, Abe M, Higashi S. Three-dimensional observations of accessory canals in mature and developing rat molar teeth. *Acta Anat (Basel)* 1992;143(2):130-8.
4. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. Dento-osseous structures. In: A Colour atlas and textbook of oral anatomy histology and embryology. London: Wolfe; 1992. p. 24.
5. Ten Cate AR, Nanci A. Structure of the oral tissues. In: Nanci A, editor. Ten Cate's oral histology. St. Louis: Mosby; 2003. p. 1-6.
6. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. Enamel. In: A Colour atlas and textbook of oral anatomy histology and embryology. London: Wolfe; 1992. p. 112.
7. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. Cementum. In: A Colour atlas and textbook of oral anatomy histology and embryology. London: Wolfe; 1992. p. 155-9.
8. Nanci A, Somerman MJ. Periodontium. In: Nanci A, editor. Ten Cate's oral histology. St. Louis: Mosby; 2003. p. 261.
9. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. Alveolar bone. In: A Colour atlas and textbook of oral anatomy histology and embryology. London: Wolfe; 1992. p. 190.
10. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. Oral mucosa. In: A Colour atlas and textbook of oral anatomy histology and embryology. London: Wolfe; 1992. p. 207.
11. Nanci A. Dentin-pulp complex. In: Nanci A, editor. Ten Cate's oral histology. St. Louis: Mosby; 2003. p. 193-5,215-29,233-5.
12. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. Dental pulp. In: A Colour atlas and textbook of oral anatomy histology and embryology. London: Wolfe; 1992. p. 147-9.
13. Lyn P, Fiore-Donno G, Lombardi T. The connective tissue cells of human dental pulp: an histologic and immunohistochemical study. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol* 1991;34(3-4):133-7.
14. Ruch JV. Odontoblast commitment and differentiation. *Biochem Cell Biol* 1998;76(6):923-38.
15. Yoshida K, Yoshida N, Ejiri S, Iwaku M, Ozawa H. Odontoblast processes in human dentin revealed by fluorescence labeling and transmission electron microscopy. *Histochem Cell Biol* 2002;118(3):205-12.
16. Magloire H, Couble ML, Romeas A, Bleicher F. Odontoblast primary cilia: facts and hypotheses. *Cell Biol Int* 2004;28(2):93-9.
17. Higashi K, Matsuki S, Soeda M, Takagi T, Sasa S, Osada T. Fine structures of primary cilia in the odontoblasts of the lower molar teeth of rats. *Kanagawa Shigaku* 1987;21(4):611-22.
18. Davenport JR, Yoder BK. An incredible decade for the primary cilium: a look at a once-forgotten organelle. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289(6):F1159-69.
19. Wheatley DN. Landmarks in the first hundred years of primary (9+0) cilium research. *Cell Biol Int* 2005;29(5):333-9.
20. Kubota K. Comparative study of the single cilium of dental pulp cells. *J Nihon Univ Sch Dent* 1977;19(1):11-5.
21. Pazour GJ, Witman GB. The vertebrate primary cilium is a sensory organelle. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15(1):105-10.
22. Senawongse P, Otsuki M, Tagami J, Mjor I. Age-related changes in hardness and modulus of elasticity of dentine. *Arch Oral Biol* 2006;51(6):457-63.
23. George A, Hao J. Role of phosphophoryn in dentin mineralization. *Cells Tissues Organs* 2005;181(3-4):232-40.
24. Mitsiadis TA, Rahiotis C. Parallels between tooth development and repair: conserved molecular mechanisms following carious and dental injury. *J Dent Res* 2004;83(12):896-902.
25. D'Souza R. Development of the pulp-dentin complex. In: Hargreaves KM, Goodis HE, editors. Seltzer and Bender's dental pulp. Chicago: Quintessence; 2002. p. 13-7.
26. Ten Cate AR, Sharpe PT, Roy S, Nanci A. Development of the tooth and its supporting tissues. In: Nanci A, editor. Ten Cate's oral histology. St. Louis: Mosby; 2003. p. 79-90,99-100,107-8.
27. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. Early tooth development. In: A Colour atlas and textbook of oral anatomy histology and embryology. London: Wolfe; 1992. p. 248.
28. Tompkins K. Molecular mechanisms of cytodifferentiation in Mammalian tooth development. *Connect Tissue Res* 2006;47(3):111-8.
29. Leonardi R, Barbato E, Paganelli C, Lo Muzio L. Immunolocalization of heat shock protein 27 in developing jaw bones and tooth germs of human fetuses. *Calcif Tissue Int* 2004;75(6):509-16.
30. Ryoo HM, Wang XP. Control of tooth morphogenesis by Runx2. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2006;16(2):143-54.
31. Scott JH, Dixon AD. Anatomy for students of dentistry. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1978. p. 219.

