

**Das Infundibulum equiner maxillärer Backenzähne:
Embryologische, makroskopische und mikroskopische
Untersuchungen zur infundibulären Zementogenese sowie
zu zahnatomischen Formvarianten**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Anika Suske

Aus dem Institut für Veterinär -Anatomie, -Histologie und -Embryologie

Betreuer: Prof. Dr. C. Staszky

**Das Infundibulum equiner maxillärer Backenzähne:
Embryologische, makroskopische und mikroskopische
Untersuchungen zur infundibulären Zementogenese sowie
zu zahnanatomischen Formvarianten**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Anika Suske
Tierärztin aus Gardelegen

Gießen, 2016

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer
Klinik für Kleintiere, Chirurgie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. vet. C. Staszuk
Institut für Veterinär -Anatomie, -Histologie und -Embryologie,
Justus-Liebig-Universität Gießen

Prof. Dr. med. vet. M. Röcken
Klinik für Pferde – Chirurgie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der Disputation: 19.12.2016

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Publikation I.....	4
3	Publikation II.....	33
4	Übergreifende Diskussionen.....	63
	4.1. Infundibuläre Hartschubstanzbildung und infundibuläre Blutgefäßversorgung während der Odontogenese.....	63
	4.1.1. Blutgefäße.....	63
	4.1.2. Entwicklung der infundibulären Form.....	63
	4.1.3. Unterschiede zwischen dem mesialen und dem distalen Infundibulum.....	64
	4.1.4. Apikale Blutgefäßversorgung.....	65
	4.1.5. Infundibuläre Hartschubstanzbildung.....	65
	4.2. Infundibuläre zementäre Hypoplasie.....	66
	4.2.1. Definition der zementären Hypoplasie.....	66
	4.2.2. Prävalenz der zementären Hypoplasie.....	67
	4.2.3. Ursachen für die zementären Hypoplasie.....	68
	4.3. Prädisponierende Faktoren für infundibuläre Erkrankungen.....	69
	4.3.1. Zementäre Hypoplasie.....	69
	4.3.2. Komplexe dreidimensionale Infundibulumform.....	69
	4.3.3. Hämoglobinreste innerhalb des zementären Kanalsystems.....	69
	4.3.4. Schmelzhypoplasie.....	70
	4.4. Infundibuläre Erkrankungen.....	70
	4.5. Fazit.....	72
5	Zusammenfassung.....	74
6	Summary.....	78
7	Literaturverzeichnis.....	81
8	Publikationsverzeichnis.....	88
9	Ehrenwörtliche Erklärung.....	90
10	Danksagungen.....	91
11	Lebenslauf.....	93

1. Einleitung

Equine, maxilläre Backenzähne sind charakterisiert durch ein mesiales und ein distales Infundibulum, welche aus einem Schmelzbecher und dem ausfüllenden infundibulären Zement bestehen.

Das Erscheinungsbild der Infundibula unterliegt großer Variation, einmal in der äußeren Form und des Weiteren in der Vollständigkeit der zementären Füllung. Diese anatomischen Formvarianten erschweren die Beurteilung der Infundibula in Hinblick auf pathologische Veränderungen. Dennoch ist eine genaue Beurteilung des infundibulären Status für das therapeutische Vorgehen während einer Zahnbehandlung essentiell.

Die morphologische Komplexität der Infundibula erklärt sich aus der Odontogenese der Backenzähne. Grundsätzlich entwickeln sich die hypsodonten, maxillären Backenzähne des Pferdes in ihren Frühphasen (Knospen-, Kappen- und Glockenstadium) genau wie die brachyodonten Zähne anderer Säugetiere (Schnorr und Kressin, 2011; Dixon und Du Toit, 2010; Staszyk, 2011). Nach dem Glockenstadium wird die individuelle Zahnform durch genetische Faktoren und durch ihre Position innerhalb des Kiefers bestimmt (Cobourne et al., 1999; Lisi et al., 2003; Mitsiadis und Graf, 2009). Die Form des Zahnes entsteht durch mitotische Teilungen in räumlich streng determinierten Arealen des inneren Schmelzepithels (Lisi et al., 2003; Nanci, 2013). Bestimmte Bereiche dieses inneren Schmelzepithels proliferieren nicht und werden Schmelzknoten genannt, welche sich zu den Spitzen der späteren Schmelzhöcker auf der primären Okklusionsfläche entwickeln. Die Schmelzepithelzellen zwischen den Schmelzknoten teilen sich weiter, was zu einer Ausdehnung des inneren Schmelzepithels in alle Ebenen des Raumes führt. Es entstehen horizontale und vertikale Einfaltungen des inneren Schmelzepithels, welche die Form des äußeren Schmelzmantels aber auch die des infundibulären Schmelzbeckers bedingen. Das bedeutet, das Infundibulum entsteht durch eine apikal gerichtete Einfaltung des inneren Schmelzepithels mit zahlreichen zusätzlichen seitlichen Einfaltungen. Um das innere Schmelzepithel weiterhin nutritiv zu versorgen, muss das Gewebe des Zahnsäckchens dieser apikalen Einfaltung folgen.

Innerhalb des Zahnsäckchens befinden sich Zementoblasten und deren nutritiven Blutgefäße, beide Strukturen sind essentiell für die spätere Zementproduktion. Das Blutgefäßsystem geht von einer zentralen Infundibulararterie aus, welche von okklusal in das Infundibulum eintritt und sich dort wurzelartig verzweigt. Sobald der Zahn in die Maulhöhle eruptiert, wird das nutritive Gefäßsystem, welches von okklusal in das Infundibulum hinein zieht, gekappt.

Nachfolgend kann kein weiteres Zement gebildet werden. Einige Autoren postulieren die Existenz einer zusätzlichen Blutversorgung, durch den apikalen Boden des Infundibulums (Dacre, 2005; Johnson und Porter, 2006; Dixon und Du Toit, 2010). Dadurch wäre eine infundibuläre Blutversorgung über den Zeitpunkt der Eruption des Zahnes hinaus gewährleistet, gleichzeitig bliebe die nutritive Versorgung zementproduzierender Zellen (Zementoblasten) insbesondere in der Tiefe des Infundibulums bestehen.

Diese Hypothese steht allerdings in Widerspruch zu der vielfach gemachten Beobachtung, dass insbesondere am Boden des Infundibulums hypozementotische Areale auftreten.

Allerdings wäre durch diese anatomische Variante auch eine Verbindung zwischen dem Infundibulum und der benachbarten Zahnpulpa etabliert. Solch eine Verbindung käme aus aetiopathologischer Sicht als potentielle Eintrittspforte für pathogene Agenzien in das Endodontium in Frage.

Während der infundibulären Zementogenese werden die infundibulären Blutgefäße von Zement umschieden, so entsteht im infundibulären Zement ein Kanalsystem, welches die Architektur des ehemaligen Blutgefäßsystems abbildet. Der weiteste Kanal entsteht um das okklusale, zentrale Blutgefäß und ist regelmäßig auf der Okklusalfäche des Infundibulums sichtbar. Wenn dieser Kanal erweitert ist, spricht man von einer zementären Hypoplasie, wobei dieser Begriff bislang gar nicht oder nur vage definiert war (Dacre, 2005; Windley et al., 2009b; Klugh, 2010). Es wird allerdings von vielen Autoren bestätigt, dass eine zementäre Hypoplasie Futtereinspritzungen in das Infundibulum hinein ermöglicht (Johnson and Porter, 2006; Du Toit et al., 2008; Fitzgibbon et al., 2010). Dies kann zu einer Erkrankung des Infundibulums führen, was ein prädisponierender Faktor für Erkrankungen des ganzen Zahnes sein kann. Es können Endodontopathien, als Folge von Infundibulopathien auftreten, wobei bis jetzt der genaue Pathomechanismus nicht bekannt war.

Es wurde vorgeschlagen, dass es durch eine Infundibulopathie zu einer destruktiven Schädigung des infundibulären Schmelzes kommt, so dass nachfolgend Krankheitserreger vom Infundibulum aus in die nun exponierten Anteile des Endodontiums einwandern können. Bislang geht man davon aus, dass endodontische Erkrankungen maxillärer Backenzähne in 16% der Fälle durch vorangehende Infundibularerkrankungen verursacht werden (Dacre et al., 2008).

Zusätzlich können durch infundibuläre Erkrankungen aber auch Zahnfrakturen entstehen, da durch den Abbau von Infundibularzement das Infundibulum ausgehöhlt wird und der Zahn instabil wird, so dass dieser den starken, seitwärts gerichteten Kaukräften nicht mehr gewachsen ist (Baker, 1979; Dacre et al., 2007; Dixon et al., 2014).

In der bisherigen Literatur besteht keine Einigkeit bezüglich der Abgrenzung von morphologischen – nicht pathologischen – Varianten des Infundibulums gegenüber pathologischen, destruktiven Veränderungen.

In Folge dessen werden in der gängigen Literatur die Begriffe Infundibularkaries, Infundibularnekrose und im englischen Sprachgebrauch „infundibular decay“ synonym verwendet. Bei Betrachtung der wissenschaftlichen Definitionen der bislang synonym verwendeten Begriffe wird allerdings klar, dass eine gezielte histomorphologische Aufarbeitung von einzelnen infundibulär erkrankten Zähnen notwendig ist, um eine adäquate Diagnose zu stellen. So wird Karies durch das Vorhandensein bestimmter Mikroorganismen (u.a. *Streptococcus mutans*) definiert (Marsh and Partin, 1999; Fejerskov und Kidd, 2003; Selwitz et al., 2007). In der equinen Zahnmedizin gibt es bis zum jetzigen Zeitpunkt, keinen abschließenden Beweis für das Vorhandensein solcher Mikroorganismen, aber einige Autoren gehen davon aus, dass die infundibulären Veränderungen auf der gleichen Ätiopathologie beruhen wie die humane Karies (Borkent and Dixon, 2015).

Der Begriff Nekrose lässt sich streng genommen nur auf zuvor vitale Zellen anwenden, die destruktiven Prozesse unterliegen (Baumgärtner und Gruber, 2011).

Die bisher zur Verfügung stehenden Angaben aus der Literatur lassen also viele Fragen zur Genese und zu pathologischen Veränderungen der Infundibula offen.

Dementsprechend sind die Ziele dieser Studie folgendermaßen definiert.

1. Aufklärung der infundibulären Zementbildung während der Odontogenese. Dokumentation und Klassifizierung von morphologischen Varianten des Infundibulums.
2. Definition von nicht-pathologischen, infundibulären Malformationen in Abgrenzung zu pathologischen, destruktiven Infundibularerkrankungen.

2. Publikation I

Infundibula of equine maxillary cheek teeth. Part 1: development, blood supply and infundibular cementogenesis

A. Suske, A. Pöschke, P. Schrock, S. Kirschner, M. Brockmann, C. Staszuk

The Veterinary Journal

Volume 209, March 2016, Pages 57–65

DOI: 10.1016/j.tvjl.2015.07.029.

Akzeptiert am: 23.07.2015

Original Article

Infundibula of equine maxillary cheek teeth. Part 1: Development, blood supply and infundibular cementogenesis

A. Suske^a, A. Pöschke^a, P. Schrock^b, S. Kirschner^c, M. Brockmann^{c,d}, C. Staszuk^{a,*}

^a*Institute of Veterinary-Anatomy, -Histology and -Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus Liebig University Giessen, Frankfurter Str. 98, 35390 Giessen, Germany*

^b*Institute of Anatomy, University of Veterinary Medicine Hannover, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover, Germany*

^c*Department of Neuroradiology, Medical Faculty Mannheim, University of Heidelberg, Theodor-Kutzer-Ufer 1-3, 68167 Mannheim, Germany*

^d*Department of Diagnostic and Interventional Neuroradiology, University Hospital of the RWTH Aachen, 52074 Aachen, Germany*

* *Corresponding author. Tel.: +49 (0) 641/99-38112
E-mail address: Carsten.Staszuk@vetmed.uni-giessen.de (C. Staszuk)*

Abstract

There is increasing interest in diseases of infundibula of equine maxillary cheek teeth. Imperfect infundibular cementogenesis has been recognized as an aetiopathological factor for the onset of infundibular necrosis. In this article, infundibular development was examined with particular attention to infundibular blood vessels and cementogenesis.

Forty-one deciduous maxillary premolars prior to eruption were investigated using routine histological and immunohistological methods to visualize blood vessels and the enamel organ. Selected specimens were scanned by micro-computed tomography to analyze the three-dimensional configuration of the developing infundibulum.

Before eruption, the infundibula are supplied by a central infundibular artery entering the infundibulum from an occlusal direction and by arteries entering the mesial infundibulum from the mesial aspect, and the distal infundibulum from the distal aspect. The central infundibular artery is destroyed shortly after tooth eruption but the lateral arteries remain vital for a time after eruption. As the arteries of the distal infundibulum are located in a more apical position, blood is received for a longer period compared with the mesial infundibulum. Cementogenesis starts first at distinct enamel in-foldings in the occlusal part of the infundibula, advancing in an apical direction. These results suggest a distinct asymmetry between the infundibula with the mesial infundibulum being prone to incomplete cementogenesis due to early blood supply cessation.

Keywords: Horse; Dentistry; Infundibulum; Odontogenesis; Cementum

Introduction

Equine maxillary cheek teeth are characterized by two deep enamel invaginations, the mesial and the distal infundibula. The infundibula usually contain a filling of infundibular cementum, but incomplete cemental fillings are frequently reported and may lead to food entrapment causing infundibular necrosis (Johnson and Porter, 2006; Du Toit et al., 2008; Fitzgibbon et al., 2010), which is recognized as a significant factor in both endodontic diseases (Dacre et al., 2008; Van den Enden et al., 2008; Veraa et al., 2009) and tooth fractures (Baker, 1979; Dacre et al., 2007; Dixon et al., 2014).

It has been suggested that incomplete infundibular cementogenesis is caused by an insufficient infundibular blood supply during pre-eruptive tooth development, but infundibular development is only poorly understood although the morphology of healthy infundibula has been described in several studies (Windley et al., 2009a; Fitzgibbon et al., 2010).

Early odontogenesis is very similar within mammals. Each tooth develops from an ectodermally-derived enamel organ, which typically progresses through a bud and cap to a bell stage (Dixon and Du Toit, 2010; Schnorr and Kressin, 2011; Staszuk, 2011). The enamel organ is surrounded by the ectomesenchymal-derived dental follicle, which gives rise to the cells of the periodontium (cementoblasts, periodontal ligament fibroblasts and alveolar bone osteoblasts).

A unique feature of equine teeth is the covering of enamel surfaces with dental cementum. After bell stage formation, the further development of the individual tooth shape is governed by genetic factors and by the position of the tooth germ within the oral cavity (Cobourne et al., 1999; Lisi et al., 2003; Mitsiadis and Graf, 2009). The different shapes of equine incisors, canines and cheek teeth evolve by means of highly coordinated mitotic divisions within the inner enamel epithelium (Lisi et al., 2003; Nanci, 2013). Non-proliferating zones (so-called ‘enamel knots’) later become the tip of the enamel cusps of the occlusal surface. Proliferating

cells between the enamel knots advance in horizontal and apical directions, forming the sides of the tooth and fossae of the occlusal surface. The deepest extension of a fossa is called a pit. By determining the amount and position of enamel knots and the proliferative action of the neighboring cells individual tooth shapes (incisiform, caniniform and molariform) are modelled.

Equine infundibula are assumed to represent extreme deep and large pits in between enamel cusps. According to this concept, the enamel organ invaginates from an occlusal direction and produces the infundibular enamel. Consequently, the dental follicle tissues (including blood vessels) have to follow the occlusal route to initiate the onset of infundibular cementogenesis. After tooth eruption the afferent blood vessels are assumed to have been destroyed and therefore cementogenesis immediately stops.

It has been supposed that additional infundibular blood vessels originate from the dental pulp, perforate the enamel organ and enter the infundibula from an apical direction (Dacre, 2005; Dixon and Du Toit, 2010; Fitzgibbon et al., 2010). If this is confirmed, it will be of significant relevance as it follows that blood vessels remain vital after eruption and may represent a route for spread of infundibular disease to the pulp via the haematogenous route.

The aim of the present study was to document infundibular development, in particular infundibular blood vessels and cementogenesis. Based on these results, further examinations were performed focusing on clinical relevant morphological variations and pathological changes of the infundibulum. These data are presented in the second part of this two –part study (see Suske et al., 2016).

Materials and Methods

Teeth

Forty-one deciduous premolars were removed from eight foals (50% male, 50% female, aged 2 months pre-parturition to 2 days post parturition). Foals had died or were

ethanized on humane grounds unrelated to this study at the Clinic of Maternity, Gynaecology and Andrology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus Liebig University Giessen, Germany.

The heads were disarticulated and the mandibles were removed. The maxillary arcades containing teeth 06 - 08 were dissected using a diamond-coated water-cooled band saw (Micro Bandsaw MBS 240/E, Proxxon) and were stored in 10% buffered formalin (pH 7.4).

Gross anatomical examination

Thirty-three teeth were further sectioned (using the diamond-coated water-cooled band saw) into horizontal planes (13 teeth) or into transversal planes (20 teeth). The sections were suitable for evaluating the presence and extension of infundibular enamel and infundibular cementum.

Microcomputed tomography (μ -CT)

Eight deciduous maxillary cheek teeth (CT) were scanned using a microcomputed tomography (μ -CT) device (TeraRecon) prior to sectioning. Slices were taken at 57 μ m (Quality Scan) and 76 μ m (Quick Scan) intervals, respectively. Using transversal two-dimensional (2-D) μ -CT images, the thickness of the peripheral and infundibular cementum was measured. Measurements were taken in the central part of each infundibulum, recording the thickest area of cementum along the occluso-apical axis. 3-D reconstructions of infundibula were generated by means of image-analysis software (Amira 5.4.2., Visualization Sciences Group) and the 3-D extension of the infundibula in relation to other parts of the tooth was visualized.

Histological examinations

Selected formalin fixed specimens were decalcified in buffered ethylenediaminetetraacetat (EDTA, pH 8.0, at room-temperature) for 4-6 weeks and

embedded in paraffin wax using an automatic paraffin embedding center (Leica Instruments). Subsequently, 5µm thick sections were prepared and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Sections were analyzed by routine light microscopy.

Immunohistological examination

Selected sections were stained for Factor VIII and pan-cytokeratin to visualize blood vessels (Factor VIII) and the enamel organ (pan-cytokeratin). Antigen retrieval was performed using 0.1 % protease (Type XXIV) for 5 min. Endogenous peroxidase was blocked for 10 minutes with 10 % H₂O₂ in methanol at room-temperature. Unspecific primary antibody binding was blocked using 10% normal goat serum (Factor VIII) or 50 % normal goat serum and 50% normal horse serum (pan-cytokeratin). Primary antibodies against Factor VIII (polyclonal rabbit, anti-human, Dako, dilution 1:300) and against pan-cytokeratin (monoclonal mouse, anti-human, Dako, dilution1:50) were applied for 12 hours at 4°C. Negative controls were performed by omitting the primary antibody. Appropriate secondary antibodies (goat anti-rabbit or goat anti-mouse, Dako) were applied for 60 min. Subsequently, immunoreactions were visualized using Vectastain Elite ABC Standard Kit-Peroxidase (PK-6100, Biologo) and Peroxidase Substratkit AEC (AE002, Biologo). Sections from equine lymph nodes (Factor VIII) and equine skin (pan-cytokeratin) were taken as positive controls.

Results

All investigated infundibula were covered by an oral mucosa; although buccal and palatine enamel cusps had already erupted through the oral mucosa in some teeth. All infundibula showed one central infundibular blood vessel embedded in soft connective tissue. The central blood vessel was orientated in an occluso-apical direction, giving rise to multiple ramifications in peripheral directions towards the infundibular wall.

The infundibular enamel and cementum were clearly visible (Fig.1), but in certain cases the

apical region of the infundibulum did not contain mineralized enamel structures and this hampered the clear identification of the infundibular bottom. The most prominent amounts of cementum were present in the occlusal aspect. At both sides (buccal and palatine) the thickness of the infundibular cementum exceeded the thickness of the peripheral cementum (Fig.1).

At the apex of the infundibulum none or only small amounts of infundibular cementum were present. First signs of infundibular cementum were always seen in the occlusal region, primarily at prominent in-foldings of the infundibular enamel (Fig.2). In most cases infundibular cementogenesis was more advanced in the mesial infundibulum compared with the distal infundibulum.

In the occlusal aspect, the infundibular enamel did not form a completed ring but presented slit-like openings to the mesial side (mesial infundibulum) or to the distal side (distal infundibulum). Such openings became narrow in an apical direction. Remarkably, in over 70% of the teeth we investigated, the distal opening at the distal infundibulum was wider and reached further apically compared to the mesial opening of the mesial infundibulum (Fig.3). In the following, the term lateral is used to indicate the position of these enamel openings in the mesial and distal infundibula, respectively.

The lateral enamel openings connected the peripheral soft connective tissue of the dental follicle to the infundibular part of the dental follicle. Peripheral and infundibular compartments were interconnected by multiple blood vessels.

In later development stages the soft connective tissue of the dental follicle was replaced by peripheral cementum. Even in these stages cemental blood vessels, which are typical features of equine cementum, connected the peripheral compartment with the infundibular compartment (Fig.4).

Occasionally, a defect in the infundibular enamel cover was observed. These hypoplastic enamel areas appeared primarily in enamel in-foldings (Fig.2). The immunohistological

detection of pan-cytokeratin allowed the outline of the enamel organ to be visualized. The enamel organ was reduced or disintegrated in sites where cementogenesis was already present (Fig.5). Mineralized enamel was present, adjacent to the inner enamel epithelium. In decalcified histological sections the fully mineralized enamel disappeared, leaving typical morphological correlates of the dentino-enamel and/or cemento-enamel junction. This phenomenon was mostly present in occlusal areas (Fig.6).

In apical areas, a histological correlate of the incompletely mineralized enamel matrix was visible. Remarkably, the mineralization front of the infundibular enamel was advanced further apically than the peripheral enamel mineralization front.

The immunohistological staining for Factor VIII supplemented the detection of blood vessels in H&E stained sections and enabled the arrangement of the blood vascular system to be analyzed. Branches of the main central artery and the lateral arteries travelled through the infundibulum in an occluso-apical direction. Further ramifications in a horizontal orientation reached the enamel organ and formed arcade-like capillary arrangements (Fig.7). In between the arteries and arterioles multiple sections of venous vessels were present.

None of the sections demonstrated a penetration of blood vessels through the enamel organ or blood vessels originating from the endodontic cavities.

Discussion

Our study demonstrates the blood supply of infundibula in non-erupted equine maxillary cheek teeth. The pre-eruptive infundibular blood supply is of crucial importance for the process of infundibular cementogenesis, which should ideally result in a complete cemental filling of the infundibulum. In accordance with previous reports, a central infundibular artery entering the infundibulum from an occlusal direction was confirmed (Baker, 1979; Dixon and Du Toit, 2010). Based on this observation it has been speculated that infundibular blood supply ceases immediately after tooth eruption due to disruption of the

central infundibular artery (Baker, 1979; Dixon and Du Toit, 2010).

Our investigations revealed that the central infundibular artery is supplemented by lateral arteries, which have not previously been recognized (Fig. 8 and see Appendix: Supplementary Video S1). These lateral arteries are embedded in a soft connective tissue bridge, which connects the intra-infundibular part of the dental follicle with the peripheral part of the dental follicle. Thus, the infundibular enamel organ features lateral openings facing the distal and the mesial side of the tooth, respectively. This complex 3-D architecture of the early infundibulum was constantly found in the specimens we investigated. We therefore assumed that the slit-like openings in the enamel organ are a constant morphological pattern governed by genetic processes.