-
32. Matalova E, Antonarakis GS, Sharpe PT, Tucker AS. Cell lineage of primary and secondary enamel knots. *Dev Dyn* 2005;233(3):754-9.
 33. Mohamed SS, Atkinson ME. A histological study of the innervation of developing mouse teeth. *J Anat* 1983;136(Pt 4):735-49.
 34. Kollar EJ, Lumsden AG. Tooth morphogenesis: the role of the innervation during induction and pattern formation. *J Biol Buccale* 1979;7(1):49-60.
 35. Johnsen DC. Innervation of teeth : developmental aspects. In: Inoki R, Kudo T, Olgart LM, editors. *Dynamic Aspects of Dental Pulp*. London: Chapman and hall; 1990. p. 3-19.
 36. Beyers MR, Närhi MVO. Nerve supply of the pulpodentin complex and responses to injury. In: Hargreaves KM, Goodis HE, editors. *Seltzer and Bender's dental pulp*. Chicago: Quintessence; 2002. p. 154-5.
 37. van Donkelaar R, Sommerdijk N. What is the role of cells in mineralization of cartilage? URL: <http://www.ifp.tue.nl/infoscherm.asp?project=239&faculteit=>
 38. Bretschneider A, Burns W, Morrison A. The ultrastructure of paraffin-embedded sections. *Am J Clin Pathol* 1981;76(4):450-3.
 39. Alliot-Licht B, Bluteau G, Magne D, Lopez-Cazaux S, Lieubeau B, Daculsi G, et al. Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. *Cell Tissue Res* 2005;321(3):391-400.
 40. Byers MR, Maeda T, Brown AM, Westenbroek RE. GFAP immunoreactivity and transcription in trigeminal and dental tissues of rats and transgenic GFP/GFAP mice. *Microsc Res Tech* 2004;65(6):295-307.
 41. He F, Tan YH, Zhang G. Isolation and identification of human dental pulp stem cells. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2005;23(1):75-8.
 42. Ajima H, Kawano Y, Takagi R, Aita M, Gomi H, Byers MR, et al. The exact expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in trigeminal ganglion and dental pulp. *Arch Histol Cytol* 2001;64(5):503-11.
 43. Goffin JM, Pittet P, Csucs G, Lussi JW, Meister JJ, Hinz B. Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of alpha-smooth muscle actin to stress fibers. *J Cell Biol* 2006;172(2):259-68.
 44. Xie J, Baumann MJ, McCabe LR. Osteoblasts respond to hydroxyapatite surfaces with immediate changes in gene expression. *J Biomed Mater Res A* 2004;71(1):108-17.
 45. Fu YF, Zhang FQ, Wu W, Weng YL. Culture and characteristics of porcine dental papilla cells (pDPCs) in vitro. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 2006;15(2):172-6.
 46. Martinez G, Carnazza ML, Leonardi R, Loreto C. Expression of vimentin intermediate filament in human odontoblast. *Minerva Stomatol* 2000;49(7-8):333-7.
 47. Lombardi T, Di Felice R, Samson J. Human odontoblasts contain S-100 protein-like immunoreactivity. *Anat Rec* 1992;232(2):190-3.
 48. Atsumi Y, Nozawa-Inoue K, Maeda T, Kurisu K, Wakisaka S. Immunohistochemical localization of S-100beta in the dental pulp of the rat molar. *Brain Res* 1999;818(2):515-9.
 49. Fugaro OJ, Fugaro JO, Matis B, Gregory RL, Cochran MA, Mjor I. The dental pulp: inflammatory markers and vital bleaching. *Am J Dent* 2005;18(4):229-32.
 50. Zhang M, Fukuyama H. CGRP immunohistochemistry in wound healing and dentin bridge formation following rat molar pulpotomy. *Histochem Cell Biol* 1999;112(5):325-33.
 51. Bongenhielm U, Haegerstrand A, Theodorsson E, Fried K. Effects of neuropeptides on growth of cultivated rat molar pulp fibroblasts. *Regul Pept* 1995;60(2-3):91-8.
 52. Yaraee R, Ebtekar M, Ahmadiani A, Sabahi F. Effect of neuropeptides (SP and CGRP) on antigen presentation by macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2005;27(3):395-404.
 53. Levite M, Chowder Y. Nerve-driven immunity: neuropeptides regulate cytokine secretion of T cells and intestinal epithelial cells in a direct, powerful and contextual manner. *Ann Oncol* 2001;12(Suppl 2):S19-25.
 54. Cuesta MC, Quintero L, Pons H, Suarez-Roca H. Substance P and calcitonin gene-related peptide increase IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha secretion from human peripheral blood mononuclear cells. *Neurochem Int* 2002;40(4):301-6.
 55. Duarte WR, Kasugai S, Iimura T, Oida S, Takenaga K, Ohya K, et al. cDNA cloning of S-100 calcium-binding proteins from bovine periodontal ligament and their expression in oral tissues. *J Dent Res* 1998;77(9):1694-9.
 56. Praetorius HA, Spring KR. Removal of the MDCK cell primary cilium abolishes flow sensing. *J Membr Biol* 2003;191(1):69-76.
 57. Carda C, Peydro A. Ultrastructural patterns of human dentinal tubules, odontoblast processes and nerve fibres. *Tissue Cell* 2006;38(2):141-50.
 58. Tsukada K. Ultrastructure of the relationship between odontoblast processes and nerve fibres in dentinal tubules of rat molar teeth. *Arch Oral Biol* 1987;32(2):87-92.
-

Bijlagen

Bijlage 1 Kwantitatieve bepaling van de immunokleuring

- 1) Start het programma Image J 1.34s.
- 2) Open de gewenste afbeelding.

File – Open...

- 3) Zet de afbeelding om van RGB color naar 8-bit color met 256 kleuren. De oorspronkelijke RGB color afbeelding bevat tot 256^3 kleurtinten, dit is te veel voor een analyse. Een 8-bit color met 256 kleurtinten is doenbaar voor verwerking.

Image – Type – 8-bit Color – 256 – Ok

- 4) Open de Look Up Table (LUT) editor voor de 256 gebruikte kleuren. Deze editor toont alle kleurtinten die in de afbeelding gebruikt zijn.

Image – Color – Edit LUT...

- 5) Zet de bruinrijze/bruinpaarse tinten van de immunokleuring om naar een opvallende kleur (e.g. geel).

In de editor kunnen de tinten die in immunoreactiviteit voorkomen één voor één aangeklikt worden en vervangen worden door geel. De nummers van de aangepaste tinten zijn nodig voor later en worden best genoteerd (**Color at Entry #** in de titelbalk waar je de kleur aanpast).

Red 255

Green 255

Blue 0

Op de afbeelding kan nagekeken worden wat het effect is bij elke tintverandering. Zo kan nagegaan worden of het enkel de immunokleuring is die beïnvloed wordt en niet te veel pixels uit de rest van de afbeelding. Hier en daar kan wel een gele pixel optreden maar dit is verwaarloosbaar.

(De nieuwe LUT kan eventueel voor later opgeslagen worden → **Save...**)

Ok

- 6) Haal de lijst op met het aantal pixels per kleurtint.

Analyze – Histogram – List – Copy All

Open het Excel document “Immunokleuring bepaling”.

-
- 7) Plak de lijst in **C14** (gele cel onder de titel Tint).
- 8) Vul de pixel afmeting van de afbeelding in in **B3** en **D3** (eerste twee gele cellen).
In Image J is de afmeting terug te vinden in het venster waarin de afbeelding wordt weergegeven net boven de afbeelding zelf. Indien het weefsel niet het volledige beeld beslaat kan de functie **Polygon selections** gebruikt worden om de omtrek van de coupe aan te duiden. Wanneer bij **Analyze – Set measurements...** de optie **Area** aangevinkt wordt, kan vervolgens bij **Analyze – Measure** het oppervlak van dit weefseldeel in pixels afgelezen worden.
- 9) In **B5** (derde gele cel) wordt naar het aantal immunokleuring pixels gevraagd. Dit wordt ingevuld onder de vorm van “=nr1+nr12+nr65”.
Het Excel document is zo aangepast dat het automatisch in de lijst opzoekt welke tinten overeenkomen met de ingevulde nummers en vervolgens het aantal pixels optelt.
- 10) In **B7** (eerste blauwe cel) verschijnt het percentage immunokleuring aanwezig in de afbeelding.
$$100/(\text{grootte afbeelding in pixels}) * (\text{aantal immunokleuring pixels})$$
- 11) Als in **D9** (vierde gele cel) het aantal pixels ingegeven wordt dat overeen komt met 100 μm dan kan in **B11** (tweede blauwe cel) het oppervlak dat de immunoreactiviteit inneemt aflezen worden.
$$(\text{Aantal immunokleuring pixels}) * (100/\text{aantal pixels per } 100 \mu\text{m})^2$$