The genetic and molecular processes that control tooth shape are widely understood. Different levels of mitotic activities within different zones of the inner enamel epithelium cause asymmetries in the shape of the enamel organ and produce the individual shape of a tooth. Non-mitotic zones within the enamel organ form enamel knots, which are believed to have regulatory functions (Cobourne, 1999; Lisi et al., 2003; Klugh, 2010). While neighbouring zones proliferate and expand in apical and horizontal directions, the enamel knots remain in position and later represent the tips of enamel cusps. Enamel knots arise at different time points of odontogenesis representing different generations, called primary and secondary enamel knots (Cobourne, 1999; Lisi et al., 2003). By this mechanism the typical topography of a tooth evolves, featuring several enamel cusps, fossae and pits – and in terms of equine teeth, infundibular and peripheral enamel in-foldings.

Enamel cusps derived from enamel knots not only determine the shape of the tooth but also are starting points of enamel mineralization (Soana et al., 1999; Hoppe, et al., 2004; Klugh, 2010). First signs of mineralization are seen at the primary enamel cusps and continue in an apical and horizontal direction following a mineralization line (Baker, 1979; Soana et al., 1999; Hoppe et al., 2004). By detecting early enamel mineralization (by means of μ CT

investigations) the complex arrangement of enamel knots within the distal or mesial walls of the infundibula could be visualized. The remarkable lateral openings of the infundibula can be understood as deep fossae in between enamel knots, but further studies are needed to elucidate the staggered occurrence of enamel knots in equine maxillary cheek teeth at cellular and molecular-biological levels.

The occurrence of slit-like openings in the infundibular enamel at the mesial and distal side of the tooth leads to an understanding of infundibular cementogenesis. As the lateral infundibular openings extend in an apical direction they allow infundibular blood supply and therefore ongoing cementogenesis, even when the occlusal surface of the tooth has already erupted through the gum. Remarkably, lateral infundibular blood supply is not only provided during the presence of a soft connective tissue bridge between the intra-infundibular area and the periphery of the tooth but also present after the soft connective tissue bridge has been replaced by dental cementum. This phenomenon is due to the equine-specific occurrence of cemental blood vessels (Boyde, 1997; Mitchell et al., 2003; Masset et al., 2006). Due to continued tooth eruption, the lateral infundibular enamel openings reach a supra-gingival position and the lateral blood supply to the infundibula is disrupted.

It should be emphasized that there is a marked asymmetry in the position of the lateral openings between the mesial and in the distal infundibula. The distal infundibulum possesses a lateral opening which is wider and reaches far more apically compared with the mesial infundibulum. Thus, the lateral opening of the distal infundibulum is likely to persist for a longer period of time, supposing that there is more efficient and complete cementogenesis in the distal infundibulum. This assumption is supported by studies which demonstrated that cemental hypoplasia is more frequent in the mesial infundibulum compared with the distal infundibulum (Veraa et al., 2009; Windley et al., 2009b). Unfortunately, the available data from this study do not allow the exact time-span to be determined for an efficient lateral blood supply to the infundibula and therefore the temporal difference of cementogenesis between

the distal and mesial infundibula.

Recently, it has been suggested that blood vessels enter the infundibulum from an apical direction by penetrating the dentin and the enamel at the bottom of the infundibulum (Dacre, 2005; Johnson and Porter, 2006; Dixon and Du Toit, 2010). This morphological construction would require vascular channels in the dentine and a penetration of the entire enamel organ by blood vessels in early odontogenesis. Indeed, some non-equine species feature vascularized dentine; for example sloths (*Bradypus tridactylus*, see Santana et al., 2013) or catfish (*Anarhichas lupus*, see Kerebel et al., 1978), but this special type of dentine has not been described in the horse.

Although the penetration of the outer enamel epithelium by blood vessels is a well-known mechanism to ensure nourishment of the ameloblasts of the inner enamel epithelium (Muller, 1926; Manzke et al., 2005), the penetration of the inner enamel epithelium has not been described previously. In accordance with the odontogenic principles described for non-equine species, our investigations on equine specimens confirmed the penetration of the outer enamel epithelium and the vascularization of the stellate reticulum. However, penetration of blood vessels through the inner enamel epithelium was not observed, so our examinations did not reveal any evidence of blood vessels entering the infundibulum through the bottom area.

The presence and distribution of infundibular blood vessels are supplemented by results concerning the principles of infundibular cementogenesis. The onset of cementogenesis is triggered by the disintegration of the enamel organ after amelogenesis has been completed (Jones and Boyde, 1974; Kilic et al., 1997; Sahara, 2014). Therefore, the temporospatial pattern of cementogenesis reflects the temporospatial pattern of amelogenesis. The observed pattern of cementogenesis in the infundibulum is in accordance with this general principle of cementogenesis. As demonstrated, the main cementum production starts at enamel prominences (presumably former enamel knots) in the occlusal area. Only minor spots of cementogenesis occur at prominent in-foldings within the infundibulum so the apical

extremity of the infundibulum is the last area to be filled with infundibular cementum. This observation contradicts a recently published concept proposing that massive cement production occurs simultaneously in occlusal and apical regions of the infundibulum (Dixon and Du Toit, 2010).

The remarkable bulk of newly-formed cementum at the occlusal entrance of the infundibulum narrows the canal for the central infundibular artery, potentially leading to an insufficient blood supply along with hampered cementogenesis in the apical parts of the infundibulum. This explains the widely observed pattern of large areas with cemental hypoplasia within the apical parts of infundibula (Kilic et al., 1997; Dacre, 2005; Johnson and Porter, 2006). Cemental hypoplasia should be regarded as an odontogenic malformation rather than a dental disease (Casey, 2013), although it is assumed that infundibular cemental hypoplasia is a predisposing factor for infundibular and, therefore, dental disorders (Du Toit et al., 2008; Van den Enden and Dixon, 2008; Dixon et al., 2014).

Another congenital malformation with pathological relevance is the occurrence of infundibular enamel hypoplasia, primarily found in enamel in-foldings. Similar observations were made in fully erupted permanent maxillary CT (Dacre, 2005). Enamel hypoplasia is one symptom of a congenital failure, called ‘amelogenesis imperfecta’, which often affects several teeth in a dentition and has been extensively described in humans (Schröder, 1997; Nanci, 2013). The enamel hypoplasia demonstrated in the infundibula is regarded as focally acquired hypoplasia and can be explained by the architecture of the narrow enamel in-foldings which limit the amount of enamel production. As a consequence, enamel production and mineralization remain insufficient, and further thin enamel layers might become fully resorbed by the regular process of enamel resorption just prior to the onset of cementogenesis (Boyde, 1997; Mitchel et al., 2003; Sahara, 2014).

Although the presented data and derived considerations are largely in accordance with results obtained from investigations on fully erupted, permanent cheek teeth, it should be emphasized

that our study was conducted using non-erupted deciduous premolars. Therefore, odontogenic particularities of permanent maxillary cheek teeth might have remained undetected. Nonetheless, it has been demonstrated previously in the horse that no significant differences exist between the development of the deciduous and the permanent equine teeth (Baker, 1979).

Conclusions

This study convincingly demonstrated asymmetries in blood supply between the mesial and distal infundibula of equine maxillary cheek teeth, and therefore differences of infundibular cementogenesis. The developmental and morphological characteristics may help to elucidate aetiopathological pathways for infundibular and endodontic diseases in equine maxillary cheek teeth.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgements

We wish to thank Prof. Dr. A. Wehrend (Clinic of Maternity, Gynaecology and Andrology, Giessen) for providing specimens, Dr. S. Reese (Department of Veterinary Anatomy, Ludwig-Maximilian University of Munich) for scanning histologic specimens, and Mrs. E. Kammer for assistance with preparing the figures.

References

Baker, G.J., 1979. A Study of Dental Disease in the Horse. PhD Thesis, University of Glasgow.

- Boyde, A., 1997. Equine dental tissues: a trilogy of enamel, dentine and cementum. *Equine Veterinary Journal* 29, 171-172.
- Casey, M., 2013. A New Understanding of Oral and Dental Pathology of the Equine Cheek Teeth. *Veterinary Clinic of North America: Equine practice* 29, 301-324.
- Cobourne, M.T., 1999. The Genetic Control of Early Odontogenesis. *British Journal of Orthodontics* 26, 21-28.
- Dacre, I., Kempson, S., Dixon, P.M., 2008. Pathological studies of cheek teeth apical infections in the horse: 5. Aetiopathological findings in 57 apically infected maxillary cheek teeth and histological and ultrastructural findings. *The Veterinary Journal* 178, 352-363.
- Dacre, I.T., 2005. Equine Dental Pathology. In: *Equine Dentistry, Second Ed.* Elsevier Saunders, St Louis, USA, pp. 91-110.
- Dacre, I.T., Kempson, S., Dixon, P.M., 2007. Equine idiopathic cheek teeth fractures. Part 1: Pathological studies on 35 fractured cheek teeth. *Equine Veterinary Journal* 39, 310-318.
- Dixon, P.M., Du Toit, N., 2010. Dental anatomy. In: *Equine Dentistry, Third Ed.* Elsevier. St Louis, USA, pp. 51-76.
- Dixon, P.M., Savill, D., Horbyl, A., Reardon, R.J.M., Liuti, T., 2014. Critical evaluation of *ex vivo* restoration of carious equine maxillary cheek teeth infundibulae following high-pressure gas and micro-particle abrasion. *The Veterinary Journal* 200, 368-374.
- Du Toit, N., Burden, F.A., Kempson, S.A., Dixon, P.M., 2008. Pathological investigation of Caries and occlusal pulpar exposure in donkey cheek teeth using computerised axial tomography with histological and ultrastructural examination. *The Veterinary Journal* 178, 387-395.
- Fitzgibbon, C.M., Du Toit, N., Dixon, P.M., 2010. Anatomical studies of maxillary cheek teeth infundibula in clinically normal horses. *Equine Veterinary Journal* 42, 37-43.
- Hoppe, K.A., Stover, S.M., Pascoe, J.R., Amundson, R., 2004. Tooth enamel biomineralization in extant horses: implications for isotopic microsampling. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 206, 355-365.
- Johnson, T.J., Porter, C.M., 2006. Infundibular Caries. In: *Focus on Dentistry, American Association of Equine Practitioners*, pp. 101-107.
- Jones, S.J., Boyde, A., 1974. Coronal Cementogenesis in the Horse. *Archives of Oral Biology* 19, 605-614.
- Kerebel, B., Le Cabellec, M., Daculsi, G., Kerebel, L., 1978. Osteodentine and Vascular Osteodentine of *Anarhichas lupus* (L.). *Cell and Tissue Research* 187, 135-146.
- Kilic, S., Dixon, P.M., Kempson, S.A., 1997. A light microscopic and ultrastructural examination of calcified dental tissues of horses: 4. Cement and the amelocemental

- junction. *Equine Veterinary Journal* 29, 213-219.
- Klugh, D.O., 2010. Embryology. In: Klugh, D.O. (Ed.), *Principles of Equine Dentistry*, First Ed. Manson Publishing, London, UK, pp. 49-56.
- Lisi, S., Peterková, R., Peterka, M., Vonesch, J.L., Ruch, J.V., Lesot, H., 2003. Tooth Morphogenesis and Pattern of Odontoblast Differentiation. *Connective Tissue Research* 44, 167-170.
- Manzke, E., Katchburian, E., Faria, F.P., Freymüller, E., 2005. Structural Features of Forming and Developing Blood Capillaries of the Enamel Organ of Rat Molar Tooth Germs Observed by Light and Electron Microscopy. *Journal of Morphology* 265, 335-342.
- Masset, A., Staszky, C., Gasse, H., 2006. The blood vessel system in the periodontal ligament of the equine cheek teeth – Part I: The spatial arrangement in layers. *Annals of Anatomy* 188, 529-533.
- Mitchell, S.R., Kempson, S.A., Dixon, P.M., 2003. Structure of Peripheral Cementum of Normal Equine Cheek Teeth. *Journal of Veterinary Dentistry* 20, 199-208.
- Mitsiadis, T.A., Graf, D., 2009. Cell Fate Determination during Tooth Development and Regeneration. *Birth Defects Research* 87, 199-211.
- Muller, J., 1926. On the occurrence of Vasculature Enamel-organs. *Proceedings Royal Academy Amsterdam* XXX, 298-307.
- Nanci, A., 2013. Development of the Tooth and Its Supporting Tissue. In: *Oral Histology*, Eight Ed. Elsevier, St Louis, USA, pp. 70-94.
- Sahara, N., 2014. Development of Coronal Cementum in Hypsodont Horse Cheek Teeth. *The Anatomical Record* 297, 716-730.
- Santana, L.N.S., Barbosa, L.V.M., Teixeira, F.B., Costa, A.M.P., Fernandes, L.M.P., Lima, R.R., 2013. Morphology of the Dentin Structure of Sloths *Bradypus tridactylus*: A Light and Scanning Electron Microscopy Investigation. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 42, 410-414.
- Schnorr, B., Kressin, M., 2011. Entwicklung der Verdauungsorgane. In: *Embryologie der Haustiere*, Sixth Ed. Enke Verlag, Germany, pp. 161-184.
- Schröder, H.E., 1997. Zahnentwicklungsstörungen. In: *Pathobiologie oraler Strukturen*, Third Ed. Karger, Germany, pp. 17-56.
- Soana, S., Gnudi, G., Bertoni, G., 1999. The Teeth of the Horse: Evolution and Anatomico-Morphological and Radiographic Study of Their Development in the Foetus. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 28, 273-280.
- Staszky, C., 2011. Anatomie. In: Vogt, C. (Ed.), *Lehrbuch der Zahnheilkunde beim Pferd*, First Ed. Schattauer Verlag, Stuttgart, Germany, pp. 1-30.
- Suske, A., Pöschke, A., Müller, P., Wöber, S., Staszky, C., 2016. Infundibula of equine

- maxillary cheek teeth. Part 2: Morphological Variations and Pathological changes. *The Veterinary Journal* 209, 66-73.
- Van den Enden, M.S.D., Dixon, P.M., 2008. Prevalence of occlusal pulpar exposure in 110 equine cheek teeth with apical infections and idiopathic fractures. *The Veterinary Journal* 178, 364-371.
- Veraa, S., Voorhout, G., Klein, W.R., 2009. Computed tomography of the upper cheek teeth in horses with infundibular changes and apical infection. *Equine Veterinary Journal* 41, 872-876.
- Windley, Z., Weller, R., Tremaine, W.H., Perkins, J.D., 2009a. Two- and three-dimensional computed tomographic anatomy of the enamel, infundibulae and pulp of 126 equine cheek teeth. Part 1: Findings in teeth without macroscopic occlusal or computed tomographic lesions. *Equine Veterinary Journal* 41, 433-440.
- Windley, Z., Weller, R., Tremaine, W.H., Perkins, J.D., 2009b. Two- and three-dimensional computed tomographic anatomy of the enamel, infundibula and pulp of 126 equine cheek teeth. Part 2: Findings in teeth with macroscopic occlusal or computed tomographic lesions. *Equine Veterinary Journal* 41, 441-447.

Figure legends

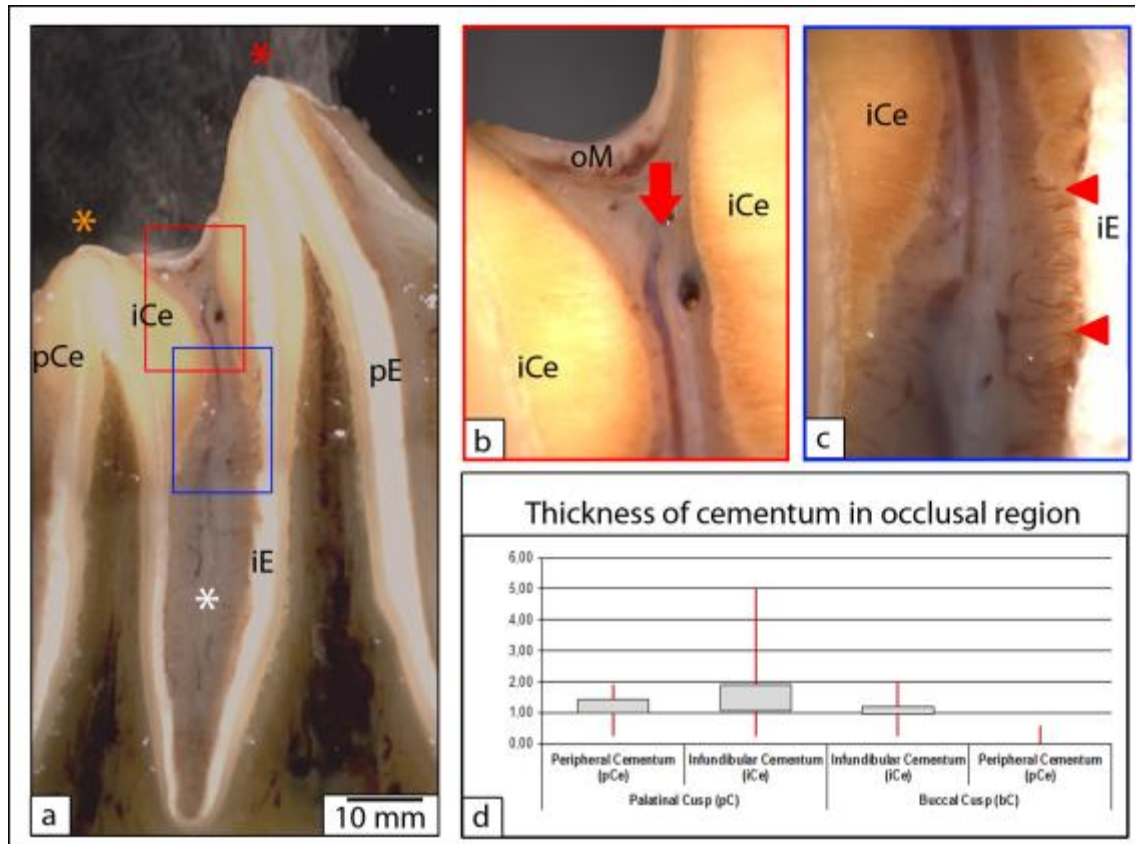


Fig. 1.

Maxillary second deciduous CT (506), transverse section, foal, 10 days old.

(a) Due to production of infundibular cementum (iCe) the occlusal opening of the infundibulum becomes narrow.

(b) Red insert, the occlusal aspect of the infundibulum is still covered by an oral mucosa (oM).

(c) Blue insert, ramifications of the central infundibular artery are arranged in a horizontal orientation and enter the infundibular cementum (red arrowheads).

(d) Thickness of cementum in the occlusal region. Deposition of cementum shows a marked asymmetry. Largest amounts of cementum are present at the palatal aspect compared to the buccal aspect, and at the infundibular side compared to the peripheral side.

Box: interquartile range ($q_1=0,25$; $q_3=0,75$);

Whiskers: outlier. Orange asterisk = palatal cusp; red asterisk = buccal cusp; white asterisk = infundibulum; red arrow = central infundibular artery; red arrowheads = ramification of the central

infundibular artery; pCe, peripheral cementum; iCe, infundibular cementum; iE, infundibular enamel;
pE, peripheral enamel; oM, oral mucosa.

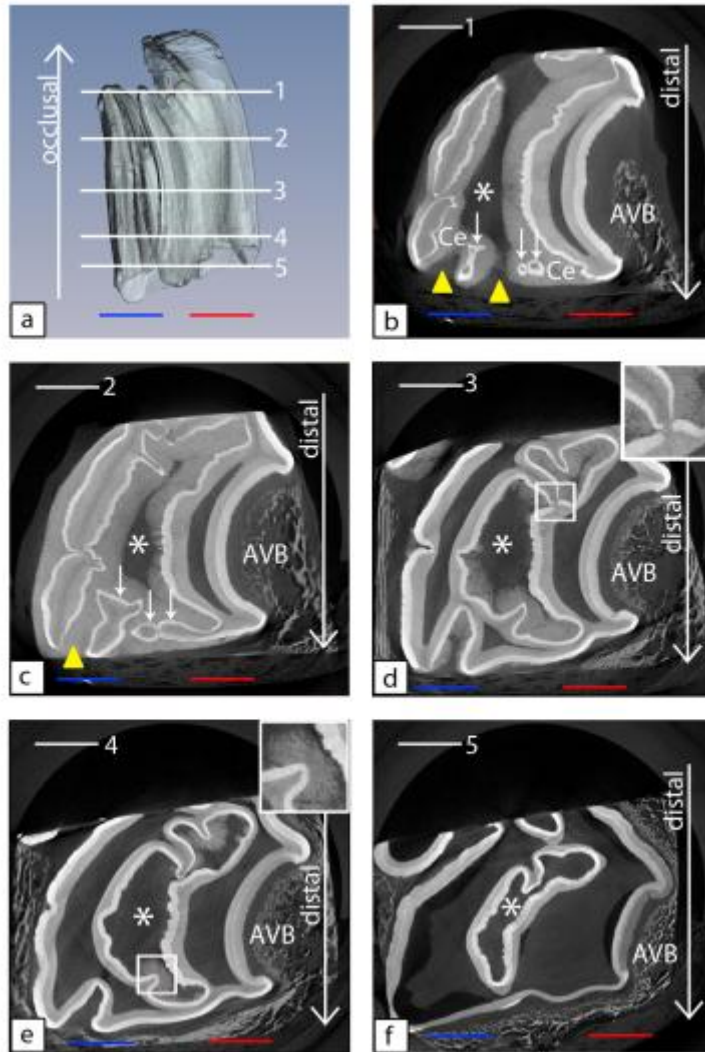


Fig. 2.

Micro-CT data of a maxillary second, deciduous premolar (606), foal, 18 days

(a) 3-D reconstruction of the enamel, distal view Lines 1 - 5 indicate positions of 2-D, horizontal micro-CT images (b-f).

(b) Level 1, the distal infundibulum (white asterisk) features a wide lateral opening (yellow arrowheads), in which small enamel cusps (white arrows) are present. The lateral opening becomes filled with cementum (Ce).

(c) Level 2, the isolated enamel cusps (Level 1) fuse further apically (Level 2, white arrows) to establish the distal infundibular wall, leaving a narrower cemental bridge (yellow arrowhead).

(d) Level 3, the infundibular enamel features a continuous line with no connection to the peripheral enamel. However, deep in-foldings create contacts between neighbouring enamel organs, apparently causing enamel hypoplasia (see inset).

(e) Level 4, cementogenesis starts at enamel in-foldings (see inset).

(f) Level 5, at the bottom of the infundibulum (asterisk) no signs of cementogenesis are present.

Blue line = palatal aspect; red line = buccal aspect; * = infundibulum; yellow arrowheads = lateral opening of the distal infundibulum; Ce, cementum, AVB, alveolar bone.

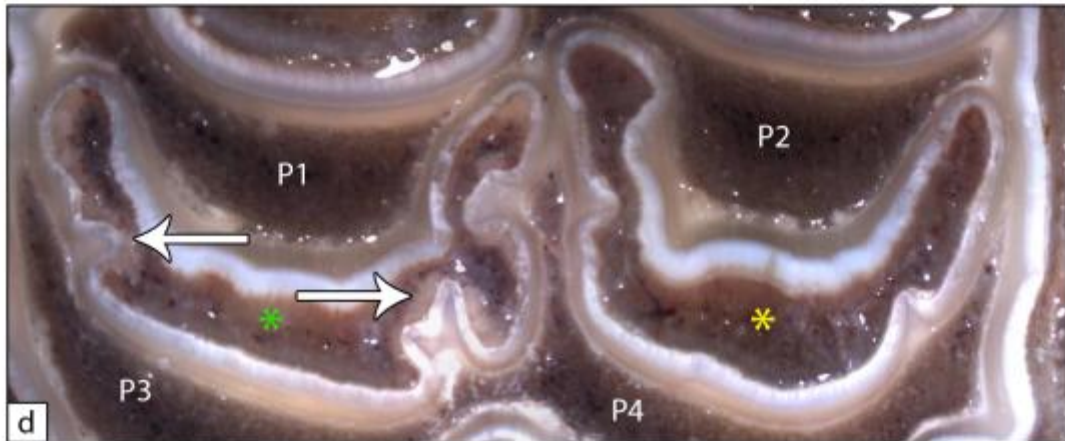
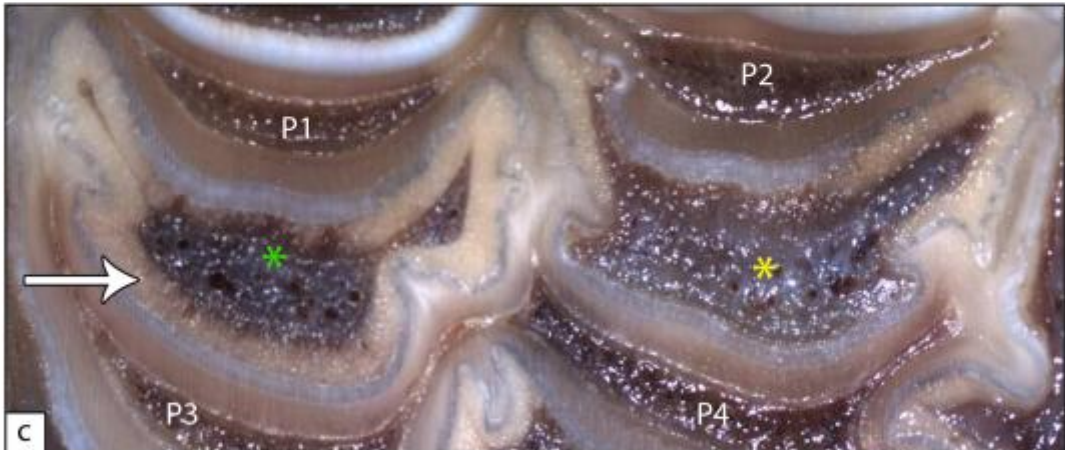
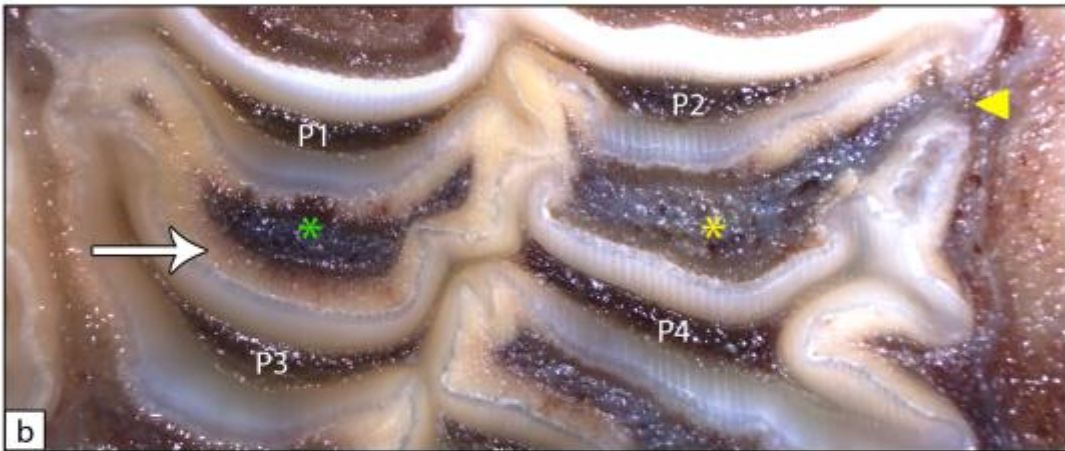
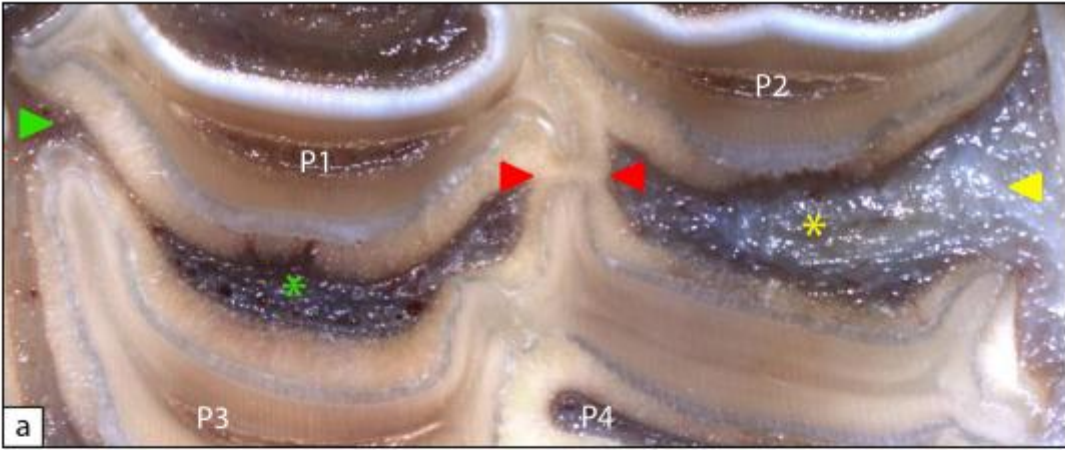


Fig. 3.

Maxillary fourth deciduous CT (508), transverse section, foal, 1 days old.

(a) Horizontal section, 5 mm subocclusal.

The infundibula are fused (red arrowheads) and possess lateral openings. The lateral opening in the distal infundibulum (yellow arrowhead) is wider than the lateral opening in the mesial infundibulum (green arrowhead).

(b, c) Horizontal sections, 10 mm (b) and 25 mm (c) subocclusal

The lateral openings are close in further apical positions. The lateral opening of the distal infundibulum extends further apical compared to the lateral opening of the mesial infundibulum. Cementogenesis (white arrows) appears to be more advanced in the mesial infundibulum.

(d) Horizontal section, 30 mm subocclusal

Cementogenesis starts at enamel in-foldings in the mesial infundibulum (white arrows), no signs of cementogenesis are visible within the distal infundibulum.

P1-P4 = pulp horns 1-4; yellow asterisk = distal infundibulum; green asterisk = mesial infundibulum; yellow arrowhead = lateral opening of the distal infundibulum; green arrowhead = lateral opening of the mesial opening; red arrow-head = connection between the infundibula; white arrow = cementogenesis.

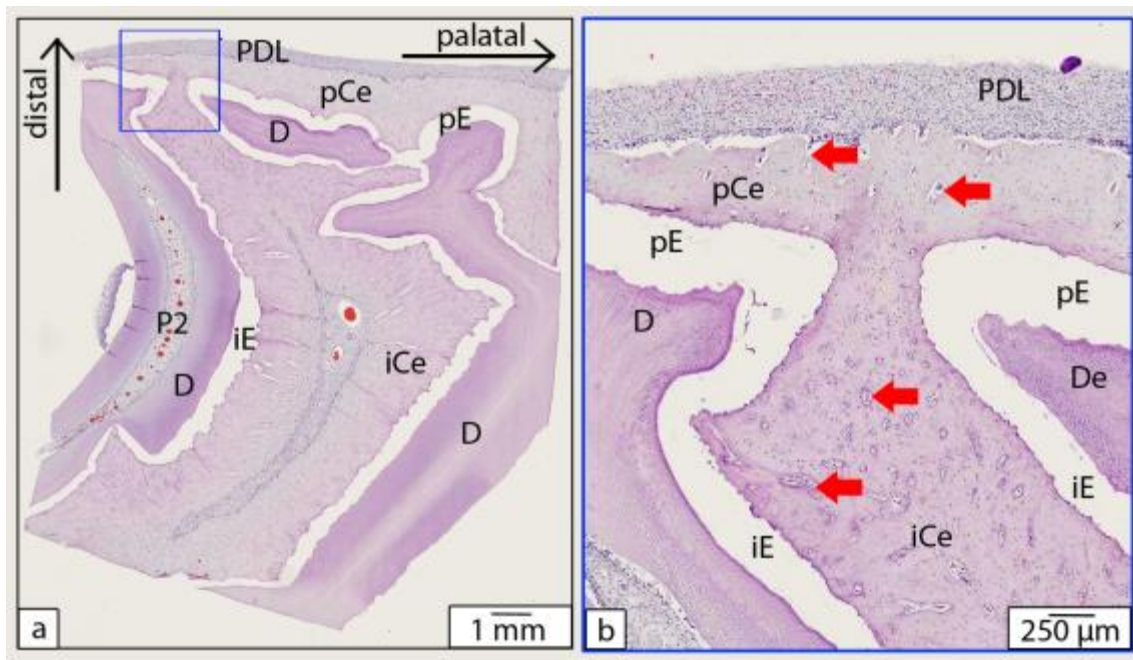


Fig. 4.

Decalcified histological section, horizontal plane, 8 mm subocclusal, maxillary third deciduous premolar (507), foal, 10 days old, H&E staining.

The distal infundibulum possesses a lateral opening featuring a cemental bridge which connects the peripheral cementum with the infundibular cementum. A higher magnification (b) demonstrates the presence of intra-cemental blood vessels (arrows).

D, dentine; P2, pulp horn 2; iCe, infundibular cementum; pCe, peripheral cementum; PDL, periodontal ligament; iE, infundibular enamel; pE, peripheral enamel (actually the enamel was totally dissolved by the process of decalcification; however the visible gap corresponds to the position of the enamel).

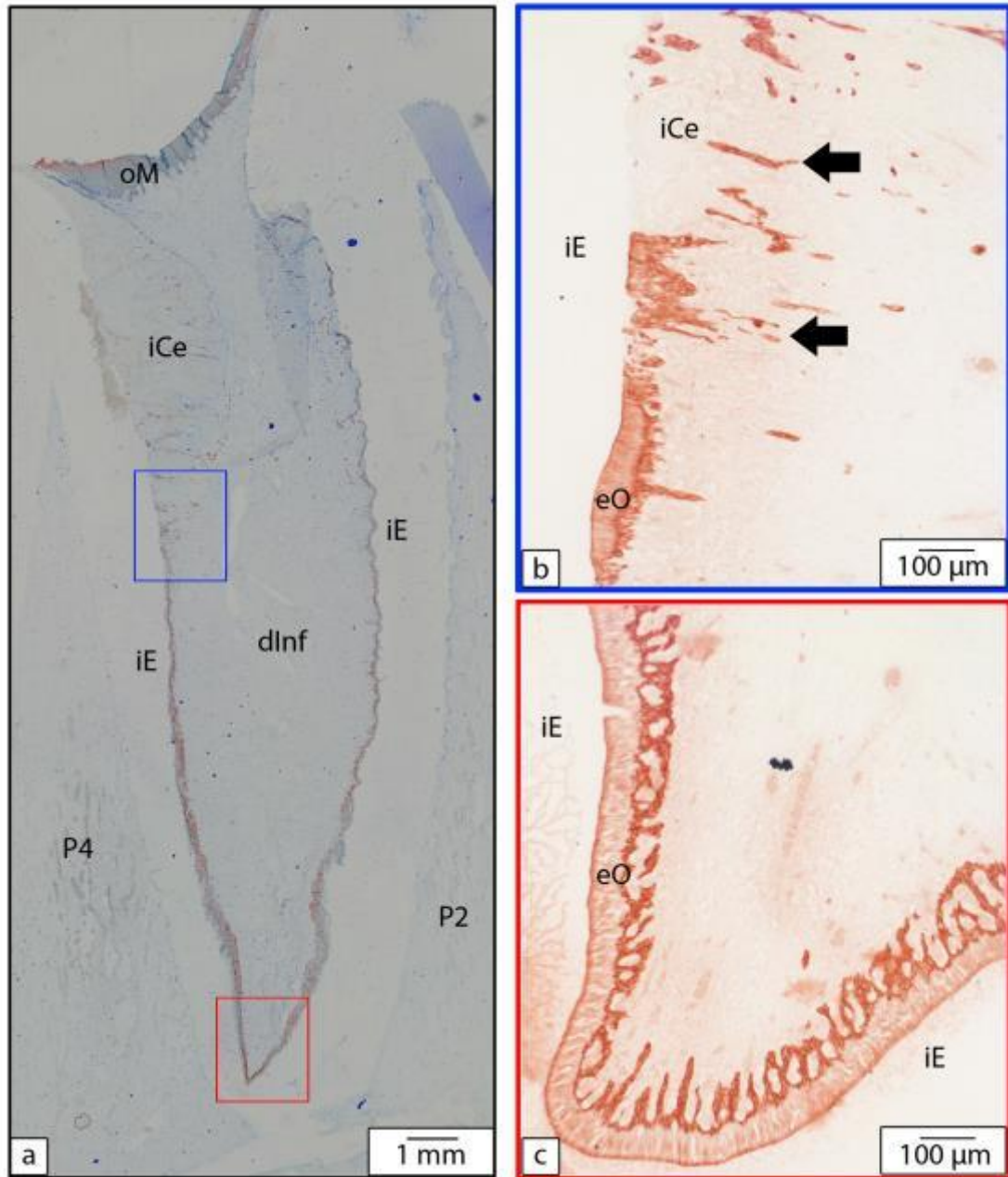


Fig. 5.

Maxillary second deciduous CT (506), transverse section, foal, 0 days old, pan-cytokeratin staining (a-c), toluidin blue counterstain (a).

Cementogenesis starts at the occlusal region and advances in apical direction.

(b) During cementogenesis the enamel organ (EO) disintegrates from the enamel surface and infundibular cementum (iCe) is deposited. Remnants of the former epithelial enamel organ (positive for pan-cytokeratin) are still visible beneath the mineralized infundibular cementum (arrows).

(c) At the bottom of the infundibulum, the enamel organ is still intact and does not show any evidence of blood vessels penetrating from the pulp horns (P2 and P4) into the infundibulum.

oM, oral mucosa; iE, infundibular enamel; dInf, distal infundibulum; iCe, infundibular cementum; P2 and P4, pulp horn 2 and 4; eO, enamel organ.

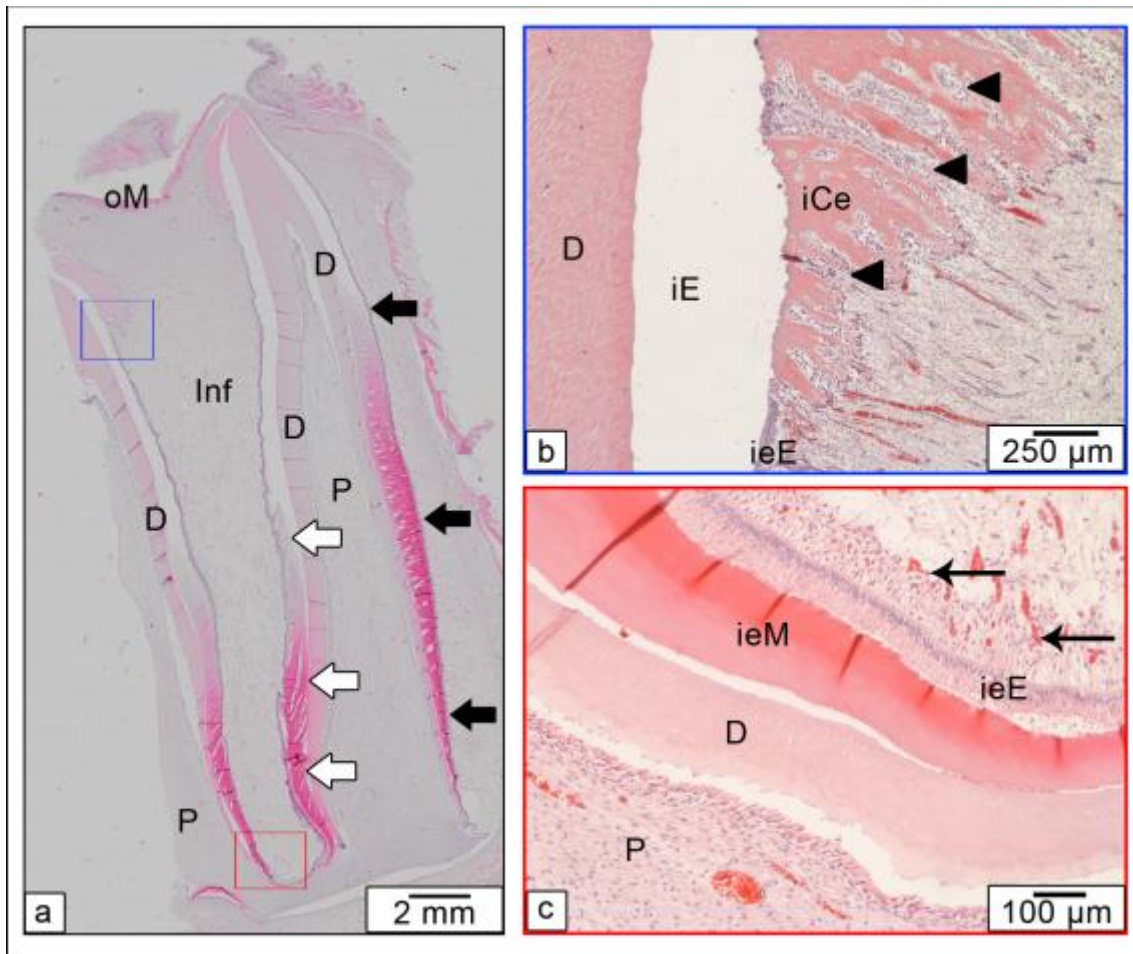


Fig. 6.

Maxillary fourth deciduous CT (508), transverse section, foal, -14 days old, H&E staining.

(a) A still non-mineralized enamel matrix is present in the infundibular enamel (white arrows) and in the peripheral enamel (black arrows). The different extension of the non-mineralized enamel matrix suggests that mineralization of the infundibular enamel starts prior to mineralization of the peripheral enamel.

(b) The infundibular cementum (iCe) contains large gaps filled with soft connective tissue and blood vessels (arrowheads).

(c) Blood vessels (arrows) penetrate the outer enamel epithelium to nourish the enameloblast of the inner enamel epithelium (ieE).

oM, oral mucosa; Inf, infundibulum; D, dentine; P, pulp; iE, infundibular enamel; iCe, infundibular cementum; ieE, inner enamel epithelium; ieM, inner enamel matrix.

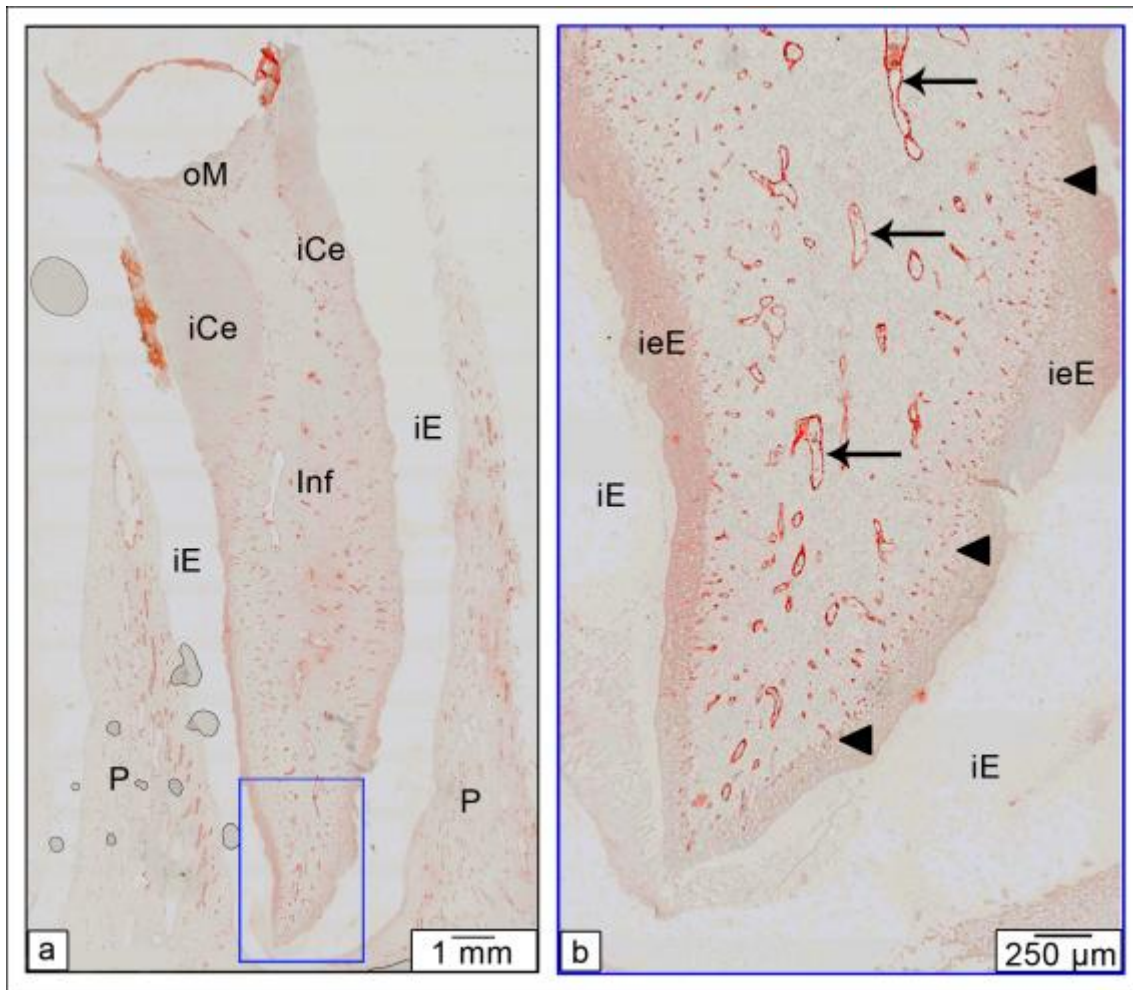


Fig. 7.

Maxillary second deciduous CT (506), transverse section, foal, 0 day old, Factor VIII staining.

(a) The infundibular blood vessels (positive for Factor VIII) are clearly visible in a typical branching pattern.

A higher magnification (b) shows the course of the small ramifications of the infundibular blood vessels (arrow), which do not penetrate the inner enamel epithelium (ieE) of the enamel organ (arrowheads).

oM, oral mucosa; iCe, infundibula cementum; iE, infundibular enamel; Inf, infundibulum; P, pulp; ieE, inner enamel epithelium.

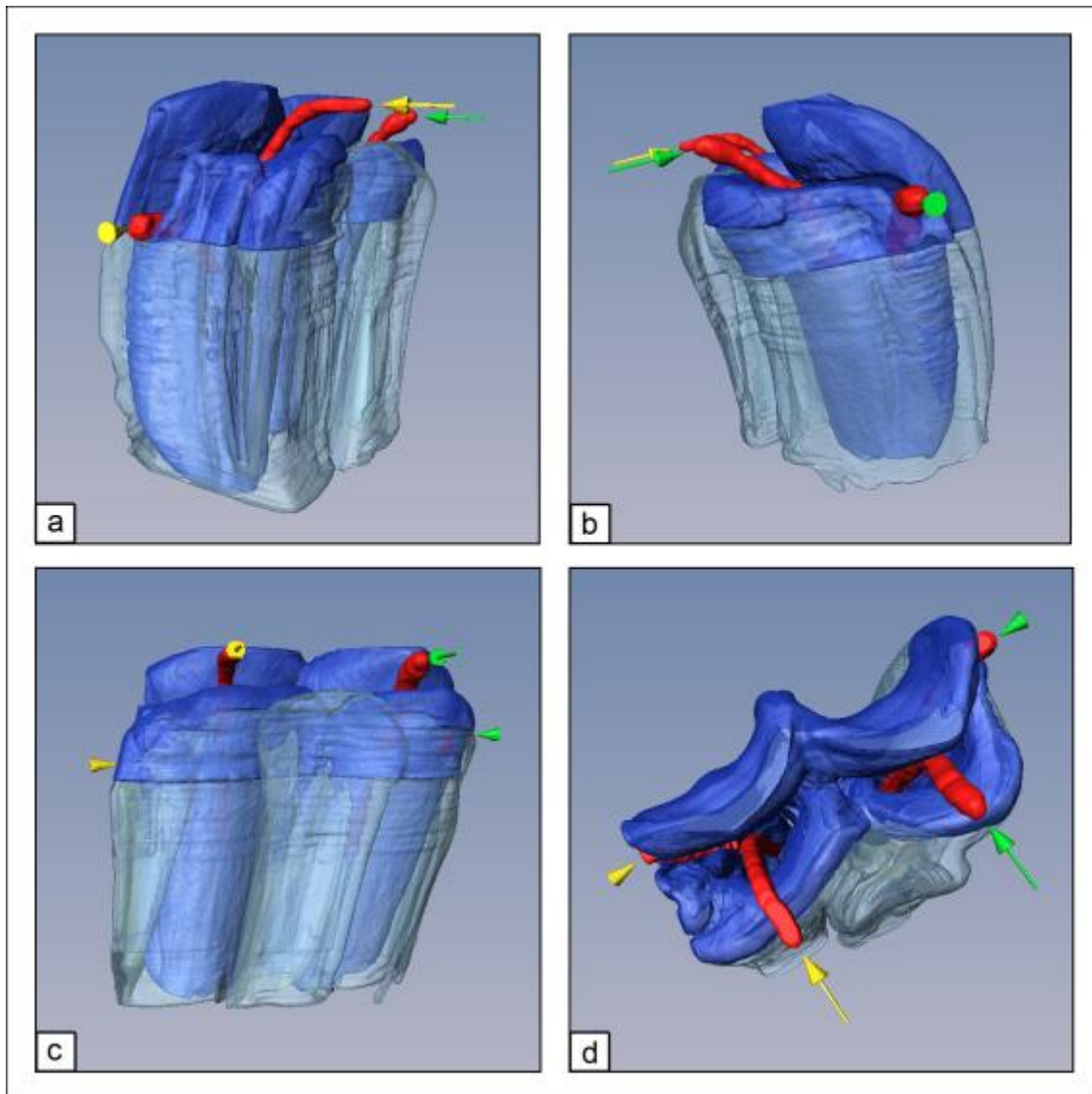


Fig. 8.

Micro-CT data of a maxillary fourth, deciduous premolar (608), foal, 18 days old, 3-D reconstruction of the enamel.

The infundibular enamel and the adjacent enamel cusps are coloured dark blue; other enamel regions are coloured light blue.

Red structures represent the infundibular blood supply.

(a) distopalatal view, (b) mesial view, (c) palatal view, (d) occlusal view.

Note the different extensions of the lateral openings in the distal and mesial infundibulum.

Arrows, occlusal blood vessel; arrowheads, lateral blood supply; yellow colour, distal infundibulum; green colour, mesial infundibulum (see also Appendix: Supplementary Video S1)

3. Publikation II

The infundibulum of equine maxillary cheek teeth. Part 2: Morphological Variations and Pathological Changes

A. Suske, A. Pöschke, P. Müller, S. Wöber, C. Staszuk

The Veterinary Journal

Volume 209, March 2016, Pages 66–73

DOI: 10.1016/j.tvjl.2015.11.023.

Akzeptiert am: 27.11.2015

Original Article

Infundibula of equine maxillary cheek teeth Part 2: Morphological variations and pathological changes

A. Suske ^a, A. Pöschke ^a, P. Müller ^b, S. Wöber ^{a, c}, and C. Staszuk ^{a, *}

^a *Institute of Veterinary-Anatomy, -Histology and -Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus Liebig University Giessen, Frankfurter Str. 98, 35390 Giessen, Germany*

^b *Large Animal Clinic for Theriogenology and Ambulatory Services, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, An den Tierkliniken 29, Leipzig 04103 Germany*

^c *Institute for General Zoology and Developmental Biology, Justus Liebig University Giessen, Stephanstr. 24, 35390 Giessen, Germany*

* Corresponding author. Tel.: +49 (0) 641/99-38112.

E-mail address: Carsten.Staszuk@vetmed.uni-giessen.de (C. Staszuk).

Abstract

Incomplete cemental filling of the infundibula of equine maxillary cheek teeth (CT) is a common feature. Depending on the extent of the defect, three stages of infundibular decay have been suggested. However, histomorphological criteria to identify non-pathological abnormalities and destructive changes have not been defined. Six hundred and eighty eight CT with no evidence of dental diseases and 55 diseased permanent, fully erupted maxillary CT were evaluated on a macroscopical level by assessing the occlusal surface and horizontal sections, including porphyrin assays to detect residual blood within the infundibular cementum. Selected specimens were investigated on a microscopic level using routine and immunohistological staining methods to identify possible routes for the spread of infectious agents from the infundibulum into the endodontic system.

Infundibular cemental hypoplasia was defined as a non-pathological developmental abnormality and was detected in >50% of CT with no evidence of dental diseases and in >70% of diseased CT. The first molar (Triadan 09) showed the highest prevalence (75%) of infundibular cemental hypoplasia. The mesial infundibulum was more often affected than the distal infundibulum. Infundibular erosion was considered as the most appropriate term to describe destructive infundibular changes. Infundibular erosion was present in <6% of CT with no evidence of dental diseases, but was detected in >27% of diseased teeth, always accompanied with endodontic diseases.

This suggests that teeth affected by infundibular cemental hypoplasia are prone to destructive erosion, which possibly leads to endodontic disease. Morphological factors that supplement this ethological hypothesis were described. In 74% of infundibula residual blood was identified, although no vital blood vessels were detected. It is assumed that this content of blood remained in the ample infundibular cemental blood system after tooth eruption and creates a favorable environment for microbial growth. The infundibular enamel was characterised by numerous infoldings to variable degrees and depths. In certain areas focal

enamel aplasia was observed. These morphological features might contribute to microbiological settlement and spread of infectious agents through the infundibular wall into the endodontic system.

Keywords: Horse; Infundibulum; Erosion; Caries; Cemental hypoplasia

Introduction

Equine maxillary cheek teeth (CT) are characterised by a mesial and a distal infundibulum, which contain infundibular cementum. During pre-eruptive tooth development, infundibular cementogenesis should ideally result in a complete cemental filling (Suske et al., 2016). One detailed anatomical study of the infundibular blood supply revealed that blood vessels entered the infundibula only in the occlusal part, and there were marked differences between the mesial and the distal infundibulum (Suske et al., 2016). It was concluded that cementogenesis was strictly limited to the pre-eruptive and peri-eruptive phase of CT development (Suske et al., 2016). These anatomical features correspond with the clinical finding that an incomplete infundibular cemental filling is a common condition, but is not necessarily associated with pathological dental changes.

Recently, Fitzgibbon et al. (2010) demonstrated a prevalence of 88% for cemental hypoplasia or altered infundibular cementum in healthy CT. Similar high prevalence rates ranging from 43% (Baker, 1974) to 90% (Windley et al., 2009a) were reported from other studies. There is general agreement that an infundibulum with an incomplete cemental filling is prone to food impaction, potentially causing infundibular disorders (Johnson and Porter, 2006; Du Toit et al., 2008; Fitzgibbon et al., 2010) associated with endodontic diseases (Dacre et al., 2008; Van den Enden and Dixon, 2008; Veraa et al., 2009) and/or tooth fractures (Dacre et al., 2007; Dixon et al., 2014).

Although the prevalence of infundibular cemental hypoplasia is remarkably high, infundibular disorders were reported to cause pulpal and periapical infections in only 16% of diseased CT (Dacre et al., 2008). There could be a large overlap between probable pathological conditions of the infundibulum and those structural abnormalities that have no clinical relevance. Klugh (2010) determined three stages of infundibular decay according to the extent of infundibular defects in the neighboring tooth substances. Our study aimed to define normal morphological variations and pathological conditions in CT infundibula on a

gross anatomical and histomorphological level, with reference to the affected tooth substances and the underlining pathological processes.

Materials and methods

Maxillary cheek teeth

Maxillary CT (n = 688; Triadan 06 - 11) with no evidence for dental disorders were examined (Table 1). CT (n = 177) originated from horses of different age, sex and breed that had been euthanized on welfare grounds for disorders unrelated to dental or periodontal diseases. Teeth were extracted immediately after euthanasia and were fixed in 10% buffered formalin (pH 7.4, room temperature). Subsequently, extracted CT were inspected macroscopically (occlusal surface, tooth sides and horizontal sections on subocclusal, mid-tooth and apical level) to detect evidence of dental and endodontic diseases (periapical infection, necrotic pulp horns, tertiary dentin filled pulp horns, necrotic root canals). CT (n = 511) were examined within macerated skulls. Teeth displaying signs of endodontic diseases or periodontal diseases (open pulp horns, crown fractures, widened diastemata) were excluded from this study.

Additionally, 55 diseased maxillary CT (Triadan 06 - 12) from 49 horses were examined after extraction for dental disorders (periapical and endodontic infections, tooth fractures, periodontal diseases; Table 1). Teeth were stored in 10% buffered formalin (pH 7.4, room temperature).

Gross anatomical examination

Infundibula of extracted teeth (healthy and diseased) were assessed for shape and for the integrity of infundibular cementum and enamel. Cemental hypoplasia was defined according to criteria that described the position of the former central infundibular blood vessels. In particular, the diameter and the number of central openings were assessed using a

ruler. Cemental hypoplasia was diagnosed if the diameter of an opening exceeded 1 mm or if more than two openings perforated the infundibular cementum (Fig. 1).

An infundibulum was defined as erosive according to criteria that described the colour and consistency of the infundibular hard substances. The consistency was determined by touching the infundibular hard substances with a needle. In brittle substances, tissue pieces were easily removed. Infundibular erosion was diagnosed if the normal structure of the infundibular cementum and / or enamel was changed (dark discolouration, brittle consistency and disintegration; Fig. 1).

Subsequently, 177 CT with no evidence of dental diseases and all diseased maxillary CT ($n = 55$) were sectioned in standardised horizontal planes (between occlusal and mid-third and between mid-third and apical third of the reserve crown; to enable visualization of the apical third of the infundibulum) using a diamond blade saw (Micro Bandsaw MBS 240/E, Proxxon) equipped with a water-cooling system to minimise frictional heat. On sectioned CT, the infundibular cementum was classified as previously described for the occlusal surfaces.

Porphyrin test

To detect residual blood within infundibula, a porphyrin test was performed to demonstrate the transformation of haemoglobin into porphyrin (Schwerd, 1977). Horizontal sections with non-discoloured ($n = 51$) and red discoloured ($n = 31$) infundibular cementum were covered with six drops of acid sulphur (95-98%, Merck) and were immediately assessed by UV irradiation (TL 8W/08 F8 T5/BLB, Philips). Red fluorescence indicated residual blood.

Histological examinations

From formalin fixed teeth, horizontal specimens (5 mm thick) were prepared and decalcified in ethylenediaminetetraacetate (EDTA, pH 8.0, room temperature) for

approximately 6 weeks. Subsequently, specimens were embedded in paraffin wax (automatic embedding center, Leica Instruments) and 5 µm histological sections were prepared and stained with haematoxylin and eosin. Tooth sections with evidence of bacterial invasion into the dentin were examined using Gram- and Giemsa- staining to confirm presence of microorganisms within dentinal tubules. All sections were analysed by routine light microscopy (DM 100, Leica Instruments).

Immunohistological examinations

To visualize endothelial cells, selected sections were immunohistologically stained for Factor VIII as described elsewhere (Suske et al., 2016).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the data analysis software system STATISTICA (v. 7.1; StatSoft). All infundibula assessed at the occlusal surface were tabulated into 'changed' and 'unchanged'. Statistically significant differences in the occurrence of infundibular cemental hypoplasia in maxillary CT were assessed by a log-linear analysis of frequency tables. To describe the relationship between infundibular erosion and endodontic disease, the chi-square test of independence was calculated.

The significance level was chosen at $\alpha = 0.05$. *P*-values of less than or equal to 0.05 were assumed to indicate statistical significance.

Results

Gross anatomical examinations

The shape of the infundibular enamel was described on the horizontal section. Each infundibulum was composed of a central part and two protrusions extending in a buccal direction (Fig. 1). The peripheral sides of the protrusions featured enamel infoldings, varying

in depth and number (Fig. 1).

Infundibular cemental hypoplasia: Prevalence in teeth with no evidence of dental diseases

Cemental hypoplasia was present in at least one infundibulum in CT of 351/688 (51%) cases at the occlusal surface and in CT of 100/177 (56%) cases at a subocclusal level (Fig. 2).

Infundibular cemental hypoplasia- prevalence in diseased teeth

Cemental hypoplasia was present in at least one infundibulum in CT of 40/55 (72%) cases at the occlusal surface and at a subocclusal level (Fig. 2).

Infundibular cemental hypoplasia: Topographical correlations

The prevalence of cemental hypoplasia in mesial infundibula was significantly higher than in the distal infundibula ($P < 0.05$, Fig. 3). Furthermore, the occurrence of infundibular cemental hypoplasia varied between teeth in different Triadan positions, with tooth 09 being the most affected tooth ($P < 0.05$) and tooth 11 having the lowest prevalence ($P < 0.05$, Fig.3). Cemental hypoplasia in at least one infundibulum was present in more than 75% of 09s.

Infundibular erosion: Prevalence

Infundibular erosion was present in at least one infundibulum in CT of 10/177 (< 6%) of teeth showing no evidence of dental diseases and in CT of 15/55 (>27%) of diseased teeth. In all diseased teeth, infundibular erosion caused pulpal infection that was confirmed on pathohistological examination. Infundibular erosion was significantly correlated with pulpal infection (chi-square test, $P < 0.001$).

Infundibular discolouration and evidence of haemoglobin

On a subocclusal level, in 49/177 (28%) of CT showing no evidence of dental diseases

and in 11/36 (31%) of diseased CT, there was red discolouration within at least one infundibulum. The strongest discolouration was present within the area of the central vascular canal, gradually fading in a peripheral direction (Fig. 4). In 74% of red discoloured infundibula, haemoglobin was detected using the porphyrin test. Additionally, infundibula with no discolouration contained haemoglobin in 65% of cases (Fig. 4). Altogether, haemoglobin was detected in > 70% of the infundibula investigated ($n = 82$).

Histological examinations: Normal infundibular cementum

The infundibular cementum contained numerous vascular canals and lacunas of cementoblasts. The canals branched extensively and gradually reduced in size towards the periphery. Some vascular canals contained remnants of soft tissue and cells (Fig. 5).

Histological examination: Infundibular cemental hypoplasia

Within the hypoplastic infundibular cementum, the central blood vascular canal was widened to a central gap varying in size; it ranged from a few millimeters up to the total diameter of the infundibulum, which was often filled with food material. Infundibular cementum directly adjacent to the gap was marked by an uneven surface and fractured pieces of cementum. This histomorphological features were regarded as brittle consistency. Peripheral zones showed normal appearance (compact) of infundibular cementum more commonly (Fig. 6).

Histological examination: Infundibular erosion

Erosive infundibular cementum was characterised by a complete loss of the normal structure of infundibular cementum, i.e. blood vascular canals were widened, with irregular walls, and fragments of infundibular cementum were frequently found embedded in a mass of food material (Fig. 7).

Focal enamel aplasia

Focal aplasia of infundibular enamel was present in several infundibula in various positions along the infundibular wall. In those cases, there was direct contact between the infundibulum and the peri-infundibular dentine (Fig. 8).

Detection of microorganisms

Microorganisms were associated with food particles within the infundibular cementum and were primarily seen in blood vascular canals. Occasionally, microorganisms were also observed in dentinal tubules adjacent to the infundibulum (Fig. 7).

Immunohistological examinations: Detection of blood vessels

Factor VIII-positive cells, indicating the presence of vital blood vessels, were exclusively obtained in pulp tissue adjacent to infundibula. Factor VIII-positive cells were not present in the infundibular cementum or in the peri-infundibular dental substances.

Discussion

In equine dentistry the term infundibular cemental hypoplasia is often confused with the terms infundibular caries, infundibular decay and infundibular necrosis, since there is no accepted definition of infundibular cemental hypoplasia (Dacre, 2005; Windley et al., 2009b; Klugh, 2010).

Fitzgibbon et al. (2010) suggested using the term infundibular cemental hypoplasia for areas of complete absence of the infundibular cementum with the underlying infundibular enamel exposed. However, this definition describes a cemental aplasia rather than a cemental hypoplasia. The latter should be considered as a developmental partial absence of the

mineralised cementum.

A clear and applicable definition should consider that infundibular cementum contains blood vascular canals (Dixon and Du Toit, 2010; Suske et al., 2016). Thus, Kilic et al. (1997) defined infundibular cemental hypoplasia on an ultrastructural level according to the ratio between the number and size of blood vascular canals and the amount of cementum proper. In the present study, we defined infundibular cemental hypoplasia on a macroscopic level. As previously shown, infundibular cementum deposits gather on the infundibular wall and grow incrementally until the central blood vessels are reached (Dixon and Du Toit, 2010; Suske et al., 2016). Accordingly, central gaps of the blood vascular canals are expected in all infundibula. We suggest using the diameter and / or the number of central blood vascular canals as criteria to define cemental hypoplasia. The threshold values we suggest (diameter >1 mm, number >2) were determined by careful inspection of 688 teeth and enabled us to analyse our specimens. However, since these are arbitrary thresholds, further studies might propose other thresholds or criteria based on other structural characteristics.

Using the suggested definition, infundibular cemental hypoplasia was diagnosed in >50% of CT displaying no evidence of dental diseases and in >70% of diseased CT. These high prevalence rates are in accordance with previous reports (Baker, 1974; Windley et al., 2009a; Fitzgibbon et al., 2010). Discrepancies between published studies are likely to be due to differences in the definitions of infundibular cemental hypoplasia.

It should be emphasised that the current definitions of infundibular cemental hypoplasia only imply a partial absence of infundibular cementum with unchanged hard substances in the surroundings (Dacre, 2005). This underlines the conclusion that infundibular cemental hypoplasia is an anatomical variation rather than an infundibular disorder (Casey,

2013).

Equine infundibular disorders are often associated with discolouration and therefore substantial changes in the infundibular enamel and the adjacent dentine (Johnson and Porter, 2006; Dacre et al., 2008; Fitzgibbon et al., 2010). Due to these changes, the term dental caries (i.e. tooth decay) are often used (Crabill and Schumacher, 1998; Johnson and Porter, 2006).

In human medicine caries is defined as a harmful process in which microorganisms produce acidic metabolites that decalcify and disintegrate dental hard substances (Marsh and Martin, 1999; Selwitz et al., 2007). Remarkably, Lundström et al. (2007) reported that in equine CT infundibula, caries-like lesions were strongly associated with *Streptococcus devriesei*. As *Streptococcus devriesei* is closely related to a characteristic microorganism for human caries (*Streptococcus mutans*), it has been proposed that the disintegration of infundibular substances is caused by a mechanism that resembles human caries (Lundström et al., 2007). However, further investigations are needed to confirm these assumptions and to rule out other potential causative factors such as dietary changes (Lundström et al., 2007).

The term infundibular necrosis is often used to describe infundibular disorders (Kilic et al., 1997; Crabill and Schumacher, 1998). However, necrosis is an irreversible destruction of vital cells and tissues caused by lethal acting noxa (Baumgärtner and Gruber, 2011). As the infundibular cementum and infundibular enamel are non-vital structures, the term necrosis appears to be inappropriate.

It seems most appropriate to hypothesise that discolouration and destruction of infundibula are caused by erosion. In human medicine dental erosion is defined as a mostly painless and slow proceeding disintegration of hard tissue, due to a chemical decalcification

without involvement of microorganisms (Schröder, 1997). However, further studies are required to confirm which process, erosion or caries, is the main cause of destruction of equine infundibular substances.

It has been generally accepted that infundibular cemental hypoplasia is a developmental malformation caused by insufficient or limited blood supply (Crabill and Schumacher, 1998; Johnson and Porter, 2006; Dacre, 2010). In accordance with other researchers, we found a higher prevalence of infundibular cemental hypoplasia in the mesial infundibulum than in the distal infundibulum (Veraa et al., 2009; Windley et al., 2009b). This asymmetry is reflected in the recent finding that the infundibular blood supply remains intact longer for the distal infundibulum than for the mesial infundibulum (Staszyk et al., 2015; Suske et al., 2016).

There is also evidence that the pre-eruptive period of tooth development influences the prevalence of infundibular cemental hypoplasia. In agreement with several other studies, the highest prevalence of infundibular cemental hypoplasia in our study was detected in maxillary 09s (Veraa et al., 2009; Windley et al., 2009b). This corresponds to the finding that 09s have a significantly shorter pre-eruptive mineralization time (11.5 months) than other CT, which mineralise for 16 (07s) to 21 (08s) months (Hoppe et al., 2004). Although these data were determined in mandibular CT, we assume that maxillary CT have similar mineralisation times (Hoppe et al., 2004).

It has been suggested that premature removal of deciduous teeth causes an early interruption of the occlusal infundibular blood supply in permanent CT, resulting in infundibular cemental hypoplasia (Kilic et al., 1997; Dacre, 2010). Although this etiological explanation agrees with current knowledge of infundibular development, it is not applicable to

molar teeth, which do not have a deciduous precursor (Fitzgibbon et al., 2010).

Fitzgibbon et al. (2010) suggested that infundibular cemental hypoplasia is a result of domestication. However, this assumption is based mainly on studies of wild equids that reported that infundibular diseases were rare or even absent (Miles and Grigson, 1990; Maslauskas et al., 2009). An analysis of possible relevant factors (e.g. nutrition, feeding behavior and genetics) that discriminate wild equids from domesticated equids has not been conducted so far.

Although infundibular cemental hypoplasia is considered a non-pathological condition, it is regarded as a predisposing factor for dental disorders (Dacre et al., 2007; Dixon et al., 2014). Food impaction in hypoplastic infundibula can lead to destructive infundibular disorders, resulting in the spread of infectious agents into the endodontic system. This cause of endodontic diseases was confirmed in 16% of 57 apically infected maxillary CT (Dacre et al., 2008).

In our study of infundibular disorders, an even higher percentage (27%) of diseased maxillary CT had endodontic infection caused by erosive infundibula.

Moreover, it has been speculated that infundibular disorders are underestimated and are important in the relatively high prevalence of disease in maxillary CT diseases (Du Toit et al., 2008). This assumption is further supported by our finding that infundibular erosion was significantly correlated with pulpal infection.

A requirement for the reliable detection of endodontic diseases caused by infundibular disorders is knowledge of the structural features of the infundibulum, including possible routes for the spread of infectious agents.

In our study, the outline of the infundibular enamel featured very heterogeneous shapes; the

walls of the protrusions varied widely in their presence and depth of infoldings. These morphological features might have an impact on the onset of the destructive process, since deep infoldings and corresponding shallow niches could support food impaction and hamper clearance by salivary flow.

A further feature of infundibula is the presence of haemoglobin within the infundibular cementum. This is in accordance with studies reporting red discolouration of the infundibular cementum, which was assumed to represent blood (Johnson and Porter, 2006; Fitzgibbon et al., 2010). In contrast to Fitzgibbon et al. (2010), we failed to detect any vital blood vessels or infundibular blood supply through the apical walls (Suske et al., 2016). However, such distinct features might represent an uncommon feature of equine infundibula. The haemoglobin detected in infundibula in this study was considered to be from residual blood after infundibular blood supply was disrupted due to tooth eruption.

Histologic investigations revealed that this residual blood remained in the typical network of small blood vascular canals in the infundibular cementum (Kilic et al., 1997). It should be emphasised that this canal system must be connected to openings on the infundibular occlusal surface, the former entrances for the central infundibular blood vessels. Accordingly, food particles and microorganisms could potentially enter and spread into the infundibular cementum as demonstrated in this study. While further spread into dentinal tubules and therefore into the endodontic system should be prevented by the infundibular enamel, it has been shown that microorganisms manage to enter the dentinal tubules and further invade into the dental pulp. Two mechanisms causing this harmful spread of infectious agents have been proposed, namely: (1) destructive processes (erosion) could perforate the infundibular enamel, or (2) developmental focal enamel aplasia might enable transmigration of microorganisms. Focal enamel aplasia has been reported to occur frequently in infundibular

enamel (Dacre, 2005) and it is assumed that it is a typical feature of equine infundibula.

Conclusions

Infundibular cemental hypoplasia can be defined as a developmental malformation due to limited blood supply during cementogenesis. It is a non-pathological condition, but affected infundibula might be more prone to destructive processes. Morphological features such as deep infoldings of the infundibular enamel, the presence of residual blood and focal enamel aplasia might be important factors for the spread of infectious agents through the infundibular walls, causing severe endodontic disease.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgements

We wish to thank Prof. Dr. K. Fey, Dr. K. Roscher (Equine Clinic, Internal Medicine, Justus Liebig University Giessen, Germany), Prof. Dr. M. Reinacher (Institute of Veterinary Pathology, Justus Liebig University Giessen, Germany) as well as numerous equine practitioners for providing specimens.

References

Baker, G.J., 1974. Some aspects of equine dental decay. *Equine Veterinary Journal* 6, 127-130.

Baumgärtner, W., Gruber, A.D., 2011. Degeneration, Regeneration, Reparation und Wachstumsstörungen. In: Baumgärtner, W., Gruber, A.D. (Eds.). *Allgemeine Pathologie für die Tiermedizin*, First Ed. Enke Verlag, Stuttgart, Ger, pp. 86-139.

Casey, M., 2013. A new understanding of oral and dental pathology of the equine cheek teeth. *The Veterinary Clinic of North America: Equine Practice* 29, 301-324.

- Crabill, M.R., Schumacher, J., 1998. Pathophysiology of acquired dental diseases of the horse. *The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 14, 291-307.
- Dacre, I.T., 2005. Equine dental pathology. In: Baker, G.J., Easley, J. (Eds.). *Equine Dentistry*, Second Edn. Elsevier Saunders, St. Louis, USA, pp. 91-110.
- Dacre, I.T., 2010. Equine dental pathology. In: Easley, J., Dixon, P.M., Schumacher, J. (Eds.). *Equine Dentistry*, Third Edn. Elsevier Saunders, St. Louis, USA, pp. 129-147.
- Dacre, I.T., Kempson, S., Dixon, P.M., 2007. Equine idiopathic cheek teeth fractures. Part 1: Pathological studies on 35 fractured cheek teeth. *Equine Veterinary Journal* 39, 310-318.
- Dacre, I.T., Kempson, S., Dixon, P.M., 2008. Pathological studies of cheek teeth apical infections in the horse: 5. Aetiopathological findings in 57 apically infected maxillary cheek teeth and histological and ultrastructural findings. *The Veterinary Journal* 178, 352-363.
- Dixon, P.M., Du Toit, N., 2010. Dental anatomy. In: Easley, J., Dixon, P.M., Schumacher, J. (Eds.). *Equine Dentistry*, Third Edn. Elsevier Saunders, St. Louis, USA, pp. 51-76.
- Dixon, P.M., Savill, D., Horbyl, A., Reardon, R.J.M., Liuti, T., 2014. Critical evaluation of ex vivo restoration of carious equine maxillary cheek teeth infundibulae following high-pressure gas and micro-particle abrasion. *The Veterinary Journal* 200, 368-374.
- Du Toit, N., Burden, F.A., Kempson, S.A., Dixon, P.M., 2008. Pathological investigation of caries and occlusal pulpar exposure in donkey cheek teeth using computerised axial tomography with histological and ultrastructural examinations. *The Veterinary Journal* 178, 387-395.
- Fitzgibbon, C.M., Du Toit, N., Dixon, P.M., 2010. Anatomical studies of maxillary cheek teeth infundibula in clinically normal horses. *Equine Veterinary Journal* 42, 37-43.
- Hoppe, K.A., Stover, S.M., Pascoe, J.R., Amundson, R., 2004. Tooth enamel biomineralization in extant horses: implications for isotopic microsampling. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 206, 355-365.
- Johnson, T.J., Porter, C.M., 2006. Infundibular caries, In: *Focus on Dentistry*, American Association of Equine Practitioners, pp. 101-107.
- Kilic, S., Dixon, P.M., Kempson, S.A., 1997. A light microscopic and ultrastructural examination of calcified dental tissues of horses: 4. Cement and the amelocemental junction. *Equine Veterinary Journal* 29, 213-219.
- Klugh, D.O., 2010. Principles of restoration of diseased teeth. In: Klugh, D.O. (Ed.). *Principles of Equine Dentistry*, First Ed. Manson Publishing, London, UK, pp. 172-175.
- Lundström, T.S., Dahlén, G.G., Wattle, O.S., 2007. Caries in the infundibulum of the second upper premolar tooth in the horse. *Acta Veterinaria Scandinavica* 49, 10-17.

- Marsh, P., Martin, M.V., 1999. Plaque-mediated diseases – dental caries and periodontal diseases. In: Marsh, P., Martin, M.V. (Eds.). *Oral Microbiology*, Fourth Edn. Elsevier Saunders, Oxford, GB, pp. 103-145.
- Maslauskas, K., Tulamo, R.M., McGowan, T., Kučinskas, A., 2009. Dental examination findings in two groups of Lithuanian horses with no history of dental prophylaxis or treatment. *Veterinarija Ir Zootechnika* 47, 60-65.
- Miles, A.E., Grigson, C., 1990. *Coyler's variation and diseases of the teeth of animals*, Cambridge University Press, Revised edition, 219-220.
- Schröder, H.E., 1997. Karies und Erosion, In: Schröder, H.E. (Ed.). *Pathobiologie oraler Strukturen*, Third Ed. Karger, Freiburg, Deutschland, pp. 79-100.
- Schwerd, W., 1977. Blutfarbstoffnachweis mit der Porphyrinprobe. *Zeitschrift für Rechtsmedizin* 80, 135-138.
- Selwitz, R.H., Ismail, A.I., Pitts, N.B., 2007. Dental caries. *The Lancet* 369, 51-59.
- Staszyk, C., Suske, A., Pöschke, A., 2015. Dental and periodontal anatomy - a tutorial review. *Equine Veterinary Education*, in press.
- Suske, A., Pöschke, A., Schrock, P., Kirschner, S., Staszyk, C., 2016. Infundibula of equine maxillary cheek teeth. Part 1: Development, blood supply and infundibular cementogenesis. (submitted to *The Veterinary Journal* in combination with this manuscript).
- Van den Enden, M.S.D., Dixon, P.M., 2008. Prevalence of occlusal pulpar exposure in 110 equine cheek teeth with apical infections and idiopathic fractures. *The Veterinary Journal* 178, 364-371.
- Veraa, S., Voorhout, G., Klein, W.R., 2009. Computed tomography of the upper cheek teeth in horses with infundibular changes and apical infection. *Equine Veterinary Journal* 41, 872-876.
- Windley, Z., Weller, R., Tremaine, W.H., Perkins, J.D., 2009a. Two- and three-dimensional computed tomographic anatomy of the enamel, infundibulae and pulp of 126 equine cheek teeth. Part 1: Findings in teeth without macroscopic occlusal or computed tomographic lesions. *Equine Veterinary Journal* 41, 433-440.
- Windley, Z., Weller, R., Tremaine, W.H., Perkins, J.D., 2009b. Two- and three-dimensional computed tomographic anatomy of the enamel, infundibulae and pulp of 126 equine cheek teeth. Part 2: Findings in teeth with macroscopic occlusal or computed tomographic lesions. *Equine Veterinary Journal* 41, 441-447.

Table 1

List of specimens used for this study.

Maxillary CT (<i>n</i> = 743)				
		No evidence of disease (<i>n</i> = 688)	Diseased (<i>n</i> = 55)	
Storage		Formalin (<i>n</i> =177)	Maceration (<i>n</i> =511)	Formalin (<i>n</i> = 55)
Assessment		Occlusal surface, Subocclusal level	Occlusal surface	Occlusal surface, Subocclusal level
dental age (mean)		12 years	unknown	8 years
Sex	male	50%	unknown	44%
	female	50%	unknown	56%
Triadan- position	06	27	87	5
	07	28	84	6
	08	32	86	6
	09	30	86	24
	10	30	84	10
	11	30	84	3
	12	0	0	1

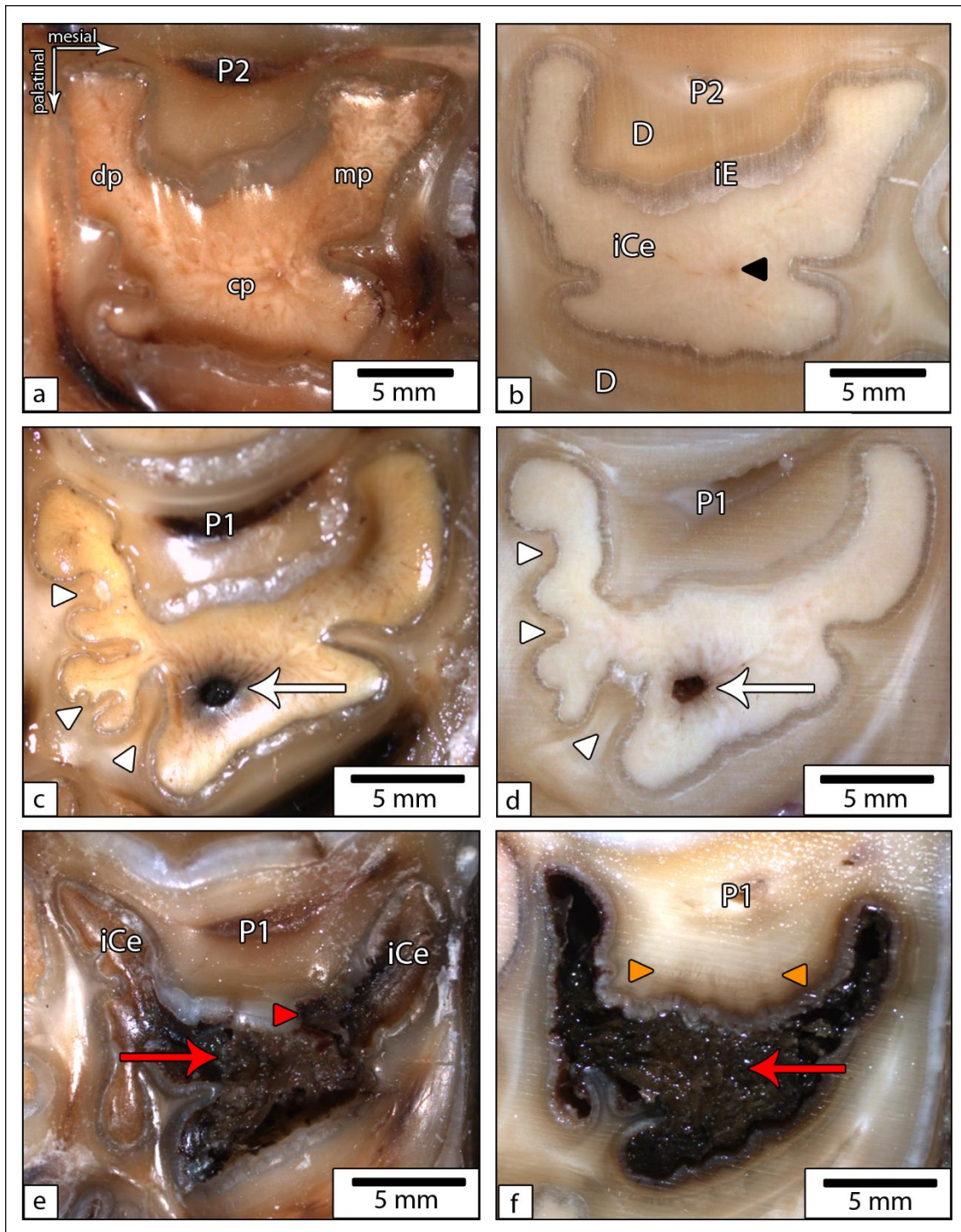


Fig. 1.

Infundibula of equine maxillary cheek teeth.

(a, b) Maxillary third molar (211), dental age 13 years, distal infundibulum,

(a) Occlusal surface, (b) Horizontal section.

The infundibulum is divided in a central part (cp) and two protrusions (dp, distal protrusion; mp, mesial protrusion). Infundibular cementum (iCe) and infundibular enamel (iE) with normal texture and colouration. Black arrowhead, central vascular canal;

(c, d) Maxillary third premolar (108), dental age 10 years, mesial infundibulum;

(c) Occlusal surface; (d) Horizontal section.

Infundibular cemental hypoplasia, diameter of the central vascular canal is > 1 mm (white arrows). The distal protrusion shows marked enamel infoldings (white arrowheads).

(e-f) Maxillary first molar (109), dental age six years, mesial infundibulum;

(e) Occlusal surface; (f) Horizontal section.

Infundibular erosion, the infundibular cementum (iCe) shows dark discolouration and brittle consistence (red arrows).

Red arrowhead, focal disintegration of infundibular enamel; orange arrowheads, discolouration of peri-infundibular dentine; P1, pulp horn no. 1; P2, pulp horn no. 2; D, dentine.

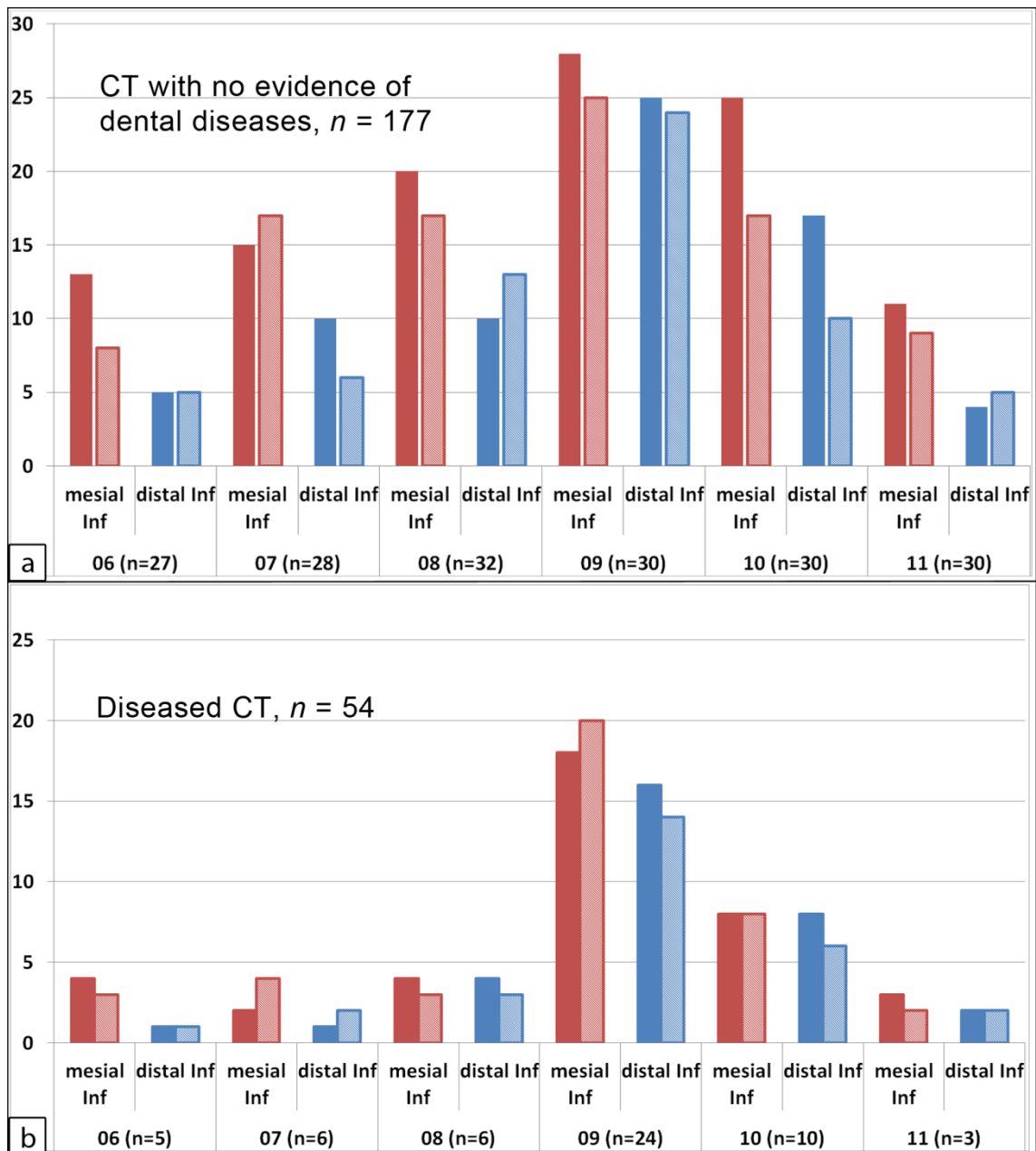


Fig. 2.

Infundibular cemental hypoplasia in cheek teeth (CT) without evidence for dental diseases (a) and diseased maxillary CT (b), assessed on occlusal and subocclusal level.

Red, mesial infundibulum; Blue, distal infundibulum; Dark colour, occlusal surface; Pale colour, subocclusal level

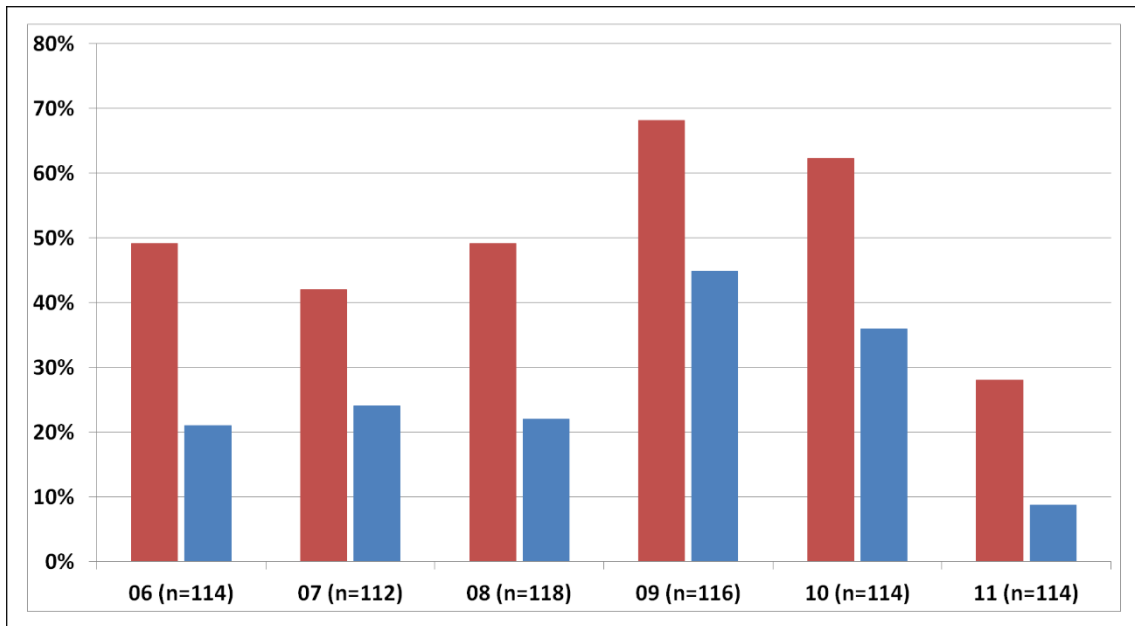


Fig. 3.

Prevalence of infundibular cemental hypoplasia in maxillary cheek teeth (CT) without evidence for dental diseases, assessed on the occlusal surface.

Red, mesial infundibulum; Blue, distal infundibulum

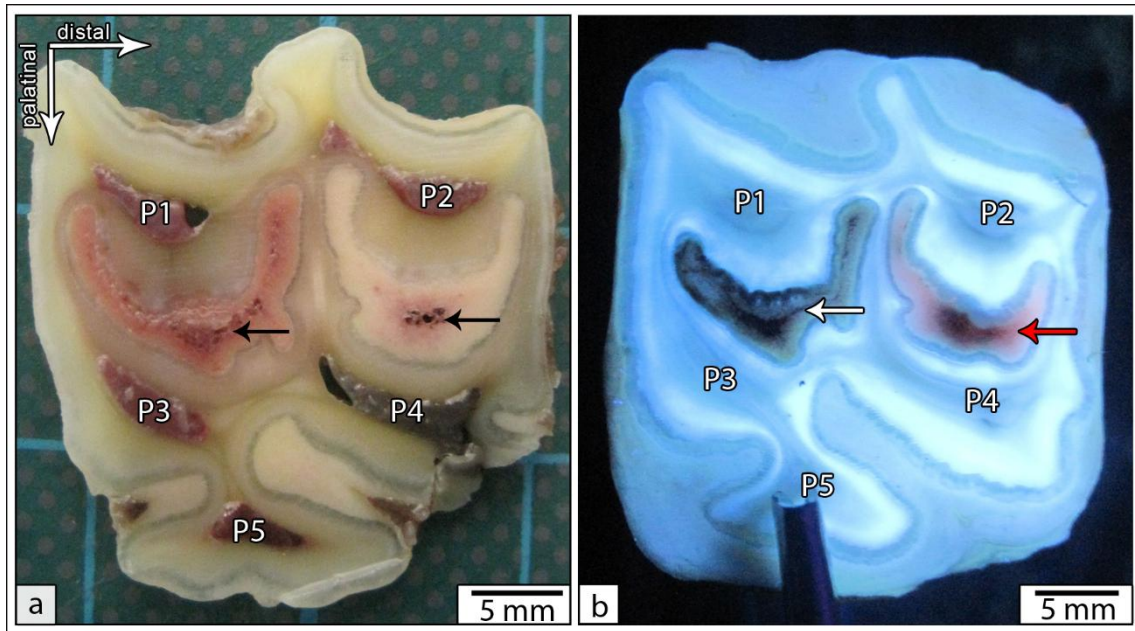


Fig. 4.

Horizontal sections of maxillary cheek teeth (CT).

(a) Maxillary first molar (109), dental age 3.5 years.

Red discolouration (black arrows) within the infundibula.

(b) Maxillary third premolar (207), dental age 8 years, Porphyrin-test,

red fluorescence within the distal infundibulum (red arrow) indicates the presence of haemoglobin. The mesial infundibulum (white arrow) does not show any fluorescence.

P1-P5, pulp horns no. 1 - no. 5.

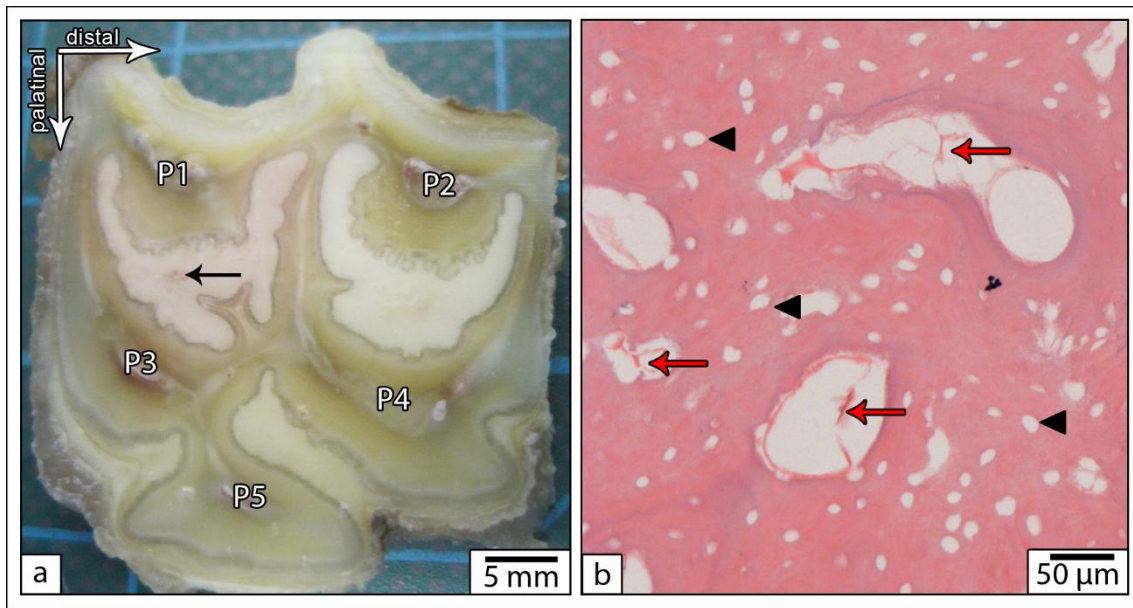


Fig. 5.

Normal infundibular cementum.

(a) Maxillary first molar (209), dental age 7 years, horizontal section, unchanged central vascular canal (black arrow).

P1-P5, pulp horns no. 1 - no. 5.

(b) Maxillary third molar (211), dental age 11 years, horizontal section, decalcified histological section, hematoxylin eosin staining.

Normal infundibular cementum is characterised by numerous lacunae of former cementoblasts (arrowheads) and canals of former blood vessels, which contain remains of endothelial cells (red arrows).

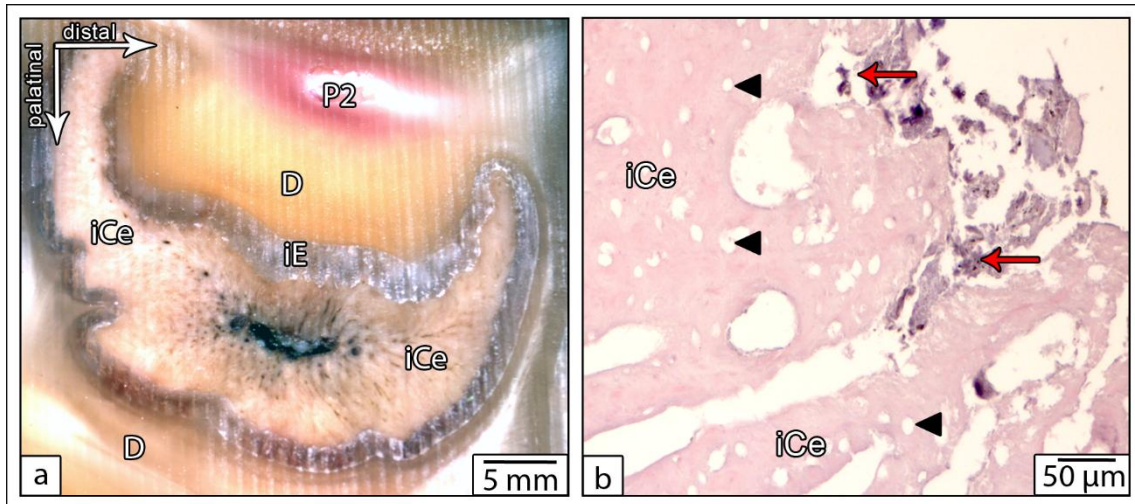


Fig. 6.

Infundibular cemental hypoplasia.

(a) Maxillary second molar (110), dental age 12 years, distal infundibulum, horizontal section.

The central vascular canal is widened and food impactions are visible.

(b) Maxillary second premolar (106), dental age 17 years, horizontal section, decalcified histological section, haematoxylin eosin staining.

Food material is pressed into the former blood vascular canals (red arrows), whereas lacunae of former cementoblasts remain unfilled (arrowheads).

iCe, infundibular cementum; iE, infundibular enamel; D, dentine; P2, pulp horn no. 2.

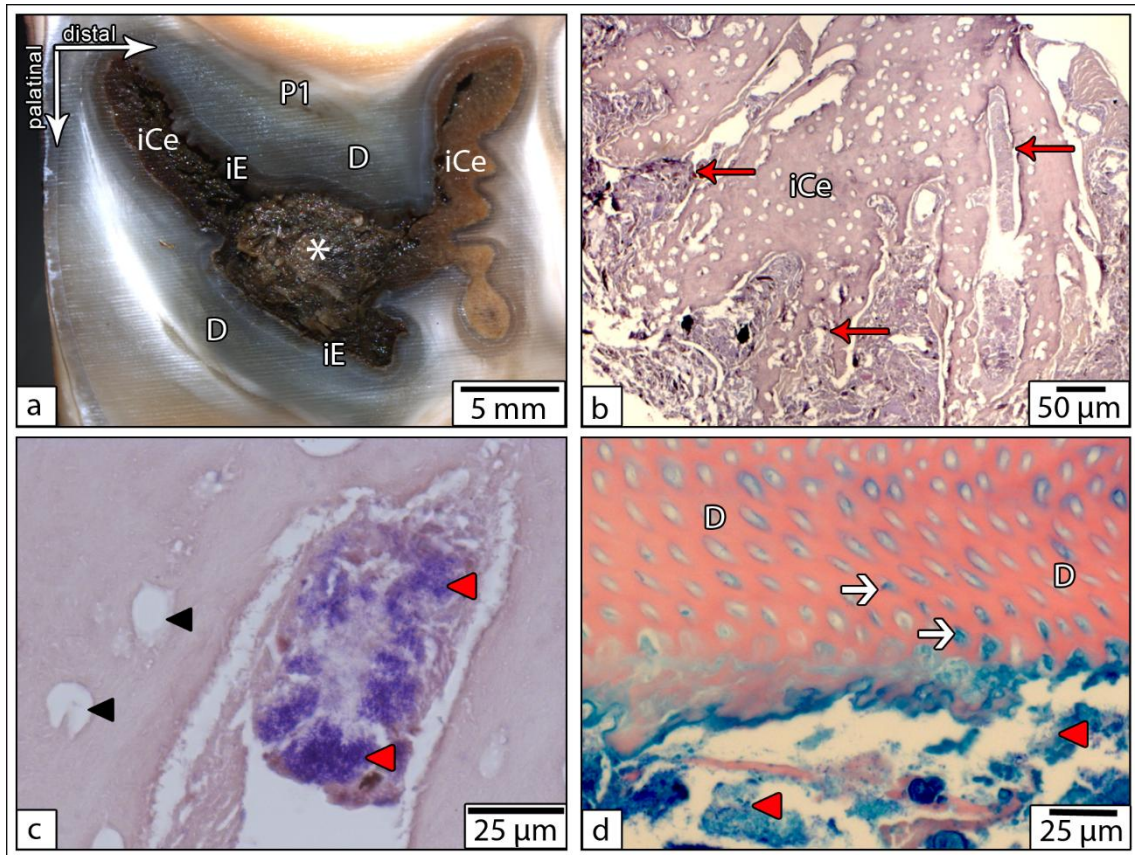


Fig. 7.

Infundibular erosion.

(a) Maxillary first molar (109), dental age six years. Mesial infundibulum, horizontal section. The infundibular cementum (iCe) appears dark brown and brittle in texture. The central part of the infundibulum is filled with food material (white asterisk). Infundibular enamel (iE) and peri-infundibular dentine (D) are darkly discoloured.

(b) Maxillary first molar cheek teeth (CT; 209), dental age 8 years, distal protrusion of the mesial infundibulum, horizontal section, decalcified histological section, haematoxylin eosin staining.

Food material is pressed into the former blood vascular canals (red arrows), the adjacent infundibular cementum (iCe) shows a ruptured texture.

(c) Maxillary first molar (209), dental age 8 years, mesial infundibulum, horizontal section, decalcified histological section, Gram staining.

Former blood vascular canals containing food material and microorganisms (purple staining, red arrowheads), which formed large colonies.

No microorganisms are present within lacunae of former cementoblasts (black arrowheads).

(d) Maxillary second molar CT (106), dental age 17 years, horizontal section, decalcified histological section, Giemsa staining.

Colonies of microorganisms (red arrowheads) are localised within disintegrated dentine (D), single microorganisms are present in adjacent dentinal tubules (with arrows).

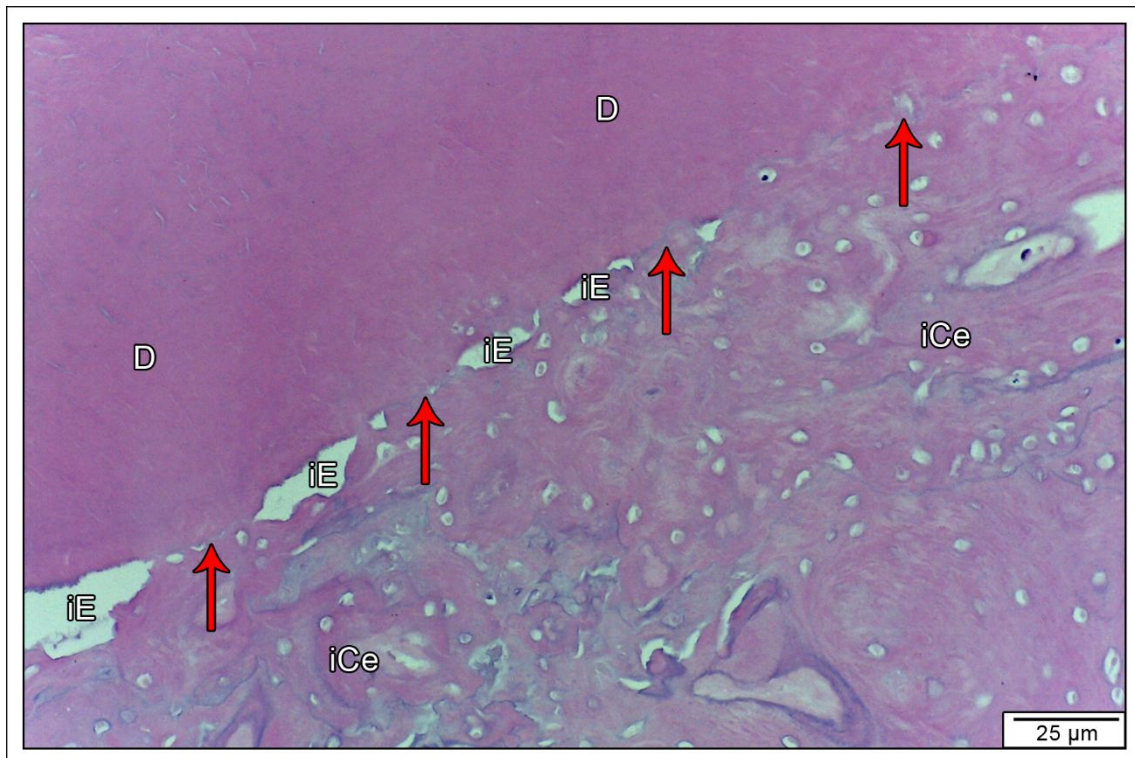


Fig. 8.

Focal aplasia of infundibular enamel.

Maxillary third molar (211), dental age 0.5 years, distal infundibulum, decalcified horizontal section, haematoxylin eosin staining.

Due to focal infundibular enamel aplasia, infundibular cementum (iCe) and peri-infundibular dentine (D) are directly connected to each other (red arrows).

iE, infundibular enamel.

4. Übergreifende Diskussionen

Die Ergebnisse der Studie lassen den Schluss zu, dass das Infundibulum als Ursache für Erkrankungen der maxillären Backenzähne unterschätzt wird (Suske et al. 2016 a,b). Im Kontrast zu Dacre et al. (2008), in deren Studien das Infundibulum lediglich in 16% der Fälle als Ursache für endodontische Erkrankungen identifiziert wurde, sind in der vorliegenden Studie in mehr als 27% der Fälle Infundibularerkrankungen als Ursache für endodontische Erkrankungen identifiziert worden.

Des Weiteren beschrieben Du Toit et al. (2008) eine deutlich höhere Erkrankungsrate maxillärer gegenüber mandibulärer Backenzähne. Einer der deutlichsten Unterschiede zwischen diesen Zahnformen ist das Infundibulum, welches nicht in mandibulären Backenzähnen vorkommt.

Um zu beweisen, dass das Infundibulum einen deutlichen Einfluss auf die höhere Prävalenz maxillärer Backenzahnerkrankungen hat, haben wir uns tiefergehend mit der Entwicklung und den anatomischen Besonderheiten des Infundibulums befasst.

4.1. Infundibuläre Hartsubstanzbildung und infundibuläre Blutgefäßversorgung während der Odontogenese

4.1.1. Blutgefäße

Die präeruptive Blutgefäßversorgung ist von essentieller Bedeutung im Prozess der infundibulären Zementogenese, welche idealerweise in einer vollständigen Füllung des Infundibulums resultieren sollte. Wie auch in früheren Studien schon gezeigt wurde, konnte auch in den von uns untersuchten Zähnen stets ein zentrales Blutgefäß, welches von okklusal in das Infundibulum zieht, dargestellt werden (Baker, 1979; Dixon und Du Toit, 2010). Folglich wurde angenommen, dass die nutritive Versorgung mit dem Ausschub des Zahnes in die Mundhöhle versiegt, da das zentrale Blutgefäß unterbrochen wird (Baker, 1979; Dixon und Du Toit, 2010).

Unsere Studien zeigen, dass zusätzlich zu dem zentralen, von okklusal eintretenden Blutgefäß seitliche Arterien vorhanden sind. Diese seitlichen Blutgefäße sind während der frühen Odontogenese in Bindegewebe eingebettet, welches die intra-infundibulären mit den peripheren Bereichen des Zahnsäckchens verbindet.

4.1.2. Entwicklung der infundibulären Form

Um den durchtritt der seitlichen Blutgefäße zu gewährleisten, besitzt das Schmelzorgan seitliche Öffnungen am distalen und mesialen Rand des Zahnes. Diese komplexe

dreidimensionale Architektur des frühen Infundibulums wurde konstant in den untersuchten Zähnen gefunden. Folglich wird angenommen, dass diese spaltförmigen Öffnungen im Schmelzorgan konstant auftretende, morphologische Eigenheiten sind, die durch genetische Prozesse determiniert sind. Die zahnformdeterminierenden Prozesse sind weitestgehend bekannt. Verschiedene Ausprägungen mitotischer Aktivität innerhalb der unterschiedlichen Zonen des inneren Schmelzepithels verursachen Asymmetrien in der Form des Schmelzorgans und so die individuelle Zahnform. Nicht mitotisch aktive Bereiche innerhalb des Schmelzorgans werden zu Schmelzknoten, von denen man annimmt, dass sie regulatorische Funktionen besitzen (Cobourne et al., 1999; Lisi et al., 2003; Klugh, 2010). Die Schmelzknoten verbleiben in ihrer Position und stellen später die Schmelzspitzen dar. Wohingegen angrenzende Bereiche in horizontale und apikale Richtungen proliferieren und expandieren. Schmelzknoten teilt man je nach Phase der Odontogenese in verschiedenen Generationen ein, man nennt sie primäre und sekundäre Schmelzknoten (Cobourne et al., 1999; Lisi et al., 2003). Durch die skizzierten Unterschiede in der proliferativen Aktivität entstehen die typischen Formen des Zahnes und folglich auch die Form des Infundibulums. Folglich können die seitlichen Öffnungen der Infundibula als tiefe Einkerbungen zwischen den Schmelzknoten verstanden werden. Weitere Studien sind nötig um das gestaffelte Auftreten von Schmelzknoten auf molekularer und zellulärer Ebene equiner, maxillärer Backenzähne darzustellen.

Das Auftreten der mesialen und distalen, seitlichen Einkerbungen im infundibulären Schmelz ermöglicht ein neues Verständnis der infundibulären Blutgefäßversorgung, die für die weitere Zementogenese von entscheidender Bedeutung ist. Dadurch, dass sich die seitlichen Öffnungen nach apikal erstrecken, wird eine seitliche Blutgefäßversorgung ermöglicht, welche auch dann erhalten bleibt, wenn der Zahn bereits durch die orale Mukosa durchgebrochen ist. Erstaunlicherweise existiert die seitliche Blutgefäßversorgung auch wenn die seitlichen Öffnungen bereits mit infundibulären Zement ausgefüllt sind. Dies kann man durch die besondere Struktur des equinen Zahnzements erklären, welcher durch die Präsenz von vitalen Blutgefäßen gekennzeichnet ist (Boyde, 1997; Mitchell et al., 2003; Masset et al., 2006). Erst wenn die seitliche Blutgefäßversorgung über das Niveau des Zahnfleisches eruptiert ist, werden die seitlich eintretenden Blutgefäße unterbrochen.

4.1.3. Unterschiede zwischen dem mesialen und dem distalen Infundibulum

Bemerkenswerterweise ist eine deutliche Asymmetrie in der Tiefe der seitlichen Einkerbungen zwischen dem mesialen und dem distalen Infundibulum vorhanden. Das distale

Infundibulum besitzt eine seitliche Öffnung die weiter apikal reicht als die des mesialen Infundibulums. Folglich dauert es länger bis die seitliche Öffnung des distalen Infundibulums vollständig eruptiert ist, dem entsprechend wird das distale Infundibulum länger durch Blutgefäße versorgt (Staszuk et al., 2015). Unglücklicherweise kann man anhand der vorliegenden Daten nicht sagen wie lange die Zeitspanne bis zur Blutgefäßunterbrechung ist und dementsprechend auch nicht, wie lange die Zementogenese in den jeweiligen Infundibula andauert.

4.1.4. Apikale Blutgefäßversorgung

Frühere Studien postulieren ein zusätzliches, apikales Blutgefäß im Infundibulum (Dacre, 2005; Johnson und Porter, 2006; Dixon und Du Toit, 2010). Folglich müsste es Blutgefäßkanäle geben, die den apikalen Boden des Infundibulums penetrieren. Dies bedeutet, dass Blutgefäße durch Dentin und Schmelzorgan beziehungsweise durch den fertigen Schmelz geführt werden müssen. Bei einigen Spezies ist tatsächlich vaskularisiertes Dentin bekannt, beispielsweise bei Faultieren (*Bradypus tridactylus*, Arsuffi, 1938; Santana et al., 2013) und Katzenfischen (*Anarhichas lupus*, Kerebel et al., 1978). Aber diese besondere Dentinform ist nicht für equine Zähne beschrieben. Obwohl die Penetration des äußeren Schmelzepithels durch Blutgefäße ein bereits beschriebener Mechanismus ist, der die Versorgung der Enameloblasten des inneren Schmelzepithels garantiert (Muller, 1926; Manzke, 2005), ist die Penetration des inneren Schmelzepithels nicht bekannt. In unserer Studie konnten weder vaskularisiertes Dentin noch Blutgefäße, die das innere Schmelzepithel durchdringen dargestellt werden. Folglich konnte die Existenz apikaler Blutgefäße nicht bestätigt werden.

4.1.5. Infundibuläre Hartsubstanzbildung

Letztendlich sind der Verlauf und die Ausprägung der infundibulären Blutgefäße von essentieller Bedeutung bei der infundibulären Hartsubstanzbildung, welche mit der Amelogenese (Schmelzbildung) beginnt.

Die bereits erwähnten Schmelzknoten im okklusalen Aspekt des Infundibulums sind Ausgangspunkt für die Schmelzmineralisierung und werden nach Mineralisation als Schmelzspitzen bezeichnet (Soana et al., 1999; Hoppe, et al., 2004; Klugh, 2010). Die ersten Anzeichen der Mineralisation sieht man an den primären Schmelzknoten, anschließend setzt sich die Mineralisation in horizontale und apikale Richtung fort (Baker, 1979; Soana et al., 1999; Hoppe et al., 2004). Als letztes mineralisiert der Boden des Infundibulums. In den

Einfaltungen des infundibuläre Schmelzes kann es zum Fehlen der Schmelzberandung kommen, dies nennt man fokale Schmelzhypoplasie, welche in deciduiden Zähnen aber auch in vollständig eruptierten, permanenten, maxillären Backenzähnen beschrieben wurde (Dacre, 2005; Asanger, 2011). Über die Entstehung der fokalen Schmelzhypoplasie kann man nur spekulieren. Entweder lagen in diesen Bereichen Lücken im Schmelzepithel vor (folglich wäre Schmelzaplasie treffender) oder die Schmelzschicht war unphysiologisch dünn ausgeprägt und wurde durch die beginnende Zementbildung abgebaut. Um die Entstehung der Schmelzhypoplasie zu klären, sind noch weitere Studien notwendig.

Die Mineralisation des Schmelzes ist eine Grundvoraussetzung für die Zementbildung, welche mit dem partiellen Abbau von bereits mineralisiertem Schmelz beginnt (Jones und Boyde, 1974; Mitchel et al., 2003; Sahara, 2014). Folglich beginnt die Zementbildung im okklusalen Bereich, insbesondere an den Schmelzvorsprüngen welche ursprünglich die Schmelzknoten waren. Konsequenterweise erfolgt die Zementbildung von okklusal nach apikal und dem entsprechend wird erst am Ende der Phase der Hartschubstanzbildung Zement in den apikalen Infundibularbereichen gebildet.

Diese Beobachtung widerspricht kürzlich veröffentlichten Studien (die auch eine apikale Blutgefäßversorgung propagieren), die eine zusätzlich apikal beginnende Zementproduktion darstellen (Dixon und Du Toit, 2010). Das neugeformte Zement am okklusalen Infundibulumeingang kann den Kanal des zentralen Blutgefäßes verengen, was eine insuffiziente Blutversorgung und damit verzögerte Zementogenese im apikalen Infundibulumbereich verursacht. Eine unvollständige Zementbildung wird als zementäre Hypoplasie bezeichnet.

4.2. Infundibuläre zementäre Hypoplasie

4.2.1. Definition der zementären Hypoplasie

Aufgrund der zementäre Entwicklung von okklusal nach apikal tritt zementäre Hypoplasie häufig im apikalen Bereich auf, kann aber auch das gesamte Infundibulum betreffen (Kilic et al., 1997; Dacre, 2005; Johnson und Porter, 2006). Folglich sollte zementäre Hypoplasie als odontogenetische Malformation angesehen werden und nicht als eine Zahnerkrankung (Casey, 2013).

Allerdings sind in der bisherigen Literatur sehr unterschiedlichen Definitionen der zementären Hypoplasie vorhanden:

Fitzgibbon et al. (2010) definieren infundibuläre, zementäre Hypoplasie als entwicklungsbedingte, vollständige Abwesenheit von Infundibularzement, sodass der darunter

liegende infundibuläre Schmelz frei liegt. Diese Definition beschreibt eher eine Aplasie als eine Hypoplasie. Ein Nachweis einer tatsächlich vorliegenden, vollständigen Aplasie bleiben die Autoren allerdings schuldig. Des Weiteren berücksichtigt die Definition nicht den zentralen Blutgefäßkanal (Dixon und Du Toit, 2010; Suske et al., 2016a). Aufgrund des zentralen Blutgefäßkanals bleibt immer eine kleine Lücke im infundibulären Zement zurück, das bedeutet es existiert in diesem Bereich kein Infundibularzement aber es liegt keine zementäre Hypoplasie vor.

Kilic et al. (1997) definieren die zementäre Hypoplasie auf einer ultrastrukturellen Ebene, Bezug nehmend auf das Verhältnis zwischen der Anzahl und Größe der Blutgefäßkanäle und der Menge der Zementmasse. In hypozementotischen Zement ist die Anzahl der Blutgefäßkanäle deutlich erhöht und folglich die Menge an Hartschmelze reduziert.

In Anlehnung daran haben wir die zementäre Hypoplasie unter Berücksichtigung des zentralen Blutgefäßkanals, auf einer makroskopischen Ebene definiert. Wir benutzen den Durchmesser des zentralen Blutgefäßkanals und die Anzahl eventuell vorhandener Blutgefäßkanäle als Kriterien für die Definition der zementären Hypoplasie. Die gewählten Werte (Durchmesser >1 mm, >2 Kanäle) wurden anhand sorgfältiger Untersuchungen von 688 Zähnen gewählt. Dies sind zunächst subjektiv determinierte Größenangaben, die allerdings gut geeignet erscheinen, unter Praxisbedingungen eine Klassifizierung von untersuchten Zähnen vorzunehmen. Weitere klinische Studien werden zeigen, ob die gewählten Maßangaben modifiziert werden müssen. In Übereinstimmung mit Dacre (2005) soll betont werden, dass die vorliegende Definition für zementäre Hypoplasie nur eine partielle Abwesenheit des Infundibularzementes mit unveränderter Hartschmelzstruktur (Schmelz und Dentin) in seiner Umgebung darstellt (Dacre, 2005).

4.2.2. Prävalenz der zementären Hypoplasie

Entsprechend unserer Definition trat zementäre Hypoplasie in >50% der maxillären Backenzähne auf, welche keine Anzeichen für Zahnerkrankungen zeigten und bei >70% erkrankter Zähne. Fitzgibbon et al. (2010) beschrieb nur Prävalenzen von 22% wohingegen Windley et al. (2009a) nur circa in 10% der Fälle von einem vollständig gefülltem Infundibulum berichtet. Baker, 1974 berichtet von Prävalenzen von 43%. Diese Diskrepanzen kommen wahrscheinlich durch die bereits beschriebenen unterschiedlichen Definitionen für zementäre Hypoplasie zustande. Des Weiteren wurde in älteren Studien die zementäre Hypoplasie oft mit Erkrankungen des Infundibulums gleichgesetzt (Dacre, 2005; Windley et al., 2009b; Klugh, 2010).

Ähnlich wie andere Autoren konnten wir eine Häufung der zementären Hypoplasie im mesialen Infundibulum darstellen (Windley et al., 2009b; Veraa et al., 2009; Asanger, 2011). Diese Asymmetrie kann durch die bereits erwähnte asymmetrische Blutgefäßversorgung erklärt werden, welche im mesialen Infundibulum wesentlich kürzer andauert als im distalen, da die seitliche Blutgefäßversorgung im mesialen Infundibulum früher aufgrund der Zahneruption unterbrochen wird, weil die seitliche Einkerbung weniger weit apikal reicht. Eine weitere topographische Häufung weist der erste molare Backenzahn (109/209) auf, dieses Phänomen konnte auch in anderen Studien beobachtet werden (Windley et al., 2009b; Veraa et al., 2009; Asanger, 2011). Dies hängt höchstwahrscheinlich mit dem Alter des Zahnes im Vergleich zu den anderen Zähnen innerhalb der Zahnarkade aber auch mit der Mineralisationszeit, die im weiteren Verlauf noch eingehend beschrieben wird, zusammen.

4.2.3. Ursachen für die zementäre Hypoplasie

Es gibt Hinweise, dass die präeruptive Zeit der Zahnentwicklung ebenfalls das Auftreten der zementären Hypoplasie beeinflusst. Je größer die präeruptive Mineralisationszeit des Schmelzes, desto größer ist die Zeitspanne für die Zementbildung. Dies passt damit zusammen, dass der 09 die kürzeste präeruptive Mineralisationszeit hat (11,5 Monate), wohingegen beispielsweise der 07 16 Monate und der 08 21 Monate hat (Hoppe et al., 2004). Folglich ist die Zeit für die Zementbildung im 09 deutlich kürzer ausgeprägt. Obwohl diese Daten für Unterkieferbackenzähne erhoben wurden, nimmt der Autor an, dass es sich bei maxillären Backenzähnen ähnlich verhält (Hoppe et al., 2004).

Eine weitere mögliche Ursache für zementäre Hypoplasie ist eventuell das zu frühe Entfernen der Milchzahnkappen, die eine verfrühte Unterbrechung der okklusalen, infundibulären Blutgefäßversorgung verursacht (Kilic et al., 1997; Dacre, 2010). Diese Erklärung mag für die prämolaren, maxillären Backenzähne zutreffend sein, allerdings nicht für die molaren, maxillären Backenzähne, welche keine Milchzahnkappen besitzen (Fitzgibbon et al., 2010).

Des Weiteren vermutet Fitzgibbon et al. (2010), dass die zementäre Hypoplasie ein Resultat der Domestikation ist. Diese Aussage beruht überwiegend auf Studien, die eine niedrige Prävalenz infundibulärer Erkrankungen bei Wildequiden gefunden haben (Miles and Grigson, 1990; Masluskas et al., 2009). Eine Studie über mögliche signifikante Faktoren (Ernährung, Kauverhalten, Genetik), die Wildequiden von domestizierten Equiden unterscheidet, gibt es nicht.

4.3. Prädisponierende Faktoren für infundibuläre Erkrankungen

4.3.1. Zementäre Hypoplasie

Anhand dieser Studie konnte bekräftigt werden, dass die zementäre Hypoplasie als eine anatomische Formvariante des Infundibulums angesehen werden kann. Trotzdem wird sie als einer der entscheidenden Faktoren bei der Entstehung von infundibulären Erkrankungen angesehen (Johnson and Porter, 2006; Du Toit et al., 2008; Fitzgibbon et al., 2010). Futterbestandteile können während des Kauvorgangs in hypozymentotische Bereiche hinein gepresst werden. Diese Futtereinsprießungen können destruktive Prozesse innerhalb des Infundibulums auslösen, welche sich bis auf das Endodontium ausbreiten können (Dacre et al., 2008; Van den Enden and Dixon, 2008; Veraa et al., 2014).

4.3.2. Komplexe dreidimensionale Infundibulumform

Des Weiteren ist die äußere Form des Infundibulums sehr heterogen. Besonders die Schmelzwände der mesialen und distalen Protrusionen variieren stark bezüglich der Ausprägung und Tiefe von Einfaltungen. Dies könnte die Entwicklung destruktiver Prozesse weiter fördern, da in besonders stark gefalteten Infundibularwänden enge Spalträume entstehen, die Futtereinsprießungen fördern und Selbstreinigungsmechanismen durch Speichelfluss behindern.

4.3.3. Hämoglobinreste innerhalb des zementären Kanalsystems

Eine weitere infundibuläre Besonderheit ist eine gelegentlich auftretende Rotverfärbung des Infundibularzementes, welche bereits von anderen Autoren beschrieben und als durch Blut verursachte Verfärbung interpretiert wurde (Fitzgibbon et al., 2010; Johnson und Porter, 2006). Durch weiterführende Untersuchungen konnten wir bestätigen, dass die Verfärbungen durch Hämoglobinreste hervorgerufen wurden (Schwerd, 1977).

Aber im Gegensatz zu Fitzgibbon et al. (2010) konnten wir keine vitalen Blutgefäße und keine infundibuläre Blutgefäßversorgung, welche durch den Boden des Infundibulums eintritt, feststellen. Vielmehr handelt es sich um Blutreste, die in das Infundibulum versacken, wenn die Blutgefäßversorgung unterbrochen wird. Folglich können sich die Blutreste im gesamten Blutgefäßkanalsystem befinden, welches sich bis zu den Schmelzwänden erstreckt.

Relevant werden diese Blutreste als Nährboden für Mikroorganismen, da diese zusammen mit Futterpartikel durch den zentralen Blutgefäßkanal in das Kanalsystem des infundibulären Zements eindringen und aufgrund des mikrobiellen Wachstums bis zum begrenzenden Schmelz gelangen können.

4.3.4. Schmelzhypoplasie

Die Ausbreitung von pathogenen Agenzien in das endodontische System sollte durch den infundibulären Schmelz verhindert werden.

Eine unzureichende Ausbildung der infundibulären Schmelzwand (fokale Schmelzhypoplasie) verursacht eine Schwachstelle in der Barriere zwischen dem infundibulären Zement, der über das Blutgefäßkanalsystem mit der Maulhöhle verbunden ist und dem angrenzenden Endodontium. Ähnlich wie bei der zementären Hypoplasie, gehen wir bei der fokalen Schmelzhypoplasie von einer anatomischen Formvariante aus.

Differentialdiagnostisch können diese Lücken im Schmelzmantel auch ein Symptom von einem kongenitalen Fehler sein, welcher Amelogenesis imperfecta genannt wird.

Diese in der humanen Zahnmedizin ausgiebig beschriebene Erkrankung ist eine unzureichende Schmelzbildung, die in der Regel den gesamten Zahn betrifft. Des Weiteren betrifft die Amelogenesis imperfecta mehrere oder sogar alle Zähne innerhalb des Gebisses (Schröder, 1997; Nanci, 2013). Da die hier beobachtete fokale Schmelzhypoplasie sich ausschließlich in sehr kleinen Bereichen innerhalb von sehr engen Einfaltungen der Schmelzberandung darstellen lässt und auch nur einzelne Zähne betroffen waren, erscheint der Begriff Amelogenesis imperfecta unangebracht. Des Weiteren ist kein Fall einer Amelogenesis imperfecta, mit ähnlichen Symptomen, wie im humanen Gebiss, in der equinen Zahnmedizin bis zum jetzigen Zeitpunkt beschrieben.

4.4. Infundibuläre Erkrankungen

Von der zementären Hypoplasie müssen Erkrankungen des Infundibulums abgegrenzt werden. Diese Abgrenzung wird durch die teilweise unzureichenden Definitionen für Erkrankungen des Infundibulums erschwert.

Anders als bei der zementären Hypoplasie sind infundibuläre Erkrankungen mit Verfärbungen und auch substantiellen Veränderungen des infundibulären Schmelzes und des angrenzenden Dentins verbunden (Dacre, 2004; Johnson and Porter, 2006; Fitzgibbon et al., 2010).

Trotzdem wird der Begriff infundibuläre Karies regelmäßig mit zementärer Hypoplasie gleichgesetzt (Johnson and Porter, 2006; Borkent and Dixon, 2015). Bedauerlicherweise ist wenig über die Mechanismen der equinen, infundibulären Karies bekannt, folglich beziehen sich die meisten Studien auf bekanntes Wissen aus der humanen Zahnmedizin (Borkent and Dixon, 2015).

In der Humanmedizin ist Karies als ein schmerzhafter Prozess definiert, welcher durch säureproduzierende Bakterien verursacht wird. Durch die gebildeten sauren Metaboliten

werden die Zahnhartsubstanzen zerstört (Marsh und Partin, 1999; Fejerskov and Kidd, 2007; Selwitz et al., 2007). Lundström et al. (2007) fanden heraus, dass die kariesartigen, infundibulären Veränderungen der Pferde durch *Streptococcus devriesei* verursacht werden. *Streptococcus devriesei* ist nah verwandt mit kariesverursachenden Mikroorganismen (z.B. *Streptococcus mutans*) des Menschen. Es wird angenommen, dass die hartschmelzreduzierenden Prozesse in equinen Infundibula denen der humanen Karies ähneln (Lundström et al., 2007). Der Autor betont aber auch, dass weitere Untersuchungen nötig sind um diese Behauptung zu bestätigen und weitere Faktoren, wie die Fütterung mit einbezogen werden müssen (Lundström et al., 2007).

Auch der Begriff Nekrose wird häufig im Zusammenhang mit infundibulären Erkrankungen verwendet (Crabill und Schumacher, 1998; Kilic et al., 1997). Allerdings ist Nekrose als eine irreversible Zerstörung von vitalen Zellen durch letale Noxen definiert (Baumgärtner und Gruber, 2011). Entgegen dieser Definition handelt es sich bei dem infundibulären Zement und dem infundibulären Schmelz nicht um vitale Strukturen, was der Definition von Nekrose widerspricht.

Anhand des aktuellen Wissenstandes lassen sich die beschriebenen Veränderungen im equinen Infundibulum am treffendsten durch den Begriff Erosion beschreiben. In der humanen Zahnmedizin ist Erosion als eine meist schmerzlose und langsam verlaufende Destruktion von Hartschmelz, aufgrund von chemischer Dekalzifizierung ohne Beteiligung von Mikroorganismen definiert (Schröder, 1997). In der equinen Zahnmedizin ist die Erosion im Zusammenhang mit saurer Fütterung bereits beschrieben (Dixon et al., 2010).

In der humanen Zahnmedizin können Erosion und Karies eindeutig voneinander unterschieden werden. Der Hauptunterschied ist die Beteiligung von Mikroorganismen bei der Karies. Des Weiteren ist Karies überwiegend lokal auf einzelne Zahnareale begrenzt und mit Plaquebildungen assoziiert (Borkent und Dixon, 2015). Entsprechende Plaques und das Vorhandensein von kariesspezifischen Bakterien konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht eindeutig in krankhaft veränderten equinen Infundibula festgestellt werden. Erst wenn man für diese Mechanismen eindeutige Beweise gefunden hat, kann man von infundibulärer Karies sprechen. Folglich müssen weitere Studien durchgeführt werden, um die Mechanismen der Krankheitsentwicklung innerhalb des Infundibulums besser verstehen zu können.

Die destruktiven Veränderungen des Infundibulums können sich auf die angrenzenden endodontischen Strukturen ausbreiten. Aufgrund des Hartschmelzabbaus kann die Schmelzbarriere zerstört werden was einen Übertritt von pathologischen Agenzien in das endodontische System ermöglicht. Des Weiteren können aufgrund von fokaler

Schmelzhypoplasie Mikroorganismen, welche sich innerhalb des infundibulären Zements befinden, leicht in die Dentintubuli eindringen und folglich in die Pulpa gelangen. Folglich können Endodontopathien entstehen, wenn die infundibuläre Schmelzbarriere überwunden wird, wobei die Erkennung von Infundibulum-assoziierten Endodontopathien nur möglich ist, wenn eine makroskopisch sichtbare Veränderung des Infundibulums in Form von Erosion vorliegt. Endodontopathien aufgrund von fokaler Schmelzhypoplasien werden oft nicht als Infundibulum-assoziiert erkannt.

4.5. Fazit

Diese Studie konnte zeigen, dass die infundibuläre Zementbildung während der Odontogenese ausschließlich im okklusalen Bereich des Infundibulums beginnt und sich dann weiter nach apikal fortsetzt. Folglich kommt es wahrscheinlicher in den apikalen Bereichen zu einer unzureichenden Zementbildung (zementäre Hypoplasie), wenn eine insuffiziente Blutgefäßversorgung vorliegt. Des Weiteren konnte das Vorliegen einer zusätzlichen apikalen Blutgefäßversorgung nicht bestätigt werden. Aber es existiert zusätzlich zu der okklusalen Blutgefäßversorgung eine seitliche Blutgefäßversorgung. Diese seitlichen Blutgefäße treten durch mesiale und distale Öffnungen der Infundibula. Diese seitlichen Blutgefäße werden erst nach dem vollständigen Ausschub der seitlichen Öffnung in die Mundhöhle unterbrochen, folglich bleibt die Blutgefäßversorgung auch für eine gewisse Zeit nach dem Durchbruch des Zahnes durch die orale Mukosa erhalten. Im mesialen Infundibulum erstrecken sich diese seitlichen Öffnungen weniger weit nach apikal, sodass hier die seitliche Blutgefäßversorgung früher unterbrochen wird. Folglich ist die Wahrscheinlichkeit eine zementäre Hypoplasie zu entwickeln im mesialen Infundibulum größer als im distalen Infundibulum. Aber nicht nur die zementäre Hypoplasie ist eine anatomische Formvariante, die man regelmäßig in den equinen Infundibula antrifft, auch die fokale Schmelzhypoplasie und die Rotverfärbung des Infundibulums sind regelmäßig auftretende anatomische Varianten.

All diese anatomischen Varianten können prädisponierende Faktoren für infundibuläre Erkrankungen sein. Wobei betont werden muss, dass die Entstehung einer infundibulären Erkrankung ein multifaktorielles Geschehen darstellt.

Des Weiteren ist es anhand dieser Studie möglich, die Okklusalfläche der Infundibula während einer Maulhöhlenuntersuchung eindeutig zu klassifizieren. Es kann klar definiert werden, dass eine Zementäre Hypoplasie vorliegt, wenn mehr als zwei Blutgefäße und/oder der zentrale Blutgefäßkanal einen Durchmesser von mehr als einem Millimeter besitzt. Des

Weiteren liegt wahrscheinlich keine infundibuläre Erkrankung vor, wenn die angrenzenden Hartschichten unverändert sind.

Trotzdem ist es aber nach wie vor schwierig eine einheitliche Definition für infundibuläre Erkrankungen zu erstellen, da die Pathomechanismen noch nicht vollständig geklärt sind. Da der sichere Nachweis von säurebildenden Bakterien innerhalb der Infundibula noch nicht erfolgt ist, sollte man nicht von einer Karies sprechen. Viel mehr ist zum jetzigen Zeitpunkt der Begriff Erosion zutreffender. Unabhängig von der Ursache der infundibulären Erkrankung, können sich destruktive Prozesse innerhalb des Infundibulums über die Zerstörung der Schmelzbarriere auf das Endodontium ausbreiten und so eine Endodontopathie auslösen. Schwieriger zu erkennen ist die Ausbreitung von Mikroorganismen entlang des Blutgefäßkanalsystems durch Bereiche mit fokaler Schmelzhypoplasie hinein in das Endodontium.

Diese Studie konnte zeigen, dass das Infundibulum großer anatomischer Formvarianten unterliegt, dass die Entstehung von infundibulären Erkrankungen ein multifaktorielles Geschehen ist, und dass das Infundibulum als Eintrittspforte für pathogene Agenzien in das Endodontium bisher offensichtlich unterschätzt wurde.

5 Zusammenfassung

Anika Suske (2016): Das Infundibulum equiner maxillärer Backenzähne: Embryologische, makroskopische und mikroskopische Untersuchungen zur infundibulären Zementogenese sowie zu zahnanatomischen Formvarianten

Das Ziel dieser Arbeit war es, das Infundibulum equiner maxillärer Backenzähne mit Hilfe von histologischen und mikrocomputertomographischen (μ CT) Untersuchungen genauer zu beschreiben. Dabei wurde vor allem auf die embryologische Entwicklung des Infundibulums in Zusammenhang mit anatomischen Varianten, wie zementäre Hypoplasie, fokale Schmelzhypoplasie und Rotverfärbungen geachtet. Bereits bekannte Zusammenhänge der anatomischen Varianten mit infundibulären Erkrankungen sollten bestätigt bzw. präzisiert werden und es sollten eventuelle Verbindungen mit Erkrankungen des Endodontischen Systems dargestellt werden.

Dafür standen 41 prämolare, maxilläre, deciduide Zähne und 743 maxilläre, permanente Backenzähne (511 mazerierte und klinisch unauffällige Zähne, 177 klinisch unauffällige und in 10%igen Formalin fixierte Zähne, 55 erkrankte und in 10%igen Formalin fixierte Zähne) zur Verfügung. Alle Zähne wurden makroskopisch beurteilt. Acht deciduide Zähne wurden in Gänze mittels Mikrocomputertomographie untersucht. Weitere deciduide Zähne wurden histologisch (H&E Färbung) bzw. immunhistologisch (Pan-cytokeratin zur Darstellung von Epithelien, Faktor VIII zur Darstellung von Endothelien) aufgearbeitet.

Bei den 511 permanenten, mazerierten Zähnen wurden nur die Okklusalfächen beurteilt, wohingegen bei den anderen Zähnen auch subokklusale Ebenen beurteilt wurden (jeweils ein Schnitt im oberen, mittleren und unteren Drittel). Diese Zähne wurden weitergehend mit histologischen, immunhistologischen und mikrobiologischen Methoden untersucht. Des Weiteren wurde bei 82 Zähnen ein Porphyrin-Test durchgeführt, der als Nachweis für Hämoglobin dient.

Bei den μ CT Untersuchungen und den makroskopischen Untersuchungen von horizontal zerteilten deciduiden Zähnen fiel auf, dass die Infundibula mesiale und distale seitliche Einkerbungen besitzen. In frühen Entwicklungsstadien enthalten diese seitlichen Einkerbungen Weichgewebe, welches im weiteren Verlauf durch Zement ersetzt wird. Bei weiterführenden histologischen und immunhistologischen Untersuchungen konnten im Weichgewebe aber auch im Zement seitliche Blutgefäße nachgewiesen werden, die das Infundibulum auch nach der Eruption der Okklusalfäche durch die orale Mukosa für eine gewisse Zeit nutritiv versorgen können. Bemerkenswerterweise reicht die Einkerbung des

distalen Infundibulums weiter nach apikal als die Einkerbung des mesialen Infundibulums, sodass im distalen Infundibulum die seitliche Blutgefäßversorgung länger erhalten bleibt als im mesialen Infundibulum. Des Weiteren konnten keine Blutgefäße, die von apikal in das Infundibulum eindringen, nachgewiesen werden. Eine weitere Auffälligkeit auf den μ -CT Aufnahmen waren fokale Lücken im infundibulären Schmelz, die sich vor allem in den engen Einfaltungen befanden.

Um eine eindeutige, makroskopische Beurteilung der adulten Zähne zu ermöglichen, wurden vor der Beurteilung Definitionen für die Begriffe zementäre Hypoplasie und erkranktes Infundibulum generiert. Eine zementäre Hypoplasie liegt vor, wenn mehr als zwei zentrale Blutgefäßkanäle vorhanden sind und / oder der Durchmesser des zentralen Blutgefäßkanals größer als 1 mm im Ausmaß ist. Des Weiteren müssen die angrenzenden Hartgewebe intakt sein. Eine Erkrankung des Infundibulums (Erosion) liegt vor, wenn das Infundibularzement und der angrenzende Schmelz und / oder das angrenzende Dentin Konsistenzänderungen und / oder Verfärbungen aufweisen.

Eine Zementäre Hypoplasie konnte bei den klinisch unauffälligen Zähnen auf der Okklusalfäche in 51% und in den subokklusalen Ebenen in 56% nachgewiesen werden. Bei den erkrankten Zähnen konnte eine zementäre Hypoplasie auf der Okklusalfäche und auf den Subokklusalfächen in 72% nachgewiesen werden. Zementäre Hypoplasie wurde häufiger im mesialen als im distalen Infundibulum beobachtet. Des Weiteren wies der erste molare Backenzahn (Triadan 09) eine vermehrte Häufung der zementären Hypoplasie auf.

Erosionen des Infundibulums konnten in weniger als 6% der klinisch unauffälligen Zähne und in über 27% der erkrankten Zähne nachgewiesen werden.

Des Weiteren konnten in über 70% aller adulten Zähne Hämoglobinreste innerhalb des Infundibularzementes nachgewiesen werden, wobei nicht zwingend eine makroskopisch sichtbare Rotverfärbung des infundibulären Zements vorlag.

Bei weiterführenden histologischen Untersuchungen fiel regelmäßig eine fokale Schmelzhypoplasie in engen Einfaltungen des Schmelzmantels auf. Zusätzlich konnte ein deutlicher struktureller Unterschied zwischen Erosion und zementärer Hypoplasie dargestellt werden. Bei der zementären Hypoplasie war der zentrale Blutgefäßkanal deutlich erweitert und das angrenzende, infundibuläre Zement wies eine unruhige Kontur auf. Das weiter peripher gelegene Infundibularzement war in Struktur und Kontur unverändert. Das histologische Bild der Erosion war gekennzeichnet durch deutliche Veränderungen der Struktur und Kontur des gesamten Infundibularzementes. Bei weiterführenden mikrobiologischen Untersuchungen (Gram- und Giemsa-Färbungen) konnten Bakterien

innerhalb der Futterbestandteile nachgewiesen werden, die sich bei bereits zerstörtem Infundibularschmelz auch innerhalb der angrenzenden Dentintubuli befanden.

Anhand der erhobenen Befunde konnte dargestellt werden, dass es zusätzlich zu der okklusalen Blutgefäßversorgung auch eine seitliche Blutgefäßversorgung der Infundibula gibt. Diese seitliche Blutgefäßversorgung lässt Rückschlüsse auf die vermehrte Häufung der infundibulären zementären Hypoplasie im mesialen Infundibulum zu. Da die seitliche Einkerbung im mesialen Infundibulum deutlich geringer ausgeprägt ist als im distalen Infundibulum, wird diese auch früher unterbrochen. Folglich kommt es wahrscheinlicher im mesialen Infundibulum zu einer insuffizienten Blutgefäßversorgung und demzufolge häufiger zu einer ungenügenden Zementbildung (zementäre Hypoplasie). Des Weiteren verbleiben Hämoglobinreste innerhalb des Infundibularzementes, wenn die okklusale und seitliche Blutgefäßversorgung unterbrochen wird. Diese Hämoglobinreste stammen nicht aus vitalen Blutgefäßen, die womöglich den Infundibulumboden penetrieren. Solche Gefäße konnten nicht nachgewiesen werden.

Wie bereits bekannt, ist die zementäre Hypoplasie kein pathologischer Prozess, vielmehr ist es eine anatomische Formvariante, die als prädisponierender Faktor für infundibuläre Erkrankungen gilt. In die Hohlräume können Futterbestandteile hinein gepresst werden, was zu destruktiven Prozessen führen kann. Des Weiteren können die Hämoglobinreste innerhalb des Infundibularzementes als Nährboden für Mikroorganismen dienen. Solche Mikroorganismen können in Bereichen fokaler Schmelzhypoplasie ungehindert in die Dentintubuli eindringen oder aber auch durch destruierende Prozesse den infundibulären Schmelz zerstören. Sobald Mikroorganismen sich innerhalb der Dentintubuli befinden, ist es sehr wahrscheinlich, dass sich eine Endodontopathie entwickelt.

Um welche Art der Destruktion es sich innerhalb des Infundibulums handelt, ist noch nicht abschließend geklärt. Einige Autoren sprechen von infundibulärer Karies, wobei Karies über das Vorhandensein von die säureproduzierenden Bakterien definiert ist, welche für das Pferd noch nicht nachgewiesen sind. Folglich sollte bis zum jetzigen Zeitpunkt der Begriff Erosion verwendet werden, dabei handelt es sich um den Abbau von Zahnhartsubstanzen ohne die Beteiligung von kariestypischen, säurebildenden Bakterien.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Entstehung einer infundibulären Erkrankung ein multifaktorielles Geschehen ist, was durch das Vorhandensein einer zementären Hypoplasie und / oder Hämoglobinresten innerhalb des Infundibularzementes begünstigt werden kann. Des Weiteren liefert diese Studie die Möglichkeit einer makroskopischen Klassifizierung der Infundibula, die einfach während einer Maulhöhlenuntersuchung durchgeführt werden kann,

sodass Infundibula mit zementärer Hypoplasie (zentraler Blutgefäßkanal > 1mm und / oder mehr als 2 Kanäle) von erkrankten Infundibula (Veränderungen in Farbe und Konsistenz des infundibulären Zements mit Veränderungen der angrenzende Hartsubstanzen) unterschieden werden können. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass makroskopisch unauffällige Infundibula ebenfalls als Eintrittspforte für Mikroorganismen in das Endodontium fungieren können, da aufgrund fokaler Schmelzhypoplasie eine Lücke in der Barriere zwischen Infundibularzement und Endodontium bestehen kann.

6 Summary

Anika Suske (2016): Infundibula of equine maxillary cheek teeth: Embryological, macroscopical and histological investigations of infundibular cementogenesis and anatomical variations

The aim of this study was to describe the infundibulum of equine maxillary cheek teeth (CT) with the help of histological and micro-computertomographical (μ -CT) examinations. The main focus was set on the embryological development of the infundibulum in relation to anatomical variations like cemental hypoplasia, focal enamel hypoplasia and red discolourations of the infundibular cementum. Already known anatomical particularities of infundibula known to cause infundibular diseases should be confirmed and specified, additional associations with endodontic diseases should be exposed.

Forty-one premolar, maxillary, deciduous CT and 743 maxillary, permanent CT (511 macerated and clinical inconspicuous teeth, 177 fixed in 10% buffered formalin and clinical inconspicuous teeth, 55 fixed in 10% buffered formalin and diseased teeth) were examined. All teeth were evaluated macroscopically. Eight maxillary, deciduous CT were analyzed by μ -CT examinations. Further deciduous teeth were examined histologically (H&E staining) and immunohistologically (Pan-cytokeratin to visualize epithelial cells, Factor VIII to visualize endothelial cells).

The 511 permanent, macerated CT were exclusively evaluated on their occlusal surface, whereas the other permanent CT were evaluated on their occlusal surface and on subocclusal levels (sectioned between occlusal and mid-third and between mid-third and apical third of the reserve crone). Depending on the findings continuative histological, himmunohistological and microbiological examinations were performed. Furthermore 82 CT were investigated by porphyrin-test, which demonstrates rests of haemoglobin.

The μ -CT examinations of the deciduous teeth and the macroscopical evaluation of horizontal sectioned deciduous teeth revealed mesial and distal openings within the infundibular enamel, which reached a few millimeters in apical direction. In early stage of tooth development these openings were filled with soft connective tissue which was replaced by cementum. Using histological and immunohistological methods blood vessels within these openings were detected. There was a sidewise nutritive blood supply of the infundibular cementum which persisted for an undefined period of time after the eruption of the occlusal surface through the oral mucosa. Remarkably the lateral opening of the distal infundibulum reaches further apical compared to the lateral opening of the mesial infundibulum. Consequently the distal

infundibulum is supplied by vital blood vessels for a longer period of time compared to the mesial infundibulum. Furthermore no apical blood vessels penetrating the bottom of the infundibulum were detected. The μ -CT examination revealed small lacks within the infundibular enamel, which were often seen within narrow enamel in-foldings.

To facilitate a precise macroscopical evaluation of the permanent CT, definitions of cemental hypoplasia and diseased infundibulum (erosion) were created. Cemental hypoplasia was diagnosed if the diameter of the central vascular canal exceeded 1 mm or if more than two vascular canals perforated the infundibular cementum. Additionally the surrounding hart tissue was classified unchanged. A disease of the infundibulum (erosion) was diagnosed if the infundibular cementum and the adjacent enamel and / or dentine were discoloured and of brittle consistence.

In clinical inconspicuous CT cemental hypoplasia was present in at least one infundibulum in 51% at the occlusal surface and in 56% at a subocclusal level. In diseased CT cemental hypoplasia was present in at least one infundibulum in 72% at the occlusal surface and at a subocclusal level. Cemental hypoplasia was more often diagnosed in the mesial infundibulum compared to the distal infundibulum. Furthermore the first molar CT (Triadan 09) was the most effected CT.

Infundibular Erosion was present in at least one infundibulum in less than 6% of clinical inconspicuous CT and in more than 27% of diseased CT.

Furthermore in over 70% of maxillary, permanent CT rests of haemoglobin were detected within the infundibular cementum. Remarkably a red discolouration was not seen in all evaluated CT.

Additional histological investigations constantly revealed focal enamel hypoplasia within narrow in-foldings of the infundibular enamel. Furthermore a clear histological classification of cemental hypoplasia and erosion was possible. Cemental hypoplasia is characterized by a widened central blood vascular canal, the adjacent infundibular cementum shows an irregular contour but the peripheral infundibular cementum was of normal appearance. Erosive infundibular cementum was characterized by complete loss of normal structure and contour. Further microbiological investigations (Gram- and Giemsa-staining) revealed microorganisms within food material, which could be found within the dentinal tubules if the infundibular enamel was missing (enamel hypoplasia) or destroyed (erosion).

By means of the obtained results it could be demonstrated that there is an occlusal blood supply and a lateral blood supply in the infundibulum of equine maxillary CT. The additional lateral blood supply can explain the high prevalence of cemental hypoplasia within the mesial

infundibulum. The lateral opening of the mesial infundibulum reaches less far apical compared to the lateral opening of the distal infundibulum. Consequently in mesial infundibula the lateral blood supply is interrupted earlier during tooth eruption compared to distal infundibula. Thus, cemental hypoplasia within the mesial infundibulum caused by an insufficient blood supply of the infundibular cementum develops with a higher prevalence compared to the distal infundibulum. Furthermore rests of haemoglobin remain within the infundibular cementum after disruption of the infundibular blood supply.

As already known, cemental hypoplasia is not a disease; it is an anatomical variation of the infundibular development. But it is a predisposing factor in the development of infundibular diseases. Food material is pressed into the empty rooms of hypoplastic cementum and can cause destructive processes. Furthermore the rests of haemoglobin within the infundibular cementum function as a nutrient medium for microorganisms. Such microorganisms can reach the dentinal tubules by traveling through areas with focal enamel hypoplasia or by destroying the infundibular enamel. Microorganisms within dentinal tubules are able to cause endodontic diseases.

The mechanisms of destroying the infundibular hard tissues are not completely known. Some authors define these pathological conditions as infundibular caries. But caries is caused by acid producing microorganisms. Such microorganisms are not sufficiently known in equine dentistry. Thus, the term erosion appears to be more adequate. Erosion is defined as a reduction of hard tissue without involvement of microorganisms.

In summary the development of infundibular diseases is a multifactorial condition, which is predisposed by cemental hypoplasia and/or rest of haemoglobin within the infundibular cementum. Furthermore this study revealed a macroscopical classification of infundibula (cemental hypoplasia, erosion), which can easily be performed by practitioners. Beside, macroscopically not conspicuous infundibula could be an entrance for microorganisms into the endodontium, due to focal enamel hypoplasia the infundibular enamel might be penetrable for microorganisms.

7 Literaturverzeichnis

Arsuffi, E., 1938. Beiträge zur Kenntnis des Vasodentins. Thesis, University of Zürich.

Asanger, K. 2011. Dokumentation, Befundung und Quantifizierung von Veränderungen an Infundibula equiner Prämolaren und Molaren des Oberkiefers anhand von Mikro-CT-Aufnahmen. Thesis, Department/Clinic for Companion Animals and Horses, Equine University Clinic, University of Veterinary Medicine, Vienna.

Baker, G.J., 1974. Some aspects of equine dental decay, Equine veterinary Journal 6, 127-130.

Baker, G.J., 1979. A Study of Dental Disease in the Horse, PhD Thesis, University of Glasgow.

Baumgärtner, W., Gruber, A.D., 2011. Degeneration, Regeneration, Reparation und Wachstumsstörungen. In: Allgemeine Pathologie für die Tiermedizin, First Ed. Enke Verlag, Stuttgart, Ger, pp. 86-139.

Borkent, D., Dixon, P.M., 2015. Equine peripheral and infundibular dental caries: A review and proposals for their investigation. Equine Veterinary Education, DOI: 10.1111/eve.12497

Boyde, A., 1997. Equine dental tissues: a trilogy of enamel, dentine and cementum. Equine Veterinary Journal 29, 171-172.

Casey, M., 2013. A New Understanding of Oral and Dental Pathology of the Equine Cheek Teeth, Veterinary Clinic of North America: Equine practice 29, 301-324.

Cobourne, M.T., 1999. The Genetic Control of Early Odontogenesis. *British Journal of Orthodontics* 26, 21-28.

Crabill, M.R., Schumacher, J., 1998. Pathophysiology of acquired dental diseases of the horse, *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 14, 291-307.

Dacre, I.T., 2004. A Pathological, histological and ultrastructural study of diseased equine cheek teeth, PhD Thesis. University of Edinburgh.

Dacre, I.T., Kempson, S., Dixon, P.M., 2007. Equine idiopathic cheek teeth fractures. Part 1: Pathological studies on 35 fractured cheek teeth, *Equine Veterinary Journal* 39, 310-318.

Dacre, I.T., Kempson, S., Dixon, P.M., 2008. Pathological studies of cheek teeth apical infections in the horse: 5. Aetiopathological findings in 57 apically infected maxillary cheek teeth and histological and ultrastructural findings, *The Veterinary Journal* 178, 352-363.

Dacre, I.T., 2005. Equine dental pathology. In: Baker, G.J., Easley, J. (Eds.). *Equine Dentistry*, Second Edn. Elsevier Saunders, St. Louis, USA, pp. 91-110.

Dacre, I.T., 2010. Equine dental pathology. In: Easley, J., Dixon, P.M., Schumacher, J. (Eds.). *Equine Dentistry*, Third Edn. Elsevier Saunders, St. Louis, USA, pp. 129-147.

Dixon, P.M., Du Toit, N., 2010. Dental anatomy. In: Easley, J., Dixon, P.M., Schumacher, J. (Eds.). *Equine Dentistry*, Third Edn. Elsevier Saunders, St. Louis, USA, pp. 51-76.

Dixon, P.M., Savill, D., Horbyl, A., Reardon, R.J.M., Liuti, T., 2014. Critical evaluation of ex vivo restoration of carious equine maxillary cheek teeth infundibulae following high-pressure gas and micro-particle abrasion, *The Veterinary Journal* 200, 368-374.

Du Toit, N., Burden, F.A., Kempson, S.A., Dixon, P.M., 2008. Pathological investigation of caries and occlusal pulpar exposure in donkey cheek teeth using computerised axial tomography with histological and ultrastructural examination, *The Veterinary Journal* 178, 387-395.

Fejerskov, O., Kidd, E.A.M., 2003. *Dental caries: the disease and its clinical management*, First Ed. Blackwell Munksgaard, Copenhagen, Denmark. pp. 4-5.

Fitzgibbon, C.M., Du Toit, N., Dixon, P.M., 2010. Anatomical studies of maxillary cheek teeth infundibula in clinically normal horses, *Equine Veterinary Journal* 42, 37-43.

Hoppe, K.A., Stover, S.M., Pascoe, J.R., Amundson, R., 2004. Tooth enamel biomineralization in extant horses: implications for isotopic microsampling, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 206, 355-365.

Johnson, T.J., Porter, C.M., 2006. Infundibular Caries, In: *Focus on Dentistry*, American Association of Equine Practitioners, pp. 101-107.

Jones, S.J., Boyde, A., 1974. Coronal Cementogenesis in the Horse. *Archives of Oral Biology* 19, 605-614.

Kerebel, B., Le Cabellec, M., Daculsi, G., Kerebel, L., 1978. Osteodentine and Vascular Osteodentine of *Anarhichas lupus* (L.). *Cell and Tissue Research* 187, 135-146.

Kilic, S., Dixon, P.M., Kempson, S.A., 1997. A light microscopic and ultrastructural examination of calcified dental tissues of horses: 4. Cement and the amelocemental junction, *Equine Veterinary Journal* 29, 213-219.

Klugh, D.O., 2010. Embryology. In: Klugh, D.O. (Ed.), *Principles of Equine Dentistry*, First Ed. Manson Publishing, London, UK, pp. 49-56.

Lisi, S., Peterková, R., Peterka, M., Vonesch, J.L., Ruch, J.V., Lesot, H., 2003. Tooth Morphogenesis and Pattern of Odontoblast Differentiation. *Connective Tissue Research* 44,167-170.

Lundström, T.S., Dahlén, G.G., Wattle, O.S., 2007. Caries in the infundibulum of the second upper premolar tooth in the horse, *Acta Veterinaria Scandinavica* 49-57.

Manzke, E., Katchburian, E., Faria, F.P., Freymüller, E., 2005. Structural Features of Forming and Developing Blood Capillaries of the Enamel Organ of Rat Molar Tooth Germs Observed by Light and Electron Microscopy. *Journal of Morphology* 265, 335-342.

Marsh, P., Martin, M.V., 1999. Plaque-mediated diseases – dental caries and periodontal diseases. In: *Oral Microbiology*, Fourth Ed. Elsevier Saunders, Oxford, GB, pp. 103-145.

Maslauskas, K., Tulamo, R.M., McGowan, T., Kučinskas, A., 2009. Dental examination findings in two groups of Lithuanian horses with no history of dental prophylaxis or treatment, *Veterinarija Ir Zootechnika* 47, 60-65.

Masset, A., Staszuk, C., Gasse, H., 2006. The blood vessel system in the periodontal ligament of the equine cheek teeth – Part I: The spatial arrangement in layers. *Annals of Anatomy* 188, 529-533.

Miles, A.E., Grigson, C., 1990. *Coyler's variation and diseases of the teeth of animals*, Cambridge University Press, Revised edition, 219-220.

Mitchell, S.R., Kempson, S.A., Dixon, P.M., 2003. Structure of Peripheral Cementum of Normal Equine Cheek Teeth. *Journal of Veterinary Dentistry* 20, 199-208.

Mitsiadis, T.A., Graf, D., 2009. Cell Fate Determination during Tooth Development and Regeneration. *Birth Defects Research* 87, 199-211.

Muller, J., 1926. On the occurrence of Vasculature Enamel-organs. *Proceedings Royal Academy Amsterdam* XXX, 298-307.

Nanci, A., 2013. Development of the Tooth and Its Supporting Tissue. In: *Oral Histology*, Eight Ed. Elsevier, St Louis, USA, pp. 70-94.

Sahara, N., 2014. Development of Coronal Cementum in Hypsodont Horse Cheek Teeth. *The Anatomical Record* 297, 716-730.

Santana, L.N.S., Barbosa, L.V.M., Teixeira, F.B., Costa, A.M.P., Fernandes, L.M.P., Lima, R.R., 2013. Morphology of the Dentin Structure of Sloths *Bradypus tridactylus*: A Light and Scanning Electron Microscopy Investigation. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 42, 410-414.

Schnorr, B., Kressin, M., 2011. Entwicklung der Verdauungsorgane. In: *Embryologie der Haustiere*, Sixth Ed. Enke Verlag, Germany, pp. 161-184.

Schröder, H.E., 1997. Karies und Erosion, In: *Pathobiologie oraler Strukturen*, Third Ed. Karger, Freiburg, Deutschland, pp. 79-100.

Schwerd, W., 1977. Blutfarbstoffnachweis mit der Porphyrinprobe, *Zeitschrift für Rechtsmedizin* 80, 135-138.

Selwitz, R.H., Ismail, A.I., Pitts, N.B., 2007. Dental caries, *The Lancet* 369, 51-59.

Soana, S., Gnudi, G., Bertoni, G., 1999. The Teeth of the Horse: Evolution and Anatomomorphological and Radiographic Study of Their Development in the Foetus. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 28, 273-280.

Staszyk, C., 2011. Anatomie. In: Vogt, C. (Ed.), *Lehrbuch der Zahnheilkunde beim Pferd*, First Ed. Schattauer Verlag, Stuttgart, Germany, pp. 1-30.

Staszyk, C., Suske, A., Pöschke, A., 2015. Dental and periodontal anatomy - a tutorial review, *Equine Veterinary Education* 27, 474-481.

Suske, A., Pöschke, A., Schrock, P, Kirschner, S., Staszuk, C., 2016a. The infundibula of equine maxillary cheek teeth. Part 1: Development, blood supply and infundibular cementogenesis. *The Veterinary Journal* 209, 57-65.

Suske, A., Pöschke, A., Schrock, P, Kirschner, S., Staszuk, C., 2016b. The infundibula of equine maxillary cheek teeth. Part 2: Morphological Variations and Pathological Changes. *The Veterinary Journal* 209, 66-73.

Van den Enden, M.S.D., Dixon, P.M., 2008. Prevalence of occlusal pulpar exposure in 110 equine cheek teeth with apical infections and idiopathic fractures, *The Veterinary Journal* 178, 364-371.

Veraa, S., Voorhout, G., Klein, W.R., 2009. Computed tomography of the upper cheek teeth in horses with infundibular changes and apical infection, *Equine Veterinary Journal* 41, 872-876.

Windley, Z., Weller, R., Tremaine, W.H., Perkins, J.D., 2009a. Two- and three-dimensional computed tomographic anatomy of the enamel, infundibulae and pulp of 126 equine cheek teeth. Part 1: Findings in teeth without macroscopic occlusal or computed tomographic lesions. *Equine Veterinary Journal* 41, 433-440.

Windley, Z., Weller, R., Tremaine, W.H., Perkins, J.D., 2009b. Two- and three-dimensional computed tomographic anatomy of the enamel, infundibulae and pulp of 126 equine cheek teeth. Part 2: Findings in teeth with macroscopic occlusal or computed tomographic lesions, *Equine Veterinary Journal* 41, 441-447.

8. Publikationsverzeichnis

Ergebnisse dieser Dissertation wurden in international anerkannten Fachzeitschriften mit Gutachtersystem (peer review) zur Veröffentlichung angenommen:

- The Veterinary Journal (akzeptiert: 23.07.2015)
Infundibula of equine maxillary cheek teeth. Part 1: development, blood supply and infundibular cementogenesis
A. Suske, A. Pöschke, P. Schrock, S. Kirschner, M. Brockmann, C. Staszuk
DOI: 10.1016/j.tvjl.2015.07.029.
Volume 209, March 2016, Pages 57–65

- The Veterinary Journal (akzeptiert: 27.11.2015)
The infundibulum of equine maxillary cheek teeth. Part 2: Morphological Variations and Pathological Changes
A. Suske, A. Pöschke, P. Müller, S. Wöber, C. Staszuk
DOI: 10.1016/j.tvjl.2015.11.023.
Volume 209, March 2016, Pages 66–73

Teilergebnisse dieser Dissertation wurden im folgenden Übersichtsartikel präsentiert:

- Equine Veterinary Education
Dental and periodontal anatomy - a tutorial review
C. Staszuk, A. Suske, A. Pöschke
DOI: 10.1111/eve.12317
Volume 27, Issue 9, pages 474–481, September 2015

Teilergebnisse dieser Dissertation wurden in folgenden Fachkongressen präsentiert:

- YGVA (Young Generation of Veterinary Anatomists) meeting in Leipzig, 17.-20. Juli 2013
Infundibula of equine cheek teeth: morphological characteristics and involvement in pathogenesis of endodontic diseases
A. Suske, L. Kaiser, C. Staszuk
- IGFP Kongress, Niedernhausen, 15.-16. März 2014
Infundibula - eine Schwachstelle im System
A. Suske, S. Kirschner, C. Staszuk
(ISBN: 978-3-00-045084-6)
- 25th European Congress of Veterinary Dentistry, Dublin, Ireland, 19-22. Mai 2016
Infundibula of equine cheek teeth: odontogenic development and malformations
A. Suske, A. Pöschke, P. Schrock, S. Kirschner, M. Brockmann, C. Staszuk
(ISBN: 978-0-9932920-1-9)

9. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

10 Danksagungen

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. vet. Carsten Staszyk, für die Vergabe des sehr interessanten Themas und die Betreuung während der gesamten Arbeit bedanken.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. M. Brockmann und S. Kirschner aus der Abteilung für Neuroradiologie aus der Medizinische Fakultät Mannheim der Universität von Heidelberg und der Abteilung für diagnostische und interventionelle Neuroradiologie des Universitätskrankenhauses RWTH Aachen, für die Anfertigung der μ CT-Aufnahmen der deciduiden Zähne, für ihre fachliche Unterstützung bei der Entwicklung geeigneter Proben und der Erstellung der Daten.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. A. Wehrend aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Universität Gießen für die Bereitstellung der Fohlenköpfe bedanke.

Ein besonderer Dank gilt auch allen Kollegen, die erkrankte Backenzähne eingesandt haben, sodass wir diese weitergehend histologisch untersuchen konnten.

Vielen Dank auch an das gesamte Team des Instituts für Veterinär -Anatomie, -Histologie und -Embryologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, insbesondere Nadine Baulig, für die freundliche Aufnahme im Kollektiv und die freundliche Arbeitsatmosphäre. Dabei gilt besonderer Dank den Kollegen der Arbeitsgemeinschaft Staszyk, die immer geholfen und durch konstruktive Kritik die Arbeit weiter gefördert haben. Insbesondere möchte ich hierbei Lena Kaiser danke, die im Labor eine sehr große Stütze für mich war und mich in die gesamten Arbeitsschritte eingewiesen hat. Des Weiteren danke ich Stephanie Wöber welche mir weiteres Datenmaterial zur Verfügung gestellt hat.

Mein allergrößter Dank jedoch geht an meine Eltern, ohne deren Hilfe und Beistand das Studium und die Promotion nie möglich gewesen wären, für die Hingabe mit der sie mich unterstützt haben und immer zu mir gehalten haben, egal ob in guten oder in schlechten Zeiten und natürlich auch für die finanzielle Unterstützung, ohne die das Ganze nicht möglich gewesen wäre.

Und nicht zu vergessen, ein herzliches Dankeschön an meine ganze Familie und meine Freunde, die immer für mich da waren und mich bei allen meinen Schritten unterstützt haben.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**