Voor afbeeldingen gemaakt met de Nikon Coolscope kan de GEMA tabel gebruikt worden.

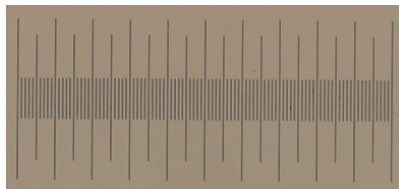
Bijlage 2 Ontwikkeling van de GEMA-tabel

De GEMA-tabel is een tabel bedoeld voor de omzetting van pixels naar micrometer van foto's van coupes gemaakt met de Nikon Coolscope. De Nikon Coolscope, een digitale microscoop, kan van histologische coupes foto's maken en deze vervolgens opslaan onder verschillende formaten. Afhankelijk van dit formaat komt een verschillend aantal pixels overeen met 1 μm op de coupe.

In de software van de Nikon Coolscope kan een schaal weergegeven worden zodat afstanden bepaald kunnen worden. Deze schaal kan echter niet samen met de afbeelding opgeslagen worden, zodat bij later bekijken van de afbeeldingen elke vorm van maateenheid (buiten de pixel) verloren gaat. Om dit probleem te omzeilen kan gebruik gemaakt worden van de GEMA-tabel.

Werkwijze

Een gekalibreerd objectglaasje, te zien in figuur 19, werd in de Nikon Coolscope gebracht. Dit objectglaasje was voorzien van een meetlatje met een lengte van 1000 μm (1 mm). De kleinste afstand meetbaar door gebruikmaking van het meetlatje bedroeg 10 μm .



Figuur 19. Gekalibreerd objectglaasje.

Het objectglaasje werd onder de 4 vergrotingen bekeken (5x 10x 20x 40x) en voor elke vergroting werd het beeld onder alle mogelijke combinaties van formaten, groottes en kwaliteiten opgeslagen.

De afbeeldingen van het gekalibreerde objectglaasje werden geopend in het tekenprogramma Microsoft® Paint en vervolgens bijgesneden zodat er enkel een stuk van 100 μm te zien was (afstand tussen twee grote strepen). Het bijsnijden van de afbeeldingen gebeurde door de grepen van de afbeelding te slepen. De grepen bevinden zich in de rechterbenedenhoek en langs de onderkant en rechterkant van de afbeelding. Om de afbeelding langs de andere zijde ook bij te snijden werd deze gespiegeld: **Afbeelding – Spiegelen/draaien...– Horizontaal spiegelen – Ok.**

Het fijne bijsnijwerk gebeurde onder vergroting door de optie vergroten (icoontje met vergrootglas) toe te passen. Op deze manier kon op 1 pixel nauwkeurig gesneden worden.

Een volledige grote streep ofwel de helft van alle twee de grote strepen werden weggesneden, dit omdat de strepen zelf ook een breedte hebben. Indien de afstand 100 μm de breedte van de grensstrepen zou inhouden, zou het volledige meetlatje, tien keer die lengte lang, in totaal 20 grote strepen moeten bevatten in plaats van 11. Het weglaten van de grote strepen zou ook een fout geleverd hebben, omdat de berekende waarde van het volledige meetlatje dan kleiner zou zijn als het werkelijke afstand.

De strepen van het objectglaasje staan niet altijd perfect recht ten opzichte van de pixel kolommen, er werd dus bij het bijsnijden steeds op dezelfde hoogte gekeken. Ook werd voor dezelfde afbeelding verschillende stukken van het meetlatje gebruikt om de pixel afstand te verifiëren. Zelden kwam het voor dat de waarde 1 pixel verschilde. Indien dit laatste het geval was, werd de waarde die het meest voorkwam geacht de juiste te zijn. Of deze afwijkende waarde van een pixel als oorzaak had een slechte bijsnijding of een lichte afwijking in het meetlatje was onduidelijk.

Voor de 40x vergroting was het zeer moeilijk en onbetrouwbaar om de waarde te bepalen, hier werd dan de waarden vanuit de drie voorgaande vergrotingen geëxtrapoleerd.

Eens de afbeelding bijgesneden was kon via het menu **Afbeelding - kenmerken...**, in het vakje naast **Breedte** wanneer **pixels** was aangestipt, de breedte in pixels afgelezen worden die overeenkomt met 100 μm in die afbeelding.

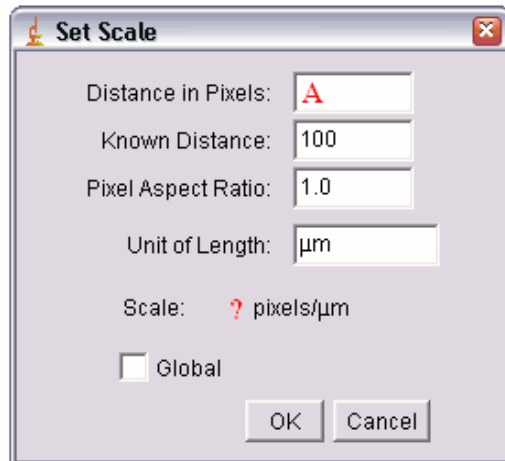
Nadat voor alle afbeeldingen de bepaling gebeurd was van de pixel- μm overeenkomst kon geconstateerd worden dat enkel de vergroting en de optie Full/Middle het aantal pixels per 100 μm verandert. Het resultaat van alle bewerkingen is de GEMA-tabel, weergegeven als tabel 9.

Tabel 9. GEMA-tabel.

Type foto	Pixels/100 μm
Full-5x	74
Full-10x	148
Full-20x	296
Full-40x	592
Middle-5x	37
Middle-10x	74
Middle-20x	148
Middle-40x	296

Bijlage 3 Pixels- μm omzetting in Image J van Nikon Coolscope afbeeldingen

Klik in het in het tabblad “**Analyze**” op “**Set Scale...**”, vervolgens verschijnt het venster dat te zien is in figuur 20.



Figuur 20. Set Scale... menu.

- Op de plaats van de “A” wordt het aantal pixels ingegeven dat overeenkomt met 100 μm voor het gebruikte type afbeelding. Deze waarde is te vinden in de GEMA-tabel.
- Op de plaats van het vraagteken verschijnt dan ter informatie het aantal pixels per μm .
- Wanneer “**Global**” aangevinkt is, zal de gedefinieerde schaal op alle afbeeldingen van toepassing zijn, de schaal wordt in het programma opgeslagen.
- Klik op “**OK**”, vanaf nu kunnen in de afbeeldingen metingen gedaan worden in gekalibreerde eenheden, hier de μm .

Algemeen:

Distance in Pixels: Zet hier het aantal pixels dat overeenkomt met die afstand ingegeven in **Known Distance** met als eenheid die eenheid ingegeven in **Units of Length**. Wanneer 0 (nul) wordt ingevuld wordt er terug overgegaan naar pixel metingen.

Pixel Aspect Ratio: Het hier invullen van een waarde verschillend van 1.0 laat het gebruik toe van verschillende ruimtelijke waarden voor de horizontale en de verticale schaal. De ratio horizontaal/verticaal kan dus hiermee ingesteld worden.

Auteursrechterlijke overeenkomst

Opdat de Universiteit Hasselt uw eindverhandeling wereldwijd kan reproduceren, vertalen en distribueren is uw akkoord voor deze overeenkomst noodzakelijk. Gelieve de tijd te nemen om deze overeenkomst door te nemen en uw akkoord te verlenen.

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

De neuro-odontoblast relatie en het odontoblast cultuursysteem uit gezonde humane pulpa

Richting: **Master in de biomedische wetenschappen**

Jaar: **2006**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt houdt in dat ik/wij als auteur de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij kan reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

U bevestigt dat de eindverhandeling uw origineel werk is, en dat u het recht heeft om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. U verklaart tevens dat de eindverhandeling, naar uw weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

U verklaart tevens dat u voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen hebt verkregen zodat u deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal u als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze licentie

Ik ga akkoord,

Geert FREDERIX

Datum: